



**INFLUÊNCIA E CUSTOS DE DIFERENTES MEIOS DE
CULTURA PARA PRODUÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*
VISANDO O CONTROLE DE PRAGAS**

ANDRÉ HENRIQUE CAMPELO MOURÃO

LAVRAS – MG

2017

ANDRÉ HENRIQUE CAMPELO MOURÃO

**INFLUÊNCIA E CUSTOS DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA
PRODUÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* VISANDO O CONTROLE DE PRAGAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. FERNANDO HERCOS VALICENTE
ORIENTADOR

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mourao, Andre Henrique Campelo.

Influência e custos de diferentes meios de cultura para
produção de *Bacillus thuringiensis* visando o controle de pragas /
Andre Henrique Campelo Mourao. - 2017.

78 p. : il.

Orientador(a): Fernando Hercos Valicente.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Biopesticida. 3. Pragas agrícolas. I.
Valicente, Fernando Hercos. . II. Título.

ANDRÉ HENRIQUE CAMPELO MOURÃO

**INFLUENCIA E CUSTOS DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PARA
PRODUÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* VISANDO CONTROLE DE PRAGAS**

**INFLUENCE AND COSTS OF DIFFERENT CULTURE MEANS FOR
PRODUCTION OF *Bacillus thuringiensis* FOR THE USE OF PEST CONTROL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de setembro de 2017.

Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana EMBRAPA MILHO E SORGO

Dr. Andréa Almeida Carneiro EMBRAPA MILHO E SORGO

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

*A DEUS, Por me dar força e mostrar sempre o caminho a seguir.
A Santa Tereza dos Andes, por ser minha intercessora e protetora.
Aos meus pais Luiz e Jussara pelo incentivo e apoio desde o início da minha caminhada.
Aos meus irmãos Vitor (in memoriam) e Mateus por estarem sempre ao meu lado.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz e inspiração.

A Embrapa Milho e Sorgo por possibilitar a realização do trabalho, cedendo laboratório e material às pesquisas.

A direção da Helix Sementes, pelo incentivo e por disponibilizar o tempo necessário para execução dos trabalhos do mestrado.

A Universidade Federal Lavras por fornecer conhecimento e pela oportunidade de ingressar na pós-graduação.

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente pela oportunidade, incentivo, por proporcionar momentos descontraídos. Principalmente pelos ensinamentos e lições não só profissionais, mas de vida.

Ao Dr. Ubiraci Lana pela ajuda, ideias e aceitando o convite para participação como membro da banca de avaliação.

A Dra. Andrea Carneiro pela disponibilidade, aceitando o convite para ser membro da banca de avaliação.

Ao Dr. André Xavier e ao Dr. Jean Marcel pela participação como suplentes na banca de avaliação.

Aos técnicos do laboratório de Controle Biológico Osmar (Nate), Celso, Ismael, Jean; aos demais estudantes pelo convívio e auxílio nas tarefas desenvolvidas. A Deborah pela ajuda direta na realização das atividades. E ao Ms. Victor Hugo pelo auxílio, ideias e análises.

Aos meus pais Luiz e Jussara pelo auxílio incondicional e por me proporcionarem mais este momento feliz em minha vida.

Ao meu irmão Mateus por me ajudar a esquecer as dificuldades que passamos e por dar força a meus pais e a mim nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Vitor (*in memoriam*), sei que está olhando por nós. *Aprender a perder nunca saberemos, mas o tempo transforma todos os sentimentos.*

A minha noiva Julie pela paciência, compreensão e palavras de incentivo.

E a todos que de alguma forma me ajudaram e continuam me ajudando.

A todos, muito obrigado.

*“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis,
teriam ficado adormecidas. ”*

Horácio

RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria que possui a capacidade de produzir inclusões cristalinas com ação tóxica a uma gama de insetos. O *Bt* pode ser utilizado para o controle de pragas na forma de biopesticida. O biopesticida é um produto que após o crescimento da bactéria em meio de cultura e formulação pode ser aplicado via pulverização. Alguns parâmetros devem ser seguidos para a produção de um biopesticida efetivo e de qualidade, a composição do meio de cultura e os parâmetros físico-químicos (temperatura, concentração de oxigênio, pH, agitação) são de fundamental importância. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da composição do meio de cultura na produção de biopesticida a base de *Bt* para o controle de pragas agrícolas. Foram utilizados quatro diferentes meios de cultura, Meio de cultura 1 (LB - testemunha): 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl; Meio de cultura 2: 1,49% glicose, 0,92% extrato de levedura, 0,088% MgSO₄; Meio de cultura 3: 1,49% glicose, 0,92% extrato de levedura, 0,09% MgSO₄, 0,02% MnSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,3% KH₂PO₄ e Meio de cultura 4: 1,49% glicose, 0,92% extrato de levedura, 0,09% MgSO₄, 0,02% MnSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,3% KH₂PO₄, 0,025% FeSO₄, 0,023% (NH₄)SO₄, 0,28% K₂HPO₄, 0,008% ZnSO₄. A cepa de *Bt* 1641 foi utilizada para o desenvolvimento dos testes. Os bioensaios foram realizados com lagartas de 1 dia após eclosão de *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Helicoverpa armigera*, *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*. O pH foi medido em intervalos regulares, durante o processo fermentativo, ocorrendo uma variação de 4,60 e 8,75. A maior concentração de esporos foi 8,92x10⁸ esporos/ml obtida no meio 3, após 48 horas de fermentação. A produção de massa celular foi maior no meio de cultura 2, com acumulado de 2,93g/L. A eficiência de 100% de mortalidade foi obtida com o meio de cultura 1 para *S. frugiperda*, *S. eridania*, *C. includens* após 32 horas de fermentação e para *A. gemmatalis*, *S. cosmioides* e *H. armigera* após 08, 56 e 60 horas, respectivamente. O meio de cultura 1 foi o meio mais efetivo para a produção de *Bacillus thuringiensis*.

Palavras chave: *Bacillus thuringiensis*. Biopesticida. Pragas agrícolas.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a bacterium that has the ability to synthesize parasporal crystalline inclusions that shows toxic activity against a wide range of insects. *B. thuringiensis* can be used for pest control in the form of biopesticide. Biopesticide is a formulated product that can be sprayed in the field after the growth of Bt in culture medium. Some parameters should be followed for the production of effective and quality biopesticide product, the composition of the culture medium, and the physicochemical parameters (temperature, oxygen concentration, pH, rpm) are essentials. The purpose of this work was to evaluate the influence of the composition of the components of the culture medium on the Bt production - based biopesticide to control of agricultural pests. Four different media were used. Medium 1 (Luria Bertani-LB - check treatment): 1% tryptone, 0,5% yeast extract, 0,5% NaCl; Medium 2: 1,49% glucose, 0,92% yeast extract, 0,088% MgSO₄; Medium 3: 1,49% glucose, 0,92% yeast extract, 0,09% MgSO₄, 0,02% MnSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,3% KH₂PO₄ and Medium 4: 1,49% glucose, 0,92% yeast extract, 0,09% MgSO₄, 0,02% MnSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,3% KH₂PO₄, 0,025% FeSO₄, 0,023% (NH₄) SO₄, 0,28% K₂HPO₄, 0,008% ZnSO₄. The Bt strain 1641 was used in this research. The bioassays were carried out using 1 day old larvae after hatching of *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides*, *S. eridania*, *Helicoverpa armigera*, *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens*. The pH was measured at regular intervals during the fermentation process, and showed variation among 4.60 and 8.75. The highest spore concentration was $8,92 \times 10^8$ spores/ml obtained in medium 3, after 48 hours of fermentation. Cell mass production was higher in medium 2 and accumulated 2.93 g/L. The efficiency of 100% mortality was obtained with the culture medium 1 for *S. frugiperda*, *S. eridania*, *C. includens* after 32 hours of fermentation and for *A. gemmatalis*, *S. cosmioides* and *H. armigera* after 08, 56 and 60 hours, respectively. Medium 1 was the most efficient medium for the production of *B. thuringiensis* as a biological pesticide..

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Biopesticide. Agricultural pests.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Pragas e perdas na agricultura.....	14
2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2.3	β -exotoxina.....	21
2.4	Aplicações agronômicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.5	Biopesticidas – condições de cultivo.....	23
2.6	Mercado de biopesticida.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Geral.....	26
3.2	Específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Escolha dos nutrientes dos meios de cultura.....	27
4.2	Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizada.....	29
4.3	β -exotoxina.....	29
4.4	Pré-inoculo	30
4.5	Condições de crescimento da bactéria.....	30
4.6	Parâmetros avaliados.....	30
4.6.1	Leitura de pH.....	30
4.6.2	Concentração de esporos.....	30
4.6.3	Densidade ótica.....	31
4.6.4	Massa celular.....	31
4.6.5	Efetividade no controle de lagartas.....	31
4.6.6	Quantificação de macro e micronutriente.....	32
4.6.7	Análise de proteína.....	32
4.6.8	Identificação de genes.....	33
4.7	Análise de custo	33
4.8	Criação de insetos.....	33
4.9	Análises estatísticas.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	Leitura de pH.....	37

5.2	Concentração de esporos	38
5.3	Densidade ótica	40
5.4	Massa celular.....	42
5.5	Efetividade no controle de lagartas.....	44
5.6	Quantificação de macro e micronutrientes	50
5.7	Análise de proteína	53
5.8	Identificação de genes.....	56
5.9	Análise do custo	57
6	CONCLUSÃO.....	60
	ANEXO	61
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados publicados pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) no IX Levantamento sobre a safra 2016/2017 o Brasil teve uma estimativa de área plantada de 60,49 milhões de hectares. Deste total 938,8 mil ha (1,5% da área total) foram utilizados para a produção de caroço e pluma de algodão. A área plantada com milho de primeira e segunda safra totalizou 17,346 milhões de ha (28,67% da área) e a de área para plantio de soja em 33,889 milhões de ha (56,02% da área). Com uma produção estimada em 2,236 milhões toneladas de caroço, 1,488 milhões de toneladas de pluma, 93,836 milhões de toneladas de milho e 113,923 milhões de toneladas de soja. (CONAB, 2017). Com esta área plantada, cultivos sucessivos e manejo inadequado, o surgimento e ressurgimento de pragas é quase que inevitável (METCALF e LUCKMAN, 1994). Insetos das ordens himenópteros, hemípteros, ortópteros, dípteros, coleópteros, isópteros, estão entre os que constantemente atacam as lavouras brasileiras. Contudo, os insetos da ordem Lepidóptera são, na maioria das vezes, os que aparecem com maior frequência e podem causar sérios danos a estas culturas.

O controle de insetos pragas é de fundamental importância para uma produção de qualidade e em quantidade suficiente para suprir a demanda por alimentos e as expectativas de retorno econômico dos produtores. Há vários anos, o principal meio de controle de pragas utilizado pelos agricultores consiste no controle químico (VLAK,1993). Com a abusividade e exclusividade deste controle, muitas vezes facilitado pela comercialização, rápido resultado e facilidade de aplicação, vários problemas ambientais e ecológicos surgiram. Para tentar amenizar os danos causados por esta excessiva aplicação de inseticidas químicos, começou-se a discussão e a implementação do conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) que visa a integração de diversos métodos de manejo para prevenção e controle de pragas. Dentre esses métodos tem-se o Controle Biológico, que consiste na utilização de inimigos naturais e/ou entomopatógenos como vírus, fungos e bactérias para o manejo de pragas (GRAVENA, 1992).

Uma das bactérias mais utilizadas para o controle de pragas é a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) (VALICENTE & ZANASI, 2005). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica ou anaeróbica facultativa

(RASKO et al. 2005) em forma de bastonete, formadora de esporos e que tem a capacidade de produzir, durante a esporulação, inclusões cristalinas altamente específicas, que são responsáveis pela atividade tóxica desta bactéria (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Esporos de *B. thuringiensis* podem ser isolados de diversos ambientes como solo, rizosfera, filoplano, água fresca, poeiras de grãos, insetos, crustáceos, anelídeos e mamíferos insetívoros (VALICENTE e BARRETO, 2003; RAYMOND et al. 2010).

A bactéria *B. thuringiensis* produz inclusões cristalinas (proteínas cry), as quais são tóxicas a diferentes ordens de insetos como: Lepidóptera, Coleóptera, Díptera e ainda nematoides e ácaros (FEITELSON et al. 1992). Tais inclusões são formadas por polipeptídios denominados δ -endotoxinas, que são liberadas junto ao esporo no momento da lise celular (DEAN, 1984; HANNAY & FITZ-JAMES, 1995).

Atualmente existem duas maneiras possíveis de controlar pragas com a utilização de *B. thuringiensis*, na forma de plantas transgênicas ou biopesticidas. As plantas transgênicas após a inserção do gene da bactéria no seu genoma, começam a expressar a proteína Bt tóxica para o inseto. Biopesticida ou pesticida biológico é produzido em indústrias e pode ser aplicado via pulverização sobre as plantas. Em ambas maneiras ocorrerá a morte do inseto após a ingestão da proteína (BODROWSKI et al. 2003).

O método mais utilizado para a produção de um biopesticida a base de *B. thuringiensis* é a fermentação líquida. A produção de um biopesticida deve seguir os principais parâmetros de otimização do processo, oxigenação, agitação, pH, temperatura e os componentes do meio de cultivo (MADIGAN, 2004). Os componentes e suas proporções no meio de cultura são de extrema importância.

Visando a importância da otimização do processo de produção de *B. thuringiensis* e do papel da constituição de um meio de cultura efetivo e barato, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da composição do meio de cultura, na produção de biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*, para o controle de importantes pragas agrícolas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pragas e perdas na agricultura

Grande parte dos pesticidas utilizados no Brasil têm como pragas alvo os lepidópteros dentre eles a *Spodoptera frugiperda* (Lagarta do cartucho) (Figura 01A). Mesmo com a adoção das tecnologias transgênicas para controle de lepidópteros pela maioria dos produtores, esta é uma praga que ainda causa danos a diversas culturas. No Brasil há uma estimativa de perdas econômicas anuais em torno de US\$400 milhões de dólares apenas na cultura do milho. No continente americano há relatos do ataque desta praga em 80 culturas com as perdas podendo chegar a 60% da produtividade.

Segundo Cruz et al. (2007) as lagartas recém eclodidas quando encontram um hospedeiro adequado, começam a alimentar-se dos tecidos verdes, geralmente começando pelas partes aéreas mais suculentas, deixando apenas a epiderme membranosa, provocando o sintoma conhecido como folha raspada. Nesta fase do inseto os biopesticidas a base de *B. thuringiensis* podem atuar no controle da praga.

Pelo fato do pH intestinal de lagartas com até 3 dias ser básico nesta fase o inseto apresenta maior susceptibilidade a ação das toxinas Bt. A ativação da pró-toxina em toxina ativa se dá devido a condições alcalinas no tubo digestivo do inseto (pH acima de 8,0) quando ocorre a quebra da proteína liberando o núcleo ativo (BRAVO et al, 2005). Além do pH alcalino há a necessidade de receptores específicos na parede intestinal do inseto para que ocorra a ação desejada no controle desta praga.

Outras pragas como a *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Helicoverpa armigera*, *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*, tem causado danos a diversas culturas no Brasil. Porém, estudos com inseticidas biológicos para controle destas pragas são recentes.

Spodoptera cosmioides (Figura 01B) além de causar danos no algodoeiro, pode ser observada no Cerrado em soja, feijão, mamona, raramente em milho e mais frequentes em plantas de *Amaranthus sp.*, causando desfolhação completa desta planta daninha (SILVIE, 2013).

Bavaresco et al. (2003) relatam que no ano de 1999, *S. cosmioides* causou severos danos em áreas experimentais de cebola cultivada em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal de Pelotas/RS. São relatados surtos desse inseto com

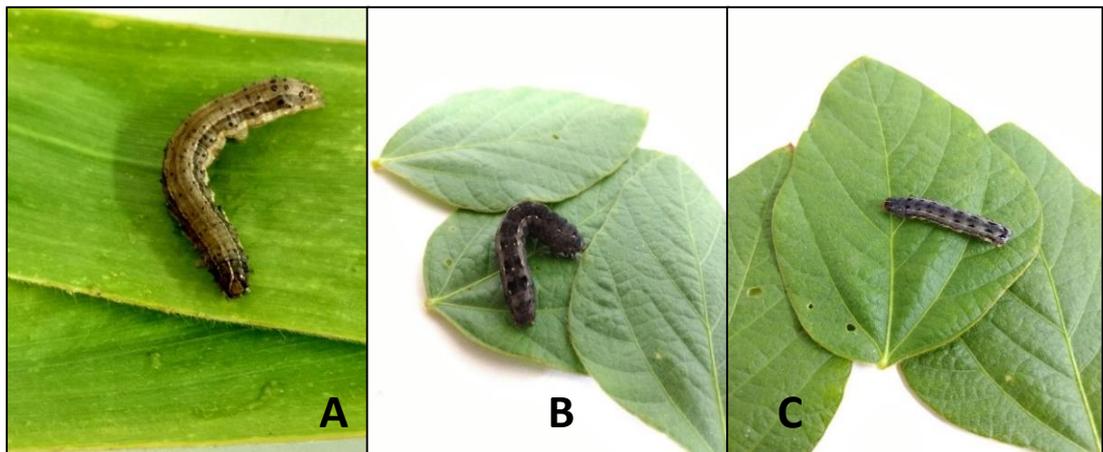
danos elevados nas culturas de macieira no estado de Santa Catarina, chegando à porcentagem de 35,4% de frutos danificados (NORA et al. 1989).

Bueno 2011 e Panizzi 2012, retratam que a lagarta *S. cosmioides* danifica diretamente as partes reprodutivas da planta de soja principalmente as vagens. Quando atacam as folhas o consumo é aproximadamente o dobro do que geralmente é consumido por outras pragas desfolhadas.

Conhecida como lagarta das folhas e/ou lagarta das vagens, a *Spodoptera eridania* (Figura 01C) era considerada uma praga secundária em diversos cultivos, incluindo espécies anuais e perenes. Entretanto, nos últimos anos, a espécie tem sido relatada como praga importante nas culturas do algodão, soja, tomate e frutíferas de clima temperado, com destaque para a macieira (NORA et al. 1989; FONSECA, 2006). A utilização do milho como planta de cobertura após o cultivo de algodão, soja e a presença de plantas daninhas como *Amaranthus spinosus* (caruru) e *Ipomea grandifolia* (corda de viola) favorecem a ocorrência deste inseto.

Tradicionalmente a *S. eridania* não era considerada uma praga relevante. Na safra 2001/2002 foi relatado danos causados nos estados de Sergipe, Alagoas e Bahia. Atualmente é considerada uma das principais pragas das regiões de cultivo do cerrado (JESUS, 2013).

Figura 01- Lagartas do complexo *Spodoptera* com aproximadamente 12 dias de idade.



A - *S. frugiperda* em folha de milho. B - *S. cosmioides* em folha de soja. C - *S. eridania* em folha de soja. Fonte: Do autor, 2017

A divulgação da identificação da *Helicoverpa armigera* (Figura 02) nos cultivos de algodão, soja e milho na Bahia, Mato Grosso, Paraná, Distrito Federal e Goiás tem sido foco de discussão e preocupação. Até então suspeitava-se que a espécie

Helicoverpa spp. ocorrentes no Brasil fosse apenas a *H. zea* como relatada inicialmente em algodoeiros no oeste da Bahia na safra 2011/2012. Nesta região, na safra 2012/2013, houve um prejuízo aproximado de R\$2 bilhões com danos causado por esta praga.

A invasão desta praga no Brasil poderá resultar em profundas mudanças bioecológicas em espécies de mesma família desta praga, por exemplo, promovendo alterações no status de populações e composição genética de *H. zea* e *Heliothis virescens* favorecendo a evolução de resistência.

Figura 02- Lagarta de *Helicoverpa armigera* com 14 dias de idade em folha de milho



Fonte: Do autor, 2017.

A *Anticarsia gemmatalis* (Figura 03) é uma praga que ocorre principalmente na cultura da soja, sendo uma das principais pragas desfolhadoras desta cultura, seu ataque pode ocasionar perdas de 100% das folhas e nervuras das plantas comprometendo toda a produtividade. Alguns autores destacam a voracidade desta praga, trabalhos relatam o consumo de 85 a 150 cm² de área foliar de soja para completar a fase larval (MOSCARDI, 2013).

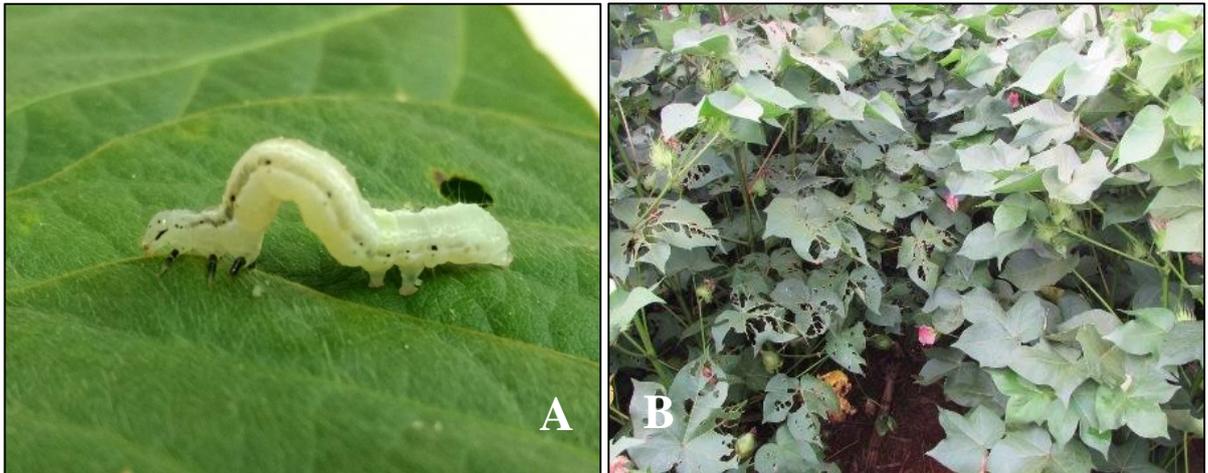
Figura 03- Lagarta *A. gemmatalis* com 12 dias de idade em folha de soja.



Fonte: Do autor, 2017.

Atualmente identificada e classificada como *Chrysodeixis includens*, (Figura 04A) a falsa medideira, ocorria principalmente em áreas de soja próximas a áreas de cultivo do algodoeiro. Esta proximidade favoreceu a migração da mariposa da soja para o algodoeiro, posicionando-a como uma das pragas mais importantes desfolhadoras do algodoeiro. Os sintomas de alimentação das lagartas da falsa medideira são diferenciados de outras desfolhadoras por apresentarem uma característica de iniciarem sua alimentação pelo centro da folha, formando orifícios de formas circulares (Figura 04B). Muitas vezes as desfolhas provocadas pela falsa medideira são iniciadas pelas folhas mais velhas, localizadas no terço inferior das plantas, o que dificulta seu controle.

Figura 04- Lagarta *C. includens* e seus danos característico em algodão.



A - *C. includens* Fonte: Do autor, 2017 B - Dano característico do ataque de *C. includens*.
Fonte: AMPASUL

Não apenas o controle químico, mas o controle biológico e a utilização de táticas de manejo incorporando o MIP (Manejo Integrado de Pragas) são de extremas importância para a obtenção de uma lavoura produtiva e de qualidade.

2.2 *Bacillus thuringiensis*

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria gram positiva, aeróbica ou anaeróbica facultativa que possui formato de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000)

B. thuringiensis foi descrito pela primeira vez por Berliner em 1911, quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Sendo este bacilo nomeado *Bacillus thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha). Porém o primeiro isolamento havia sido feito pelo biólogo S. Ishiwata em 1901. Em 1908 Iwabuchi a denominou como *B. sotto Ishiwata*, por ser o agente causal da “sotto-disease”, que, posteriormente foi considerado inválido, mantendo-se o nome mais recente (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

Segundo Valicente e Barreto (2003) *B. thuringiensis* pode ser isolado de diferentes ambientes tais como solo, palhada, poeira, água, restos vegetais e insetos. Como esse microrganismo não é considerado um entomopatógeno com grande agressividade e nem sempre esporula em insetos, antes ou após a sua morte, dificilmente é encontrado em epizootia natural em insetos, porém alguns trabalhos

relatam este fato. Possíveis locais de reprodução incluem o solo, a rizosfera, o filoplano ou outros tecidos da planta, insetos vivos ou mortos e outros invertebrados (RAYMOND et al. 2010).

Os métodos para isolamento deste patógeno são eficientes e geralmente de fácil execução (SALEH et al. 1969; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985; TRAVERS et al. 1987). Segundo Damgaard (2000) o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo pode variar de 10^2 a 10^4 , enquanto que em plantas, endofílicas, este número pode chegar a 100 UFC.cm².

A busca pelo isolamento de novas cepas de *B. thuringiensis*, contendo diferentes genes ativos é contínua e tem sido uma das grandes metas de pesquisas pois objetiva a descoberta de isolados mais efetivos (CAROZZI et al. 1991) e que possam auxiliar no manejo preventivo de resistência de insetos-alvo às δ -endotoxinas presentes nos atuais transgênicos comerciais e biopesticidas.

O *B. thuringiensis* produz basicamente 3 proteínas tóxicas Cry, VIP, Cyt para uma gama de insetos pragas urbanas e da agricultura. Além das proteínas Cry, Cyt e VIPs (proteínas inseticidas vegetativas) *B. thuringiensis* pode produzir uma série de outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases (HANSEN & SALAMITOU, 2000).

As proteínas Cyt são δ -endotoxinas encontradas principalmente em cepas ativas contra dípteros, denotam uma inclusão proteica parasporal (cristal) que exibe atividade hemolítica e são toxinas de menor peso molecular (25-28 kDa) (CRICKMORE et al. 1998).

As inclusões cristalinas produzidas pelo *B. thuringiensis* (proteínas Cry), as quais são tóxicas a diferentes ordens Lepidóptera, Coleóptera, Díptera e ainda nematoides e ácaros (FEITELSON et al. 1992) são formadas por polipeptídios denominados δ -endotoxina, que são liberados junto ao esporo no momento da lise celular (DEAN, 1984 e HANNAY & FITZ-JAMES, 1995). Estudos mencionam que a ação primária dessa toxina é lisar as células epiteliais do intestino médio do inseto-alvo pela formação de poros na membrana microvilosa apical das células do mesêntero (ARONSON e SHAI, 2001; de MAAGD et al. 2001, BRAVO et al. 2005). As protoxinas inativas ingeridas por lagartas suscetíveis dissolvem-se no meio alcalino do intestino são solubilizadas e clivadas por proteases do intestino médio produzindo proteínas resistentes a proteases de 60-70 kDa (BRAVO et al. 2005). Após a ativação

da proteína, que envolve a remoção proteolítica de um peptídeo N- terminal, a toxina ativada então se liga a receptores de glicoproteínas específicos na borda da membrana das células epiteliais do intestino médio (de MAAGD et al. 2001; BRAVO et al, 2005) antes de ser inserida na membrana.

As proteínas VIPs (Vegetative Insecticidal Proteins) foram descobertas por Estruch (1996). Desde então dois grandes grupos têm sido identificados em *B. thuringiensis*. Um grupo de toxinas VIP consiste de toxinas binárias que são as VIP1 e VIP2 (WARREN, 1997), tendo 100 kDa e 52 kDa, respectivamente. São eficientes para algumas espécies de Coleópteros (ESPINASSE et al. 2003) sendo altamente inseticida para um inseto agronomicamente importante, o crisomelídeo do milho (*Diabrotica virgifera*), mas mostrando baixa atividade inseticida para lepidópteros (HAN et al. 1999).

O segundo grupo consiste nas toxinas VIP3, que não apresentam similaridade de sequência com VIP1 ou VIP2. Por exemplo, a proteína VIP3A consiste de uma proteína de 88,5 kDa ativa contra um amplo espectro de insetos lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea*, alguns dos quais têm baixa suscetibilidade à maioria das δ -endotoxinas (ESTRUCH et al. 1996; YU et al. 1997).

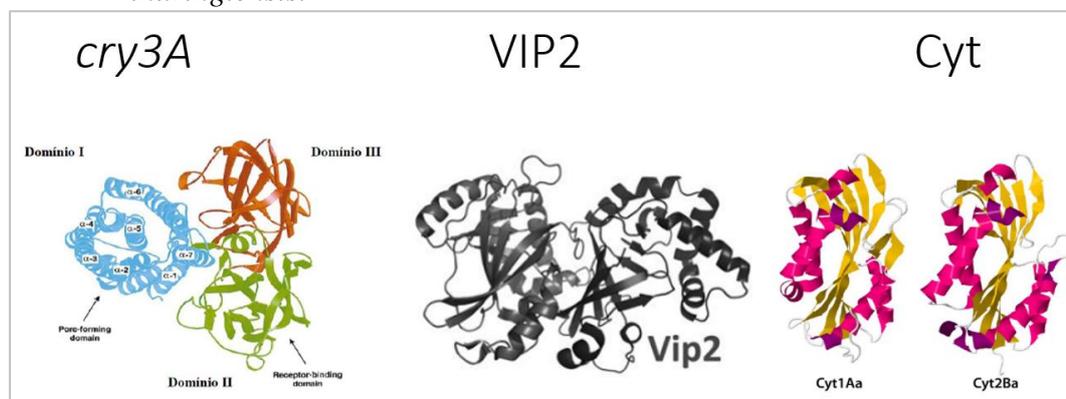
As proteínas VIP e Cry têm ação diferente no intestino do inseto. As proteínas Cry têm sua ação caracterizada principalmente em insetos lepidópteros, que ainda são considerados as principais pragas que atacam as culturas brasileiras. De forma resumida, a ação do *B. thuringiensis* se dá através do consumo de alimento tratado com endotoxinas (ou da planta geneticamente modificada contendo o gene *cry*) e geralmente resulta na parada da alimentação de lagartas de lepidópteros devido a paralisação do intestino. Quando as lagartas se alimentam com altas doses da toxina sofrem uma paralisia geral seguida de morte. Com doses mais baixas ou em insetos menos susceptíveis, o dano às células intestinais é suficiente para parar a secreção normal do intestino, o qual abaixa o pH do lúmen, permitindo a germinação dos esporos, no caso do biopesticida. A eficiência de determinada proteína não está associada apenas ao fato dela ser ou não ativada, mas também há uma associação com os receptores do inseto alvo e o seu grau de solubilização (BRAVO et al. 2005).

As proteínas VIP causam paralisia intestinal, lise osmótica completa das células e conseqüentemente morte do inseto, causados pela formação de poros na

membrana do epitélio do intestino médio. Assim, a ruptura das células do intestino parece ser o principal mecanismo de letalidade das proteínas VIP (YU et al, 1997)

Através da técnica de cristalografia de raios X foi possível determinar a primeira estrutura de proteína Cry (*cry3A*) em 1991, por Li e colaboradores. Posteriormente foi possível realizar também a identificação das estruturas de proteínas Cyt e VIP. Proteínas VIP3 que apresentam características interessantes para o controle de pragas agrícolas, ainda não tiveram sua estrutura tridimensional elucidada (Palma, 2016).

Figura 05- Estrutura tridimensional das proteínas Cry, VIP e Cyt de *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Palma, 2016

A atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* está associada com a síntese destas proteínas que são altamente tóxicas e específicas para insetos de várias ordens e outros invertebrados (HÖFTE & WITELEY, 1989; GLARE & O' CALLANGHAM, 2000).

Os esporos produzidos pelo *B. thuringiensis* também podem contribuir com a patogenicidade através da ação sinérgica realizada juntamente com as δ -endotoxinas (JOHNSON & McGAUGHEY, 1996).

2.3 β -exotoxina

Algumas cepas de *B. thuringiensis* são capazes de produzir β -exotoxina. Por causa da toxicidade da β -exotoxina em mamíferos e insetos não-alvo a OMS (Organização mundial de Saúde) recomenda que produtos comerciais a base de *B. thuringiensis* sejam livres desta toxina (WHO, 1999).

As β -exotoxinas, também denominadas de thuringiensinas, são toxinas não proteicas, termoestáveis, hidrossolúveis, secretadas no meio de cultura durante a fase vegetativa ou início da fase de esporulação (FARKAS et al. 1969; CALBERG et al. 1995). São relatados dois tipos de β -exotoxinas, toxinas do tipo I e tipo II.

A β -exotoxina I age inibindo a atividade da RNA polimerase, é análoga ao ATP, composta por adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 70kDa, interferindo conseqüentemente na síntese de RNA (LECADET, BARJAC, 1981). A β -exotoxina I afeta a muda e pupação dos insetos e em doses sub-letais apresentam efeitos teratogênicos e mutagênicos (IGNOFFO e GREGORY, 1972; LECADDET e BARJAC, 1981) pode ter efeitos contra insetos não alvos como *Apis mellifera* (CANTWELL et al. 1964) e outros invertebrados como ácaros e nematoides, além de ser tóxica também para vertebrados, sendo particularmente ativas contra dípteros, coleópteros e lepidópteros. (BOND et al, 1971).

A β -exotoxina II, é análoga ao UTP e sua toxicidade é maior que a do tipo I, principalmente contra coleópteros (LEVINSON et al. 1990).

Espinasse et al. (2002) relatam a identificação de um locus que abriga dois genes, *berA* e *berB*, como possíveis responsáveis pela codificação necessária para a síntese da β -exotoxina I. Perani et al 1998 relatam que a produção deste metabólico com a presença do gene *cry1B*, apesar de não ter sido estabelecida uma relação estatística, o que também foi relatado por Espinasse et al. (2002), juntamente com a presença do gene VIP2.

Os bioensaios são uma forma rápida e prática para a detecção da presença de β -exotoxina e tem se mostrado como uma forma viável, relativamente simples e que não exigem equipamentos de alta tecnologia. Há também o método de RP-HPLC que é um procedimento relativamente rápido, mas que apresenta alguns inconvenientes, como a possibilidade de obter falsos negativos (HERNÁNDEZ et al. 2001; Pinheiro, 2013).

2.4 Aplicações agronômicas de *Bacillus thuringiensis*

Desde o advento das plantas geneticamente modificadas (GM) houve uma adoção significativa por parte dos produtores à tecnologia. A tecnologia facilita o manejo de plantas infestantes, conhecidas como plantas daninhas, assim como o manejo e aumento da eficiência no controle de insetos praga na lavoura (BERNARDI et al. 2011).

Para o controle de pragas, utilizando as plantas geneticamente modificadas, plantas como algodão, milho, soja, dentre outras, tem um ou mais genes de *B. thuringiensis* inseridos em seu DNA através de técnicas moleculares. Estas plantas durante o seu ciclo ou em período específico do ciclo, expressam a toxina Bt, que quando ingerida pelo inseto ocasiona sua morte. Atualmente todas as culturas comercialmente disponíveis que expressam toxina, codificam a expressão de genes *cry*, *VIP* ou ambos. Dentro de um conceito de manejo integrado de pragas (MIP) a utilização de plantas Bt pode ser considerada uma tática adicional ao controle de pragas (BERNARDI et al. 2011).

B. thuringiensis também pode ser aplicado via pulverização através dos formulados de biopesticida. O biopesticida é um produto industrializado que tem como base o *B. thuringiensis* (ingrediente ativo) e os inertes que servem como estabilizantes.

O meio de cultura, meio de cultivo ou meio de crescimento serve como fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano. Após o processo de fermentação e crescimento da bactéria ocorre o processo de formulação, que proporcionará um aumento na concentração do princípio ativo em determinado volume, visando principalmente proporcionar maior estabilidade e vida de prateleira ao produto, assim como aumento da persistência no campo de esporos viáveis e proteína.

2.5 Biopesticidas – condições de cultivo

Segundo Moraes et al. (2000) alguns fatores são de fundamental importância para a produção eficiente do biopesticida à base de *B. thuringiensis*. O meio de cultura a ser utilizado, seleção da cepa, processo fermentativo e suas variáveis, estocagem, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto e análise de qualidade são primordiais.

O meio de cultura corresponde a solução nutritiva (líquida, sólida ou semi-sólida) utilizada para realizar o crescimento bacteriano em laboratório ou indústria. Este meio deve fornecer condições nutricionais básicas para um desenvolvimento ótimo das bactérias.

Como citado, o meio de cultura e o processo fermentativo são de fundamental importância para a qualidade final do produto. O processo de produção de *B. thuringiensis* ocorre geralmente por fermentação submersa (líquida) descontínua, também conhecida como processo em bateladas (ANGELO et al, 2010). O processo de

batelada consiste na realização da inoculação do meio de cultura, período de crescimento da bactéria e ao final todo o fermentado é retirado de uma vez. Não ocorre adição ou remoção significativa do meio fermentado durante o processo. Todo o processo ocorre dentro de um fermentador que propicia condições ideais de temperatura, agitação e oxigenação para o crescimento bacteriano.

A temperatura ótima para o crescimento e produção das proteínas Cry é em torno de 30 °C. Temperaturas acima deste valor podem diminuir o rendimento da produção devido a supressão da formação de proteína Cry e desnaturação do material celular. Temperaturas baixas podem desacelerar o ciclo de multiplicação celular (COUCH et al, 2000) e reações metabólicas, o que pode acarretar aumento no tempo de crescimento e maior custo de produção.

A agitação além de proporcionar uma melhor homogeneização de crescimento e distribuição dos nutrientes, está relacionada também com a aeração do meio de cultura. O oxigênio atua na recepção final da cadeia transportadora de elétrons de organismos aeróbicos e é um fator crítico para a biossíntese das proteínas Cry (ANGELO et al, 2010) além de participar na oxidação de açúcares para a obtenção de carbono.

O pH (potencial de hidrogênio) é outro fator importante para o processo de produção. Os valores de pH em torno da neutralidade (7-7,5) são os mais adequados para a absorção de nutrientes e desenvolvimento da maioria das bactérias, o que também ocorre com o *B. thuringiensis*. As reações químicas em sistemas vivos, são extremamente sensíveis a mudança na acidez ou alcalinidade do meio. Se a concentração de ácido (H⁺) ou base (OH⁻) é muito alta ou muito baixa as enzimas mudam sua conformação, perdem atividade e não promovem de maneira eficiente as reações químicas dentro da célula.

A manutenção do pH durante o processo fermentativo é possível pela adição de ácido/base ou com a utilização de solução tampão. Porém há controvérsias quanto a utilização deste método, alguns estudos apontam que as variações de pH podem proporcionar melhorias na produção, enquanto outros sugerem desvantagens (IÇGEN; ÖZCENGİZ, 2002).

Os nutrientes utilizados para a formulação do meio de cultura também são de essencial importância. As fontes a serem utilizadas na elaboração dos meios devem ser conhecidas e suas quantidades devem ser equilibradas. Para *B. thuringiensis* os macronutrientes exigidos pela bactéria são o carbono presente na maioria das substâncias que compõem as células e o nitrogênio componente de proteínas e ácidos

nucleicos, ambos fonte energética. Os micronutrientes são exigidos em menor quantidade (Mn, Mg, Fe, Zn, dentre outros) e geralmente atuam como cofatores de algumas enzimas.

Para a otimização da metodologia de produção de biopesticidas busca-se constantemente um meio de cultura eficiente, que propicie os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, tenha baixo custo de produção e seja de fácil preparo.

Após o processo de produção, a formulação e análise da qualidade são os próximos passos antes da comercialização deste produto.

2.6 Mercado de biopesticida

O plantio da soja convencional é ainda o maior consumidor de biopesticida a base de *B. thuringiensis*, porém o aumento do plantio da soja transgênica *Bt*, acarretou a diminuição no uso do biopesticida. Por outro lado, houve um aumento de 18% na comercialização de produtos à base de vírus, fungos, além de parasitoides e predadores. Há uma grande expectativa no retorno do crescimento do mercado de biopesticida à base de *B. thuringiensis* tanto pelo plantio de milho não transgênico para alimentação humana, quanto pelo apelo social e ambiental visando a diminuição de resíduos e impactos ambientais gerados pela utilização dos produtos químicos.

Há uma expectativa de o valor global de pesticidas chegar a US\$81,13 bilhões em 2020 com os pesticidas biológicos podendo ter uma participação de 12,38% e valores atingindo um patamar de US\$10,05 bilhões.

Atualmente, no mercado brasileiro, há 14 produtos à base de *B. thuringiensis* registrados para comercialização descritos no site do Agrofit/MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). O relatório do MAPA de fevereiro de 2015 mostra que foram utilizados no Brasil 1,1 milhão de toneladas de produtos à base de *B. thuringiensis*, sendo 22,13% de produção nacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a influência e custo da composição do meio de cultura na produção de biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* para o controle de pragas agrícolas.

3.2 Específicos:

- Correlacionar os parâmetros físico/químicos durante o processo de fermentação.
- Selecionar o meio de cultura mais eficiente para o controle de *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Chrysodeixis includens*, *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera*.
- Correlacionar o perfil proteico com genes identificados.
- Avaliar o consumo de macro e micronutrientes totais pela bactéria durante processo fermentativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha dos nutrientes dos meios de cultura

A determinação dos nutrientes utilizados na elaboração dos meios de cultura foi feita após busca pelos principais meios de cultura utilizados em trabalhos anteriores com *B. thuringiensis* (Anexo I).

As fontes de macronutrientes e micronutrientes utilizadas para a produção de quatro diferentes meios são relatadas nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 01 – Macro nutrientes mais utilizados em meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

MÉDIA DE PESO (g/L)	NUTRIENTE	% DE CITAÇÃO DO NUTRIENTE NOS MEIOS DE CULTURA
14,86	Glucose	55
9,15	Extrato de levedura	50
3,00	Peptona	20
18,33	Melaço	15
28,33	Farelo soja	15
10,67	Caldo nutriente	15
30,67	Infusão de milho	15
11,50	Dextrose	10
51,50	Amido de milho	10
10,00	Proflo (Traders Protein)	10
4,00	Extrato de carne	5
6,40	Sacarose	5
2,00	Peptona de soja	5
19,50	Caseína	5
30,00	Extrato de soja	5
10,00	Carne de porco em pó	5
4,00	Levedura hidrolisada	5
10,00	Extrato de batata	5

Tabela 02 – Micronutrientes mais utilizados em meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

MEDIA DE PESO (g/L)	MICRONUTRIENTES	% DE CITAÇÃO DO NUTRIENTE NOS MEIOS DE CULTURA
0,88	MgSO ₄	90
0,18	MnSO ₄	70
0,28	CaCl ₂	55
2,97	KH ₂ PO ₄	50
0,25	FeSO ₄	45
2,26	(NH ₄) ₂ SO ₄	40
2,76	K ₂ HPO ₄	40
0,08	ZnSO ₄	30
4,00	CaCO ₃	15
5,00	NaCl	10
5,50	Ácido casamino	10
0,04	CuSO ₄	10
1,20	KCl	10
6,00	Tampão Fosfato	5
7,00	H ₃ PO ₄	5
1,50	Na(NH ₄)PO ₄	5
0,02	FeCl ₂	5
2,00	Polipeptona	5
1,00	Ca(NO ₃) ₂	5
1,00	MnCl ₂	5
0,02	Fe ₂ (SO ₄) ₃	5

Após análise das tabelas foram definidos três meios de culturas para realização dos testes e 1 meio de cultura padrão. O meio de cultura 1, meio de cultura padrão utilizado foi o LB (Lúria Bertani). O meio de cultura 2 contendo apenas as principais fontes de carbono, nitrogênio e o micronutriente mais citado nos trabalhos anteriores.

Para elaboração do meio de cultura 3, foi utilizado um ponto de corte de 50%, ou seja, foram utilizados os reagentes (macro e micronutrientes) que aparecerem em pelo menos 50% dos meios de culturas catalogados. Para o meio de cultura 4, foi utilizado um ponto de corte de 25%, ou seja, foram utilizados reagentes (macro e micronutrientes) que aparecerem em pelo menos 25% dos meios de culturas catalogados.

Segue composição dos meios de culturas utilizados:

Meio de cultura 01 Padrão (LB): 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl.

Meio de cultura 02 (macro e micronutrientes mais comuns): 1,49% glicose, 0,92% extrato de levedura, 0,088% MgSO₄.

Meio de cultura 03 (ponto de corte 50%): 1,49% glicose, 0,92% extrato de levedura, 0,09% MgSO₄, 0,02% MnSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,3% KH₂PO₄.

Meio de cultura 04 (ponto de corte 25%): 1,49% glicose, 0,92% extrato de levedura, 0,09% MgSO₄, 0,02% MnSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,3% KH₂PO₄, 0,025% FeSO₄, 0,023% (NH₄)SO₄, 0,28% K₂HPO₄, 0,008% ZnSO₄.

Para a fermentação foram preparados 3,750 litros de cada meio de cultura, divididos em 3 repetições. Todos os meios de cultura tiveram os pH inicialmente ajustados para 7,5 e posteriormente esterilizados em autoclave, a 121°C por 20 minutos.

4.2 Cepa de *Bacillus thuringiensis* utilizada

Foi utilizada a cepa 1641, pertencente ao banco de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Controle Biológico/CNPMS indicam ser uma cepa promissora para a produção de biopesticida e eficiente no combate a diversas pragas.

4.3 β -Exotoxina

Como descrito anteriormente a OMS recomenda que produtos comerciais a base de *B. thuringiensis* sejam livres de β -exotoxina. Então faz-se necessária uma análise para detecção desta.

Pinheiro 2013, descreve uma metodologia para identificação de β -exotoxina.

No trabalho realizado por Pinheiro 2013 é citada a utilização da cepa 1641 para averiguação da presença ou ausência de β -exotoxina. Após os testes e análises não foi detectada a presença desta toxina. Sendo esta uma cepa adequada para utilização na produção de biopesticida.

4.4 Pré inoculo

Uma alíquota de 10 μ L da cultura bacteriana foi estriada em placa de petri contendo meio LB + sais (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,3% MgSO₄, 0,01% MnSO₄, 0,01% ZnSO₄, 0,01% FeSO₄) sólido. As placas foram mantidas por 16 horas a 28°C. Após este período a massa de célula foi raspada e adicionada à 250 ml de meio LB líquido. O pré inoculo líquido ficou sob agitação constante (200RPM) por 16 horas a 28°C em shaker.

Após o crescimento foi realizada visualização em microscopia de contraste de fase e contagem de células/mL. Foi utilizado um volume de 5% v/v do pré inoculo ao meio de cultura a ser testado na concentração de 1×10^8 esporos/mL.

4.5 Condições de crescimento da bactéria

O pré inoculo foi adicionado ao meio de cultura previamente esterilizado. Para o crescimento da bactéria foram utilizados 3 erlenmeyer de 2 litros contendo 1,250 ml para cada repetição, totalizando 3,750 litros por meio de cultura. Temperatura de 28°C, sob agitação constante (200 RPM), sem controle de pH.

4.6 Parâmetros avaliados

Para realização das análises as amostras foram coletadas em intervalos regulares de 2 horas, até 60 horas. Sendo realizados os seguintes testes:

4.6.1 Leitura de pH

Em todas as amostras coletadas foram realizadas leituras de pH em pHmetro de bancada devidamente calibrado.

4.6.2 Concentração de esporos

Em todas as amostras coletadas foram realizadas contagem de esporos para determinação da concentração de esporos/ml. A contagem foi realizada em microscopia de contraste de fase, aumento de 40x, com auxílio da câmara de Neubauer.

4.6.3 Densidade ótica

Em todas as amostras coletadas foram realizadas leitura de densidade ótica a 600nm, em espectrofotômetro.

4.6.4 Massa celular

Nas amostras coletadas com 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 e 60 horas após o início da fermentação foi realizada a quantificação da massa celular. Para esta análise foram coletados 100 mL do fermentado (meio de cultura + células bacterianas) e após centrifugação a 10000g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet liofilizado e utilizado para o cálculo da massa celular, a qual foi expressa em g/L.

4.6.5 Efetividade no controle de lagartas

Nas amostras coletadas com 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 e 60 horas após o início da fermentação foi realizado o teste de mortalidade contra lagartas de um dia de idade de *S. frugiperda*, *H. armigera*, *S. cosmioides*, *S. eridania*, *A. gemmatalis* e *C. includens*.

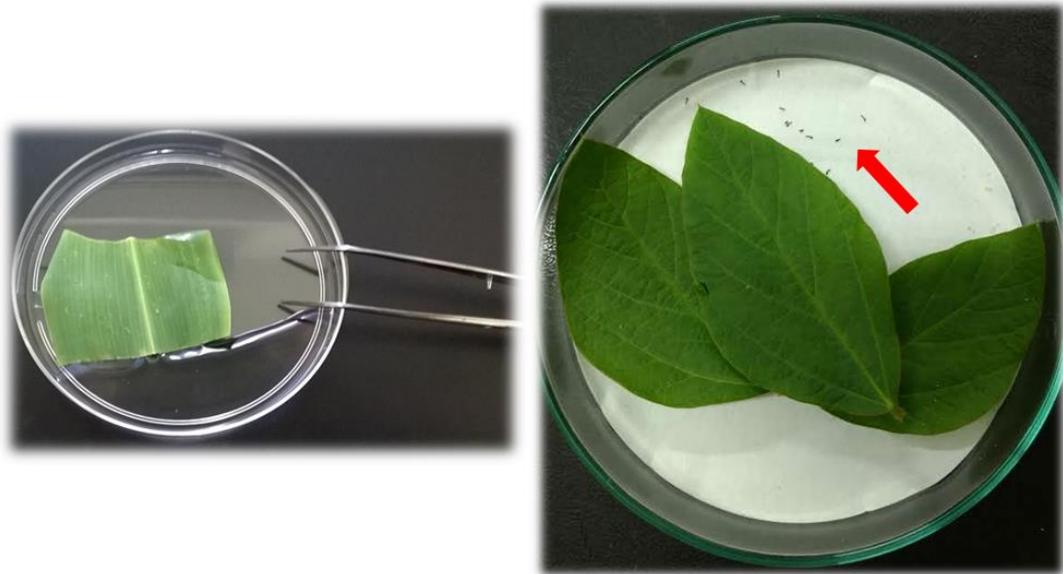
Para *S. frugiperda* e *H. armigera*, pedaços de folhas de milho foram lavadas em água deionizada corrente, depois foram secas, cortadas, imersas no material fermentado e oferecidas às lagartas provenientes de criação artificial. A folha de milho e as lagartas foram colocadas em placas de petri vedadas para evitar fuga. Para evitar o ressecamento das folhas, foi depositado no fundo da placa de petri uma solução de ágar a 3% previamente autoclavada, sendo disposta por cima do ágar uma folha de papel filtro com mesmo diâmetro da placa de petri.

Foram realizadas seis repetições com 15 lagartas cada. As lagartas ficaram expostas a folha de milho inoculadas com o *B. thuringiensis* a 28°C, UR 50%, por 96 horas, quando foi realizada a avaliação da mortalidade.

Para lagartas de *S. cosmioides*, *S. eridania*, *A. gemmatalis* e *C. includens* foi adotado o mesmo procedimento, porém com folhas de soja.

Em todos os tratamentos foi utilizada testemunha, com a mesma quantidade de insetos e repetições, porém as folhas foram imersas apenas no meio de cultura.

Figura 06- Montagem de bioensaio e lagartas mortas com sintomatologia características de infecção por *B. thuringiensis*.



Esquerda: Imersão de folha de milho em água. Mesma metodologia utilizada para a inoculação da solução contendo *B. thuringiensis*. Direita: Placa de petri contendo o papel filtro, folhas de soja e lagartas (seta) utilizada para o bioensaio. Fonte: Do autor (2017).

4.6.6 Quantificação de macro e micronutriente

Para averiguação do consumo dos nutrientes pela bactéria amostras foram coletadas e enviada para análise. Todas as amostras foram previamente centrifugadas a 5.000 RPM por 10 min e filtradas em filtro PPT-O, 22 μm , com o intuito de remover a massa de célula do meio a ser analisado.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análise Foliar/ CNPMS para realização das análises de micronutrientes e a quantificação de macronutrientes foi realizada no Laboratório de Química dos Solos/CNPMS. Para a análise de micronutrientes foi utilizada a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP/OES). Para quantificação de carbono foi utilizado o método de titulação após oxirredução por via úmida, adaptado de Walkley-Balck.

Como parâmetro de comparação, logo após a esterilização do meio, antes do início do processo fermentativo, foi coletada uma amostra e analisada.

4.6.7 Análise de proteína

A extração de proteína total foi feita de acordo com Valicente e Lana (2008).

Posteriormente foi realizada quantificação de proteínas pela metodologia de Bradford, com leitura realizada no equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH) utilizando o software Omega - Control (BMG LABTECH) em microplaca “SBS standard 96”. Para análise dos resultados, foi utilizado o software Omega Data Analysis (BMG LABTECH).

Para quantificação foi realizada uma curva padrão com a utilização de albumina de soro bovina (BSA) nas concentrações de 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,5; 0,3; 0,1 e 0 mg/mL.

4.6.8 Identificação de genes

O conhecimento dos genes inseticidas presentes em uma cepa de *B. thuringiensis* é de suma importância. Através da análise das sequências pode-se ter uma melhor interpretação da análise das proteínas produzidas durante o processo de fermentação.

Após análise de diversos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, para detecção de genes na cepa 1641, foi possível observar uma relação genes cry e VIP presentes.

Para detecção foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se primers específicos (dados não publicados) para detecção dos genes.

4.7 Analise de custos de produção

O custo de produção de um biopesticida envolve vários fatores, como gasto com equipamentos para fermentação, equipamentos e/ou reagentes para formulação, mão de obra capacitada, aquisição ou pesquisa de uma cepa de *B. thuringiensis* eficiente para determinado inseto-praga alvo, gastos com energia, construção de galpão para abrigo do maquinário, além dos reagentes necessários para a elaboração do meio de cultura para o crescimento da bactéria, dentre outros.

O objetivo desta etapa, foi a realização de uma análise de custos apenas dos reagentes necessários para a produção de um meio de cultura com boas condições para produção de um biopesticida. Foi realizada uma busca em empresas que comercializam os reagentes e o cálculo final extrapolado para uma fermentação de 1.000 litros.

4.8 Criação de insetos

Para se realizar os testes de eficiências da cepa de *B. thuringiensis* crescida em diferentes meios de cultura, se faz necessário inicialmente a manutenção da criação dos insetos em laboratório.

Para a criação destes insetos, é de fundamental importância o preparo de dietas artificiais que supram as necessidades nutricionais destes. Abaixo, nas tabelas 03 e 04, segue a lista dos ingredientes necessários para formulação da dieta e após, o modo de preparo. Para a criação de *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania* foi utilizada a tabela de ingredientes 03. Na tabela 04, segue a listagem dos ingredientes para formulação de dieta para criação de *H. armigera*, *A. gemmatalis*, *C. includens*.

Tabela 03- Ingredientes para o preparo de dieta artificial de *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*

Ingredientes sólidos (g)	
Feijão (carioca)	333,00
Germe de trigo	158,40
Levedura de cerveja	101,40
Ácido sórbico	10,20
Ácido ascórbico	3,30
Metilparahidroxibenzoato (Nipagin®)	6,30
Ágar	40,00
Ingredientes líquidos (ml)	
Solução inibidora	8,30
Formaldeído	8,30
Água	2800,00

(Volume de 3,7L de dieta para um recipiente de alumínio com dimensões 27,5 x 39cm x 3,5 cm. Quantidade para alimentar 600 insetos.)

* Solução inibidora de fungos: Ácido Propiônico 41,8 %, Ácido Fosfórico 4,2 % e Água 54 %.

Preparo: O feijão foi cozido em pressão por 20 a 25 minutos. O ágar pesado separadamente dos demais ingredientes e cozido em 1000 ml de água em micro-ondas por aproximadamente 8 minutos. Após cozimento, o feijão foi batido junto ao ágar por 4 minutos em liquidificador industrial. Após adicionou-se os demais ingredientes sólidos e 1800 ml de água. Após 4 minutos adicionou-se os ingredientes líquidos e bateu por mais 2 minutos

A dieta foi vertida em bandeja de alumínio previamente desinfetada. Após solidificação total a dieta foi cortada e armazenada em geladeira.

Tabela 04- Ingredientes para o preparo de dieta artificial de *H. armigera*, *A. gemmatalis* e *C. includens*.

Ingredientes sólidos (g)	
Feijão branco	206,00
Germe de Trigo	164,00
Farelo de Soja	103,00
Leite em pó	62,00
Levedura de Cerveja	25,70
Ácido Ascórbico	9,80
Ácido Sórbico	5,00
Metilparahidroxibenzoato (Nipagin®)	11,00
Tetraciclina	0,40
Ágar	35,00
Ingredientes líquidos (mL)	
Solução Vitamínica	16,00
Formaldeído	10,00
Inibidor de Fungos*	5,00
Água	2400,00

(Volume de dieta para um recipiente de alumínio com dimensões 27,5 x 39cm x 3,5 cm, volume 3,7 L. Quantidade para alimentar 600 insetos.)

* Solução inibidora de fungos: Ácido Propiônico 41,8 %, Ácido Fosfórico 4,2 % e Água 54 %.

Preparo: Para o preparo desta dieta, seguir a metodologia de preparo da dieta anterior.

Para a criação de insetos, as lagartas recém-eclodidas foram repicadas em uma quantidade de aproximadamente 100 indivíduos em copo plástico de 50,0 mL contendo dieta artificial. Os copos foram fechados com tampas de acrílico e colocados em suportes de isopor com furos apropriados. As lagartas ficaram nestes recipientes durante uma semana até a individualização, que também é feita em copo plástico de 50 mL.

A individualização e transferência para copos fazem-se necessárias em razão do alto canibalismo de algumas espécies. Outras, apesar de não canibais, a individualização se faz necessária para evitar a contaminação por fungos, devido ao excesso de fezes.

Após esta etapa, as lagartas foram mantidas no recipiente até fase de pupa e posterior emergência dos adultos. Após emergência, os adultos foram retirados e colocados nas gaiolas contendo folhas de papel, onde ocorre a oviposição. A temperatura da sala de criação, durante todos os instares/fases dos insetos, 25°C (\pm 2 °C).

O ciclo dos insetos em laboratório foi completado em aproximadamente 35 dias, variando ente 30 e 40, dependendo da espécie e da temperatura da sala de criação.

4.9 Análises estatísticas

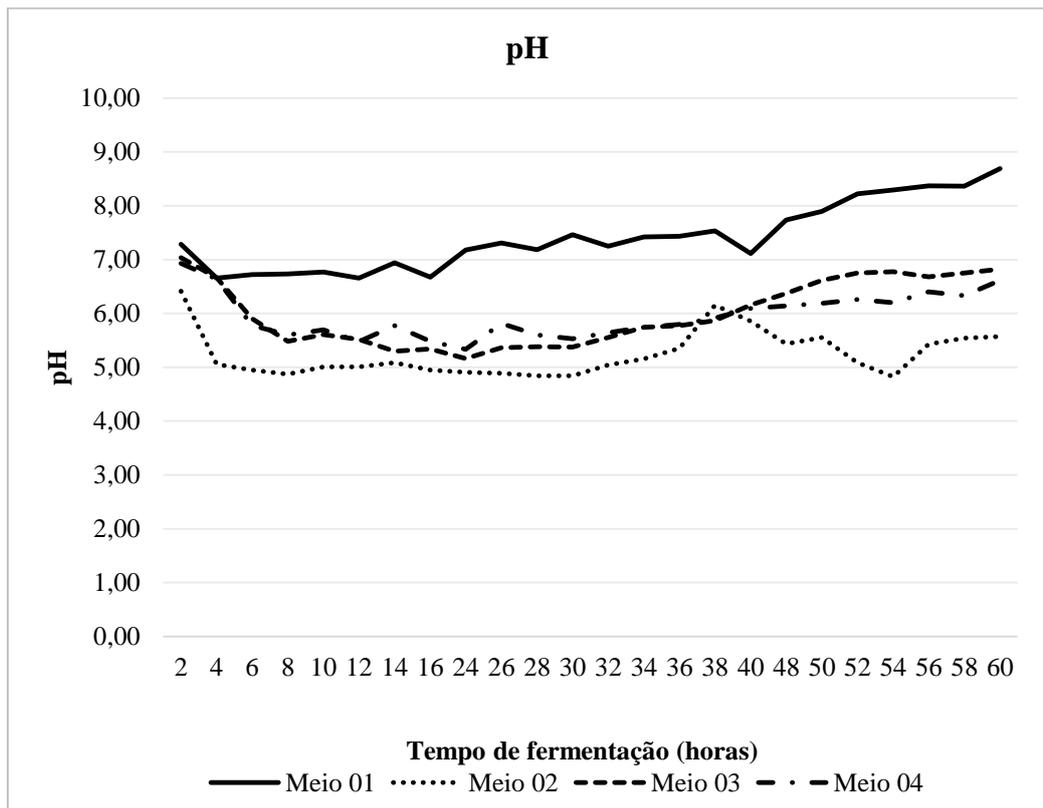
O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) dispostos em fatorial com três repetições. Os fatores foram os diferentes meios cultivados nos diferentes tempos. Os resultados foram analisados utilizando o *software* estatístico *R* (SILVA & AZEVEDO, 2016). Visto que os dados podem ou não demonstrar distribuições conforme o modelo normal, foi necessário realizar a transformação dos mesmos utilizando a fórmula $(\log X + 1)$, de forma a contornar eventuais pressupostos de não normalidade. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Quando os pressupostos de normalidade não foram conseguidos com a transformação foram realizadas análises de modelos mistos generalizados (GLM) e as médias comparadas por contraste de modelos par a par.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Leitura de pH

É possível observar na Figura 07 que na comparação entre os 4 meios de cultura, após 8 horas de fermentação, ocorre um declínio no pH, sendo que para os meios de cultura 3 e 4 este declínio continua até as 12 horas de fermentação. Após este período há uma tendência de o pH aumentar novamente, tendendo-se a neutralidade. Após 40 horas o pH tem um aumento de leitura tornando-se levemente básico, exceto para o meio de cultura 2.

Figura 07- pH de 4 meios de cultura usados para crescimento de *Bacillus thuringiensis* ao longo do tempo de cultivo.



O meio de cultura 1 teve uma variação de pH entre 6,37 e 8,75, nos tempos de 16 e 60 horas de fermentação, respectivamente. O meio de cultura 2 teve o pH mínimo de 4,60 com 30 horas de fermentação e máximo de 6,64 com 60 horas. Os meios de cultura 3 e 4 tiveram uma variação de 5,09 a 6,95 e de 5,2 a 6,80 respectivamente nos tempos de 24 e 60 horas de fermentação.

Alguns trabalhos sugerem que o pH durante o processo fermentativo seja mantido com a adição de ácido ou base, quando necessário ou com a adição de uma solução tampão no início da fermentação. İçgen et al 2002, relatam que a faixa ideal para crescimento durante a produção do *B. thuringiensis* é de 5,5 a 6,5 e que esta faixa de pH não alterou a produção de proteínas. Smith 1982 relatou que a tamponização do meio de cultura para manutenção do pH entre 5,7 e 8,1 não interfere na produção de proteínas e que a variação do pH entre 6,5 e 8,0 não afeta significativamente a produção de proteínas.

Saksinchai et al 2001 relatam que nas primeiras 10 horas de fermentação houve uma queda no pH em diferentes meios analisados para 5,5, tendo como partida pH 7,2. Após este período tem-se um leve aumento no pH e em seguida estabilização.

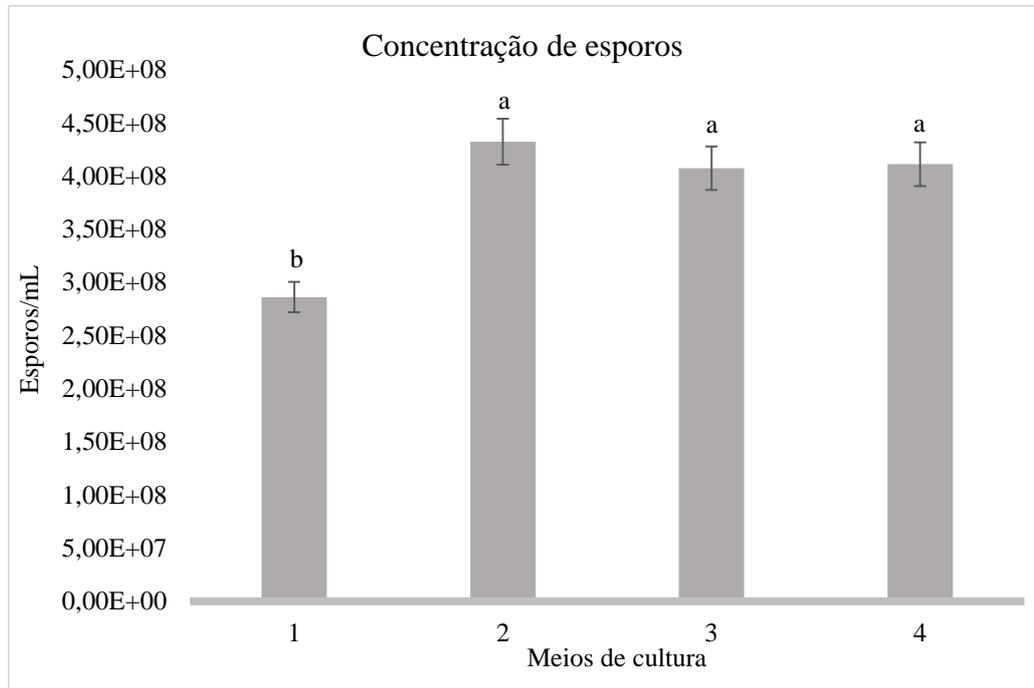
Resultados obtidos por Valicente e Mourão 2008, Morris et al 1996 e Surampalli et al 2002 corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. No geral, nas primeiras horas de fermentação ocorre uma queda no pH e após ocorre um leve aumento tendendo-se a basicidade.

Hanson et al 1963 e İçgen et al 2002 descrevem que a queda brusca de pH nas primeiras horas de fermentação se deve a liberação de ácido acético e ácidos orgânicos proveniente do crescimento do *B. thuringiensis* porem em seguida, devido ao consumo destes pelo *B. thuringiensis* ocorre o aumento do pH.

5.2 Concentração de esporos

Na avaliação da concentração de esporos/ml, foi possível observar que os meios de cultura 2, 3 e 4 são significativamente superiores ao meio de cultura 1, como observado na Figura 08.

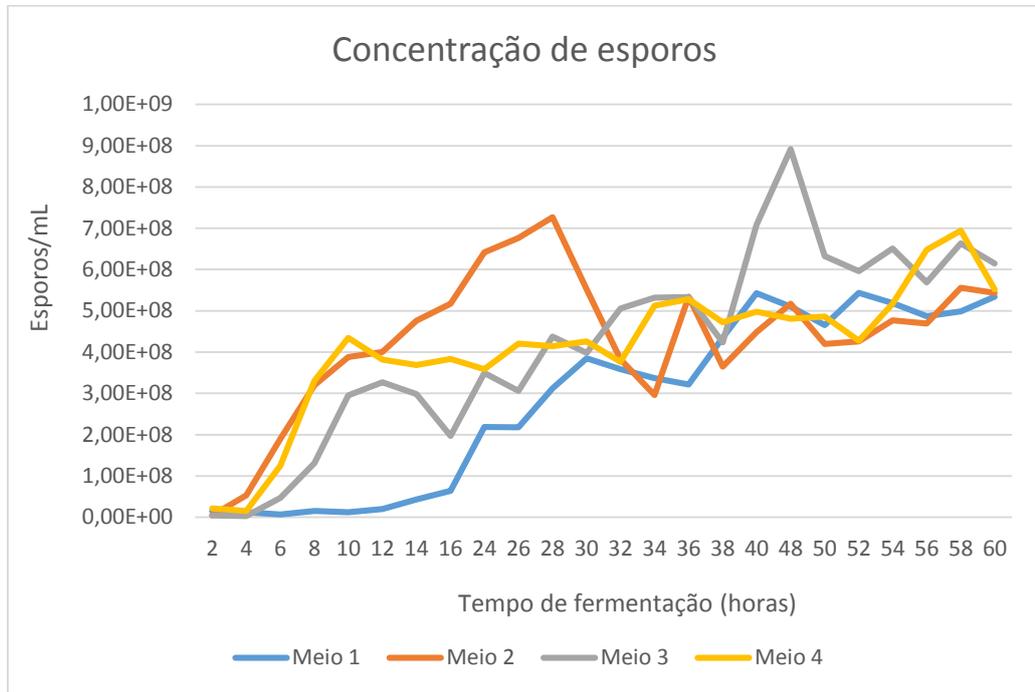
Figura 08- Médias de concentração de esporos/ml para 4 meios de cultura utilizados para crescimento de *Bacillus thuringiensis* durante 60 horas de fermentação.



Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Após 48 de fermentação foi possível observar a maior concentração de $8,92 \times 10^8$ esporos/mL no meio de cultura 3 em comparação aos demais meios. No meio de cultura 2 foi observado com 28 horas de fermentação $7,27 \times 10^8$ esporos/mL e no meio de cultura 4, com 58 horas de fermentação $6,94 \times 10^8$ esporos/mL. O meio de cultura 1 apresentou o seu maior pico de produção de esporos $5,43 \times 10^8$ esporos/mL, após 52 horas de fermentação, como observado na Figura 09.

Figura 09- Concentração de esporos/mL dos 4 meios de culturas usados para crescimento de *Bacillus thuringiensis* ao longo do tempo de cultivo.



Salama et al 1981, em testes com diferentes meios de cultura, relatam que a adição dos micronutrientes CaCO_3 , 0,2%; MgSO_4 , O, 0,03%; MnSO_4 , H, O, 0,002%; FeSO_4 , 0,002% e ZnSO_4 , 0,002% na composição dos meios de cultura, elevou a concentração média final de $2,1 \times 10^8$ esporos/mL para $4,9 \times 10^8$ esporos/mL, após crescimento entre 3 e 4 dias. Estes dados corroboram com os resultados encontrados em que os meios de cultura que tiveram adição de todos ou parte destes micronutrientes houve aumento médio de duas vezes na concentração de esporos/mL após 60 horas de fermentação.

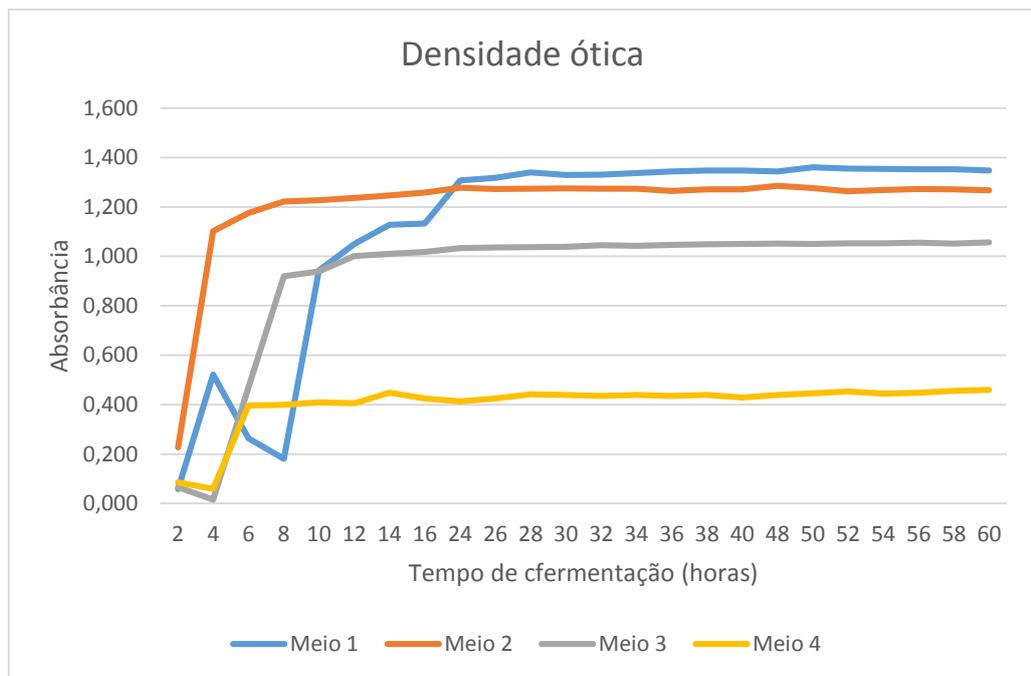
5.3 Densidade ótica

A densidade ótica é um indicativo do crescimento bacteriano. Na Figura 10 é possível observar que no início do processo fermentativo as leituras de densidade ótica são inferiores, o que indica um menor crescimento, com uma tendência de crescimento de leitura no decorrer do tempo. Após 24 horas de crescimento as leituras de absorvância tendem a se estabilizar tornando-se estatisticamente iguais para todos os meios, exceto

para o meio de cultura 4 que tem um crescimento acentuado nas primeiras 6 horas de fermentação e após este período é possível observar uma estabilização.

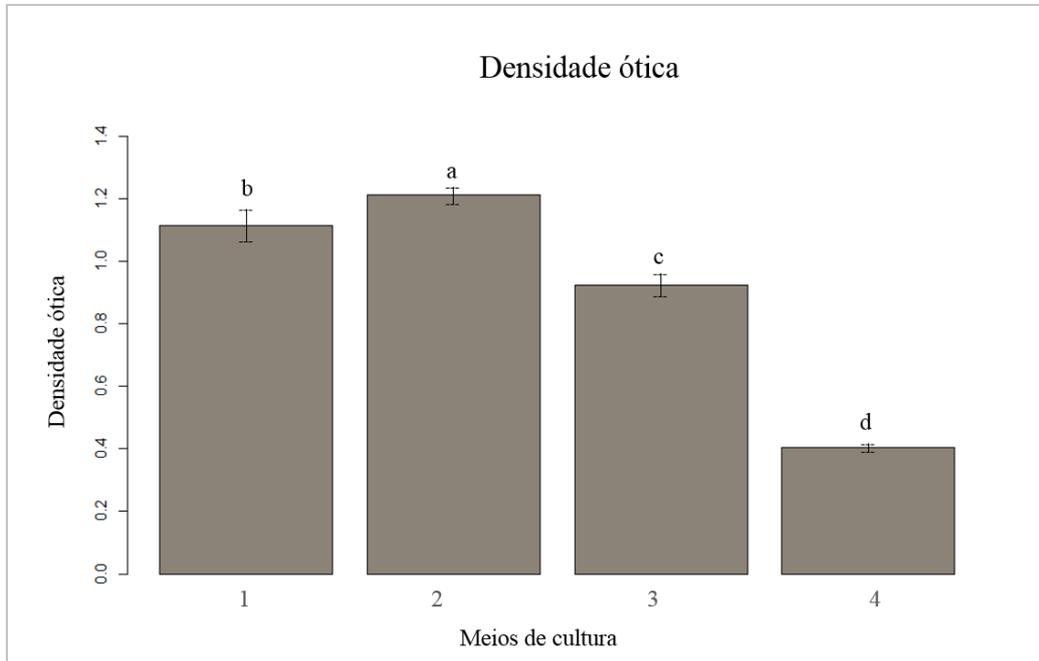
Resultados encontrados por Içgen et al 2002 em testes com diferentes fontes de carbono e nitrogênio sugerem uma tendência comum a todos os meios testados, onde ocorre um crescimento acentuado na leitura de densidade ótica, ou seja, aumento na absorbância, nas primeiras 6 horas de crescimento, após este período é observada uma estabilização. O que também é relatado por Pootathi e Kumar 2003 no qual é observado um crescimento linear nas primeiras 18 horas de cultivo ocorrendo a estabilização de leitura após este período.

Figura 10- Densidade ótica dos 4 meios de culturas usados para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



A maior leitura, 1,374 foi observada no meio de cultura 1 após 50 horas de crescimento. No meio de cultura 2 foi observada uma absorbância 1,301, após 58 horas. Para os meios 3 e 4 a maior absorbância foi detectada após 60 horas de crescimento com 1,067 e 0,497 respectivamente. Porém de maneira geral, como observado na Figura 11, o meio de cultura 2 apresentou maiores leituras de absorbância, sendo estatisticamente superior aos demais.

Figura 11- Médias de densidade ótica a 600nm, para os 4 diferentes meios de cultura utilizados para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



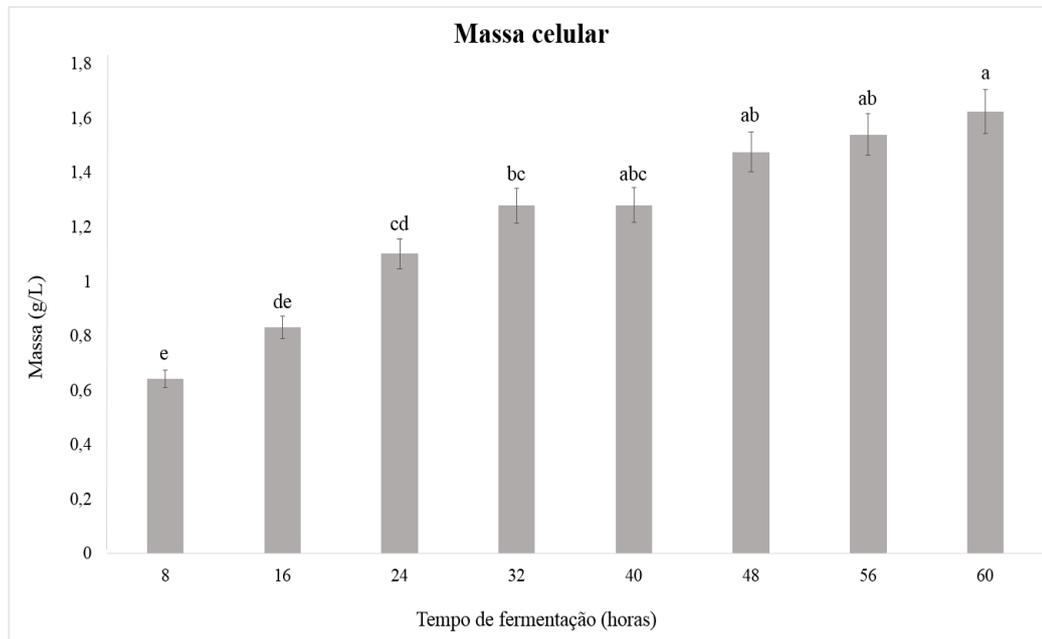
Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Içgen et al 2002 estudaram a interferência dos micronutrientes Cu, Zn, Ca, Mn e Mg na produção de proteínas, medidas indiretamente pelos valores de densidade ótica. Como resultado parcial do experimento, observaram que a leitura da densidade ótica não foi influenciada pela adição destes nutrientes o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

5.4 Massa celular

A Figura 12 mostra uma tendência de crescimento para a massa celular com o passar do tempo de fermentação, sendo que após 60 horas de crescimento observa-se uma maior massa celular, o que também é apresentado por Joua et al 1997 e Angelo et al 2002.

Figura 12- Médias da massa celular nos diferentes tempos de fermentação de *Bacillus thuringiensis*.

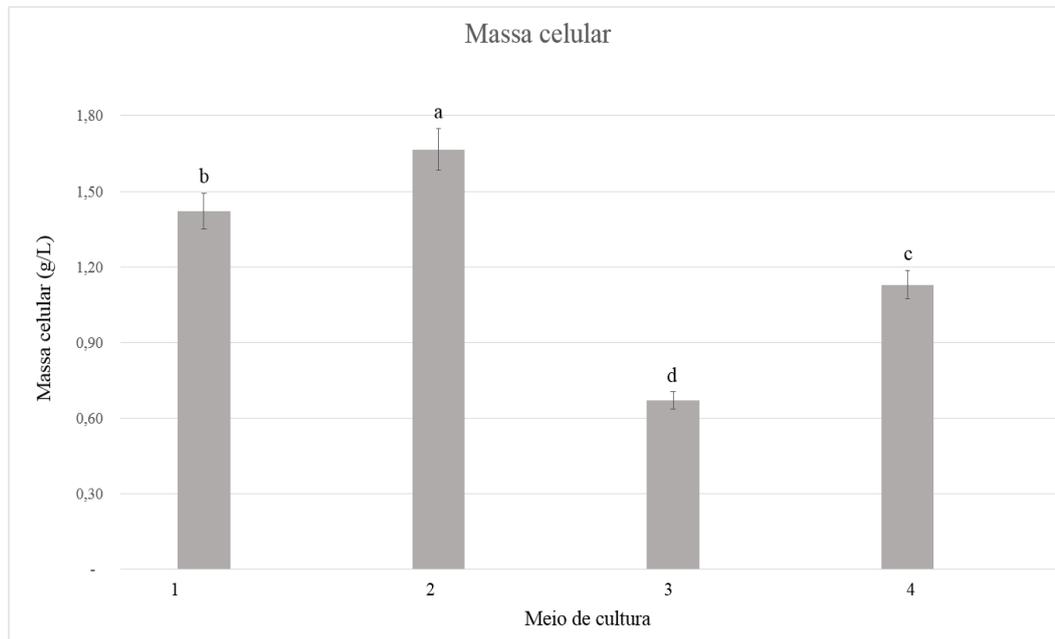


Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Valicente e Mourão 2008 relatam uma flutuação na quantidade de massa celular ao longo do tempo de cultivo, não sendo possível observar um padrão de crescimento. Joua et al 1997 e Angelo et 2002 mostram resultados que com o passar do tempo de fermentação, a tendência é de aumento na produção de massa celular.

Angelo et al 2012 descrevem que o incremento em 10 vezes dos sais $MgSO_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $MnSO_4$, $CaCl_2$ e $(NH_4)_2SO_4$ levou a um aumento na produção de massa celular, elevando a produção de 1,7 g/L para 2,7 g/L na produção total de massa, independente das variações das quantidades das fontes de carbono e nitrogênio. O que contradiz o resultado encontrado neste trabalho em que o incremento do micronutrientes afetou negativamente a produção da massa celular, como mostrado na Figura 13.

Figura 13- Médias da massa celular dos quatros meios de cultura utilizados para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O meio de cultura 2 apresentou a maior massa celular observada após 60 horas de fermentação, massa de 1,67 g/L, diferenciando estatisticamente dos outros meios. O meio 1 apresentou massa celular de 1,42 g/L após 32 horas de fermentação. Os meios de cultura 3 e 4 apresentaram após 60 horas de fermentação, massa celular de 0,67 g/L e 1,13 g/L, respectivamente.

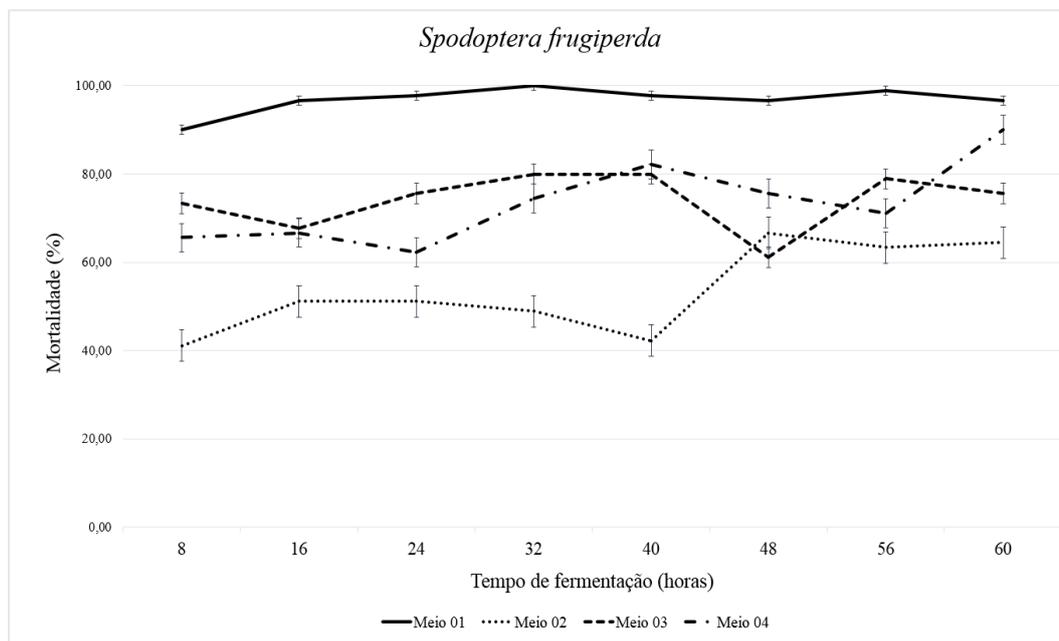
5.5 Efetividade no controle de lagartas

A efetividade contra as pragas-alvo deste estudo é um dos principais parâmetros a ser avaliado. Foi possível observar uma correlação entre a concentração de esporos/mL e a efetividade contra lagartas. De modo geral, é possível observar uma correlação positiva, na qual, com o passar do tempo de fermentação, aumenta-se a concentração de esporos/mL e a efetividade contra as lagartas.

➤ *Spodoptera frugiperda*

Em teste realizado com *S. frugiperda* é possível observar que o meio de cultura 1 apresenta maior eficiência, independentemente do tempo de crescimento, sendo estatisticamente superior aos demais. Porém após 60 horas de fermentação o meio de cultura 4, apresenta uma mortalidade acima de 90% para esta praga, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14- Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* utilizando diferentes meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



A eficiência de 100% foi obtida com a utilização do meio de cultura 1, após 32 horas de fermentação. O meio de cultura 2 apresentou eficiência de 66,67%, após 48 horas e o meio de cultura 3 após 32 horas de crescimento foi possível observar 80% de eficiência.

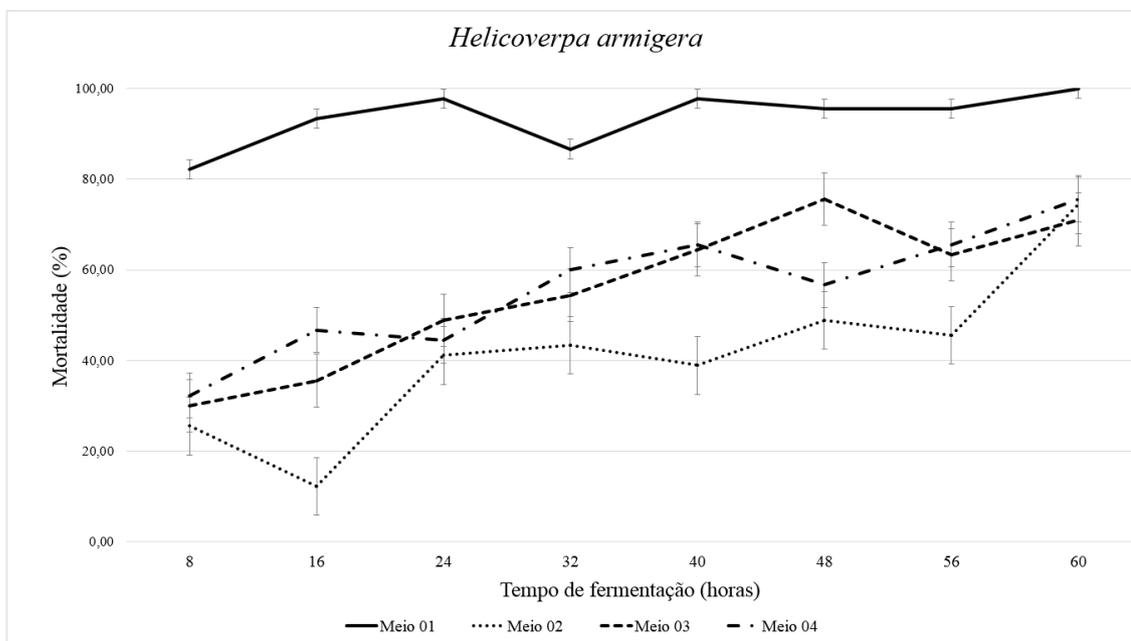
Diversos trabalhos relatam a eficiência de *B. thuringiensis* contra larvas de *S. frugiperda* (VALICENTE e BARRETO, 2003; SILVA et al, 2004; VALICENTE et al, 2010; SUMERFORD e SOLOMON, 2000; ASHFAQ et al, 2001). Valicente e Fonseca 2004, relatam que *B. thuringiensis* var. *tolworthi* (isolado T09) causou mortalidade de 95,8% em *S. frugiperda*. Hernandez 1988 relata mortalidade de 100% em teste realizado com duas concentrações diferentes de *B. thuringiensis*. Estes dados corroboram com os dados encontrados, para os meios de culturas 3 e 4, quanto a eficiência de *B.*

thuringiensis contra larvas de *S. frugiperda*, os quais apresentaram eficiência superior a 90%.

➤ *Helicoverpa armigera*

A fermentação utilizando o meio de cultura 1 mostra-se a mais promissora para a utilização visando o controle de *H. armigera*, mostrando-se estatisticamente superior e com eficiência de 100% de mortalidade após 60 horas de fermentação. Os demais meios de cultura, apesar de apresentarem um aumento na mortalidade de *H. armigera* com o passar do tempo de fermentação, foi possível observar uma mortalidade máxima de 75,56%, com a utilização do meio de cultura 4, após 60 horas de fermentação. Trabalhos que testam a eficiência de *B. thuringiensis* contra *H. armigera* são recentes. Barbosa 2017 relata que em teste com 50 diferentes cepas, uma mostrou alta eficiência (95,60%) contra larvas de *H. armigera*.

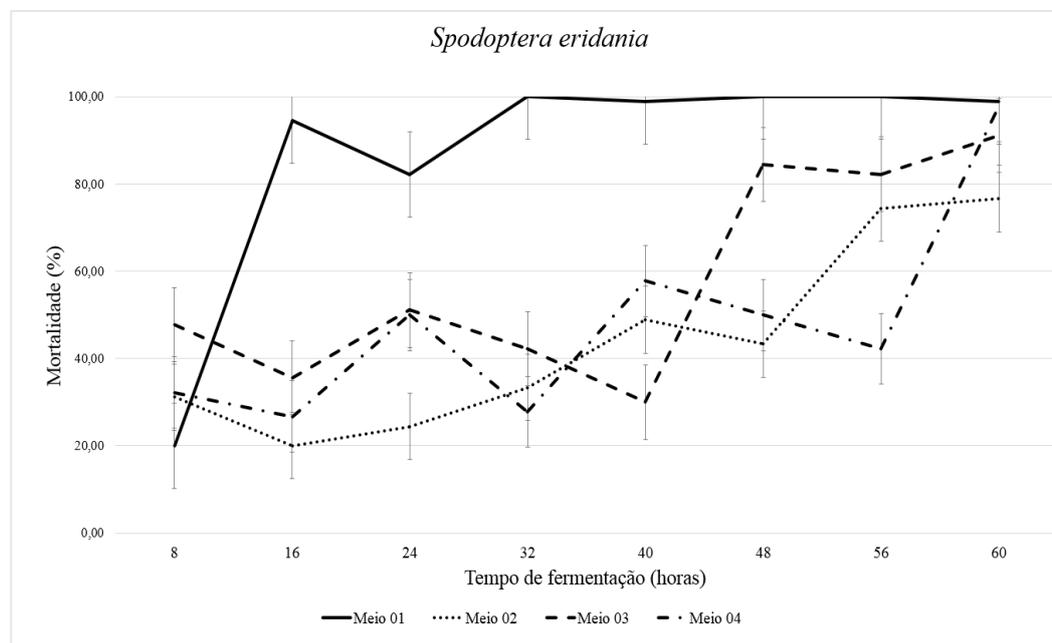
Figura 15- Mortalidade de *Helicoverpa armigera* utilizando diferentes meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



➤ *Spodoptera eridanea*

A fermentação utilizando o meio de cultura 1 mostrou a maior eficiência para o controle de *S. eridanea*. Após 32 horas de fermentação foi possível observar uma elevada taxa de mortalidade, acima de 98,89%, que se manteve com até 60 horas. Este meio mostra-se superior também estatisticamente aos demais.

Figura 16- Mortalidade de *Spodoptera eridanea* utilizando diferentes meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

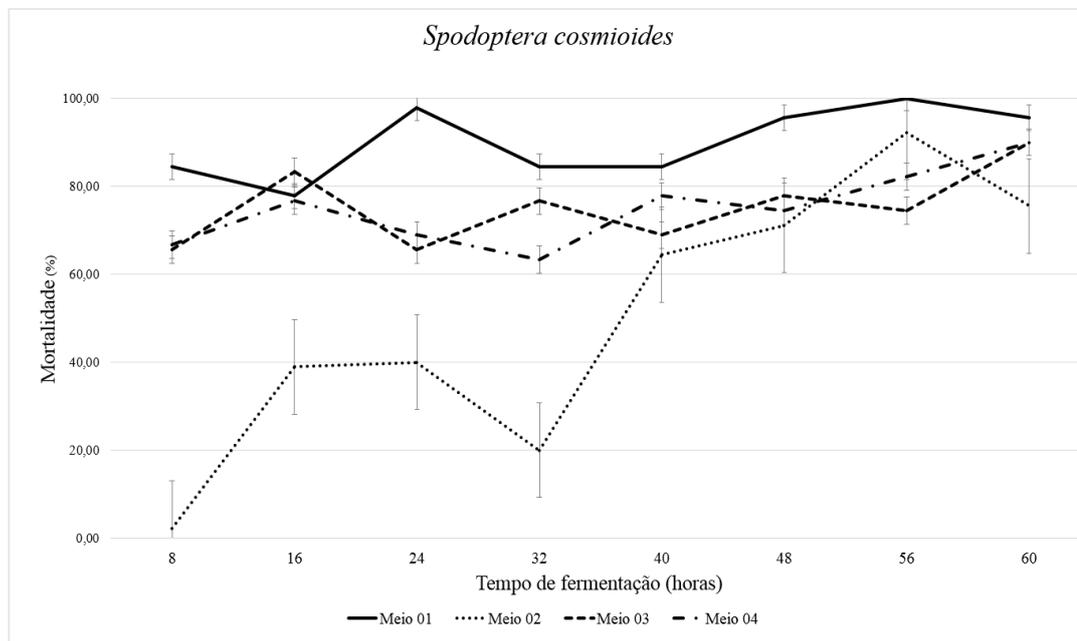


Após 60 horas de crescimento foi possível observar elevadas mortalidades com a utilização dos meios 3 e 4, chegando a 91,11% e 97,78% de eficiência, respectivamente. Com a utilização do meio de cultura 2 a maior mortalidade obtida, 60 horas de crescimento, chegou a 76,67% de eficiência para o controle desta praga.

➤ *Spodoptera cosmioides*

Como é possível observar na Figura 17 o meio de cultura 1 mostra-se superior quando comparado aos demais. Com 24 horas de crescimento é observada uma eficiência de 97,78%. Após, há um decréscimo na eficiência deste meio de cultura, contudo após 48 horas até o final do processo fermentativo é observada uma eficiência superior a 95,56%.

Figura 17- Mortalidade de *Spodoptera cosmioides* utilizando diferentes meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



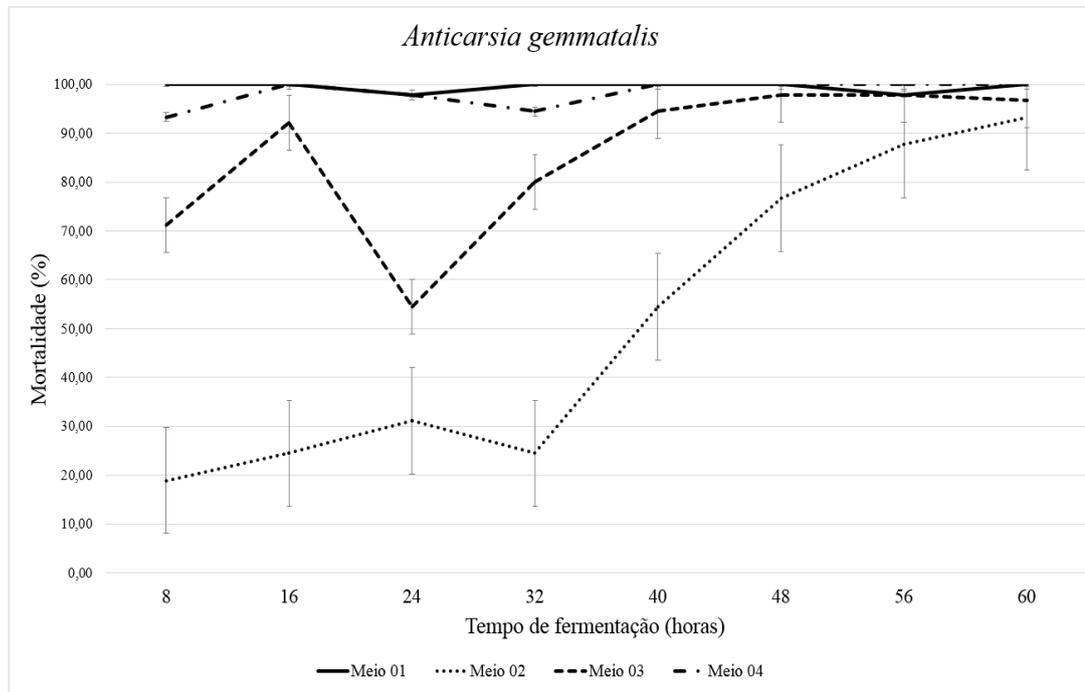
Quanto a eficiência dos meios de cultura para o controle de *S. cosmioides*, ocorre certa variação ao longo do período de crescimento. No meio de cultura 2 foi observada maior eficiência de controle com 56 horas de crescimento, 92,22%. Com a utilização dos meios de cultura 3 e 4 foi observada uma eficiência de 90%, após 60 horas de crescimento.

➤ *Anticarsia gemmatalis*

A fermentação utilizando os meios de cultura 1 e 4 mostraram-se promissores para o controle de *A. gemmatalis*, sendo estatisticamente iguais, alcançando mortalidades superiores a 93,33% durante todo o período de cultivo.

Contudo, após 56 horas de fermentação todos os meios de cultura testados apresentam eficiência para o controle de *A. gemmatalis* acima de 87,78%.

Figura 18- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* utilizando diferentes meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

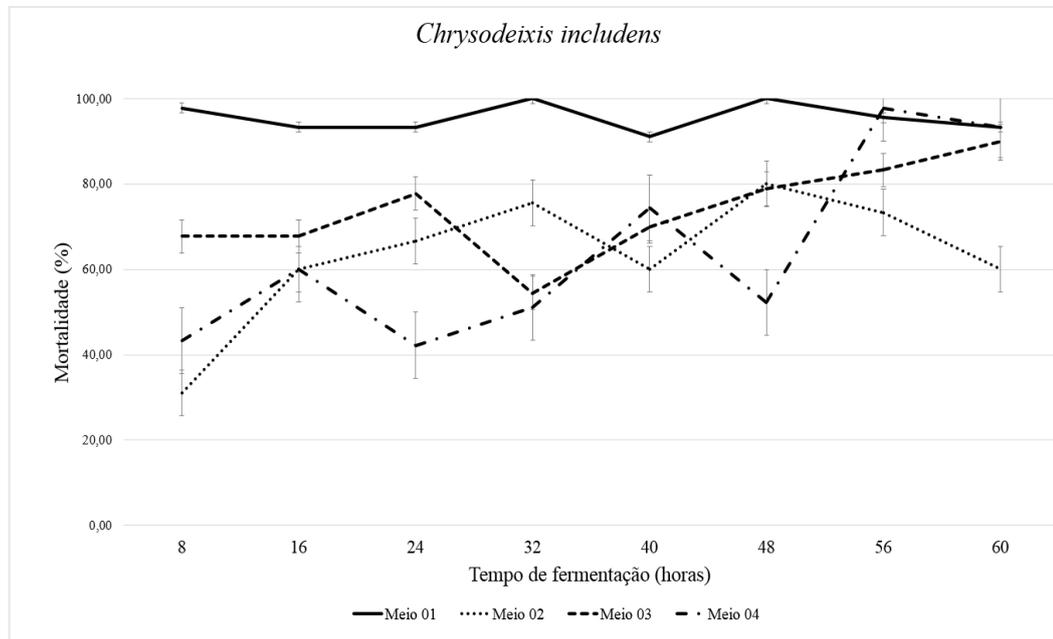


➤ *Chrysodeixis includens*

A fermentação utilizando o meio de cultura 1 mostra-se superior aos demais meios quanto a eficiência de controle de *C. includens*. Durante todo o processo fermentativo é possível observar mortalidade superiores a 91,11%.

Após 60 horas de fermentação os meios de cultura 3 e 4, apresentam eficiência superior a 90%, igualando-se ao meio de cultura 1. O meio de cultura 2 apresenta maior eficiência após 48 horas de fermentação, com eficiência de 80%.

Figura 19- Mortalidade de *Chrysodeixis includens* utilizando diferentes meios de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.



5.6 Quantificação de macro e micronutriente

Na análise realizada para comparação entre os diferentes tempos de fermentação, não houve diferença estatística para a quantificação de carbono nas amostras. O que não corrobora com os resultados encontrados em outros trabalhos, os quais relatam o consumo de carbono ao longo do tempo de fermentação

O meio de cultura 1 obteve maior concentração inicial de carbono, 1,947 mg/ml, dentre os meios testados, sendo estatisticamente superior aos demais meios de cultura.

Farrera et al. 1998 e Rosa et al. 1990 relatam que o consumo de carbono é constante ao longo do crescimento de *B. thuringiensis*. Contudo como podemos observar na Tabela 5, não foi possível observar esta tendência de consumo de carbono ao longo do tempo de fermentação.

Tabela 05- Concentração de carbono (mg/mL) em quatro diferentes meios de cultura utilizados para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

Tempo de fermentação	Concentração de Carbono (mg/mL)			
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
0 horas	1,947 a	1,463 a	1,557 a	1,533 a
30 horas	2,676 a	1,197 a	0,980 a	1,167 a
60 horas	2,550 a	1,217 a	2,170 a	1,380 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Farrera et al 1998 testaram diferentes relações C:N para produção de *B. thuringiensis* variando a relação de 3:1 a 11:1. A máxima produção de esporos/mL foi alcançada na relação 7:1, com aproximadamente 34 horas de fermentação. Relatam também que após 10 horas de fermentação, a concentração de glicose (carbono) reduz drasticamente e que após 30 horas de fermentação o residual para a relação 7:1 é praticamente zerada. Sendo que as concentrações de nitrogênio variam ao longo do tempo, porém não ocorre a consumação total deste nutriente.

Jaoua et al 1997 sugerem uma relação adequada de C:N entre 5 e 7 para 1. Mostrando que o meio de cultura com uma variação de 5 a 7 unidades de carbono para uma de nitrogênio apresenta melhores resultados para produção de *B. thuringiensis*.

Rossa et al 1990, comparam diferentes relações C:N, com relação C:N acrescida de 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Descrevem que com as quantidades de 10g/L de glicose e 10g/L de extrato de soja (relação 1:1) houve produção de 2,71 g/L. Com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, houve um incremento de 0,34 g/L na produtividade de biomassa, mantendo a relação de 1:1, aumentando também a produção de delta-endotoxina (g/L).

Rossa et al 1990 relatam que o aumento da concentração de extrato de levedura de 1,84 g/L para 2,6 g/L ou 3,0 g/L ou 4,0 g/L, no qual houve a manutenção da concentração de glicose (6g/L) não acarretou em um incremento na produção de delta-endotoxina.

A quantificação dos micronutrientes em um meio de cultura e seu consumo durante o processo fermentativo podem auxiliar na interpretação da real necessidade de cada cepa de *B. thuringiensis* e suas exigências nutricionais.

Içgen et al 2002 descrevem que o Ca é um fator que estimula a esporulação e como observado na tabela 6, este micronutriente é consumido pela bactéria no meio de cultura 1, porem nos demais meios, apesar de estar presente, não foi possível observar um padrão de consumo deste ao longo do tempo. Quando levado em consideração este micronutriente é possível observar que os meios de cultura 3 e 4 que apresentam maiores quantidade de Ca e apresentaram também maiores concentrações de esporos/mL.

Tabela 06- Consumo de micronutrientes pelo *Bacillus thuringiensis* após 0, 30 e 60 horas de fermentação.

	Horas de fermentação	P (mg/L)	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	S (mg/L)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Zn (mg/L)
Meio 1	0h	162,73 c	267,83 d	8,60 b	12,46 b	144,07 c	0,47 b	0,36 ab	0,82 bc
	30h	129,67 c	240,60 d	7,94 b	9,10 b	126,77 c	0,34 b	0,30 ab	0,77 bc
	60h	140,60 c	265,27 d	1,33 b	2,47 b	127,50 c	0,40 b	0,05 ab	0,57 bc
Meio 2	0h	139,33 d	484,50 c	3,15 b	92,57 a	187,37 b	0,40 b	0,52 b	1,36 b
	30h	100,52 d	453,27 c	5,14 b	88,57 a	178,63 b	0,39 b	0,12 b	1,06 b
	60h	83,29 d	481,87 c	3,51 b	67,54 a	177,93 b	0,27 b	0,09 b	0,91 b
Meio 3	0h	768,83 b	1626,00 b	25,43 a	67,86 a	201,5 b	0,10 b	21,58 a	0,28 c
	30h	785,73 b	1520,00 b	64,84 a	82,14 a	185,7 b	0,28 b	61,08 a	0,95 c
	60h	630,40 b	1336,33 b	32,5 a	50,69 a	162,07 b	0,09 b	11,59 a	0,27 c
Meio 4	0h	1144,00 a	2717,33 a	14,06 a	54,13 a	803,27 a	4,66 a	8,28 ab	2,61 a
	30h	1195,67 a	2606,33 a	57,43 a	84,91 a	791,60 a	7,19 a	48,66 ab	9,54 a
	60h	1033,30 a	2429,00 a	40,54 a	57,09 a	714,13 a	1,71 a	19,04 ab	2,85 a

Medias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O aumento da quantidade de Mn no meio de cultura estimula o crescimento de *B. thuringiensis*. Porém como citado por Içgen et al 2002, apenas traços de Mn, tem efeito benéfico para o crescimento de *B. thuringiensis*. Como pode ser observado, quando há um aumento na quantidade de Mn no meio de cultura, ocorre o aumento na produção de *B. thuringiensis*, porém ocorre uma diminuição na eficiência da bactéria no controle de pragas. Içgen et al 2002 relatam que a concentração ideal de Mn no meio de cultura seja de 0,3 mg/L, o que corrobora com os dados obtidos.

Ennouri 2015 relatam que os compostos FeSO₄, MgSO₄ e MnSO₄ afetam indiretamente a produção de δ -endotoxina. Mas que é de grande relevância, a ausência do manganês (Mn) no meio reduz a capacidade da síntese de δ -endotoxina.

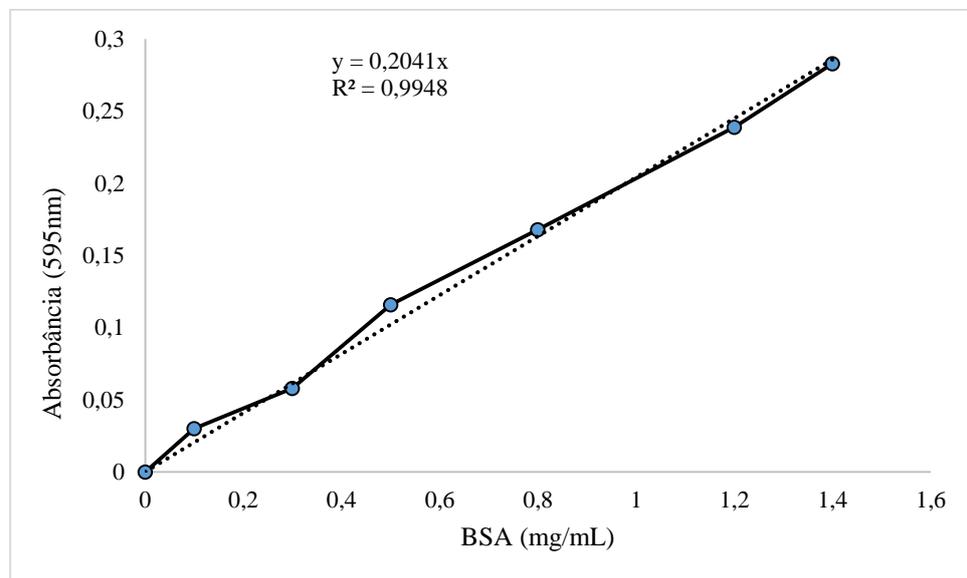
Sikdar et al 1991 relatam que os níveis ótimos para produção de delta endotoxina são de 1 g/L e 0,3g/L de K_2HPO_4 e $MgSO_4$ respectivamente. Como observado no meio de cultura 3, foi utilizado 1,6 g/L de K_2HPO_4 , sendo este o meio de cultura que apresentou maior concentração de esporos/mL.

5.7 Análise de proteína

Como não foi realizada a quantificação e padronização inicial das proteínas, não é possível obter uma análise mais aprofundada dos resultados do perfil proteico e consequentemente, a produção de proteína. Porém, há um indicativo de que há uma variação na produção de proteína em função do tempo de cultivo e do meio de cultura. Foram produzidas bandas proteicas de peso molecular variando de 20 a 70 kDa, na figura 21.

Para estimativa da produção de proteína, foi gerada uma curva padrão (Figura 20) baseada na concentração de BSA.

Figura 20- Curva padrão BSA na concentração de 0 a 1,4 mg/mL.



Com base na equação da reta da curva padrão foi determinada a concentração de proteínas totais das amostras coletadas com 24, 48 e 56 horas de fermentação nos diferentes meios de cultura.

Tabela 7- Quantificação de proteínas totais de *Bacillus thuringiensis* em quatro meios de cultura com 24, 48 e 56 horas de fermentação.

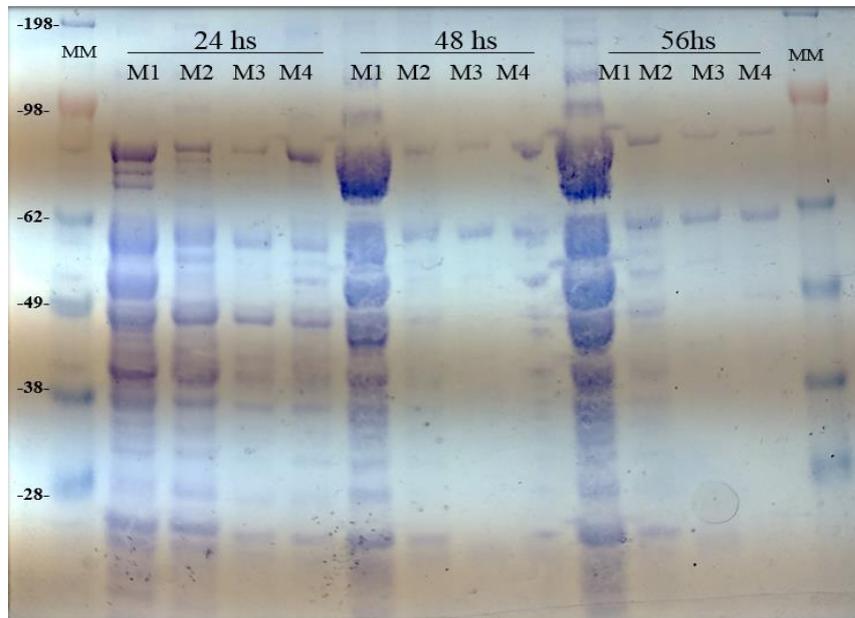
Meios de cultura/Tempo de fermentação (horas)	Concentração de proteína total (mg/mL)
Meio 1 - 24	1,320
Meio 2 - 24	0,472
Meio 3 - 24	0,078
Meio 4 - 24	0,235
Meio 1 - 48	2,198
Meio 2 - 48	0,131
Meio 3 - 48	0,066
Meio 4 - 48	0,045
Meio 1 - 56	2,277
Meio 2 - 56	0,083
Meio 3 - 56	0,025
Meio 4 - 56	0,053

No meio de cultura 1 independentemente do tempo de fermentação (24, 48 ou 56 horas) ocorre a presença de bandas com os pesos moleculares de 20 kDa, 40 kDa, 46 kDa, 54 kDa, 62 kDa e 70 kDa, o que não ocorre nos demais meios de cultura.

Bandas de 62 kDa e 70 kDa estão presentes com 24, 48 e 56 horas de fermentação em todos os meios de cultura, sendo mais intensas no meio de cultura 1.

Com 24 horas de fermentação é possível observar que o padrão de bandas proteicas se repete nos 4 meios de culturas, tendo o meio de cultura 1 bandas de maior intensidade.

Figura 21- Padrão de proteínas totais da cepa 1641 em quatro diferentes meios de cultura, coletadas com 24, 48 e 56 horas de fermentação.



(M1) – meio de cultura 1. (M2) – meio de cultura 2. (M3) – meio de cultura 3. (M4) – meio de cultura 4. (MM) – Marcador molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard. Fonte: Do autor (2017).

Os genes *cry* codificam proteínas com uma gama de massas moleculares, geralmente variando de 20 a 140 kDa. Após a ingestão pelo alvo suscetível, as protoxinas são solubilizadas e processadas proteoliticamente para liberar o fragmento tóxico (BRAVO, 1997).

Com o conhecimento dos pesos moleculares das proteínas é possível obter um indicativo do gene responsável pela produção da proteína. A proteína *cry3A* tem peso molecular de 70 kDa (BRAVO,1997). Proteínas com peso molecular de 72 kDa e 78 kDa são geralmente transcritas por genes *cry4D* e *cry 4C*, respectivamente (HOFTE e WHITELEY, 1989). Os genes *cry2A*, *cry2B*, *cry 11* podem gerar proteínas de mesmo peso molecular, 73 kDa. (HOFTE e WHITELEY, 1989; IBRAHIM et al 2010).

Foi possível observar a presença de bandas com peso molecular correspondente a proteínas VIP's. Apesar do processo de purificação de proteínas conter etapas de centrifugação, o que propicia a concentração de proteínas *cry* em detrimento as proteínas VIP, é possível que estas possam ser detectadas.

A proteína VIP2 constitui uma toxina binária, juntamente com a proteína VIP1. O gene *vip2* é transcrito a partir de um operon de ~ 4-kb e codifica proteína de ~ 50-kDa. (PALMA et al 2014). Peso molecular similar, foi observado na análise do gel de

SDS-PAGE. Observou-se também uma banda de peso molecular com aproximadamente 66 kDa que pode ser correspondente a proteína codificada pelo gene *vip3*. (PALMA et al. 2014).

A expressão de uma proteína de 20 kDa foi relatada por Hofte e Whiteley, 1989 e é descrita como um peptídeo que possivelmente está envolvido na proteção de CytA da degradação e aparentemente é transcrito como parte do operon que contém *cry4D*.

5.8 Identificação de genes

Após análises dos dados realizados em trabalhos anteriores com a cepa 1641, foi possível observar uma constante repetição da presença de sete genes *cry* e dois genes *vip*.

Tabela 08- Lista dos genes encontrados na cepa 1641.

Gene
cry 1A
cry 1B
cry 1D
cry 1E
cry 1G
cry 1I
cry 2A
VIP 1
VIP3

Kees van Frankenhuyzen 2009 apresenta uma relação de alguns genes de *B. thuringiensis* (*cry*, *VIP* e *Cyt*) e sua efetividade contra insetos das ordens Coleóptera, Collembola, Díptera, Hemíptera, Lepidóptera, dentre outros, assim como espécies pertencentes a estas ordens. Após análise e compilação dos dados, foi possível correlacionar os dados descritos com os genes presentes na cepa 1641.

Na correlação a nível de ordem, é possível observar, que os genes encontrados na cepa estudada, podem ser eficientes para o controle de dípteros (*cry1A*, *cry1B* e *cry2A*), coleópteros (*cry1B*, *cry1I* e *VIP1*), hemípteros (*cry2A*) e lepidópteros (*cry1A*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1I*, *cry 2A* e *VIP3*).

5.9 Análise de custo

O custo de produção de um biopesticida é um fator determinante em uma indústria. As empresas geralmente buscam um meio de cultura barato, de fácil manipulação, prático, que possibilite uma alta produção de proteína ativa e com bom custo/benefício.

Após busca de valores dos reagentes foi possível obter uma relação de valor para cada meio de cultura. Na Tabela 09 são apresentados os meios de cultura e o respectivo custo para elaboração de 1.000 litros destes.

Tabela 09- Valor total dos reagentes para preparo de 1.000 litros de meio de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

Meio de cultura	Reagente	Valor (R\$) / Kg	Quantidade necessária para produção de 1.000 litros (Kg)	Valor (R\$) reagentes para produção que 1.000 litros de meio de cultura
1*	Comercial	646,00	13,00	8.398,00
1**	Triptona	632,80	10,00	10.266,50
	Extrato de levedura	678,00	5,00	
	NaCl	109,70	5,00	
2	Glicose	8,50	14,86	6.396,89
	Extrato de levedura	678,00	9,15	
	MgSO ₄	76,00	0,88	
3	Glicose	8,50	14,86	6.941,35
	Extrato de levedura	678,00	9,15	
	MgSO ₄	76,00	0,88	
	MnSO ₄	11,90	0,18	
	CaCl ₂	70,00	0,28	
	KH ₂ PO ₄	176,00	2,97	
4	Glicose	8,50	14,86	7.282,70
	Extrato de levedura	678,00	9,15	
	MgSO ₄	76,00	0,88	

MnSO ₄	11,90	0,18
CaCl ₂	70,00	0,28
KH ₂ PO ₄	176,00	2,97
FeSO ₄	50,00	0,25
(NH ₄)SO ₄	64,00	2,26
K ₂ HPO ₄	63,24	2,76
ZnSO ₄	120,80	0,08

*Meio de cultura LB comercial; **Meio de cultura LB preparado em laboratório.

Como podemos observar o meio de cultura 2 é o meio mais barato apresentando um menor custo de produção, sendo o meio 1 o meio de cultura mais caro. Porém outros fatores devem ser levados em consideração para a escolha do meio de cultura.

As tabelas 10 e 11 apresentam um resumo de todos os valores máximos dos dados obtidos neste trabalho sendo possível a realização de uma análise mais detalhada para a escolha do meio de cultura.

Tabela 10- Custo de produção, massa celular, concentração de esporos observados durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

Meio de cultura	Custo (R\$)	Massa Celular (g/L)	Concentração (esp/mL)
1 **	10.266,50	1,42	5,43x10 ⁸
2	6.396,89	1,67	7,27x10 ⁸
3	6.941,35	0,67	8,92x10 ⁸
4	7.282,70	1,13	6,94x10 ⁸

Tabela 11- Mortalidade de *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera eridanea*, *Spodoptera cosmioides*, *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* obtida em quatro diferentes meios de cultura usados para crescimento de *Bacillus thuringiensis*.

Meio de cultura	Mortalidade (%)					
	S.	H.	S.	S.	A.	C.
	<i>frugiperda</i>	<i>armigera</i>	<i>eridanea</i>	<i>cosmioides</i>	<i>gemmaatalis</i>	<i>includens</i>
1 **	100,00	100,00	98,89	97,78	100,00	100,00
2	66,67	74,44	76,67	92,22	93,33	80,00
3	80,00	75,56	91,11	90,00	97,76	90,00
4	90,00	75,56	97,78	90,00	100,00	97,78

Para avaliação da eficiência de um meio de cultura alguns parâmetros são de grande importância. A eficiência para o controle de lagartas e a produção de proteínas podem ser destacados como os principais fatores a serem analisados. Porém quando se trata da formulação a concentração de esporos/mL e a produção de massa celular também deve ser analisada. A densidade óptica e o pH servem como suporte de análise para a escolha de um meio de cultura.

Contudo o caráter econômico/custo da composição de um meio de cultura muitas vezes é um fator determinante para uma indústria. Analisando apenas os dados apresentados na tabela 08, podemos observar que o meio de cultura mais viável economicamente é o meio 2, sendo o meio 1 o meio de cultura mais caro.

Levando em consideração os demais parâmetros contidos nas tabelas 09 e 10, o meio de cultura 1, apesar de apresentar a constituição mais cara e uma baixa produção de esporos/mL em relação aos demais apresenta a maior eficiência de mortalidade contra as lagartas testadas, mostrando-se o meio de cultura ideal a ser utilizado em um processo industrial de produção de *B. thuringiensis*.

Quando comparado os meios de cultura há uma relação em que o meio de cultura que possui maior variedade de micronutrientes tem maior tendência de ser um meio de cultura mais produtivo, porém nem sempre mais efetivo para o controle das pragas testadas neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

A constituição do meio de cultura afeta diretamente na produção e efetividade de *Bacillus thuringiensis*.

O meio de cultura 1, mesmo apresentando um custo mais elevado de produção, é o mais indicado para o desenvolvimento de um meio de cultivo para o crescimento de *Bacillus thuringiensis* devido a capacidade de propiciar uma alta efetividade contra os insetos praga estudados.

7 ANEXO

Anexo I

Golberg et al 1980	
Quantidade (g/L)	Reagente
4,50	Extrato de levedura
3,00	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,036	CaCl
0,075	CuSO ₄
0,0135	FeSO ₄
30,00	Glicose
7,00	H ₂ PO ₄
5,00	Infusão de milho liquida
2,00	MgSO ₄
0,04	MnSO ₄
2,00	Peptona de soja
0,075	ZnSO ₄

Faloci M. M 1990	
Quantidade (g/L)	Reagente
1,00	(NH ₄) ₂ SO ₄
4,00	Ácido casamino
4,00	Bacto peptona
0,08	CaCl ₂
4,00	Extrato de carne
8,00	Glucose
3,00	K ₂ HPO ₄
3,00	KH ₂ PO ₄
0,20	MgSO ₄
0,05	MnSO ₄
4,00	Peptona

Jouzani et al 2015	
Quantidade (g/L)	Reagente
2,00	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,001	CuSO ₄
20,00	Extrato de levedura
0,01	FeSO ₄
1,00	K ₂ HPO ₄
0,78	KH ₂ PO ₄
20,00	Melaço
0,30	MgSO ₄
0,015	MnSO ₄

Holmberg et al 1980	
Quantidade (g/L)	Reagente
0,05	CaCl
0,01	FeSO ₄
5,00	K ₂ HPO ₄
5,00	KH ₂ PO ₄
0 – 40	Melaço
0,05	MgSO ₄
0,03	MnSO ₄
1,50	Na(NH ₄)PO ₄
20-60	Farelo soja

Wakisaka et al 1982	
Quantidade (g/L)	Reagente
10,00	CaCO ₃
10,00	Carne de porco em pó
10,00	Extrato de batata
15,00	Farelo de soja
0,02	FeCl ₂
5,00	Glicose
0,30	MgSO ₄
2,00	Polipetona
0,2	ZnSO ₄

Cintia Panarotto 2006	
Quantidade (g/L)	Reagente
3,00	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,12	CaCl ₂
12,00	Extrato de levedura
20,00	Glicose
1,50	K ₂ HPO ₄
1,50	KH ₂ PO ₄
1,50	MgSO ₄
0,09	MnSO ₄

Angelo E A et al 2012	
Quantidade (g/L)	Reagente
0,10	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,04	CaCl ₂
4,50	Glicose
0,10	K ₂ HPO ₄
0,10	KH ₂ PO ₄
4,00	Levedura hidrolisada
0,10	MgSO ₄
0,03	MnSO ₄

Lecadet et al 1980	
Quantidade (g/L)	Reagente
7,00	Ácido casamino
0,018	CaCl ₂
0,02	Fe ₂ (SO ₄) ₃
3,00	Glicose
6,80	KH ₂ PO ₄
0,12	MgSO ₄
0,002	MnSO ₄
0,014	ZnSO ₄

Arcas 1985	
Quantidade (g/L)	Reagente
7,00	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,28	CaCl ₂
28,00	Extrato de levedura
56,00	Glicose
7,00	K ₂ HPO ₄
7,00	KH ₂ PO ₄
7,00	MgSO ₄
0,21	MnSO ₄

Morris O. N 1995	
Quantidade (g/L)	Reagente
1,00	CaCO ₃
15,00	Dextrose
2,00	Extrato de levedura
0,02	FeSO ₄
0,30	MgSO ₄
2,00	Peptona
10,00	Proflo (Traders Protein)
0,02	ZnSO ₄

Ennoury et al 2015	
Quantidade (g/L)	Reagente
35,00	Amido
30,00	Extrato soja
0,02	FeSO ₄
1,50	K ₂ HPO ₄
1,50	KH ₂ PO ₄
0,50	MgSO ₄
0,02	MnSO ₄

Rossa C A 1990	
Quantidade (g/L)	Reagente
10,00	Glicose
1,00	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,08	CaCl ₂
10,00	Extrato de levedura
3,00	K ₂ HPO ₄
3,00	KH ₂ PO ₄
0,20	MgSO ₄
0,05	MnSO ₄

Drake and Smythe 1963	
Quantidade (g/L)	Reagente
68,00	Amido de milho
19,50	Caseína
47,00	Infusão de milho
6,00	Levedura
6,40	Sacarose
6,00	Tampão Fosfato

Lecadet et al 1980	
Quantidade (g/L)	Reagente
1,00	CaCl ₂
8,00	Caldo nutriente
3,00	Extrato de levedura
1,00	FeSO ₄
0,40	KCl
1,00	MgSO ₄
1,00	MnSO ₄

Valicente e Mourao, 2008	
Quantidade (g/L)	Reagente
30,00	Farinha de soja
0,02	FeSO ₄
10,00	Glicose de milho
0,30	MgSO ₄
0,02	MnSO ₄
0,02	ZnSO ₄

Baldani et al 1999	
Quantidade (g/L)	Reagente
10,00	Tryptona
5,00	Extrato de levedura
5,00	NaCl

Thorne et al 1968	
Quantidade (g/L)	Reagente
1,00	CaCl ₂
8,00	Caldo nutriente
0,20	MgSO ₄
1,00	MnSO ₄
5,00	NaCl

Moraes et al 1980	
Quantidade (g/L)	Reagente
40,00	Infusão de milho
15,00	Melaço de cana

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA LC, ARRIGONI EB, RODRIGUES FILHO JP. 1997. **Modelo de análise econômica para avaliação do controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis***. In: Seminário Copersucar de Tecnologia Agrônômica, 7. Piracicaba. Anais. Piracicaba: Copersucar, 1997.p. 95-104.

ANGELO EA, VILAS-BÔAS GT, CASTRO-GÓMEZ RJH. 2010. ***Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958.

ANGELO EA, VILAS-BÔAS GT, dos SANTOS CA, LOPES J, ARANTES OMN. 2012. **Development of a low-cost medium for the culture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis***. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 33, n. 2, p. 161-170.

ARCAS J, YANTORNO O, ERTOLA R. 1985. **Effect of High Concentration of Nutrients on *Bacillus thuringiensis* Cultures**. Biotechnol. Lett., p. 105-110.

ARONSON AI, SHAI Y, 2001. **Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action**. FEMS Microbiol. p 1-8.

ARRIGONI, E. de B. 2002. **Broca da cana-de-acucar – importância econômica e situação atual**. In: ARRIGONI, E. DE B.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; ROSSETO, R. Pragas da cana-de-açúcar – importância econômica e enfoques atuais. Piracicaba: STAB, p.1-4.

ASHFAQ M. 2001. **Larval Mortality and Development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) Reared on a Transgenic *Bacillus Thuringiensis*-Cotton Cultivar Expressing CryIAc Insecticidal Protein** .J Econ Entomol 94 (5), p. 1053-1058.

AVIGNNE CAR, YANTORNO OM, ARCAS JA, ERTOLA RJ.. **Organic and inorganic nitrogen source Ratio effects on *Bacillus thuringiensis* Var. *Israelensis* delta-endotoxin**. World Journal of Microbiology and 81btechnology 6, p. 27-31

BARBOSA TAN, 2017. **Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* visando o controle de *Helicoverpa armigera***. Dissertação/UFLA. p. 47

BAVARESCO A, GARCIA MS, GRÜTZMACHER AD, FORETSI J, RINGENBERG R. 2003. **Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamão, soja e feijão**. Ciência Rural, v.6, p.993-998.

BERNARDI O, ALBERNAZ KC, VALICENTE FH, OMOTO C. 2011 **Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas**. In: Borém, A.; Almeida, G. D. de. Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. Visconde de Rio Branco: Suprema. p. 179-204.

BERNHARD K, JARRETT P, MEADOWS M., BUTT J, ELLIS DJ, ROBERTS GM, PAULI S, RODGERS P, BURGESS HD. 1997. **Natural isolates of *B. thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests**. J Invertebr Pathol. p 59-68.

BRAVO A. 1997. **Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Family proteins and their functional domains**. Journal of Bacteriology. vol 179. p 2793-2801.

BRAVO A, GILL SS, SOBERO NM. 2005. ***Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use**. In: Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier BV.

BUENO RCOF, BUENO AF, MOSCARDI F, PARRA JRP, HOFFMANN-CAMPO CB. 2011. **Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions**. Pest Management Science, Sussex, v. 67, n. 2, p. 170-174.

CANTWELL GE, HEIMPEL AM, THOMPSON MJ. 1964. **The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner**. Journal article : Journal of Insect Pathology Vol.6 No.4 p.466-480

CARLBERG, GUNNEL. 1995. **Safety testing of *Bacillus thuringiensis* preparations, including thuringiensin, using the Salmonella assay.** Journal of invertebrate pathology, v. 66, n. 1, p. 68-71.

CAROZZI NB, KRAMER VC, WARREN GW, EVOLA S & KOZIEL MG. 1991. **Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles.** Applied and Environmental Microbiology. 57: p. 3057- 3061.

CHENGCHEN XU, BI-CHENG WANG, ZINIU YU, MING SUN. 2014. **Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins.** P. 2732-2770.

COUCH, T. L. **Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria.** In: Charles JF. 2000. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications. New York: Kluwer Academic Publishes, p. 297-316

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento – Nono levantamento safra 2016/2017. Vol.4. p. 12-22

CRICKMORE N, ZEIGLER DR, FEITELSON J, SCHNEPF E, VAN RIE J, LERECLUS D, BAUM J & DEAN DH. 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: p. 807-813

CRUZ I, VALICENTE FH, dos SANTOS JP, WAQUIL JW, VIANA PA. 1997. **Manual de identificação de pragas da cultura do milho.**

CRUZ I. 2007. **A broca da cana, *Diatrea saccharalis*, em milho, no Brasil.** Circular técnica 90, Embrapa Milho e Sorgo.

CRUZ I. 2007. **Alternativas para o Controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* e principais cuidados no uso de milhos transgênicos resistentes a insetos.** In: Fancelli AL, NETO DD. (Ed.). Milho – Fatores determinantes da produtividade. Piracicaba: USP-ESALQ.

CURTIS B, Thorne. 1968. **Transducing Bacteriophage for *Bacillus cereus*. Journal of virology.** p. 657-662,

DAMGAARD, P.H. 2000. **Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment.** In: Charles, J.F.; Nielsen-Lerous, C.; Delécluse (Ed). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 23-40.

De MAAGD RA, BRAVO A, CRICKMORE N. 2001. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** Trends Genet. p . 193 – 199.

DEAN, D. H. 1984. **Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering.** Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Andover, v. 2, p. 341-363.

DRAKE, BB and SMYTHE, CV (1963). US Patent 3087865. In: Microbial Technology. Ed: CM Ignoffo. Academic Press, New York pp 1-29.

ENNOURI K, AYED RB, HASSEN HB, MAZZARELLO M, OTTAVIANI E. 2015. **Experimental design and bayesian networks for enhancement of delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis*.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. p. 379-392.

ESPINASSE S, CHAUFAX J, BUISSON C, PERCHAT S, GOHAR M, BOURGUET TD, SANCHIS V. 2003. **Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*.** Current Microbiology. New York, US, v. 47. p. 501 - 507

ESTRUCH JJ, WAREEN GW, MULLINS MA, NYE GJ, CRAIG JA, KOZIEL MG.1996. **Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** Proc. Natl. Academic Science. p. 5389 – 5394.

FALOCI MM, YANTORNO OM, MARINO HA, ARCAS JA, ERTOLA RJ. 1990. **Effect of the media composition on the Growth parameters and biological Properties of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* delta-endotoxin.** World Journal of Microbiology and Biotechnology 6, p. 32-38

FARKAS, J. 1969. **The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*.** Preliminary communication. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, v. 34, n. 3, p. 1118-1120.

FARRERA RR, PÉREZ-GUEVARA F, DE LA TORRE M. 1998. **Carbon: nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73.** p 758-765

FEITELSON, S, Payne I, Kim, L.1992. ***Bacillus thuringiensis*: insects and beyond.** Biol Technology 10, p 271-275.

FONSECA FL. 2006. **Ocorrência, monitoramento, caracterização de danos e parasitismo de noctuidae e geometridae em pomares comerciais de macieira em Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil.** Curso de Pósgraduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GLARE TR, O'CALLAGHAM M. 2000. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety.** Chichester: John Wiley and Sons; p. 350.

GOLDBERG I, SNEH BE, BATTAT DK. 1980. **Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisid.** Biotechnol. Letters, 2, pp. 419-426

GRAVENA S. 1992. **Controle biológico no manejo integrado de pragas.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. p 281-299.

HAN, S, CRAIG JA, PUTMAN CD, CAROZZI NB, TAINER JA. 1999. **Evolution**

and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. Nat. Struct. Biol. p. 932 – 936.

HANNAY CL, FITZ-JAMES PC. 1995. **The protein-crystals of *Bacillus thuringiensis berliner*.** Can J Microbiol, v. 1, p. 694-710.

HANSEN BM, SALAMITOU S. 2000. **Virulence of *Bacillus thuringiensis*.** Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application pp 41-64

HANSON RS, SRINIVASAN VR, HALVORSON HO. 1963. **Biochemistry of Sporulation.** Metabolism of Acetate by Vegetative and Sporulating Cells. J. Bacteriol., 85: p 451-460.

HERNÁNDEZ CS. 2001. **Update on the detection of β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis.** Journal of applied microbiology. v. 90, n. 4, p. 643-647.

HERNANDEZ, J.L.L. **Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*.** Entomophaga, v.32, p.163-171, 1988.

HOLMBERG A, SIEVANEN R, HELSINKI. 1980. **Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for Exotoxin Production: Process Analysis Study.** University of Technology, Systems. Theory Laboratory, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXII, p. 1707- 1724.

HÖFTE H, WHITELEY HR. 1989. **Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.** Microbiological Reviews, v. 53, n. 2, p. 242-255.

IBRAHIM MA, GRIKO N, JUNKER M, BULLA LA. 2010. ***Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective.** Bioengineered bugs, p 31-50.

IÇGEN AY, IÇGEN BB, ÖZCENGİZ AG. 2002. **Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH.** Research in Microbiology. P 599–604

IÇGEN AY, IÇGEN BB, ÖZCENGİZ AG. 2002. **Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*:. II. Effects of carbon and nitrogen sources** Research in Microbiology. p 605–609

IÇGEN, Y. IÇGEN, B. ÖZCENGİZ, G. 2002. **Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH.** Res. Microbiol.,153: p 599- 604.

JESUS FG, SOUSA PV, MACHADO BR, PEREIRA AIA, ALVES GCS. 2013. **Desenvolvimento de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros Development of *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) in different hosts - Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.80, n.4, p. 430-435.**

JOHNSON DE, MCGAUGHEY WH. 1996. **Contribution of *Bacillus thuringiensis* Spores to Toxicity of Purified Cry Proteins Towards Indianmeal Moth Larvae.** Volume 33, Issue 1, p 54–59

JOUA S, ZOUARI N. 1997. **Purification and immunological characterization of particular delta-endotoxins from three strains of *Bacillus thuringiensis*.** Biotechnology Letter. Vol 19. p 825-829.

JOUZANI GS, ABBASALIZADEH S, MORADALI MF, MORSALI HJ. 2015. **Development of a Cost Effective Bioprocess for Production of An Iranian Anti-Coleoptera *Bacillus thuringiensis*.** Strain, Agr. Sci. Tech. p 1183 – 1196.

LECADET MM, BLONDEL M, RIBIER J. 1980. **Generalized Transduction in *Bacillus thuringiensis* var. Berliner.**Journal of General Microbiology. p. 203-212.

LECADET MM, DE BARJAC H. 1981. ***Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin.**

Information Systems Division, National Agricultural The National Agricultural Library

LEIGHTON TJ, ROY HD. 1971. **The Stability of Messenger Ribonucleic Acid During Sporulation in *Bacillus subtilis*** The journal of biological chemistry Vol. 246, No. 10.

LEVINSON, BARRY L. 1990. **Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography.** Journal of bacteriology, v. 172, n. 6, p. 3172-3179.

LÓPEZ PAZOS SA, SALAMANCA JAC. 2007. **Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins: a review.** Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2004. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004.

MENDES SM, MARUCI RC, MOREIRA SG, WAQUIL JW. 2008. **Milho Bt: Avaliação preliminar da resistência de híbridos comerciais á lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797).**

METCALF RL, LUCKMAN WH. 1994 **Introduction to insect pest management.** 3ª Edição

MORAES IO, CAPALBO DMF, AARRUDA ROM, **Produção de bioinseticidas.** In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schidell W. 2000. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, p. 245-265.

MORAES IO, SANTANA MHA, HOKKA CO. 1980. **The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production.** In: Adv Biotechnol. Proceedings of 6th International Fermentation Symposium, London, Canada, 1: p 75–79

MORRIS ON, CONVERSE V, KANAGARATNAM P, DAVIES JS. 1995. **Effect of Cultural Conditions on Spore–Crystal Yield and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD133)**. Journal of invertebrate pathology 67, p 129–136.

MOSCARDI F, BUENO AF, SOSA-GOMEZ DR, ROGGIA S, HOFFMAN-CAMPO CB, POMARI AF, CORSO IC, YANO SAC. 2013. **Soja: Manejo integrado de insetos e outros artropodes praga**. Cap 4, p 213.

MUMMIGATTI SG, RAGHUNATHAN AN. 1989. **Influence of Media Composition on the Production of Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis***. Journal of Invertebrate Pathology 55, p 147-151.

NORA,I., W. REIS FILHO & H. STUKER. 1989. **Danos de lagartas em frutos e folhas da macieira: Mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares**. Agropec. Catarin. 2: p 54-55

ÖSKAN M, DILEK FB, YETIS U, ÖZCENGİZ, O. 2003. **Nutritional and cultural parameters influencing antidpteran delta-endotoxin production**. Research in Microbiology, Paris, v. 154, n. 1, p. 49-53.

PALMA L, MUNOZ D, BERRY C, MURILLO J, CABALLERO P. 2014. ***Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity**. Journal toxins. p 3296-3325.

PANAROTO C. 2006. **Influencia de parâmetros operacionais, fontes protéicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis***

PANIZZI AR, BUENO AF, SILVA FAC. 2012. **Insetos que atacam vagens e grãos**. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa. p. 335-420.

PINHEIRO DH. 2013. **Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda**

escovada da membrana apical (BBMV's) do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina em isolados de *Bacillus thuringiensis*. Dissertação UFLA. p 113

POOPATHI S, ANUP KUMAR K. 2003. **Novel Fermentation Media for Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis***. Biological and Microbial Control. J. Econ. Entomol. 96(4): p 1039-1044

POOPATHI S, KUMAR KA. 2003. Novel Fermentation Media for **Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis***. Journal of Economic Entomology. p 1039-1044.

RASKO DA, ALTHER MR, HAN CS, RAVEL J. 2005. **Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms**. FEMS Microbiology Reviews, v. 29.p 303 – 329

RAYMOND B, JOHNSTON PR, NIELSEN-LEROUX C, LERECLUS D, CRICKMORE N,. 2010. ***Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?** Trends in Microbiology, v. 18, N.5.

ROSSA CAA, YANTORNO OM, ARCAS JA, ERTOLA RJ. 1990. **Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotox production**. Woeld Journal of Microbiology and Biotechnology. p 27-31.

SAKSINCHAI S, SUPHANTHARIKA M, VERDUYN C. 2001. **Aplication of simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation fo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, p 307-316.

SALAMA HS, FODA MS, DULMAGE HT, EL-SHARABY A. **Novel Fermentation Media for Production of Endotoxins from *Bacillus thuringiensis***. Journal of Invertebrate Pathology 41, p 8-19.

SALEH SM, HARRIS RF, ALLEN ON. 1969. **Method for determining *Bacillus thuringiensis* var Berliner in soil**. CNIIO(/. J. Microhiol., 15, 1 p 101- 1104.

SIKDAR DP, MAJUNDAR MK, MAJUNDAR SK. 1991. **Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*.** Biotechnology Letters. Vol 13. p 511-514

SILVIE PR, THOMAZONI D, SORIA MF, SARAN PE, BÉLOT JL. 2013. **Pragas e seus danos em algodoeiro.** Boletim de identificação. IMAmt.

SMITH DB, HOSTETTER DL, PINNELL RE, IGNOFFO CM. 1982. **Laboratory studies of viral adjuvants: formulation development.** J. Econo. Entomol. 75, p 16-20

SMITH, RA. 2009. **Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*,** Can. Journal Microbiology. 28 (1982) p 1089.

SUMERFOR DV e SOLOMON WL. 2000. **Growth of wild *Pseudoplusia includens* (Lepdoptera: Noctuidae) larvae collected from Bt and non-Bt cotton.** Fla Entomol. 83: p 354-357

TAIKIM Y, GREGORY BG, IGNOFFO CM. 1972. **The β -exotoxins of *Bacillus thuringiensis*: III.** Effects on *in vivosynthesis* of macromolecules in an insect system Journal of Invertebrate Pathology. Volume 20, Issue 1, p 46-50

TRAVERS RS, MARTIN PA & REICHELDERFER CF. 1987. **Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.*** Applied and Environmental Microbiology. 53: p 1263-1266.

VALICENTE FH, BARRETO MR (2003) ***Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** Neotrop Entomol 32: p 639-644

VALICENTE FH, EDGARD ATP, MARIA JVV, NEWTON PC, ANDRÉIA AC, CLÁUDIA TG, UBIRACI GL (2010) **Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 genes from Brazilian strains effective against the fall**

armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Biol Control 53: p 360-366.

VALICENTE FH, FONSECA MM (2004) **Susceptibilidade da lagarta-docartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis***. Rev Bras Milho Sorgo 3: p 21-29.

VALICENTE FH, MOURÃO AHC. 2008. **Use of By-Products Rich in Carbon and Nitrogen as a Nutrient Source to Produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-Based Biopesticide** Neotropical Entomology 37(6): p 702-708.

VALICENTE FH, ZANASI RF. 2005. **Uso de meios alternativos para produção de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis***. Circular Técnica 60. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.

VALICENTE FH, LANA UDP. 2010. **Molecular characterization of the *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains 344 and 1644, efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 7, n. 3, p. 195-209.

VLAK JM. 1993. **Genetic engineering of Baculoviruses for insect control** In: Whitten, M. J.; Oakeshot JG. eds. Molecular approaches to pure and applied entomology. New York: Springer-Verlag. p. 90-127.

WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; NISHIMOTO, Y. 1982. **Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- γ -hydroxybutyric acid by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis***. Appl. En. Microbiol., 43: p 1473-1480.

WARREN GW. 1997. **Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests**. In CAROZZI, N. B. KOZIEL, M. G. (ed.). Advances in insect control: the role of transgenic plants. Taylor & Francis, London, United Kingdom.

WHO. 1999. **Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use**. WHO Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2. World Health Organization, Geneva.

YU CG, MULLINS MA, WARREIN GW, KOZIEL MG, ESTRUCH JJ. 1997. **The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, US, v. 63, n. 2. p 532 – 535.

ZOUARI N, JAOUA S. 1999. **The effect of complex carbon, and nitrogen, salt, tween-80 and acetate on delta- endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, New York, v. 23, n. 6, p. 497-502.