

SAMARA ERNANDES

**ESTUDOS DA UTILIZAÇÃO DE SANGUE DE
ABATEDOUROS COMO SUBSTRATO
FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE *Bacillus*
thuringiensis POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", Campus de Araraquara, para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia (Área de
Concentração: Biotecnologia).

Orientadora: Prof^a Dr^a Iracema de Oliveira Moraes

**Araraquara/SP
1998**

DADOS CURRICULARES

Samara Ernandes
26 anos
Av. Vera Cruz, 716, apto 11
Parque Estoril
São José do Rio Preto - SP
CEP 15085-010
Tel.: (017) 2275638/2254019

FORMAÇÃO

Graduada do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela UNESP de São José do Rio Preto - SP, no ano de 1992.

Graduada do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela UNESP de São José do Rio Preto - SP, no ano de 1994.
Registro no MEC: LP 9708238/DEMEC/SP.

MESTRADO

Instituto de Química - UNESP - Araraquara
Área de concentração: Biotecnologia
Orientadora: Profª Drª Iracema de Oliveira Moraes

Título da dissertação: Estudos da utilização de sangue de abatedouros como substrato fermentativo para produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação submersa.

Disciplinas cursadas:

✧ "Microbiologia aplicada à Biotecnologia".

Prof. resp.: Dr. Pedro Magalhães Lacava.

✧ "Fermentações Industriais".

Profes. resps.: Dr. Alirio de Carvalho e Dr. Jonas Contiero.

✧ "Fatores nutricionais em leveduras industriais".

Prof. resp.: Dr. José Roberto Ernandes

✧ "Produção de bioinseticida a partir do *Bacillus thuringiensis*".

Prof. resp.: Dra. Iracema de Oliveira Moraes.

APRIMORAMENTO TÉCNICO

- Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN- S.J.R.P.

Área: Controle de Vetores.

Orientadora: Bióloga Sirlé Abdo Salloum Scandar.

Período: 1º de março de 1993 a 28 de fevereiro de 1995.

Apoio financeiro: FUNDAP.

ESTÁGIOS

“Chiroptera”

Orientador : Prof. Dr. Valdir Antonio Taddei.

Duração: 200 horas.

Promoção: Departamento de Zoologia - IBILCE - UNESP - S.J.R.P.

Período: 1º de Maio de 1990 a 28 de fevereiro de 1991.

Estágio no laboratório de Microbiologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Orientadora : Profª Margarete Tereza Gottardo de Almeida.

Duração: 90 horas

Promoção: Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital de Base.

Período: Setembro a Dezembro de 1992.

Estágio na Seção de Virus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz.

Orientadora: Pesquisadora Iraí Maria Rocco.

Local: São Paulo - SP.

Período: 27 de junho a 26 de julho de 1994.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Moraes, I.O., Capalbo, D.M.F., Arruda, R.O.M. Pelizer, L.H., Ernandes, S. Bioprocess engineering to get agrobiological products - The case of *Bacillus thuringiensis*. Abstracts of BIOTEC/98 - IV IBERIAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY Guimaraes - Portugal, 1998.

Ernandes, S., Moraes, I.O. Estudo comparativo do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis* em fermentação submersa contendo sangue de ave e sangue de suíno. In: Abstracts of 6º SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO - 6º SICONBIOL. Rio de Janeiro - RJ, 1998.

Ernandes, S. e Moraes, I.O. . Verificação do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis*, obtido por fermentação submersa em meio de cultura composto por resíduo agroindustrial. Anais do II SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas - SP 1997.

Ernandes, S. e Moraes, I.O. Estudos preliminares do efeito da fonte de nitrogênio no crescimento de *Bacillus thuringiensis*. Anais do XXIV COLÓQUIO DE INCENTIVO À PESQUISA. São José do Rio Preto - SP, 1997.

Ernandes, J.R., D'Alkmin, R., Ernandes, S., Contiero, J., Cruz, S.H. O efeito da natureza da fonte de nitrogênio no crescimento e secreção de atividade amilolítica em *Saccharomyces cerevisiae*. Anais do XI SINAIFERM - "Simpósio Nacional de Fermentações". São Carlos - SP. 1996.

Cardoso Jr, R.P., Scandar, S.A.S., Mello, N.V., Ernandes, S., Botti, M.V., Nascimento, E.M.M. Detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, na zona urbana do município de Catanduva - SP, após controle de epidemia de dengue. Anais do XXX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. Salvador - BA. 1994.

CURSOS DE APERFEIÇOAMENTO

- Curso de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.
Período: 08 a 19 de agosto de 1994.
Carga horária: 40 horas.
Local: São Paulo - SP.
Promoção: Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.
- Curso: "Principais Endemias Brasileiras".
Período: 17 a 28 de janeiro de 1994.
Carga horária: 20 horas.
Local: São Paulo
Promoção: Faculdade de Saúde Pública - USP.
Ministrado pelos Prof. Dr. José Maria Soares Barata e Prof. Délsio Natal.

MINI-CURSOS

- "Animais em Extinção e Explosão Demográfica" - 1993.
Carga horária: 08 horas.
Local: UNESP - São José do Rio Preto.
- "Introdução à Filogenética" - 1993.
Carga horária: 08 horas.
Local: UNESP - São José do Rio Preto.
- "Horticultura e dormência de sementes" - 1992.
Carga horária: 06 horas.
Local: UNESP - São José do Rio Preto.
- "Métodos de separação e purificação de proteínas" - 1991.
Carga horária: 06 horas.
Local: UNESP - São José do Rio Preto.

- “Aconselhamento genético”- 1991.
Carga horária: 08 horas.
Local: UNESP - São José do Rio Preto.
- “Invertebrados peçonhentos”- 1989.
Carga horária: 09 horas.
Local: UNESP - São José do Rio Preto.

CONGRESSOS, SIMPÓSIOS E SEMANAS

- 6º SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO - 6º SICONBIOL - 1998
Local: Rio de Janeiro - RJ.
- II SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS - 1997.
Local: Campinas - SP.
- XVI/XVII/XVIII/XXIV COLÓQUIO DE INCENTIVO À PESQUISA - 1989/91/93/97.
Local: UNESP - São José do Rio Preto - SP
- I JORNADA EDUCACIONAL & BIOMÉDICA DA SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS - 1996.
Local: SUCEN - São Paulo.
- SEMINÁRIO DE CULTURA DE TECIDOS - 1994.
Local: Instituto Biológico - São Paulo.
- II REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISADORES NIKKEIS - Sessão de Virologia - 1994.
Local: Instituto Butantan - São Paulo.
- V/VI/VII/VIII/IX SEMANA DA BIOLOGIA - 1989/90/91/92/93.
Local: UNESP - São José do Rio Preto - SP.
- X ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA - 1992.
Local: UNESP - São José do Rio Preto - SP.
- JORNADA DE ATUALIZAÇÃO EM “ ANTIBIOTICOTERAPIA”- 1992.
Local: UNESP - São José do Rio Preto - SP.

CURSO MINISTRADO

Participação do Treinamento para funcionários da SUCEN e Equipe Municipal - SUS, ministrando aulas sobre "Aspectos básicos da Esquistossomose", perfazendo um total de 08 horas, nos dias 22/09, 27/09, 07/10 e 20/10 de 1994.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

IDIOMA

- Inglês: FISK Certificate of Achievement English Course.
- Francês: Curso Básico de Língua Francesa - Centro de Cultura de São José do Rio Preto (Março de 1993 a Novembro de 1994).

A meu pai, *Miguel Ernandes*

Como exprimir a tua falta neste momento tão importante?

Sentimentos de pesar, tristeza? Não!!

Quero exaltar a excelência da tua passagem nesta vida, a sabedoria, o amor e as repreensões, que de tão carinhosas, tornaram-se ensinamentos preciosos e formativos, jamais esquecidos.

Alegrar-me e agradecer-te pela gênese... da minha vida, pelo estímulo ao estudo, que culmina, agora, neste trabalho e pelo porvir.

À minha mãe, *Celisa Molers Ernandes*, pelo amor e zelo que sempre demonstrou pela família e ajuda inestimável durante a realização de todo e qualquer trabalho que vise o engrandecimento pessoal de seus filhos.

Às minhas filhas, *Beatriz e Isabela*, pura alegria e travessura convertidas em amor, leveza e perseverança.

“... não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.”

Is 41:10

AGRADECIMENTOS

À Deus, por acompanhar-me em todos os momentos de minha vida.

À Profª Drª Iracema de Oliveira Moraes, primeiramente pelo acolhimento generoso em orientar-me, e sobretudo pela segurança que transmitiu -me durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ernandes, meu primeiro orientador, que com carinho e paciência paternais ensinou-me as primeiras técnicas laboratoriais, bem como o rigor e raciocínio na pesquisa científica.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica - IQ - Araraquara pelo auxílio e amizade no início do programa de pós-graduação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IQ - Araraquara, Izolina, Sandra, Carlos e Vilma pelos esclarecimentos e prontidão com que sempre me atenderam.

À Drª Deise M. F. Capalbo e Dr. Roberto da Silva pelas sugestões durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Vanildo Luiz Del Bianchi, pela preciosa sugestão em trabalhar com sangue, acompanhamento e esclarecimentos na realização do trabalho experimental.

Ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - UNESP-São José do Rio Preto, por conceder os laboratórios e equipamentos para que o trabalho fosse executado.

Ao técnico João Carlos C. de Oliveira, pela preciosa ajuda e sugestões e pelos momentos de descontração no laboratório.

Aos técnicos Tânia Maria Vinturim, Ginaldo Vieira dos Santos e Luis Carlos Camolezi, pelo constante auxílio.

À estudante de Engenharia de Alimentos Karina Brazil de Souza, não só pela ajuda na rotina laboratorial, mas sobretudo pela amizade.

Ao Frango Sertanejo, representado pelo Caseri e Leandra, a minha gratidão pela concessão do sangue de ave, algumas referências bibliográficas e fotos.

Ao Guapiasuínos, pela concessão do sangue de suínos.

Aos Laticínios Colar, pela concessão do soro de queijo.

À Refinações de Milho Brasil, pela concessão da milhocina.

À amiga Cristine Benfatti Gonzalez, que segue comigo nesta caminhada desde a nossa graduação, com amizade e companheirismo.

À Andréa T. Andrade, pela amizade e descontração durante os longos períodos no laboratório.

À amiga Patrícia Raquel Kharfan, por acreditar na seriedade do meu trabalho e pelas oportunidades que me proporcionou.

Ao meu irmão Marsel, pelo apoio e compreensão.

Aos meus avós, tios e primos, que indiretamente propiciaram a realização deste trabalho.

À Maria e Rosinéia, que, com carinho, garantem o bem estar de minha família.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FOTOS E FLUXOGRAMA	16
RESUMO	18
I - INTRODUÇÃO	19
II - REVISÃO DA LITERATURA	21
II.1 - Controle microbiano de insetos	21
II.2 - Fungos, nematóides e protozoários	23
II.3 - Bactérias e o Controle Biológico	23
II.3.1 - Características gerais do microrganismo	24
II.3.2 - Toxinas	25
II.4 - Processo de produção	28
II.4.1 - Etapas	28
II.4.1.1 - Fermentação	28
a) Semi-sólida	28
b) Submersa	29
II.4.1.2 - Recuperação do produto	30
II.4.1.3 - Padronização	30
II.4.1.4 - Formulação	30
II.4.2 - Meio de cultura	30
a) Necessidades nutricionais e variáveis físico-químicas	30
b) Utilização de resíduos ou sub-produtos agroindustriais	31
c) Algumas considerações sobre sangue de animais	35
II.4.3 - Influência da fonte nitrogenada	37
II.5 - Situação mundial e brasileira em relação à produção de bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
III - OBJETIVOS	40

IV - MATERIAL E MÉTODOS	41
IV.1. Microrganismo	41
IV.2. Meios de cultura	41
IV.2.1. Meio de manutenção	41
IV.2.2. Meios de fermentação	41
IV.3. Inóculo	44
IV.4. Equipamentos	44
IV.5. Determinação do crescimento celular	44
IV.6. Determinação do teor de nitrogênio	44
IV.7. Determinação da quantidade de açúcar redutor	45
IV.8. Processo de atordoamento e sacrifício para a obtenção do sangue de animais	45
a) Aves	45
b) Suínos	50
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
V.1. Estudos preliminares em meio estéril contendo sangue de suíno e glicose	51
V.2. Estudos realizados com sangue de suíno não estéril e glicose	52
V.3. Estudos realizados com sangue de ave não estéril e glicose	55
V.4. Estudos realizados com água de maceração de milho (milhocina)	71
V.5. Estudos com efluente de indústria cervejeira	73
V.6. Estudos com soro de queijo	74
V.7. Análise do teor de nitrogênio dos resíduos utilizados	75
VI - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	76
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
<i>Abstract</i>	81

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Porcentagem de artigos científicos na área de controle microbiano publicados até o início de 1997 (total 350 trabalhos).....	22
Figura V.1. Crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura estéril composto por sangue de suíno nas concentrações de 10, 16 e 20 g/l e glicose 6 g/l.....	51
Figura V.2. Variação de pH durante crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura estéril composto por sangue de suíno nas concentrações de 10, 16 e 20 g/l e glicose 6g/l.....	51
Figura V.3. Crescimento de <i>B.t.</i> em sangue de suíno nas concentrações de 50 e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	52
Figura V.4. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	53
Figura V. 5. Crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	54
Figura V.6. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	54
Figura V.7. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de <i>B.t.</i> em sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	55
Figura V.8. Crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	56
Figura V.9. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	57
Figura V. 10 - Comparação do crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em sangue de ave e sangue de suíno nas concentrações de 50 e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	58
Figura V. 11. Crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	58
Figura V. 12. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	59

Figura V. 13. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de <i>B.t.</i> em sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.....	59
Figura V. 14. Crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l e glicose 6 g/l.....	60
Figura V. 15. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l e glicose 6 g/l.....	60
Figura V. 16. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de <i>B.t.</i> em sangue de ave nas concentrações de 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l e glicose 6 g/l.....	61
Figura V. 17. Comparação do crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de ave (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.....	68
Figura V. 18. Comparação da variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.....	68
Figura V. 19. Comparação do crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de suíno (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.....	69
Figura V. 20. Comparação da variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.....	69
Figura V. 21. Comparação do crescimento de <i>B.t.</i> em meio de cultura composto por sangue de ave e sangue de suíno (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com pré-fermentação.....	70
Figura V. 22. Comparação da variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno e sangue de ave (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com pré-fermentação.....	70
Figura V. 23. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de <i>B.t.</i> em sangue de suíno e sangue de ave (100 g/l) e glicose 6 g/l em experimento com pré-fermentação.....	71
Figura V. 24. Crescimento de <i>B.t.</i> em milhocina nas concentrações de 4 g/l, 8 g/l, 12 g/l e 16 g/l.....	72

Figura V. 25. Variação de pH durante crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em água de maceração de milho ("milhocina"), nas concentrações de 4, 8, 12 e 16 g/l.....	72
Figura V. 26. Crescimento de <i>B.t.</i> em efluente de indústria cervejeira, utilizado nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g/l.....	73
Figura V. 27. Variação de pH em meio de cultura composto por efluente de indústria cervejeira, utilizado nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g/l.....	73
Figura V. 28. Crescimento de <i>B.t.</i> em soro de queijo nas concentrações de 50 e 100 g/l.....	74
Figura V. 29. Variação de pH em meio de cultura composto por soro de queijo nas concentrações de 50 e 100 g/l.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1: Fases e Custos de desenvolvimento de um Inseticida Químico e um Biológico.....	24
Tabela II.2: Composição de amostra de farinha de soja.....	32
Tabela II.3: Composição de duas amostras de água de maceração de milho.....	32
Tabela II.4: Composição em aminoácidos, da água de maceração de milho.....	33
Tabela II.5: Composição de mistura de vários lotes de milhocina da RMB.....	33
Tabela II.6: Composição de amostras de Melão de Cana.....	34
Tabela II.7: Composição de Melão em pó.....	34
Tabela II.8: Composição de meios de cultura para fermentação de <i>Bt</i>	34
Tabela II.9: Rendimentos em diferentes meios de cultura.....	35
Tabela II.10: Composição bioquímica do plasma sanguíneo.....	37
Tabela IV.1: Formulação dos meios de cultura utilizados.....	42
Tabela IV.2: Composição química do sangue de suíno.....	42
Tabela IV.3: Percentuais obtidos de análises químicas da água de maceração de milho ("milhocina").....	43
Tabela IV.4: Análise química de rotina do efluente de indústria cervejeira.....	43
Tabela IV.5: Composição química do soro de leite.....	43
Tabela V.1. Análise do teor de nitrogênio dos resíduos utilizados.....	75

LISTA DE FOTOS

Foto 1. Aves suspensas pelos ganchos antes de entrarem no tanque de atordoamento.....	46
Foto 2. Aves saindo do tanque de atordoamento.....	47
Foto 3. Aves em direção à fâca giratória para a efetivação da sangria.....	49
Foto 4. Aves recém saídas do processo de sangria.....	49
Foto 5. Detalhe do local da sangria e tanque coletor.....	49
Foto 6- Fotomicrografia óptica (a) de tubo de manutenção de <i>B.t.</i> concedido pela EMBRAPA, evidenciando células vegetativas (1), em processo de esporulação (2) e cristais(3).....	62
Foto 7- Fotomicrografia óptica (b) de tubo de manutenção de <i>B.t.</i> concedido pela EMBRAPA, evidenciando células vegetativas (1), em processo de esporulação (2) e cristais(3).....	62
Foto 8 - Linhagem utilizada na realização deste trabalho (tubo de manutenção), evidenciando esporos e cristais.....	63
Foto 9 - Processo fermentativo em sangue de ave (3 horas).....	63
Foto 10 - Processo fermentativo em sangue de ave (6 horas).....	64
Foto 11- Processo fermentativo (12 horas).....	64
Foto 12- Processo fermentativo (12 horas).....	65
Foto 13- Processo fermentativo (24 horas) (a), evidenciando o início da formação dos cristais.....	65
Foto 14- Processo fermentativo (24 horas) (b), evidenciando o início da formação dos cristais.....	66
Foto 15- Processo fermentativo (36 horas) (a), evidenciando o maior número de cristais.....	66
Foto 16- Processo fermentativo (36 horas) (b), evidenciando o maior número de cristais.....	67

Foto 17- Processo fermentativo (36 horas) (c), evidenciando o maior número de cristais.....	67
---	----

FLUXOGRAMA

Fluxograma II.1.....	28
Fluxograma II.2.....	36

RESUMO

Foi estudado o desenvolvimento de um microrganismo por fermentação submersa usando resíduos da agroindústria e pecuária como principal substrato fermentativo, com a finalidade de obtenção de um biopesticida para uso contra pragas da Agricultura ou da Saúde Pública.

A literatura apresenta os conceitos de Controle Biológico e de Controle Microbiano, sendo que o presente trabalho estudou o desenvolvimento do *Bacillus thuringiensis* comparando seu desenvolvimento sobre substratos já reconhecidos, como melação, água de maceração de milho, glicose, com outros tais como, soro de queijo, água de cervejaria, sangue de aves e sangue de suínos.

O processo foi desenvolvido em agitador rotatório, sendo as variáveis do processo fermentativo, pH inicial, temperatura, agitação e aeração respectivamente 7,3; 30 ° C, 150 rpm e a relação 1/5 entre volume de meio de cultura para volume nominal de frasco (50 ml/250 ml).

Os experimentos usando sangue como substrato, mostraram que a esterilização do sangue reduz o pH inicial do meio de cultura a níveis incompatíveis com o crescimento bacteriano e o meio de cultura não esterilizado apresentou bom crescimento do *Bacillus thuringiensis*, com a consequente esporulação e formação de cristais.

Foram acompanhados o comportamento do pH e do consumo de açúcar, bem como por microscopia o aparecimento de cristais e esporos, os quais são apresentados por fotos.

Os resultados obtidos permitem concluir que o sangue de aves especialmente, por permitir crescimento e esporulação mais rápidos, mas também o de suínos, que se constituem resíduos abundantes e poluentes, podem ser utilizados com vantagens para a produção de biopesticidas de *Bacillus thuringiensis*.

1 - INTRODUÇÃO

Estima-se que sejam conhecidos 1 milhão de espécies de insetos, de um total de mais de 2,5 milhões que, provavelmente, ocorrem sobre a Terra. Desse total, cerca de 10% podem ser considerados pragas da agricultura ou pragas urbanas. Assim, se cada espécie de inseto for atacada por, no mínimo um patógeno, pode-se inferir que a patologia de insetos e o controle microbiano terão, no futuro, importância relevante no controle dos insetos-praga e na cura de doenças dos insetos úteis.

O controle biológico de pragas é um conceito antigo e bem estabelecido sendo que os antigos Chineses usavam um tipo de formigas, chamadas de "Pharaoh's ants", em celeiros para combater insetos destrutivos de grãos armazenados. Até o desenvolvimento de pesticidas químicos, o controle biológico, primariamente através de práticas culturais, foi o único método de proteção de culturas agrícolas.

O controle microbiano de insetos utiliza microrganismos patogênicos isolados de insetos doentes durante epidemias que ocorrem naturalmente. Estes microrganismos produzem certas toxinas (esporos, células ou outros produtos) durante seu desenvolvimento e estas apresentam algumas atividades entomopatogênicas. Pesticidas microbianos são formulações que contém os esporos, células vegetativas ou algum metabólito do desenvolvimento dos microrganismos patogênicos e que mantêm a característica de entomopatogenicidade.

O número de pesticidas comercializados mundialmente, baseados em bactérias, fungos, vírus e outros está crescendo rapidamente, porém em bem menor velocidade e concentração, que aqueles que possuem significantes vendas, como os químicos. O grande otimismo que recai sobre o desenvolvimento e uso de biopesticidas é baseado principalmente na possibilidade de minimizar o uso indiscriminado de pesticidas químicos, e nos benefícios que isto poderia implicar. Até agora, os biopesticidas aplicados não se mostraram tóxicos para o homem e os mamíferos de uma maneira geral, intervêm de uma maneira menos drástica em sistemas ecológicos e não persistem no ambiente muito tempo depois de satisfazerem o seu propósito. Os que permanecem muito mais tempo já pertenciam àquele habitat. Desta forma, devido à velocidade de crescimento da informação pública e às restrições governamentais um tanto rigorosas aos pesticidas químicos, o futuro dos "biológicos" parece ser promissor.

As bactérias, representadas principalmente pelas diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis*, são os patógenos que, nos últimos trinta anos, receberam maior atenção por parte das indústrias em todo mundo. Cerca de 50% das formulações de produtos microbianos existentes no mercado são produzidos à base das diversas espécies e variedades de *Bacillus*.

A grande evolução das pesquisas com bactérias entomopatogênicas pode ser explicada pelos seguintes motivos:

- Facilidade de produção em larga escala, usando, tanto o método de fermentação submersa como o de fermentação semi-sólida, com substratos de baixo custo;
- A maioria dos resíduos ou águas residuárias agroindustriais, pode ser utilizada em virtude da natureza do patógeno e da existência de uma tecnologia de fermentação plenamente adaptável às necessidades desses microrganismos;
- Ação entomopatogênica rápida, baseada na presença de toxinas e esporos estáveis durante os processos de obtenção, formulação e comercialização do produto;
- Grande especificidade hospedeira e boa eficiência quando comparados com os pesticidas químicos, sendo essas características ideais para a utilização em programas de Manejo Integrado de Pragas - MIP, em culturas nas quais o nível de danos pode ser elevado;
- Preços compatíveis com os dos pesticidas químicos, principalmente se forem computados os custos ecológicos, dentro de uma avaliação econômica criteriosa, a qual já demonstrou serem os produtos microbianos, em média, cinco a dez vezes superiores aos inseticidas químicos;
- Interesse crescente dos consumidores por produtos biológicos não-poluentes e de difícil aparecimento de resistência em campo, comprovada através de bioensaios cientificamente planejados.

As bactérias formadoras de esporos pertencem em sua maioria à família Bacillaceae, com ênfase para o gênero *Bacillus*. São também essas bactérias as de maior potencial para o controle biológico, pelas mesmas características que lhes conferem resistência às condições adversas ambientais e de processamento industrial.

II - REVISÃO DA LITERATURA

II.1 - Controle microbiano de insetos

Dos 2,5 milhões de insetos que ocorrem sobre a Terra, estima-se que sejam conhecidos 1 milhão de espécies de insetos. Deste total, cerca de 10% podem ser considerados pragas da agricultura ou pragas urbanas.

A patologia de insetos ou entomopatologia é a ciência que estuda as doenças dos insetos, abrangendo a etiologia, a sintomatologia e a epizootiologia, visando utilizá-las para o controle de pragas ou com o objetivo de evitá-las quando ocorrem em populações de insetos úteis.

O controle microbiano é a principal meta da entomopatologia representando um ramo do controle biológico de insetos. Este ramo, trata da utilização racional dos patógenos, visando a manutenção da população das pragas a níveis de danos econômicos (2).

A indústria de biopesticidas está usando especialmente o argumento ambiental para tentar acelerar a aprovação e o registro de seus produtos.

A maioria dos biopesticidas tem um alvo altamente seletivo, o que é considerado tanto uma vantagem quanto uma desvantagem. A especificidade de alvo permite atacar somente um patógeno, preservando seus predadores, assim como as espécies não alvo intimamente relacionadas e desta forma minimizando o impacto no ambiente natural. Entretanto, o mercado para pesticidas altamente específicos é bem menor do que para pesticidas de espectro amplo e isto tem um impacto na sua atratividade comercial.

Os bioinseticidas competem com os inseticidas químicos também em outros aspectos:

- Os custos de desenvolvimento e comercialização tendem a ser menores, devido à facilidade em obter registro e aprovações, especialmente para os microrganismos não manipulados geneticamente, em particular aqueles que ocorrem naturalmente no ambiente, porém ainda não existe uma forma de registro específica para os produtos biológicos;
- A aplicabilidade é maior em pragas nacionais ("soil-borne"), nas quais os pesticidas químicos tem um efeito limitado ou a aplicação é restringida pelo governo;
- Devido à crescentes problemas de resistência de alguns insetos, fungos e ervas daninhas aos pesticidas químicos, os biopesticidas podem conquistar o mercado mais facilmente.

As limitações mais importantes aos biopesticidas devem-se ao fato de se consistirem de organismos viáveis ou inviáveis, ao invés de materiais inanimados, como os "químicos", embora existam diferenças significantes entre os diversos tipos de organismos:

- A produção *in vivo* de biopesticidas é bastante demorada e às vezes difícil de ser aumentada;
- O tempo que a maioria dos microrganismos requer para a reprodução, os impede de manifestarem-se imediatamente no inseto alvo, o que pode resultar em perdas antes que a peste seja erradicada;
- A meia-vida, ou o tempo em que o biopesticida pode ser estocado antes de sua aplicação, é restrito a poucos dias acima de 18 meses;
- Muitos microrganismos têm um curto tempo de persistência no ambiente, sendo que aplicações múltiplas podem ser necessárias.

Os custos de biopesticidas por aplicação e/ou estação tendem a ser mais altos do que aqueles de pesticidas convencionais e esta é outra razão pela qual a maioria dos biopesticidas é limitada a mercados locais de culturas de alto valor econômico(11).

Mostrando o crescente interesse no assunto, apresenta-se abaixo (2) um balanço da literatura existente, ou seja, da produção de artigos científicos na área de controle biológico, relacionando-a com o organismo utilizado para o mesmo.

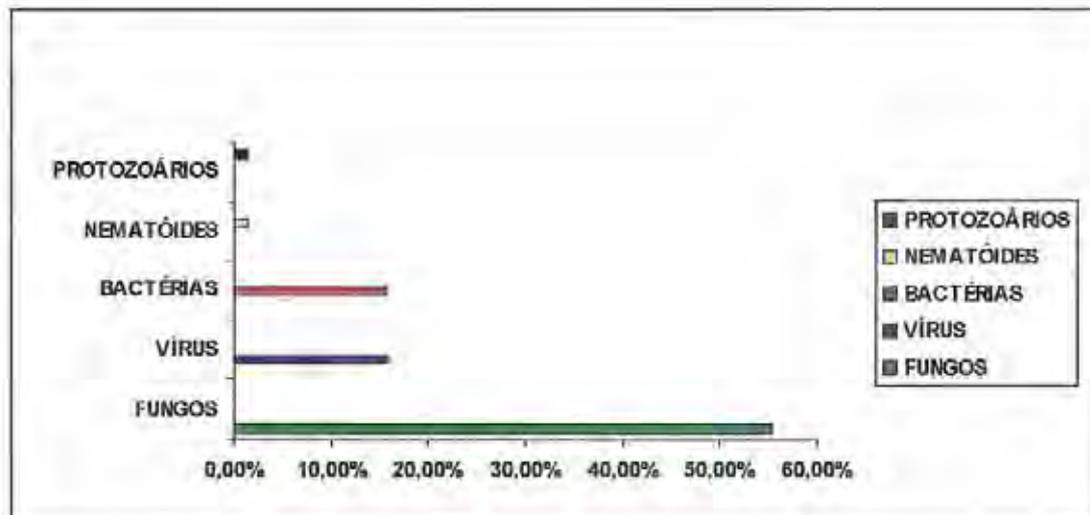


Figura 1.1. Porcentagem de artigos científicos na área de controle microbiano publicados até o início de 1997 (total 350 trabalhos).

II. 2 - Fungos, nematóides e protozoários

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano, no Brasil e no mundo de uma forma geral. Contudo, esse grupo de patógenos é, sem dúvida, o mais complexo para ser desenvolvido como inseticida microbiano e por isso estão pouco disponíveis em quantidades e formulações adequadas para o controle das pragas (3, 4).

A principal desvantagem dos fungos como pesticidas microbianos envolve a faixa restrita de condições ambientais apropriadas para o seu uso. Aproximadamente todos os fungos entomopatogênicos requerem alta umidade e temperaturas moderadas. São recomendadas condições de umidade relativa acima de 85% por 10-12 horas/dia dentro de uma faixa de temperatura de 15-25°C. Então, em regiões temperadas o uso deste produto está restrito a estufas climatizadas de acordo com as necessidades do microrganismo (28). Menos de 15% das formulações de inseticidas microbianos são de natureza fúngica. Praticamente quase todas as formulações do mercado têm problemas de estabilidade, pureza e concentração de propágulos, entre outros.

O desenvolvimento de produtos à base de nematóides apresenta, além dos investimentos limitados na área, outros fatores, tais como problemas relacionados à produção e formulação e uso limitado para pragas subterrâneas ou aquáticas, sendo muito dependentes das condições de umidade do ambiente.

Quanto ao desenvolvimento comercial de protozoários como entomopatógenos, além dos baixos investimentos em pesquisa nessa área, o que repercute diretamente na qualidade dos produtos já desenvolvidos, pode-se somar o problema da estabilidade das formulações e a concorrência com os pesticidas químicos.

II.3 - Bactérias e o Controle Biológico

As vantagens oferecidas pelo uso das bactérias no Controle Biológico incluem a produção de esporos, que são bastante resistentes aos fatores adversos do ambiente; podem ser mantidas na forma de pó ou emulsão; são facilmente utilizadas em equipamentos projetados para aplicação de inseticidas químicos (25).

Dentre as desvantagens, está o fato de as bactérias agirem por via oral, não tendo nenhuma ação por contato. Sua ação geralmente se restringe a um estágio de desenvolvimento do inseto e, por consequência, a aplicação do produto deve ser mais precisa e controlada, diferentemente dos fungos que podem infectar os insetos através da cutícula (25 e 28). Este fato pode ocasionar o aumento de custo, pois, em se tratando de pragas agrícolas, uma superfície maior da planta deve ser abrangida quando se compara com a quantidade necessária de inseticidas que agem por contato (12).

A tabela abaixo permite estabelecer uma comparação entre o custo de produção de um inseticida químico e um bacteriano, desde o projeto à realização (23).

Tabela II.1: Fases e Custos de desenvolvimento de um Inseticida Químico e um Biológico(Thuricide).

Fases	1000 US\$	
	Sevin	Thuricide
Síntese - seleção	500	80
Laboratório	200	480
Teste de campo	300	250
Toxicologia	350	250
Patente	25	25
Formulação	80	100
Desenvolvimento do produto	450	355
Desenvolvimento do processo	350	275
Estudo de mercado	250	200
	-----	-----
	2505	2015
IGNOFFO,C.M., citado em 23.		

Nos EUA, o mercado para pesticidas à base de bactérias, fungos, vírus e feromônios foi estimado em US\$107 milhões em 1990, ou 2,5% do total das vendas de pesticidas. É esperado que este mercado cresça 11% ao ano até alcançar US\$300 milhões até 1999. Os produtos mais importantes são baseados no *Bacillus thuringiensis* (Bt), que representa cerca de 90% do total de vendas de biopesticidas. De acordo com um artigo comercial de 1991, as vendas de biopesticidas à base de Bt dobraram desde 1987 e espera-se um aumento de cerca de 20% ao ano (11).

II.3.1 - Características gerais do microrganismo

Bacillus thuringiensis (B.t.) é uma bactéria mesófila (28°-35°C), aeróbica ou anaeróbica facultativa e gram - positiva. Foi isolada pela primeira vez pelo bacteriologista japonês ISHIWATA em 1902 de larvas de *Bombyx mori* (bicho da seda). Em 1915, BERLINER isolou, na Alemanha, o mesmo microrganismo das lagartas de grãos de trigo *Anagasta kuehniella*. Esse material é considerado atualmente como *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (serótipo H-1) (20, 24).

A existência de um corpo para-esporal nas células esporuladas de *B. thuringiensis* foi notada já em 1915 por BERLINER e em 1927 por MATTES, porém mereceu pouca atenção dado o estágio de conhecimento deste entomopatógeno. Foi somente em 1953 que HANNAY o redescobriu e em 1954

ANGUS demonstrou que esse corpo para-esporal era um cristal protéico, atuando como potente toxina a determinados insetos (24).

As primeiras notificações do uso do B.t. para o controle de insetos datam do final de 1920 e início de 1930 contra a broca do milho *Ostrinia nubilalis*, no sudeste da Europa, como parte de um projeto internacional fundado pelos EUA. Durante as duas décadas seguintes as pesquisas de campo contra lepidópteros continuaram na Europa e EUA. O primeiro produto comercial (Sporeine) foi produzido em 1938, na França. Mais produtos comerciais foram desenvolvidos durante a década de 50 em vários países, incluindo a URSS, Tcheco-Eslováquia, França e Alemanha. Nos EUA, o trabalho de STEINHAUS (1951) estimulou o interesse na comercialização do B.t., culminando na produção do Thuricide, em 1957 (18).

Com o grande número de isolados de *B. thuringiensis* obtidos em vários países até o início da década de 60, surgiram os problemas de classificação das diferentes variedades desse bacilo. A introdução de serótipos baseados no antígeno flagelar (método serológico do antígeno-H, aglutinação flagelar), ou seja, antígeno-H, além de parâmetros bioquímicos mais precisos, facilitou bastante a diferenciação entre os vários isolados. A revisão de De BARJAC & FRANCHON (1990) estabeleceu 27 serótipos, e em 1998 são relatadas 45 diferentes variedades (20).

II.3.2 - Toxinas

As variedades de *B. thuringiensis* produzem algumas toxinas já caracterizadas, além de substâncias de ação tóxica pouco definida para muitos insetos. As toxinas que se seguem são as mais importantes:

- **δ -endotoxinas (toxinas do cristal)**

O cristal protéico (corpo parasporal), descoberto por HANNAY (1953), é um agregado de moléculas, geralmente em forma bipiramidal, com peso molecular de aproximadamente 230.000 daltons. Sabe-se que os cristais podem variar em tamanho, forma e número entre os diferentes serótipos de *B. thuringiensis*, dependendo também da composição do meio de cultura utilizada para a produção deste microrganismo (20).

SRINIVAS *et al.* (1995), estudando variações na morfologia do cristal induzida pela composição do meio, verificou que em agar-nutriente e em agar Luria, os cristais assumiam formatos irregulares com dimensões de cerca de 1,9 μ m. Em meio mínimo, os cristais eram bipiramidais ou fusiformes, assemelhando-se a halteres e raramente grandes dependendo das concentrações de casaminoácidos e glicose utilizadas, com dimensões de 1,3 a 1,4 μ m por 4,1 a 6,3 μ m. Neste mesmo estudo, análises eletroforéticas mostraram que, apesar do formato diferente relacionado ao meio de cultura, os cristais mantinham as mesmas composições polipeptídicas.

Na maioria dos casos, os cristais localizam-se fora do exosporio e representam o componente principal dos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*.

Os cristais da maioria das linhagens desse patógeno podem conter, na verdade, mais de uma toxina, com peso molecular entre 26 e 140 Kda, e hoje seria mais conveniente chamá-las de δ -endotoxinas, ou simplesmente toxinas do cristal.

Após o crescimento vegetativo em meio artificial, *B. thuringiensis* transforma-se num esporo resistente às condições ambientais adversas. O cristal é formado durante esse processo de esporulação.

As características químicas, serológicas e patogênicas da proteína do cristal são idênticas às da proteína da parede do endosporo. Entretanto, a quantidade de proteína na parede do esporo é bem menor do que a do cristal, tendo então, seu efeito mascarado pelo efeito daquela do cristal.

Atualmente, sabe-se que o cristal protéico de *B. thuringiensis*, em si, não tem ação tóxica, sendo considerado como pró-toxina. A sua dissolução em meio alcalino (acima de pH 8), em tampões alcalinos redutores, ou em solução de enzimas proteolíticas, resulta em moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos. Desse modo, as δ -endotoxinas seriam algumas dessas moléculas que participam na formação do cristal e a dissolução desse cristal é sempre necessária para a liberação e atuação das δ -endotoxinas. Esse fato explica a razão pela qual apenas os insetos de pH intestinal alcalino são susceptíveis a esse patógeno e por que injeções intrahemocélicas do cristal intacto não têm efeito tóxico. Sabe-se portanto que a ação tóxica das δ -endotoxinas depende da dissolução do cristal em meio enzimático alcalino.

Uma revisão de HOFTE & WHITELEY (1989) trata da classificação, genética e modo de ação das proteínas tóxicas do cristal de *B. thuringiensis*. Os estudos sugerem que treze genes chamados *cry* especificam uma família de proteínas (δ -endotoxinas) com ação inseticida, que podem ser separados em quatro grandes grupos com vários sub-grupos, baseando-se nas similaridades estruturais e no espectro de ação das toxinas que codificam. Assim, os genes *cry* I estariam associados às toxinas ativas contra lepidópteros, os genes *cry* II às toxinas específicas para lepidópteros e dípteros, os *cry* III aos coleópteros e, finalmente, os *cry* IV aos dípteros. O *cyt* A, existente em algumas linhagens, codifica uma toxina que é citolítica e ativa contra dípteros e não se relaciona estruturalmente com os genes *cry*. Nos últimos anos, outros genes para as toxinas de *B. thuringiensis* foram sequenciados e analisados, sendo que FEITELSON et al. (1992) relacionam 29 proteínas dos cristais, sugerindo duas novas categorias, *cry* V e *cry* VI, na classificação de HOFTE & WHITELEY (1989), para abrigar as toxinas ativas contra nematóides (20)

- **β -exotoxina (thuringiensina)**

Distingue-se a exotoxina do complexo esporo-cristal ao menos em quatro aspectos: termoestabilidade a 121°C por 15 minutos, espectro das espécies de insetos susceptíveis, sintomas diferentes e existência de alguns sorotipos de B.t. não produtores do complexo endotóxico que são produtores da exotoxina termoestável. Além disto, é aquosolúvel e não está restrita a insetos com pH intestinal alcalino. A gama de espécies de insetos susceptíveis a ela é bem maior que ao cristal (δ -endotoxinas) produzido pela mesma bactéria e é capaz de causar a morte em espécies de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera e Orthoptera. A thuringiensina também é considerada tóxica para outros invertebrados, como ácaros e nematóides. A ação mutagênica e a inibição da biossíntese de RNA em alguns mamíferos, resultaram na limitação do uso de algumas linhagens produtoras dessa toxina (20, 25 e 28).

Em entomologia, definem-se as endotoxinas produzidas pelos microrganismos entomopatogênicos como sendo aquelas toxinas ligadas à célula microbiana, enquanto as exotoxinas são aquelas excretadas no meio de cultura. Nesse sentido, a toxina termoestável de B.t. é definida como exotoxina. SEBESTA *et al.* (1981) afirmaram que a produção da exotoxina se faz principalmente por algumas linhagens do serótipo HD-1 (var. *thuringiensis*) que se dá durante a fase exponencial do crescimento, completando-se na esporulação (25).

- **α -exotoxina (“toxina de camundongos” ou “toxina termossensível”)**

É solúvel em água, termolábil e tóxica para insetos. Exige um intervalo de pH entre 6,6 e 7,4 para melhor atuação. Esta toxina foi encontrada no sobrenadante de culturas de *B. thuringiensis* por KRIEG (1971) e foi demonstrada ser tóxica para camundongos (20).

- **Toxina dos piolhos**

GINGRICH *et al.* detectaram alta susceptibilidade de quatro espécies de piolhos de mamíferos a uma linhagem não produtora de β -exotoxina, substância tóxica inclusive para esses insetos. Como a δ -endotoxina não tem efeito patogênico nos piolhos, pois o pH intestinal não permite a dissolução do cristal, a morte desses piolhos foi atribuída então a uma nova substância denominada como fator piolho, “louse-factor” (20).

- **$\hat{\nu}$ -endotoxina A:** produzida por *B.t. var morrisoni* e ativa contra coleópteros.
- **$\hat{\nu}$ -endotoxina B:** produzida por *B.t. var tobworthi* e ativa contra *Leptinotarsa decemlineata*.

- Outras toxinas ativas contra nematóides e mosca -dos-chifres.

II.4 - Processo de produção

Para a produção comercial de microrganismos ou produtos microbianos, há a necessidade de seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo e de variações, a fim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições de fermentação econômicas, segundo MORAES et al , 1998.

II.4.1 - Etapas

Pode-se esquematizar a produção comercial do inseticida de B.t. através do Fluxograma II.1:



II.4.1.1 - Fermentação

Os processos fermentativos envolvem várias etapas na obtenção de grandes quantidades de células e/ou seus metabólitos.

Em biotecnologia basicamente dois tipos de métodos de produção de *B.t.* são usados: (a) fermentação semi-sólida e (b) fermentação submersa. Esta pode ser contínua ou descontínua.

a) Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida (FSS), é um sistema de produção alternativo para obtenção de algumas substâncias, a partir de microrganismos que se desenvolvem na superfície de substratos sólidos.

Do ponto de vista da engenharia de processos, a FSS oferece características atrativas, tais como: meio de cultura muitas vezes natural e simples, utilizando resíduos agroindustriais e aeração facilitada pelos espaços vazios entre partículas do substrato (25). Entretanto, a produção através de FSS apresenta uma série de dificuldades. Problemas com o suprimento de ar ao meio, prevenção da contaminação, controle da fermentação, rendimento e lucro comparativamente menores dessa técnica, fazem-na menos utilizada, ou até mesmo, impraticável como um método de produção comercial (28).

A fermentação submersa é, então, o método preferido para a produção industrial em massa.

b) Fermentação submersa

A fermentação submersa pode ser contínua ou descontínua.

Na fermentação contínua existe um fluxo constante de meio de cultura estéril ao fermentador. As condições de equilíbrio do sistema podem ser manipuladas de forma a permitir um estudo profundo da cinética do crescimento do microrganismo e dos produtos de seu metabolismo. A fase de crescimento exponencial pode se prolongar por um longo período de tempo (30). Apesar de a técnica de cultura contínua ter sido alvo de muitos ensaios e utilizada com sucesso para fermentações industriais, o uso de cultura contínua, especificamente para microrganismos esporuláveis, é impraticável. Pode-se operar com um sistema multi-estágio em que a fermentação contínua se executa até a fase exponencial e depois num outro estágio, em descontínuo, opera-se a esporulação (24).

A fermentação submersa descontínua caracteriza-se por ser executada em bateladas, ou seja, não admite fluxo constante de meio de cultura ao fermentador. Desde meados do século XX, todos os produtos contendo B.t. têm sido obtidos por fermentação submersa descontínua, variando apenas a forma de recuperação dos esporos e a formulação final. É indiscutivelmente, para a produção de entomopatógenos, o método mais produtivo, econômico, simples (em escala comercial), reproduzível e seguro (30, 28, 25).

Uma fermentação submersa descontínua típica é iniciada pela inoculação em um frasco de meio de cultura estéril, com uma alça de bactéria proveniente de uma placa ou tubo de ensaio contendo meio de manutenção de B.t. Este frasco é incubado em um agitador (pré-fermentação), com temperatura e pH definidos.

A cultura é usada então para inocular um fermentador maior com o mesmo meio de cultura estéril, e assim sucessivamente, até se atingir o volume final desejado. O volume de inóculo varia de 1 a 10%, conforme as demais condições de cultivo.

É no estágio final das fermentações que as fontes de nutrientes se tornam limitantes, o que promove a etapa final de esporulação, chegando-se à obtenção de um grande número de cristais e esporos.

II.4.1.2 - Recuperação do produto

Após concluída a fermentação separa-se o complexo esporo-cristal ou endotoxina do mosto de fermentação, no qual permanecem as exotoxinas. Esta separação é geralmente feita por centrifugação ou filtração e é a etapa de recuperação do produto. Depois disto segue-se a purificação da endotoxina que pode ser feita pelo método de Dulmage citado por MORAES, 1973 (23), de co-precipitação com lactose e acetona.

II.4.1.3 - Padronização

Posteriormente, chega a fase de normalização (padronização) do produto, na qual empregam-se biotestes para determinar o grau de susceptibilidade do inseto-teste ao inseticida. Nos insetos-teste são verificadas as respostas às aplicações de várias concentrações do inseticida, determinando-se a dose letal média, DL₅₀, que indica o nível de toxicidade aguda de cada inseticida. (25)

II.4.1.4 - Formulação

Na etapa de formulação, são acrescentados ao entomopatígeno (princípio ativo), determinados compostos que melhoram o seu desempenho no campo, facilitam o manuseio e a aplicação e, principalmente, permitem o armazenamento sob condições nas quais se minimiza o custo, com perda mínima das qualidades do produto (23,7).

II.4.2 - Meio de cultura

a) Necessidades nutricionais e variáveis físico-químicas.

A composição do meio de cultura para fermentação deve constar de água, carbono e nitrogênio, para biossíntese e energia, e traços de minerais. Alguns íons como Ca, Mn, Mg, Cu, Fe, Co e Zn melhoram o crescimento e a esporulação. Além disso, sais de fosfato podem ser adicionados devido à sua capacidade tamponante.

As condições de cultura do B.t. são otimizadas para atingir dois objetivos: altas densidades celulares e altas taxas de esporulação.

A maioria das linhagens não crescem em meio com glicose a menos que sejam suplementadas por alguma fonte de aminoácidos, por exemplo, peptonas ou extrato de leveduras. Já que o B.t. produz exoproteases, os aminoácidos podem ser substituídos por proteínas ou peptídeos. Além das fontes de proteína a maioria dos meios também contém açúcar, principalmente como fonte de energia (35)

Como determinado por DULMAGE (1993), crescimento e rendimento não variam muito entre temperaturas de 26° C até 34° C; entretanto o melhor rendimento em esporos foi obtido quando a temperatura foi mantida em 30° C.

O oxigênio deve ser continuamente suprido, para se atingir um alto rendimento em esporos e conseqüentemente em endotoxinas.

As condições de operação comumente utilizadas industrialmente, indicam um pH inicial de 7,2 a 7,6 para o meio de fermentação (25).

b) Utilização de resíduos ou sub-produtos agroindustriais

Quando se trabalha em escala laboratorial, o meio de cultura para fermentação é geralmente preparado usando um dos meios padronizados pela Difco, Oxoid, BBL, etc. Para isolar microrganismos ou promover o crescimento de bactérias em tubos de ensaio, o alto custo desses meios é mais do que compensado pela reprodutibilidade e facilidade de uso. Entretanto, quando grandes quantidades de meio de cultura são necessárias é preciso encontrar fontes alternativas de nutrientes. Obviamente que tais materiais, devido ao seu baixo custo, não são tão puros ou padronizados quanto os seus similares laboratoriais.

A fim de minimizar o custo de produção, a maior parte das fontes nutricionais são encontrados entre bioprodutos, resíduos agrícolas ou águas residuárias industriais. Sendo assim, como fonte de carbono podem ser usados melaço de cana, melaço de beterraba e amido/fécula de cereais, raízes ou tubérculos. O nitrogênio pode ser suprido como sais de amônio, porém como fontes mais econômicas temos a água de maceração de milho, farinha e farelo de soja e caseína hidrolizada (24).

Dentre estes subprodutos, os melaços, a água de maceração de milho e a farinha de soja são os mais utilizados para a produção de microrganismos em larga escala.

A farinha de soja é uma fonte de nitrogênio complexa, onde o nitrogênio não está prontamente disponível aos microrganismos, embora os actinomicetos sejam frequentemente cultivados neste substrato. A farinha desengordurada é geralmente extraída removendo a fração lipídica que perfaz acima de 18-22% do grão de soja. A composição de uma amostra da farinha, apresentada pela British Soya Products Ltd (34), segue-se na tabela II.2. a seguir.

Tabela II.2: Composição de amostra de farinha de soja (34):

<u>Constituintes</u>	<u>%</u>
Nitrogênio total	11,2
Lípidios	0,6
Carboidratos totais	29,9

A água de maceração de milho é um produto que contém glicose e amido, extraídos no processo de maceração. O milho é macerado em uma solução de dióxido de enxofre diluída e muitos resíduos minerais e nitrogenados são retirados do milho. Quando evaporado até obter 50-55% dos sólidos totais, o material é usado largamente nas indústrias de fermentação. Assim como outros produtos naturais, a composição da água de maceração de milho varia com a composição do milho e o processo usado.

A tabela abaixo mostra a composição de duas amostras de água de maceração de milho, produzidas pela Corn Products Ltd. and Albion Sugar Co. Ltd (34).

Tabela II.3: Composição de duas amostras de água de maceração de milho (34):

<u>Constituinte</u>	<u>Amostra A</u>	<u>Amostra B</u>
Sólidos totais	52,0%	50,7%
Nitrogênio total	4,3%	3,7%

Muito do nitrogênio presente neste substrato está na forma de aminoácidos. RHODES and FLETCHER (1966) citados em (34) apresentam esta análise, conforme mostrado na tabela , a seguir.

Tabela II.4: Composição em aminoácidos, da água de maceração de milho (34):

Aminoácidos presentes na água de maceração de milho

<u>Aminoácido</u>	<u>% de nitrogênio</u>
Alanina	<25,0
Arginina	8,0
Ácido glutâmico	8,0
Leucina	6,0
Prolina	5,0
Isoleucina	3,5
Treonina	3,5
Valina	3,5
Fenilalanina	2,0
Metionina	1,0
Cistina	1,0

MORAES, I.O, 1976 (24) determinou a composição média de nitrogênio de uma mistura de vários lotes de água de maceração de milho ("Milhocina") das Refinações de Milho Brasil.

Tabela II.5: Composição de mistura de vários lotes de milhocina da RMB (24)

Composição da Milhocina

<u>Composição</u>	<u>%</u>
Sólidos totais	49,60
Nitrogênio total	3,75

Os melaços são obtidos das indústrias produtoras de açúcar e representa a substância que permanece depois que o açúcar branco refinado foi recristalizado a partir do açúcar marrom, não refinado.

Os melaços servem principalmente como fontes de carbono devido ao elevado teor de carboidratos, porém possuem em sua composição algum teor de nitrogênio e outras substâncias, especialmente vitaminas e sais minerais o que faz dele um substrato rico para fermentações.

A tabela II.6 mostra a composição de algumas amostras de melaço de cana, segundo WHITE (1948) citados em (34).

Tabela II.6: Composição de amostras de Melaço de Cana (34)

	<u>Amostras</u>		
	A	B	C
Açúcares totais(%)	56	75	66
Nitrogênio(%)	0,48-0,59	0,08-0,13	0,29-0,45

MORAES, I.O., 1976 (24) determinou a composição de uma amostra de melaço em pó, a qual foi usada em seus experimentos de produção de *Bacillus thuringiensis*.

Tabela II.7: Composição de Melaço em pó (24)

<u>Composição</u>	%
Açúcares	52,0
Proteína bruta	2,0

MORAES, I.O., 1973, (23) estudando o efeito da adição de melaço ou “milhocina” ao meio de cultura referente à biomassa produzida, encontrou, através de resultados de peso seco, que os meios complementados com “milhocina” apresentavam rendimento ligeiramente superior ao daquele com melaço.

Tabela II.8: Composição de meios de cultura para fermentação de *Bt* (23)

Meio de cultura para fermentação

<u>Componentes (g/l)</u>	<u>Meio de cultura</u>	
	“Milhocina”	Melaço
KH ₂ PO ₄	1,0	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0
Caseína hidrolisada	23,0	23,0
Melaço	-	10,0
Milhocina	10,0	-
<u>Peso seco (g/l)</u>	4,4	4,2

A mesma autora, em 1976, estudando o meio de cultura mais viável economicamente, encontrou os maiores rendimentos (4,20 a 5,33 g/l) quando os dois substratos eram misturados nas seguintes proporções:

Tabela II.9: Rendimentos em diferentes meios de cultura (24)

Meio de cultura	"Milhocina"(g/l)	Melaço(g/l)	Biomassa (g/l)
1	10	25	5,33
2	10	30	4,80
3	10	20	4,20

Sendo assim, concluiu que, nas condições experimentais estudadas:

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

- O teor ótimo de melaço situou-se em torno de 10 g/l.

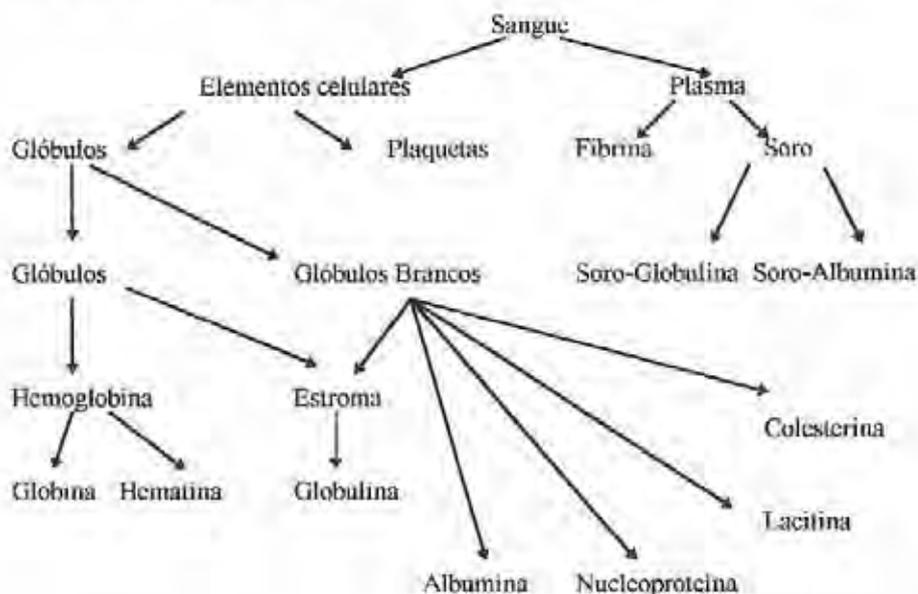
- O teor ótimo de água de maceração de milho situou-se em torno de 25 g/l.

Outros sub-produtos além dos descritos foram estudados e alguns trabalhos foram desenvolvidos com sangue de animais como substrato fermentativo. ERNANDES, S., 1997, (13) apresenta dados preliminares de fermentações realizadas com *B.t.*, tendo como substrato sangue de aves e suínos. Os resultados sugerem que estes substratos são viáveis na medida em que promoveram o crescimento do microrganismo, corroborando, também, o perfil de pH obtido por MORAES, 1976, (24) trabalhando com "milhocina" e melaço de cana. SOUZA, K. B., 1998, (32) trabalhando com sangue de suínos, estudou o efeito da esterilização do meio de cultura composto com estes substratos, verificando pequeno crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meios esterilizados.

c) Algumas considerações sobre sangue de animais

O sangue recolhido por ocasião do abate dos animais nos matadouros constitui um resíduo de elevado valor nutritivo, sobretudo em virtude de suas proteínas, ricas em ácidos aminados essenciais, vitaminas e sais minerais, a par do seu alto coeficiente de digestibilidade (27).

Os principais componentes plásticos do sangue podem ser vistos no Fluxograma II.2, representado a seguir:



O aproveitamento do sangue permite a utilização de diversificada gama de subprodutos, quer para fins de alimentação animal, quer para numerosas aplicações industriais.

Alguns produtos derivados do sangue:

1. Farinha de sangue: destinada à alimentação animal.
2. Sangue em pó: produto mais sofisticado, seja nos processos de elaboração, seja em relação às suas finalidades, em confronto com a farinha de sangue. Destinado principalmente para fins industriais (plásticos, adesivos).
3. Plasma (albumina branca). as proteínas plasmáticas têm sido usadas na indústria alimentícia principalmente para melhorar as propriedades emulsificantes, de ligar e reter água e melhorar as propriedades de textura de produtos cárneos e sistemas alimentícios diversos como em panificação e confeitaria. A obtenção do plasma inclui a adição de anticoagulante (31 e 27). GUNSTONE em PARDI (27), lembra que o plasma constitui excelente meio de cultura.

A composição bioquímica do plasma, conforme NAVARRO e PACHALY (1994), citado em (19), é a seguinte:

Tabela II.10: Composição bioquímica do plasma sanguíneo (NAVARRO E PACHALI, 1994)

Plasma

91,5% de água

7,5% de sólidos orgânicos: -7% de proteínas
 -0,5% de substâncias nitrogenadas,
 gorduras neutras, colesterol, fosfolipí-
 dios, glicose, enzimas e hormônios.

1% de sólidos inorgânicos: -minerais como Na, Ca, K, Mg, P, Cu
 e HCO₃.

4. Albumina vermelha (fração ou massa celular): subproduto obtido mediante a desidratação dos glóbulos vermelhos do sangue. Seu emprego é efetivo na indústria pelo seu poder adesivo e pela participação em determinadas conservas alimentares.
5. Soro: obtido quando não se emprega anticoagulante. Além do seu emprego pela indústria farmacêutica, sobretudo para a extração de certos hormônios, pode vir a ter papel mais destacado na terapêutica humana e veterinária.
6. Fibrina: obtida da desfibrinação do sangue. É empregada pela indústria farmacêutica para o preparo de peptonas e mesmo para determinados usos alimentares em mistura com sangue em pó.

Apesar do uso consagrado do sangue, como descrito anteriormente, é altamente preocupante o baixo índice de aproveitamento desse resíduo ou água residuária, sobretudo nos estabelecimentos menos qualificados, ainda que ele se destine a fins de alimentação animal, a fertilizante ou a certos empregos industriais.

É indispensável que se faça algo para evitar o desperdício que se traduz, também, em acentuada poluição ambiental, em prejuízo econômico e no desvio de matéria-prima nobre (27).

II.4.3 - Influência da fonte nitrogenada.

Muitas linhagens não crescem em meio com glicose, a menos que elas sejam suplementadas com alguma fonte de aminoácidos, como por exemplo peptonas ou extrato de levedura. Como o *B.t.* produz exoproteases, os aminoácidos podem ser substituídos por proteínas ou peptídeos.

Sabe-se que existe uma influência da fonte nitrogenada no crescimento celular. Em experimentos feitos com triptose, peptona e triptona, foi observado um crescimento mais rápido em meio complementado com peptonas,

sendo que o melhor rendimento, em peso seco, foi obtido em meio complementado com triptose (MORAES, I.O., 1973).

O efeito de aminoácidos no crescimento de *B.t.* H-14 foi estudado por ABDEL-HAMEED-A, 1992. Os resultados por ele obtidos evidenciam que a leucina e metionina promoveram um maior crescimento da bactéria. Nenhum efeito significativo no crescimento foi notado quando a serina, glicina, isoleucina ou treonina foram adicionadas individualmente ao meio de cultura.

LIU, W. M. e BAPJPAL, R. K., 1995, estudando as limitações havidas no cultivo contínuo e em batelada de fermentações de altas densidades, estabeleceram que as limitações seriam atenuadas somente pela adição de extrato de levedura ou água de maceração de milho; a adição de algum sal ou aminoácidos individuais não influenciaram o comportamento da cultura.

NUMATA et al., 1992, estudando os efeitos de quatro hidrolisados enzimáticos de células sanguíneas de porco, utilizados como fonte de nitrogênio, no crescimento de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* verificou que a diferença na composição de aminoácidos entre os quatro hidrolisados parecia não afetar o crescimento destas bactérias.

CHANG, C. L. e CHEN, H. C., 1994, estudaram os aspectos do crescimento de bactérias e fungos em hidrolisados de sangue de suíno em várias concentrações (5-20%), servindo como fonte de nitrogênio. O crescimento dos microrganismos foi acompanhado em meios modificados, na qual a triptona e a peptona foram substituídas por estes hidrolisados. Os padrões de tamanho, número ou pigmentação da maior parte das colônias dos microrganismos crescidos nos meios-teste foram superiores àqueles obtidos em meios comerciais.

FALOCI et al., 1990, analisando o efeito de vários meios de cultura no crescimento, rendimento em esporos e proteínas, incluindo delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, verificou que, das várias fontes de nitrogênio utilizadas, a Bacto-peptona, extrato de carne, peptona de caseína e peptona de carne garantiram uma concentração de proteína significativamente maior do que aquela obtida com extrato de levedura e casaminoácidos. Porém, em relação ao efeito tóxico, este mostrou-se mais efetivo quando no meio de cultura foram utilizados extrato de levedura, casaminoácidos ou Bactopeptona.

AVIGNONE ROSSA et al., 1990, monitorando o crescimento e a produção de delta-endotoxina em *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sob várias combinações de carbono e nitrogênio orgânico e inorgânico, observaram que quanto maior a concentração de extrato de levedura, maior era o valor de biomassa seca e de delta-endotoxina. O mesmo efeito foi obtido mantendo a concentração da fonte de nitrogênio constante e aumentando a concentração de glicose inicial. Alguns parâmetros indicam que qualquer que sejam as concentrações de carbono e nitrogênio utilizadas isto não afetou o metabolismo do microrganismo. Grandes diferenças tanto em rendimento da delta-endotoxina quanto em biomassa somente foram observadas quando o extrato de levedura foi suplementado com 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{l}$. Entretanto, quando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado como única fonte de nitrogênio, pouco ou nenhum crescimento foi observado. O extrato de levedura, como única fonte de nitrogênio, não garantiu uma boa produção da delta-

endotoxina. Os autores concluem que, pode-se verificar que combinações das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico afetam a produção da delta-endotoxina superando as diferentes combinações nas taxas de carbono e nitrogênio.

11.5 - Situação mundial e brasileira em relação à produção de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*.

Segundo ALVES et al (39), as formulações de *B. thuringiensis* são os produtos biológicos mais vendidos em todo o mundo representando cerca de 90 % do faturamento com esses produtos. O seu emprego destina-se principalmente para o controle de lagartas, pragas florestais (30 milhões de dólares) e vetores representados por pernilongos e borrachudos. O custo para o tratamento de um hectare de cultura varia de US\$ 7,5 a 15. Para o tratamento visando o controle de pernilongos, o custo envolvendo aplicação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* pode chegar a US\$ 67 o hectare. O mercado potencial para B.t. deve crescer 10% ao ano e atingir cerca de US\$ 150 milhões no ano 2000. Existem pesquisadores que acreditam em valores entre 300 a 750 milhões de dólares.

No Brasil, o mercado para esses produtos é também muito promissor, pois ocorrem cerca de quinhentas pragas de importância econômica.

Existem cerca de 65 produtos já desenvolvidos pelas indústrias, a partir de B.t., em diversas regiões do mundo, sendo 4 desenvolvidos por micro indústrias brasileiras.

Os principais produtos microbianos comercializados no Brasil são formulações de *B.t.*, normalmente importadas ou formuladas no país, sendo a Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. o principal fornecedor. Este mercado, baseado em estatísticas de faturamento global, foi avaliado em US\$ 2 milhões. Espera-se um possível crescimento do mercado em função da substituição dos produtos químicos usados para o controle de vetores. O produto Bactur PM é produzido pela Geratec e o custo de tratamento é de US\$ 9 por hectare. Atualmente, o mercado de *B. thuringiensis*, incluindo as variedades para o controle de lagartas e pernilongos, consome cerca de 160 toneladas, o que representa um faturamento aproximado de US\$ 2,48 milhões. O controle de borrachudos consome cerca de 90% das formulações a base da variedade *israelensis*, ficando o restante para pernilongos (5).

III - OBJETIVOS

Constituiu objetivo geral deste trabalho, estudar o desenvolvimento de *Bacillus thuringiensis* utilizando águas residuárias de abatedouros de aves e suínos.

Os objetivos específicos foram:

- estudar o crescimento do *Bacillus thuringiensis*
- verificar o comportamento do pH
- observar a esporulação e o aparecimento do cristal proteico

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV.1. Microrganismo

Os experimentos foram realizados com o *Bacillus thuringiensis* mantido em meio de cultura agar nutriente à temperatura de 4°C (em refrigerador). Repiques trimestrais da cultura, ou quando necessário, tendo a cultura sido desenvolvida por 72 horas e depois mantida em refrigerador, foram efetuados para sua manutenção.

IV.2. Meios de cultura

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

IV.2.1 Meio de manutenção

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

Os tubos de ensaio contendo aproximadamente 7 ml de meio de cultura, foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. Esfriado e inclinado foi posteriormente inoculado com o *Bacillus thuringiensis*.

IV.2.2 Meios de fermentação

Para este trabalho alguns resíduos foram escolhidos, baseados em análise prévia de seus constituintes bioquímicos, bem como na proximidade da instituição fornecedora do material ao local onde o trabalho foi executado. Sendo assim, foram testados a água de maceração de milho (milhocina), um efluente de indústria cervejeira, soro de queijo, sangue de suíno e sangue de ave. O volume de resíduos obtido para utilização no processo, foi mantido em congelador para posterior utilização, visando o uso dos resíduos com as mesmas características.

Os meios de cultura foram compostos pelo resíduo em diferentes concentrações e glicose na concentração de 6 g/l, exceto o meio com milhocina, que não possuía este último componente. Em relação à glicose, o valor supracitado foi determinado por MORAES, I. O. (1976) como sendo o que proporciona um maior crescimento bacteriano, em detrimento às concentrações superiores ou inferiores que diminuem o valor de biomassa obtido.

A formulação dos meios de cultura está apresentada a seguir:

Tabela IV.1: Formulação dos meios de cultura utilizados

	Concentração do Resíduo (g/l)	Concentração de Glicose (g/l)
"Milhocina"	4	6
	8	
	12	
	16	
Efluente de cervejaria	20	6
	40	
	60	
	80	
	100	
Soro de queijo	50	6
	100	
Sangue de suíno	50	6
	100	
Sangue de ave	50	6
	75	
	100	
	150	

Quanto ao sangue de suíno, deve-se salientar que é um composto de alto valor protéico, o que pode ser constatado através da tabela abaixo, e pelas análises do teor de nitrogênio feitas em laboratório.

Tabela IV.2: Sangue de suíno - composição química em 100 gramas, conforme Franco, 1982:

Glicídios	0,40 g
Proteínas	20,40 g
Lipídios	0,10 g
Cálcio	14 mg
Fósforo	84 mg
Ferro	36,30 mg

Quanto à milhocina, seguem-se na tabela abaixo algumas análises químicas de rotina, fornecidas pela indústria fabricante do resíduo.

Tabela IV.3: Percentuais obtidos de análises químicas da água de maceração de milho ("milhocina")

Açúcar redutor:	7,5%
Ácido láctico:	17%
Proteínas:	45%
pH:	4,0-4,5
Concentração:	45-50% de sólidos

Quanto ao efluente de indústria cervejeira, seguem-se algumas análises químicas de rotina, fornecidas pela indústria

Tabela IV.4: Análise química de rotina do efluente de indústria cervejeira

pH médio:	8,8
D.Q.O:	2.225 mg/l
Sólidos sedimentáveis:	4,30 ml/l

Tabela IV.5: Soro de leite - composição química em 100 gramas, conforme Franco, 1982:

Glicídios	5,76 g
Proteínas	0,84 g
Lipídios	0,36 g
Cálcio	105 mg
Fósforo	97 mg
Ferro	0,10 mg
Sódio	130 mg
Potássio	140 mg

Todos os meios de cultura, exceto aqueles com sangue, foram esterilizados a 121°C durante 20 minutos, resfriados e a seguir inoculados com o *B.L.* A esterilização pelo calor em meios contendo sangue tem algumas implicações negativas para a realização de fermentações, tais como a coagulação de proteínas e o abaixamento brusco de pH, o que está detalhado na discussão do experimento inicial realizado com sangue estéril. Neste trabalho, os experimentos com sangue foram realizados sem esterilização. Contudo, houve o monitoramento através de microscopia, para constatar qualquer contaminação.

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura, acondicionados em agitador-incubador, sendo 150 r.p.m. a agitação, 30°C a temperatura e o tempo de duração variando entre 24 horas e 96 horas. A relação 50 ml de meio para 250 ml do frasco propicia a necessária aeração.

IV.3. Inóculo

Os experimentos com milhocina, efluente de indústria cervejeira e soro de queijo foram inoculados com 3 alçadas do microrganismo retirados diretamente do tubo de manutenção da cultura.

Nos experimentos iniciais com sangue de suíno e ave optou-se por inocular usando uma suspensão de células, que foi feita adicionando-se água destilada diretamente ao tubo de manutenção. Com o auxílio da alça de platina, as células eram suspensas e completava-se o volume para cerca de 30 ml. Desta suspensão, 1 ml foi inoculado em cada erlenmeyer.

Através do método de contagem de células em câmara de Neubauer, nesta suspensão, existia a quantidade de $3,4 \times 10^8$ células/ml.

Nos experimentos em que optou-se pela realização da pré-fermentação, foi repetido o mesmo processo de inoculação acima. Do líquido pré-fermentado, uma alíquota de 10% foi retirada para inocular o processo fermentativo propriamente dito.

IV.4. Equipamento

- Agitador-incubador horizontal (Shaker) com refrigeração modelo MA-325/425.
- Frascos erlenmeyers de 250 ml.
- Espectrofotômetro digital modelo B 342 II Micronal.
- Balança Marte modelo AS 1000.
- Autoclave vertical modelo 103 "FABBE"
- pHmetro Micronal.
- Digestor-Destilador de proteínas

IV.5. Determinação do crescimento celular

Foi monitorado o crescimento celular medindo-se a turbidez do meio de cultura em diversos tempos de fermentação, a variação de pH do meio e a variação da quantidade de açúcar redutor.

IV.6. Determinação do teor de nitrogênio

A quantidade do nitrogênio total foi determinada pelo método de Kjeldahl em amostras dos resíduos.

O princípio do método é o da transformação do nitrogênio orgânico das substâncias nitrogenadas em sulfato de amônio, por ebulição em ácido sulfúrico concentrado ($d=1,84$) e na presença de catalisadores. Esse é tratado com hidróxido de sódio em excesso, liberando amônia sob a forma de hidróxido de amônio, que é destilado e recolhido em ácido bórico. O nitrogênio é então determinado por titulação com ácido clorídrico valorado, ao vermelho de metila (pH 4,2-6,3).

Para o cálculo da porcentagem de nitrogênio na amostra pode-se usar a expressão:

$$\%N = \frac{mL\ HCl \times N\ HCl \times 0,014 \times 100}{Peso\ da\ amostra(g)}$$

IV.7. Determinação da quantidade de açúcar redutor

A quantidade de açúcar redutor foi determinada pelo método de Somogy-Nelson, no qual os açúcares redutores reduzem o sal de cobre, em meio alcalino e a quente. A forma reduzida do sal de cobre atua sobre o reativo arsenomolibdico determinando o aparecimento de uma cor azul, cuja intensidade é proporcional ao teor de glicose na amostra. A concentração de açúcares redutores, expressa em miligramas de glicose por mililitro de solução, é determinada utilizando-se uma curva-padrão elaborada com soluções padrão de glicose.

IV.8. Observações sobre o Processo de atordoamento e sacrifício para a obtenção do sangue de animais

a) Aves

Conforme explicado em (8), as aves suspensas por ganchos (Foto 1), passam da rampa de descarga à zona de atordoamento à qual recebem uma descarga elétrica. Existem dois tipos básicos de equipamentos de atordoamento elétrico: os de alta voltagem, que funcionam por volta de 500 V e os de baixa voltagem, que operam entre 70 e 100 V. Esta última modalidade é a operante no abatedouro no qual se obteve o produto utilizado neste trabalho.

O método do banho de água consiste em um recipiente com água em contato com a corrente elétrica, na qual se introduz a cabeça da ave, fechando assim um circuito com o gancho de suspensão (Foto 2).

Quando uma ave é atordoada adequadamente, se produz um espasmo cuja manifestação é uma contração imediata de todos os músculos esqueléticos. A cabeça se arqueia para cima, juntamente com as plumas do rabo e depois de um estremecimento inicial das patas, elas ficam totalmente esticadas. As asas também se encolhem com contrações rápidas. Enquanto não se produz este espasmo é improvável que as aves estejam completamente adormecidas. Durante este espasmo desaparece o reflexo corneal. Porém, este reflexo pode se recuperar posteriormente e se considera que uma ave pode ter reflexo corneal e continuar inconsciente. Há outros dois reflexos que indicam inconsciência. Um é o reflexo da crista, que, ao tocá-la, faz-se com que a ave mova a cabeça para cima se não estiver inconsciente. O outro é o reflexo da pata, que ao ser tocada, desencadeia uma reação de recuo, quando o animal não está inconsciente. No momento da eletronarcose, o coração bate mais lento, mas se recupera depois de uns 30 segundos; por isso deve-se esperar este período para sangrá-la, assegurando um processo completo e com ele, a morte do animal. Se as aves se atordoam adequadamente, mas não se sangram totalmente, podem recuperar-se e estar vivas

ao entrar no tanque de escaldo. Obviamente isto é indesejável, então, depois de um atordoamento eficaz deve-se sangrar corretamente. Existem equipamentos automáticos que realizam a maior parte das atividades dos matadouros de aves. Há, no mercado, degoladoras automáticas que conduzem a cabeça da ave até uma faca giratória que realiza a incisão (Foto 3). As degoladoras automáticas de pescoço podem, ocasionalmente, deixar vivas algumas aves; por isso é conveniente colocar um trabalhador na saída para que faça a incisão nas aves que escapam da faca giratória. O corte é feito usualmente na união do pescoço com a cabeça, abrindo as carótidas e em algumas ocasiões as jugulares, mas sem afetar o esôfago e a traquéia. A sangria ocorre em um local separado, ou sobre um canal coletor de sangue e aproximadamente se recolhe a metade do sangue total das aves (Fotos 4 e 5).



Foto 1. Aves suspensas pelos ganchos antes de entrarem no tanque de atordoamento



Foto 2. Aves saindo do tanque de atordoamento



Foto 3. Aves em direção à faca giratória para a efetivação da sangria



Foto 4. Aves recém saídas do processo de sangria



Foto 5. Detalhe do local da sangria e tanque coletor

b) Suínos

Os suínos podem ser atordoados eletricamente ou anestesiados com dióxido de carbono. Qualquer que seja o método, é desejável que a medula oblongada no cérebro não seja destruída. Este centro, que controla o coração e vasos, deve continuar seu funcionamento por algum tempo, já que a ação destes órgãos ajuda na expulsão do sangue, quando os vasos sanguíneos são seccionados.

Ao contrário das aves, os suínos são sangrados pela secção da veia cava anterior.

Mesmo com uma sangria efetiva, somente cerca de 50% do sangue total é removido, pois os diferentes músculos retêm mais ou menos sangue de acordo com sua natureza. Quando a corrente elétrica é aplicada, há um considerável aumento na pressão sanguínea; os músculos são contraídos e seus capilares são quase que totalmente cheios de sangue. Na sequência, os músculos relaxam e se a pressão sanguínea não é normalizada pelo corte externo, o sangue é forçado para dentro dos capilares com força suficiente para romper muitos deles e adentrar na musculatura.

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Estudos preliminares em meio estéril contendo sangue de suíno e glicose.

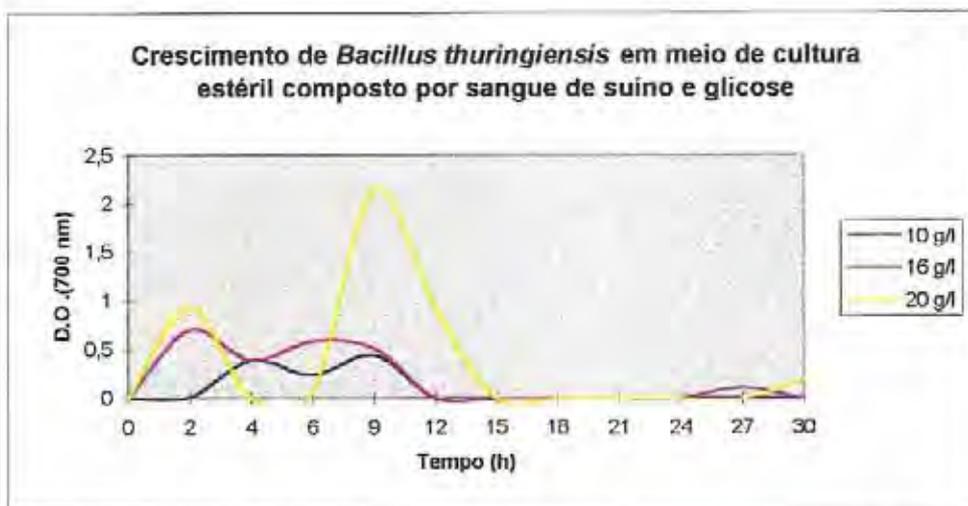


Figura V.1. Crescimento de *B.t.* em meio de cultura estéril composto por sangue de suíno nas concentrações de 10,16 e 20 g/l e glicose 6 g/l.

* Os valores de D.O. de todos os gráficos de crescimento estão multiplicados pelas diluições.

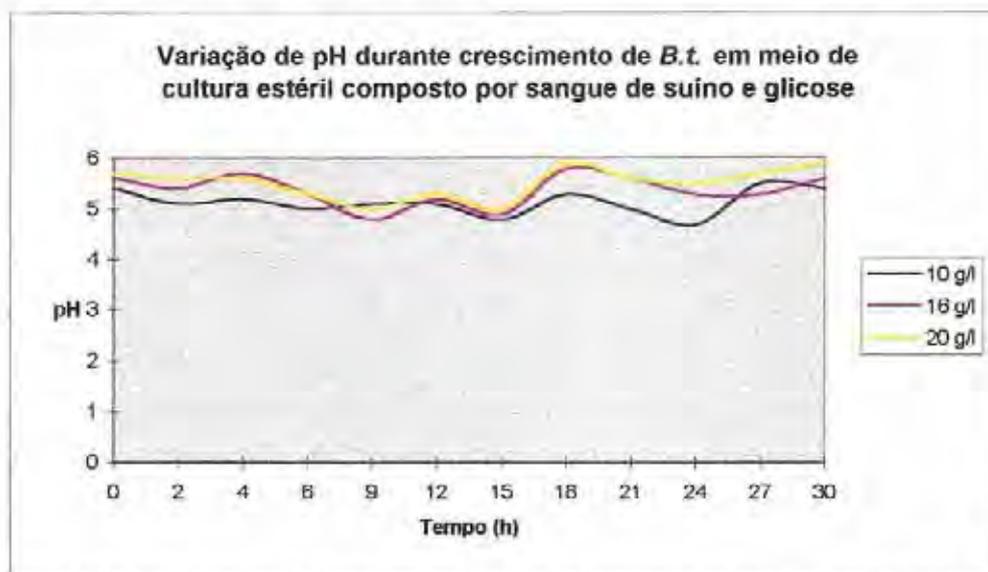


Figura V.2. Variação de pH durante crescimento de *B.t.* em meio de cultura estéril composto por sangue de suíno nas concentrações de 10, 16 e 20 g/l e glicose 6g/l

Analisando a Fig. V.1 observa-se um pico às 9 horas, mostrando talvez um crescimento apenas vegetativo, pois não ocorreu a esporulação, verificada por microscopia e o processo entrou em fase de declínio em seguida.

Pela Fig V.2 observa-se que não houve variação do pH em relação ao inicial após esterilização (pH 5,5), o que contraria a tendência natural durante o

crescimento de *B.t.*, no qual existe uma queda inicial, após a qual uma elevação, a valores acima de pH 7, durante a esporulação, a qual poderá ser evidenciada em outros experimentos, neste trabalho.

A esterilização por tratamento térmico, ao mesmo tempo que desnatura enzimas, destrói também vários nutrientes essenciais, além do que ocasionou uma queda irreversível de pH inicial (ajustado a 7,3 com queda a 5,5 após a esterilização) a um valor abaixo do ótimo ao crescimento de *B.t.*

Sabe-se que existe uma degradação de proteínas pela complexação com carboidratos. Como o tratamento térmico foi enérgico, outras reações ocorreram, com a conseqüente degradação de carboidratos e de outros aminoácidos da proteína. O resultado final é o escurecimento do produto e o acúmulo de certos compostos de degradação, que podem ser tóxicos (31) e certamente foi isso que acarretou o não crescimento do *Bacillus thuringiensis*, após ter causado uma queda irreversível do pH inicial.

V.2. Estudos realizados com sangue de suíno não estéril e glicose.

O sangue de suíno apresentou um resultado considerável como meio de cultura em fermentações com *Bacillus thuringiensis*. Os resultados referem-se a processos em que não se realizou pré-fermentação e se acompanhou por 96 horas e com a realização de pré-fermentação acompanhado por 36 horas.

Acompanhamento por 96 horas (50 e 100 g/l), sem pré fermentação

Crescimento

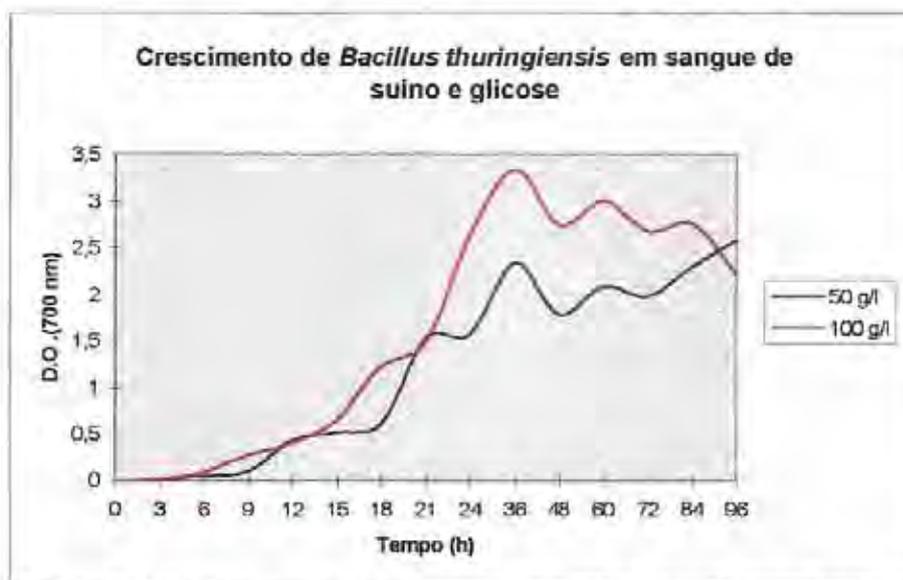


Figura V.3. Crescimento de *B.t.* em sangue de suíno nas concentrações de 50 e 100 g/l e glicose 6 g/l.

Através da análise do mesmo percebe-se o início da fase logaritmica de crescimento ao redor de 18 horas de fermentação, sendo que para a concentração de 100 g/l apresentou o pico de crescimento em torno de 36 horas. Após isso o processo com 100 g/l inicia a fase de declínio, enquanto com 50 g/l continua crescendo lentamente, após um ligeiro declínio de 36 horas a 48 horas.

pH

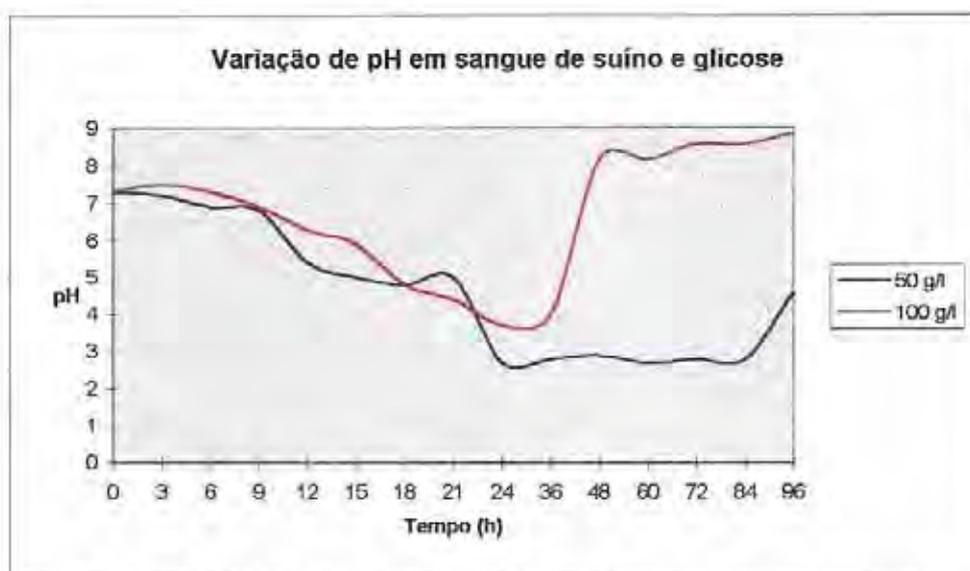


Figura V.4. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

Analisando a Fig. V.4, observa-se um ligeiro aumento de pH nas primeiras 3 horas de fermentação para a concentração de 100 g/l, a partir do qual declina até ao redor de 24 horas (pH 3,7). Das 36 horas em diante existe um considerável aumento no valor de pH, ficando este em 8,9, em 96 horas de fermentação.

Na concentração de 50 g/l o pH sofre um declínio desde o início da fermentação que vai até as 36 horas quando o pH mantém-se estável até cerca de 84 horas, onde volta a subir. O pH final em 96 horas de fermentação é de 6,4.

Acompanhamento por 36 horas com pré-fermentação (50 e 100 g/l)

Crescimento

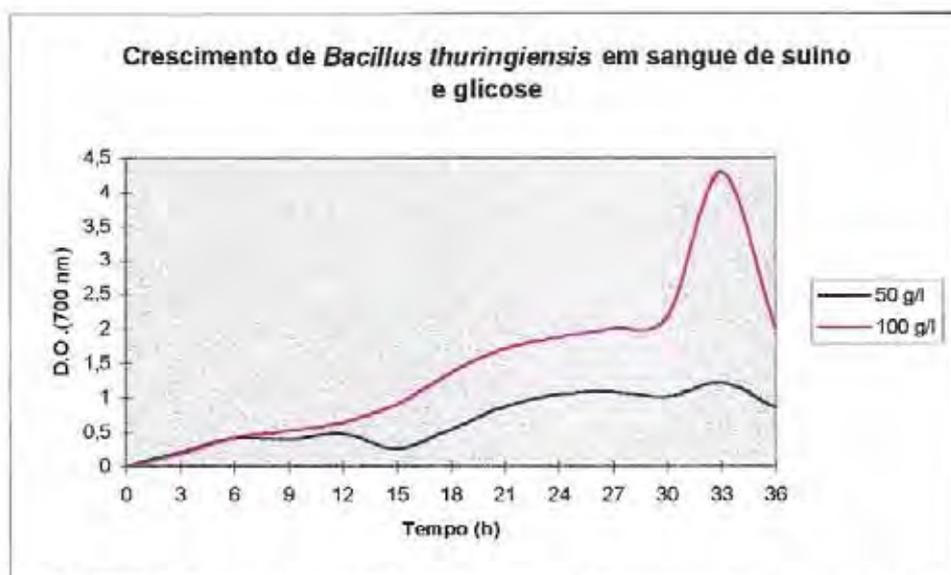


Figura V. 5. Crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

pH

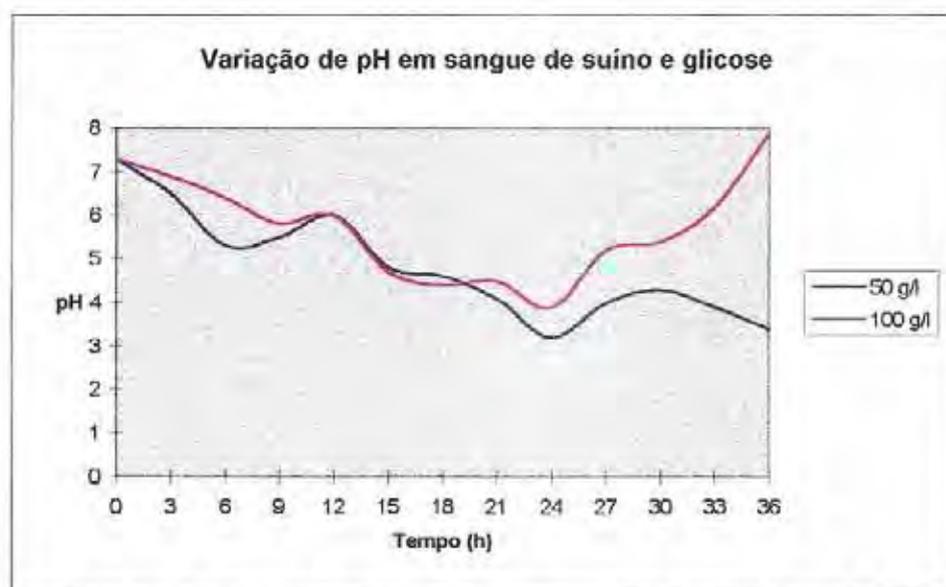


Figura V.6. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

Dosagem de açúcar redutor

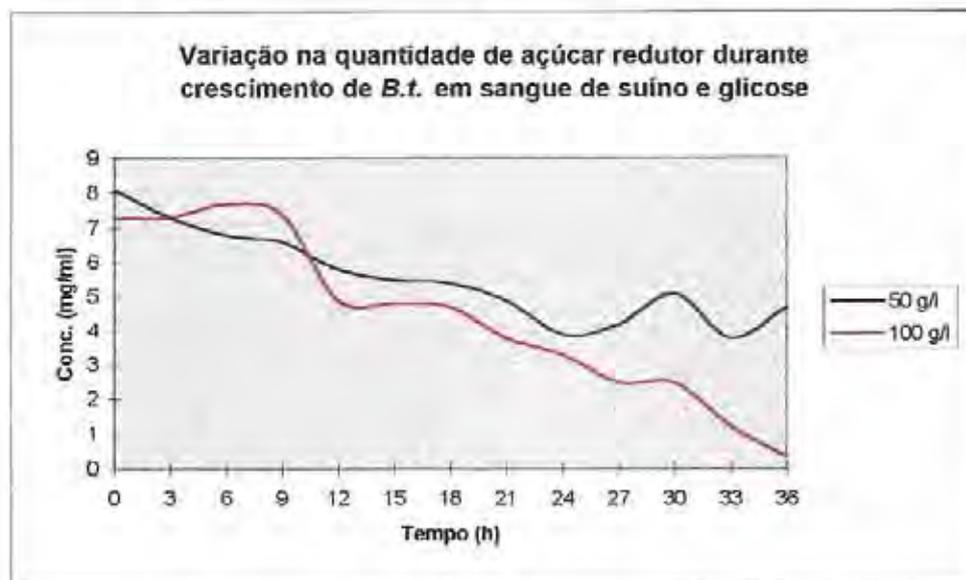


Figura V.7. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de *B.t.* em sangue de suíno nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

As figuras V.5, V.6, V.7 apresentam os resultados obtidos.

Observa-se melhor crescimento com 100 g/l, sendo que o comportamento do pH e do consumo de açúcar também corroboram esse resultado. A fermentação em 50 g/l não apresenta crescimento do microrganismo, o pH baixa à fase ácida e nela permanece e o açúcar residual se consome cerca de 30%.

V.3. Estudos realizados com sangue de ave não estéril e glicose.

Acompanhamento por 96 horas (50 e 100 g/l)

Crescimento

A Fig. V.8 apresenta os resultados obtidos no crescimento do *B.t.* em sangue de ave:

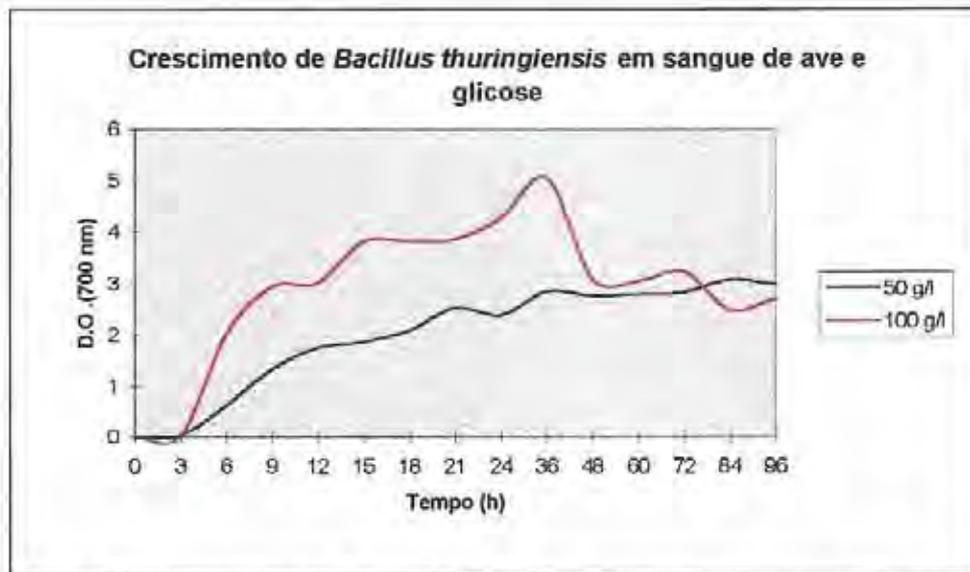


Figura V.8. Crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

Através da análise da Fig. V.8, observa-se um maior crescimento na concentração de 100 g/l. A fase logarítmica inicia-se ao redor de 3 horas de fermentação para ambas as concentrações, sendo que para a concentração de 100 g/l existe um pico de crescimento por volta das 36 horas, após o qual há um decréscimo. Em 96 horas de fermentação, o valor de absorvância para a concentração de 50 g/l é similar ao de 100 g/l, mas o microrganismo neste processo com 100 g/l está na fase de declínio e o de 50 g/l ainda está, de modo aparente, lentamente crescendo.

É interessante notar o grande crescimento nas primeiras 6 horas de fermentação sobretudo na concentração de 100 g/l. Esses valores são importantes quando se estuda a produtividade de um processo.

pH

A Fig. V.9 apresenta a variação de pH durante fermentação com *B.t.* em sangue de ave.

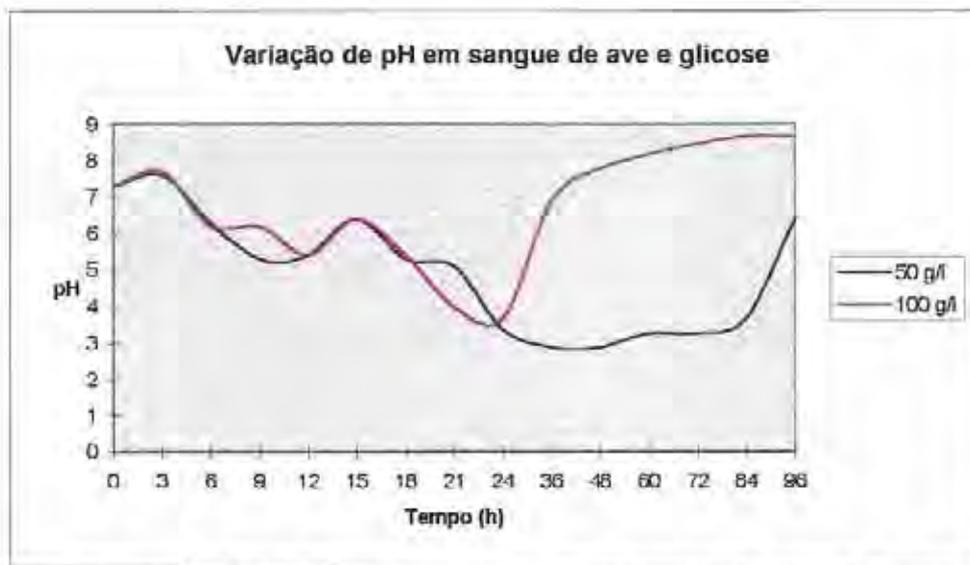


Figura V.9. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

Em relação ao comportamento do pH em fermentação com sangue de ave, observa-se de uma maneira geral sofre um declínio até 30 horas, quando na concentração de 50 g/l de 36 horas a 84 horas o pH mantém-se num valor estável, a partir do qual volta a subir ficando em 6,4 em 96 horas de fermentação, valor este abaixo do pH inicial (7,3).

Quanto ao comportamento de pH na concentração de 100 g/l, observa-se que existe um aumento considerável a partir de 36 horas de fermentação, sendo que o valor em 96 horas de fermentação é de 8,7, acima, então, do pH inicial, o que está de acordo com as observações de (24) Moraes, 1976, para as fermentações bem sucedidas.

É interessante observar que o crescimento do microrganismo segue, de uma maneira geral, um mesmo padrão até o pico do melhor deles, para sangue de suíno e sangue de ave, o que pode ser constatado pela análise dos gráficos de crescimento e pH de ambos resíduos.

Comparação do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis* em sangue de ave e sangue de suíno, scm pré fermentação.

A Fig. V. 10, a seguir, apresenta uma comparação do crescimento de *B.t.* nos dois resíduos e pode-se observar que o crescimento do microrganismo é maior e mais rápido em sangue de ave. Entretanto, o padrão de crescimento parece ser o mesmo tendo em vista o pico que ocorre em torno de 36 horas. Após esse tempo o processo em sangue de ave inicia o declínio e em sangue suíno continua um crescimento lento, quase como se fosse uma fase estacionária. Dos resultados, parece que a quantidade de nitrogênio não é o fator preponderante para o crescimento do microrganismo, visto que o sangue de ave, de acordo com as

análises do teor de nitrogênio feitas em laboratório, tem menor quantidade deste constituinte.

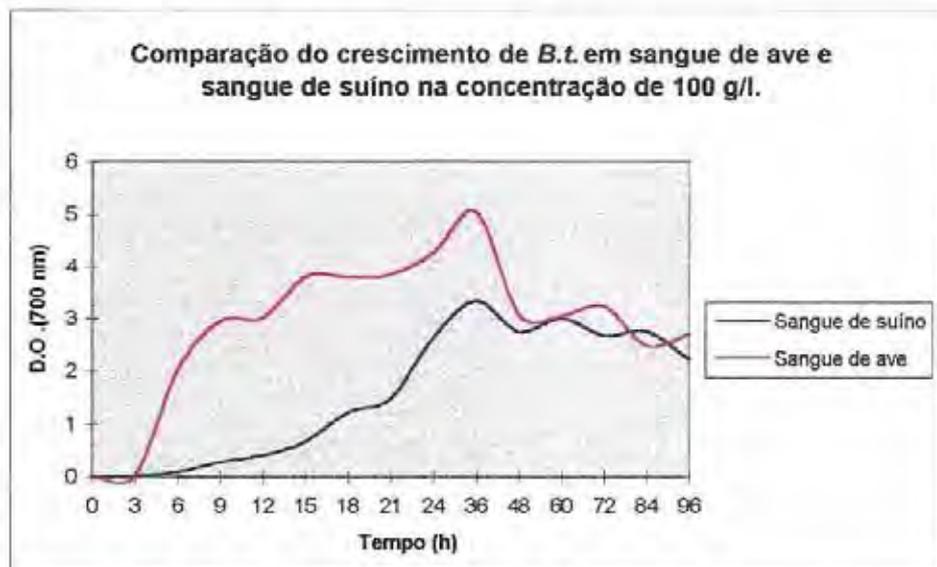


Figura V. 10 - Comparação do crescimento de *Bacillus thuringiensis* em sangue de ave e sangue de suíno nas concentrações de 50 e 100 g/l e glicose 6 g/l.

Acompanhamento por 36 horas com pré-fermentação (50 e 100 g/l)

Crescimento

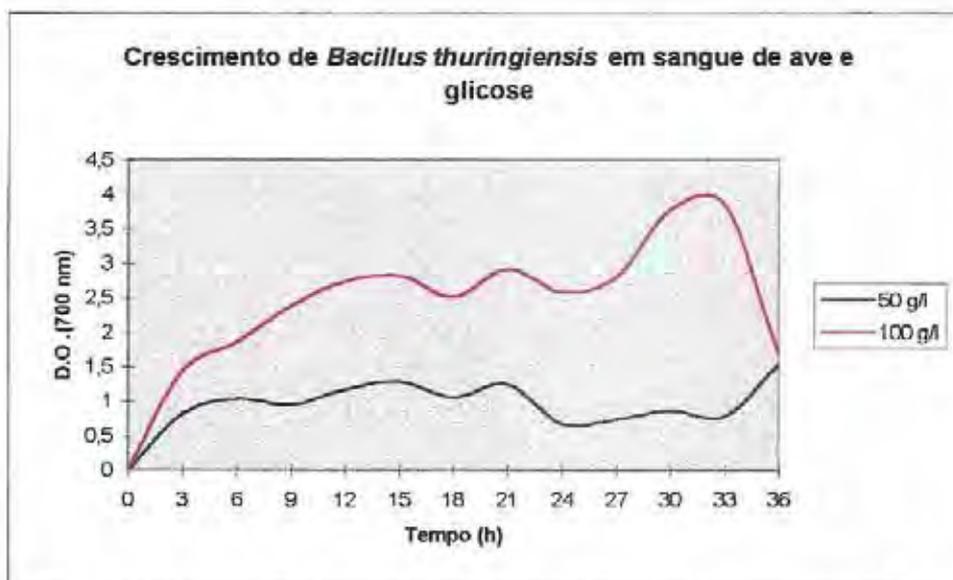


Figura V. 11. Crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/l.

pH

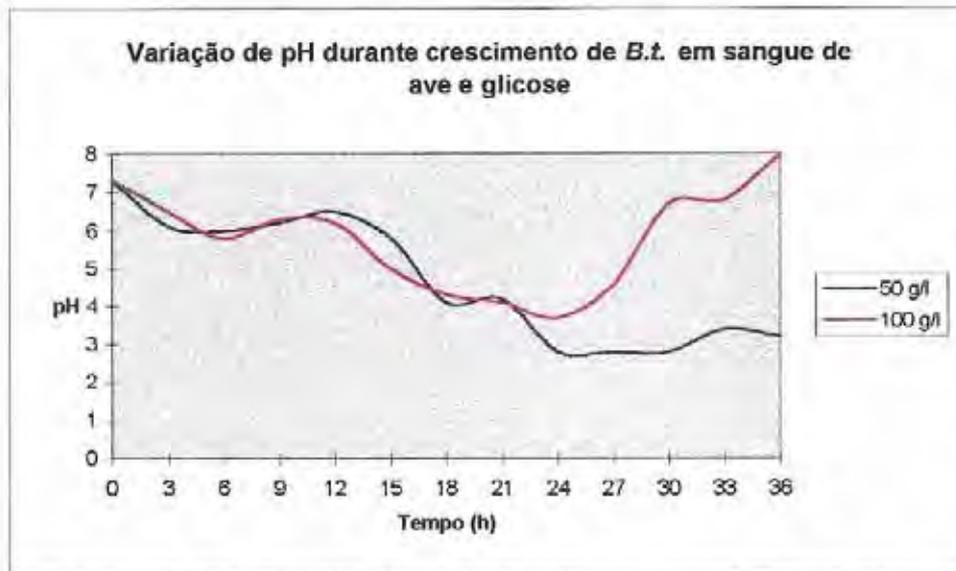


Figura V. 12. Varição de pH em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/L.

Dosagem de açúcar redutor

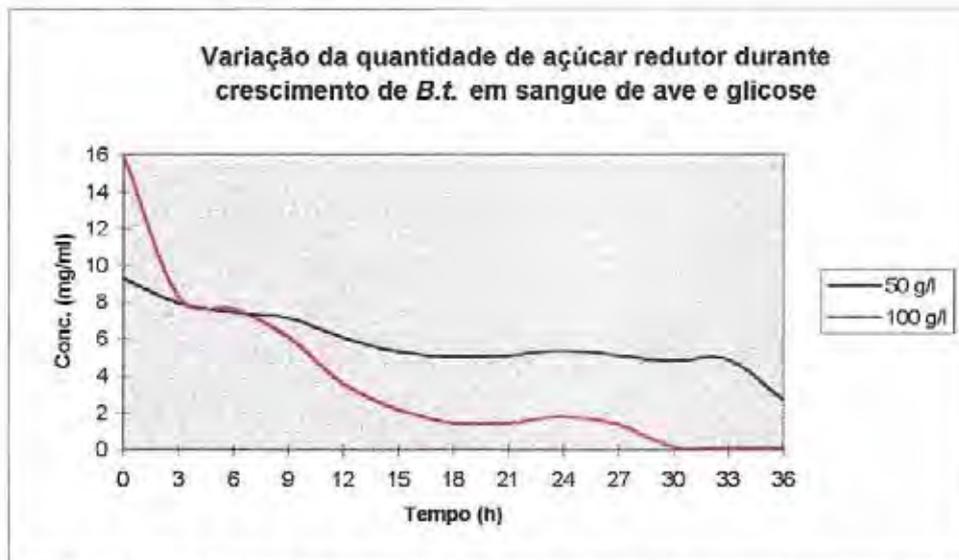


Figura V. 13. Varição na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de *B.t.* em sangue de ave nas concentrações de 50 g/l e 100 g/l e glicose 6 g/L.

Os comportamentos obtidos são similares aos das Figuras V.8 e V. 9, porém os resultados obtidos em absorvância são ligeiramente menores.

Acompanhamento por 36 horas nas concentrações 50, 75, 100 e 150 g/l.

Crescimento

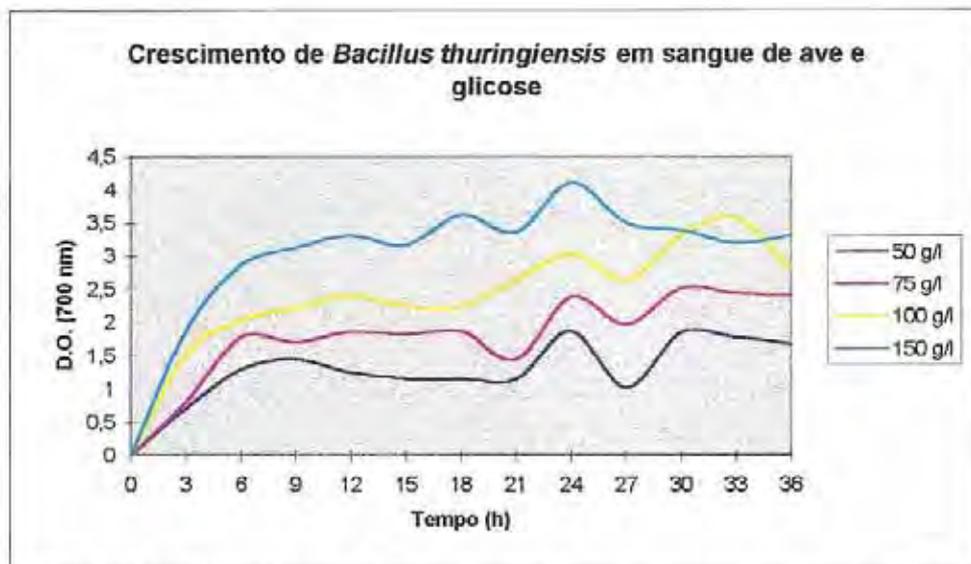


Figura V. 14. Crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l e glicose 6 g/l.

pH

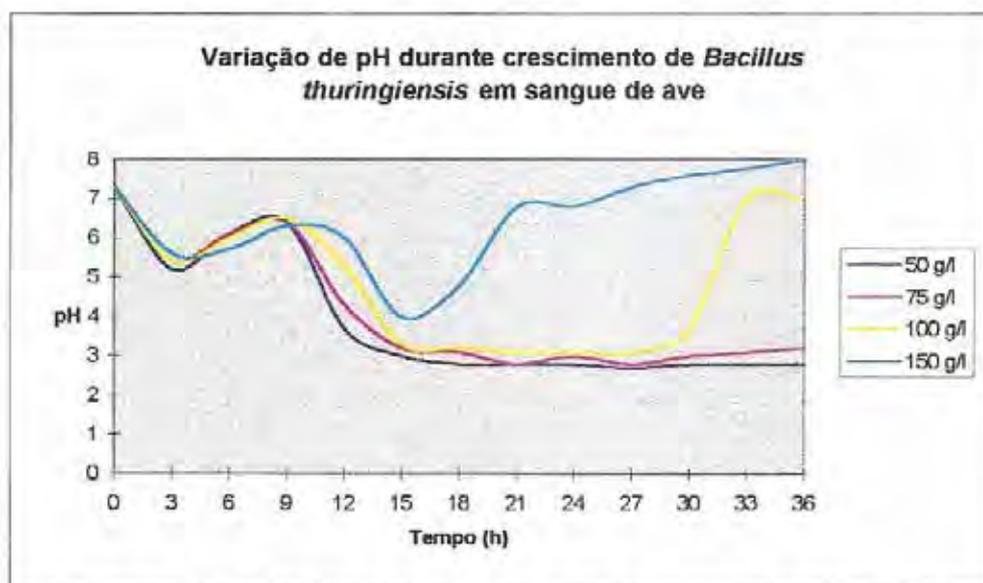


Figura V. 15. Variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave nas concentrações de 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l e glicose 6 g/l.

Dosagem de açúcar redutor

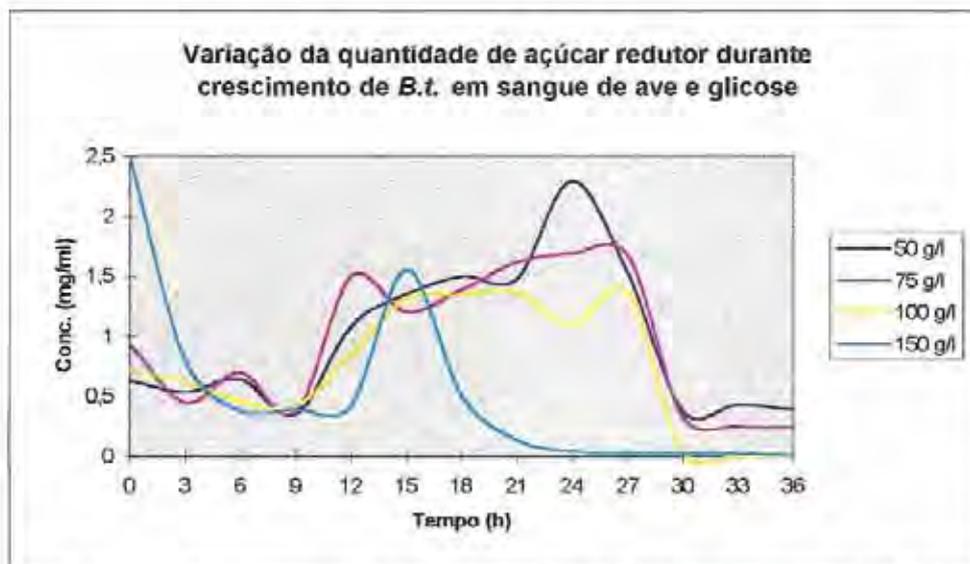


Figura V. 16. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de *B.t.* em sangue de ave nas concentrações de 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l e glicose 6 g/l.

Nas quatro concentrações estudadas o padrão de comportamento para 50 e 75 g/l é o mesmo, tanto para crescimento quanto para pH. Não houve esporulação, apenas crescimento vegetativo e muito lento. Para 100 e 150 g/l o comportamento é similar e a velocidade de crescimento é maior para 150 g/l, sendo que o pico de 15 horas que corresponde ao mínimo pH para essa concentração reflete maior produtividade.

Neste experimento foi também feita a observação em microscópio de amostras do líquido fermentado da concentração de 150 g/l nos vários tempos do processo fermentativo, evidenciando a formação dos esporos e dos cristais protéicos nas últimas horas do processo fermentativo.

Nas fotos pode se observar a existência de esporos e cristais bem como se verificar a quantidade relativa deles nos diversos experimentos fotografados.

Apresentam-se a seguir as fotos relativas às células (esporos) obtidas, no tubo de manutenção e a 3, 6, 12, 24 e 36 horas.

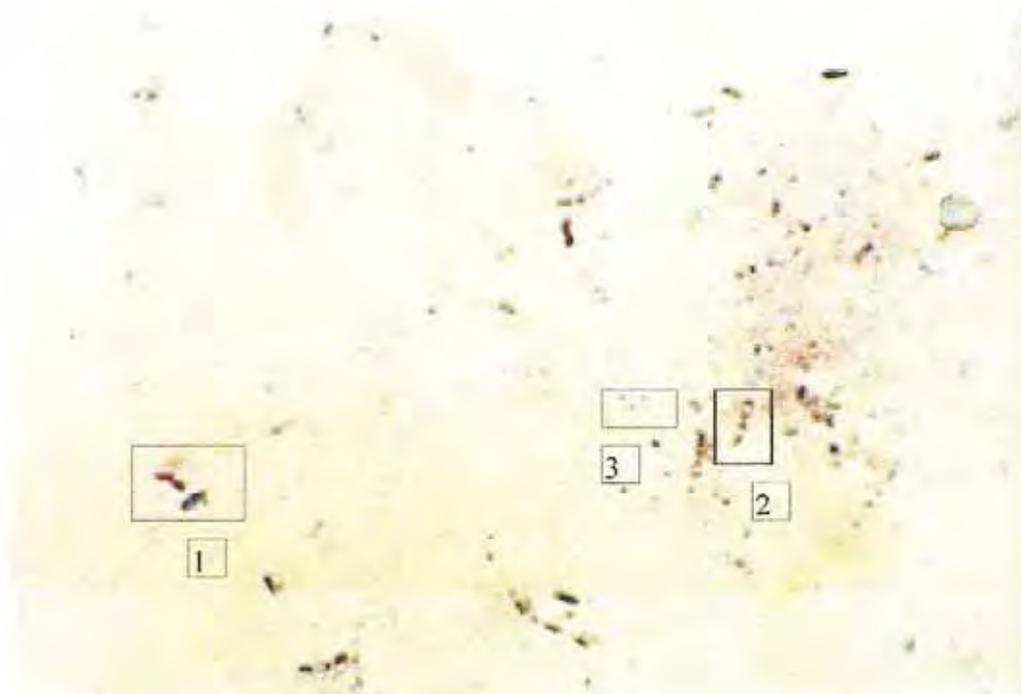


Foto 6- Fotomicrografia óptica (a) de tubo de manutenção de *B.t.* concedido pela EMBRAPA, evidenciando células vegetativas (1), em processo de esporulação (2) e cristais(3)



Foto 7- Fotomicrografia óptica (b) de tubo de manutenção de *B.t.* concedido pela EMBRAPA, evidenciando células vegetativas (1), em processo de esporulação (2) e cristais(3)



Foto 8 - Linhagem utilizada na realização deste trabalho (tubo de manutenção), evidenciando esporos e cristais



Foto 9 - Processo fermentativo em sangue de ave (3 horas)

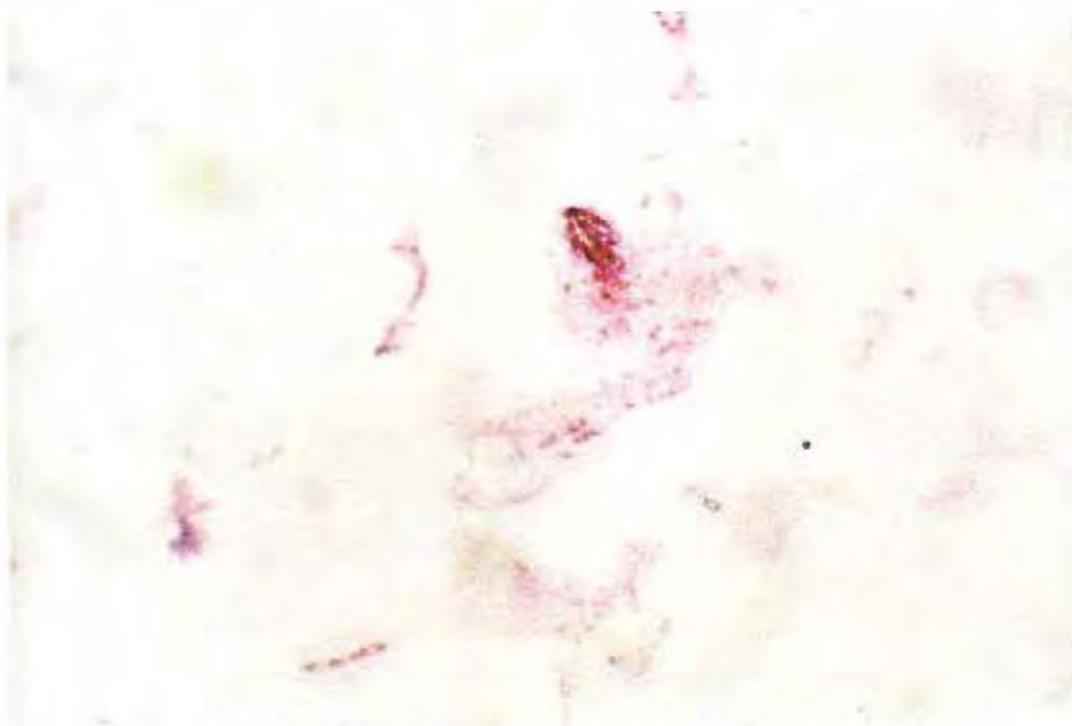


Foto 10 - Processo fermentativo em sangue de ave (6 horas)

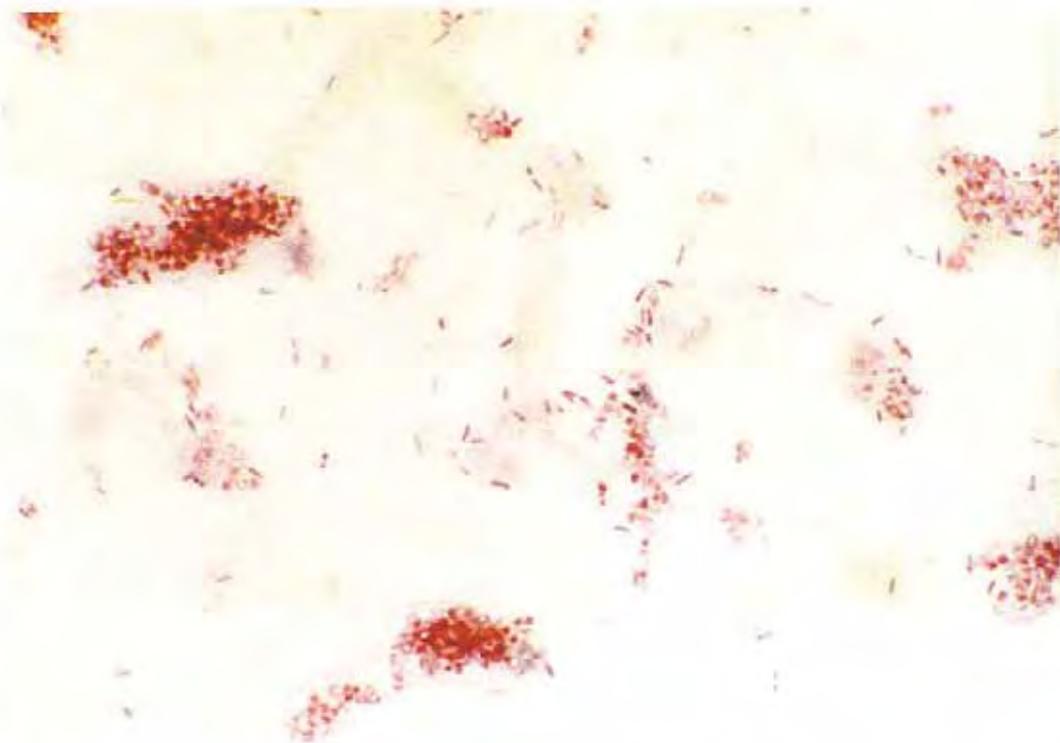


Foto 11- Processo fermentativo (12 horas)



Foto 12- Processo fermentativo (12 horas)

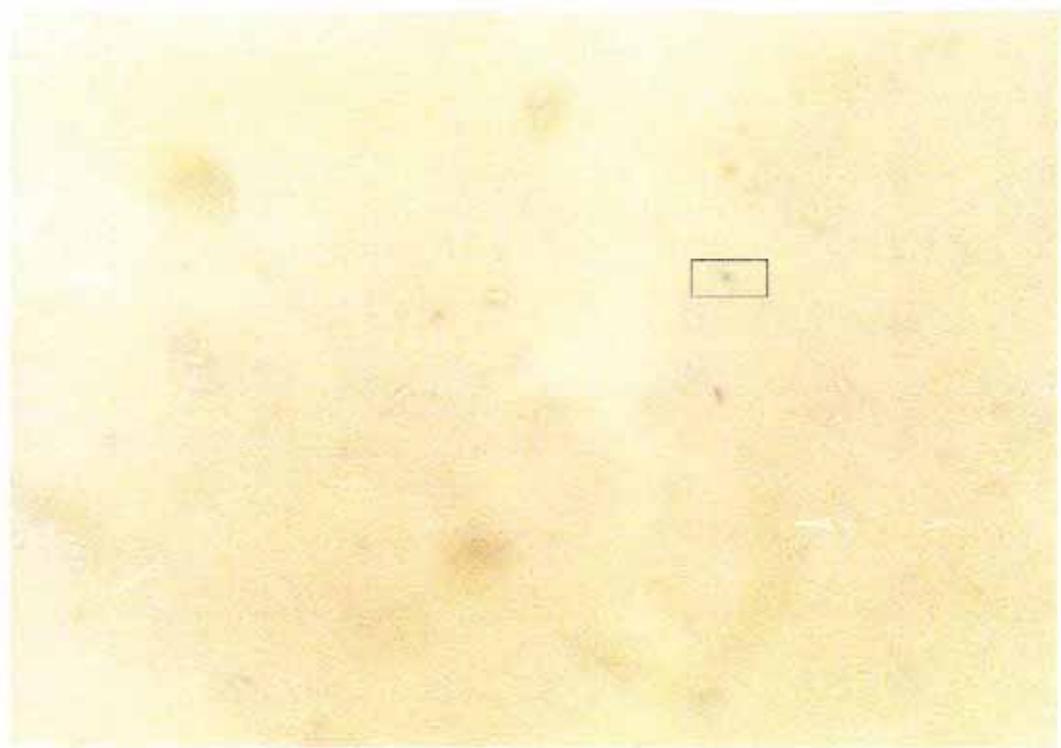


Foto 13- Processo fermentativo (24 horas) (a), evidenciando o início da formação dos cristais

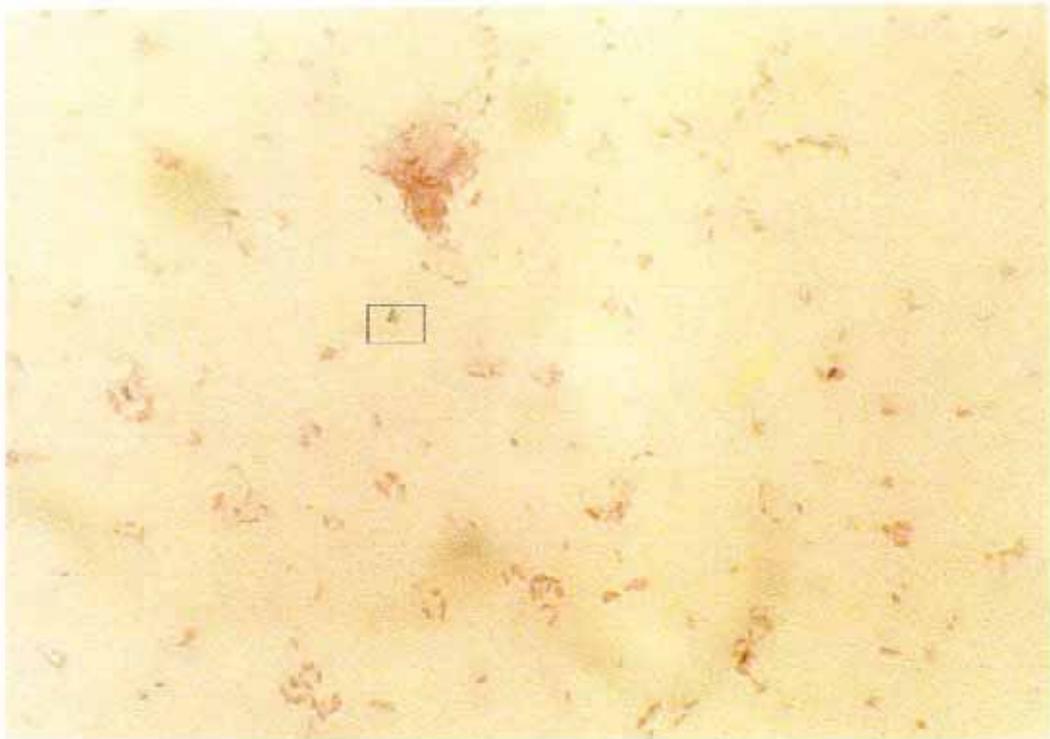


Foto 14- Processo fermentativo (24 horas) (b), evidenciando o início da formação dos cristais

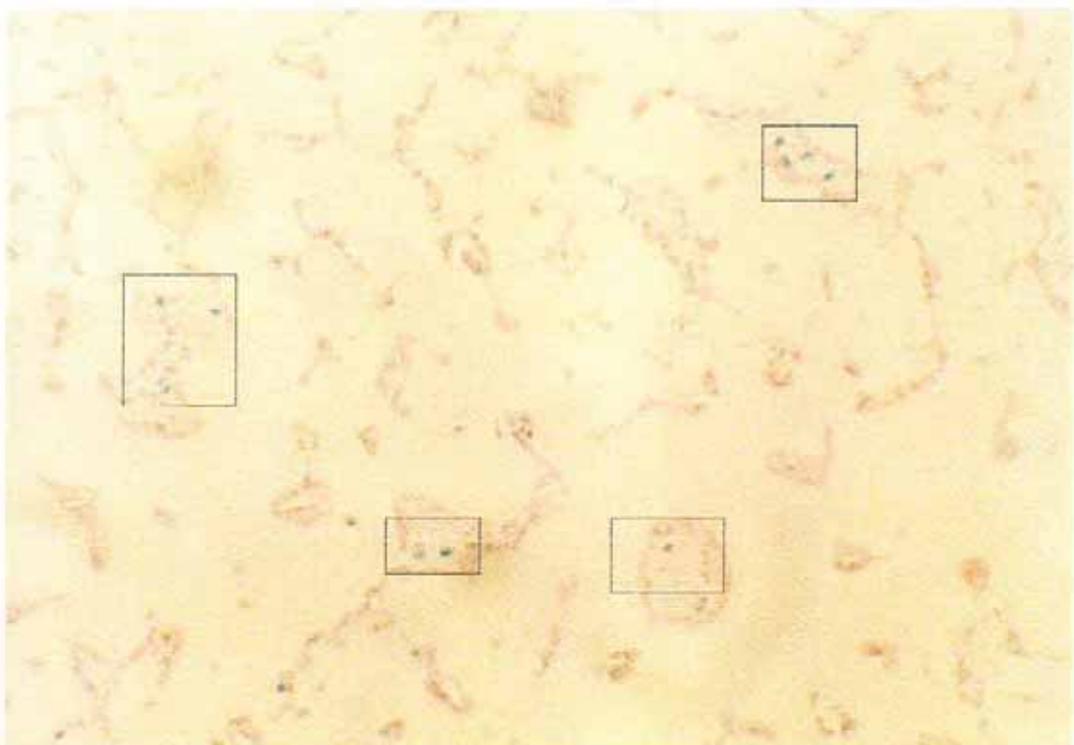


Foto 15- Processo fermentativo (36 horas) (a), evidenciando o maior número de cristais



Foto 16- Processo fermentativo (36 horas) (b), evidenciando o maior número de cristais

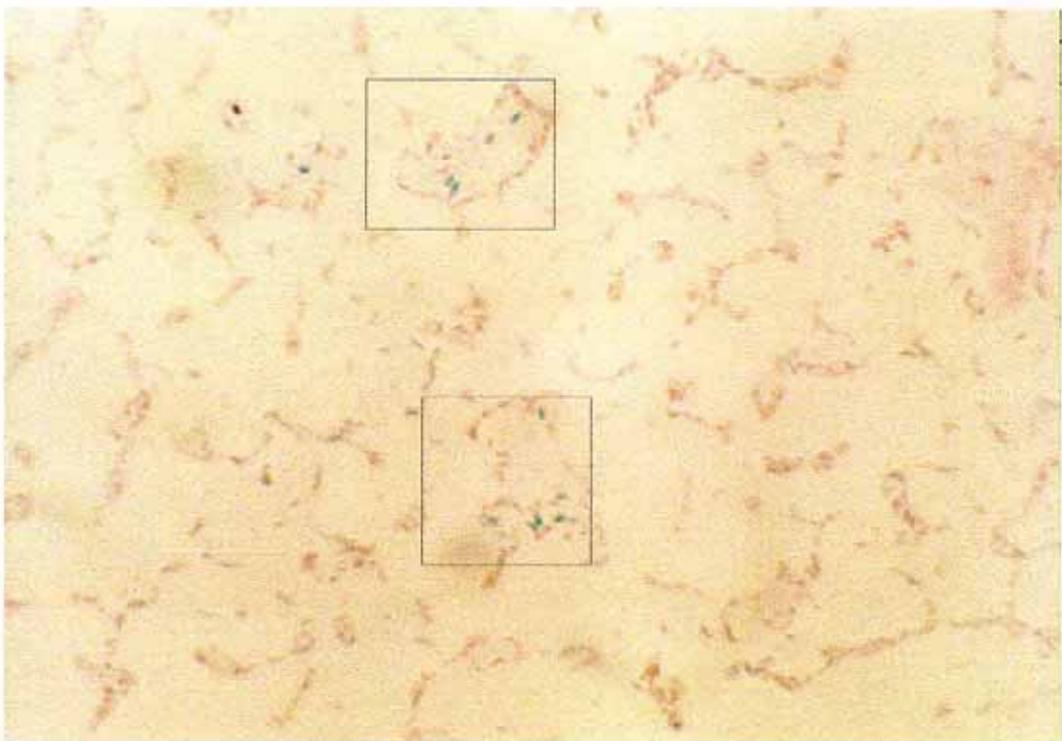


Foto 17- Processo fermentativo (36 horas) (c), evidenciando o maior número de cristais

Comparação relativa de resultados com e sem pré-fermentação. A relatividade está no sentido de que os percentuais de inóculo e os tempos finais são diferentes

Sangue de ave

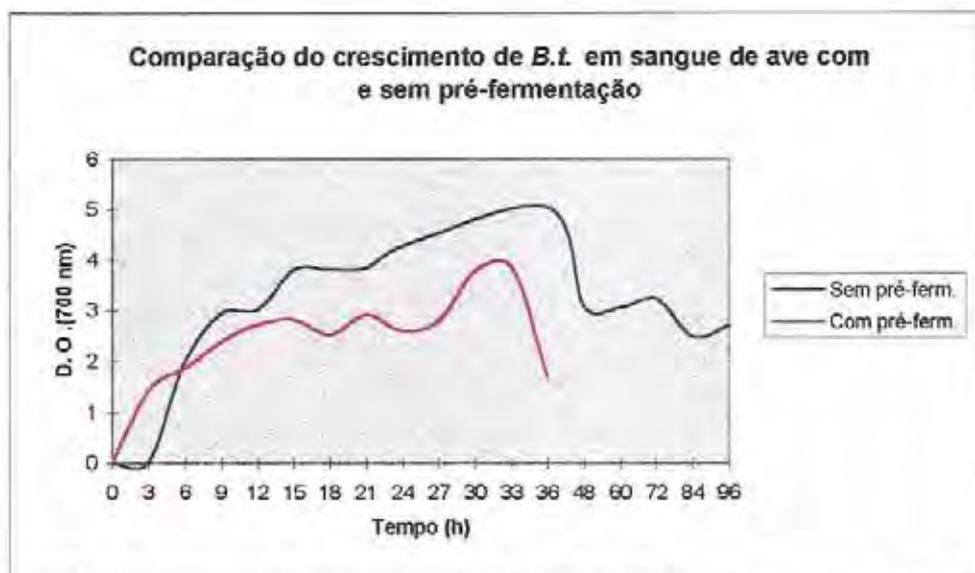


Figura V.17. Comparação do crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de ave (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.

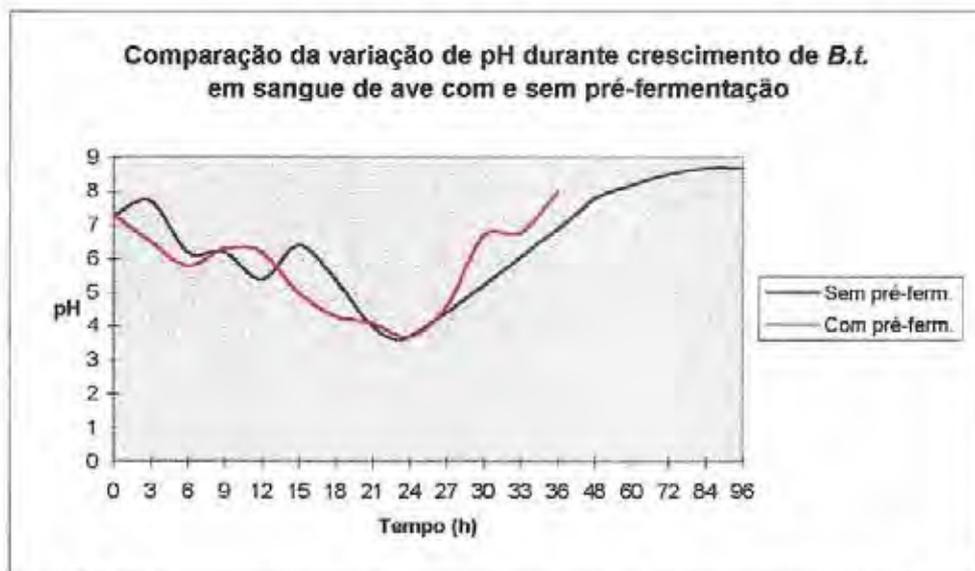


Figura V. 18. Comparação da variação de pH em meio de cultura composto por sangue de ave (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.

Observa-se que o experimento realizado com pré fermentação não apresenta a fase de latência, porém a curva da velocidade de crescimento a partir de seis horas sofre uma inversão favorecendo o experimento sem pré fermentação.

O comportamento do pH é muito similar em ambos os processos.

Sangue de suíno

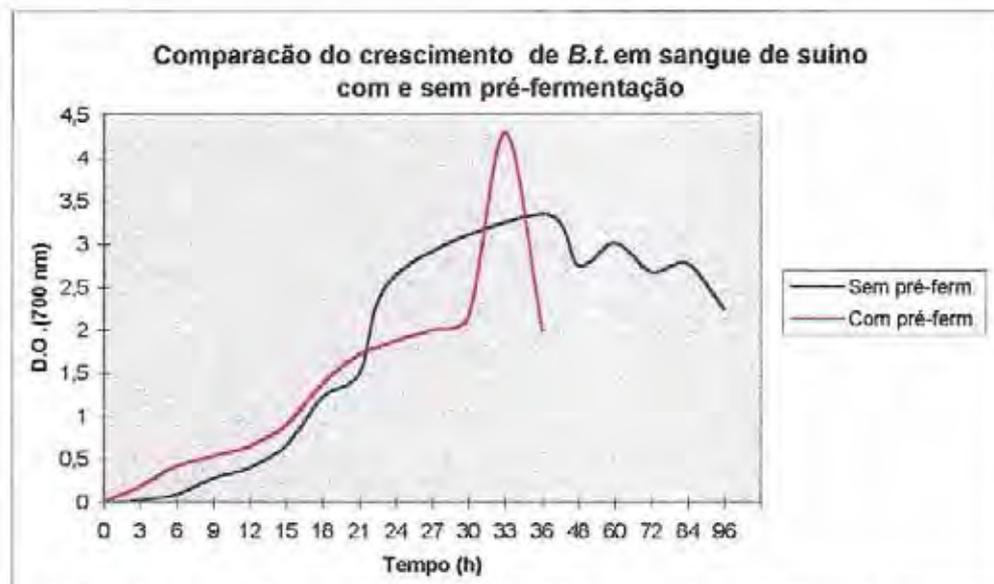


Figura V. 19. Comparação do crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de suíno (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.

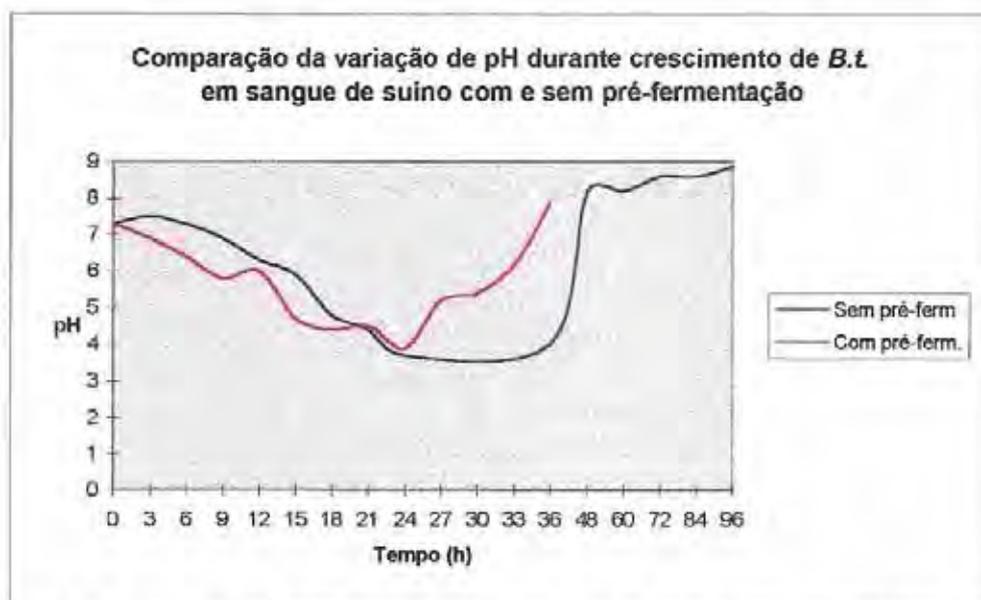


Figura V. 20. Comparação da variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com e sem pré-fermentação.

A mesma observação para o sangue de aves se aplica no caso de sangue de suínos apenas que neste caso houve um pico pronunciado para o experimento com pré fermentação, comportamento que também se evidencia no caso do pH.

Comparação dos resultados obtidos com pré fermentação, com o sangue de ave e suíno.

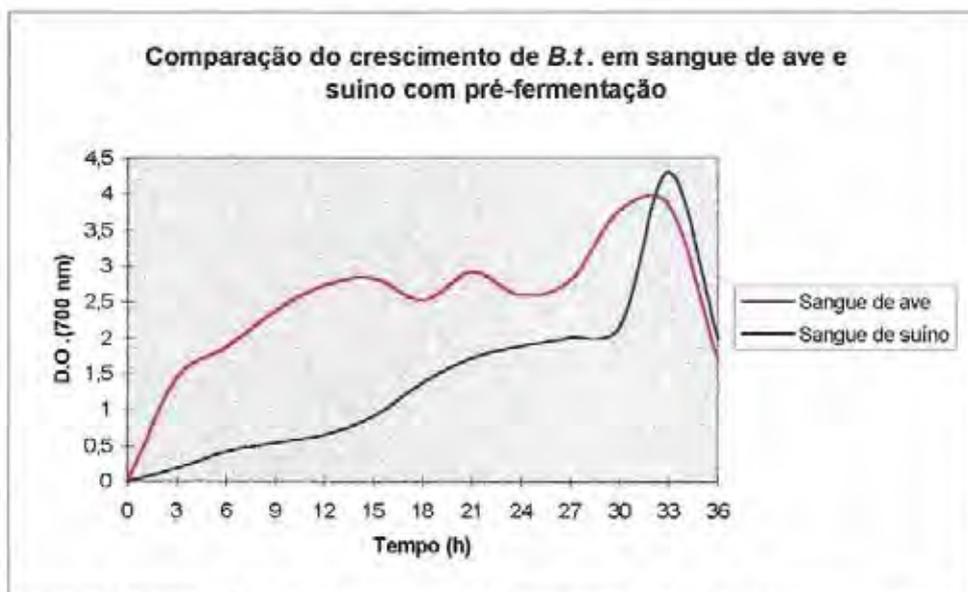


Figura V. 21. Comparação do crescimento de *B.t.* em meio de cultura composto por sangue de ave e sangue de suíno (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com pré-fermentação.

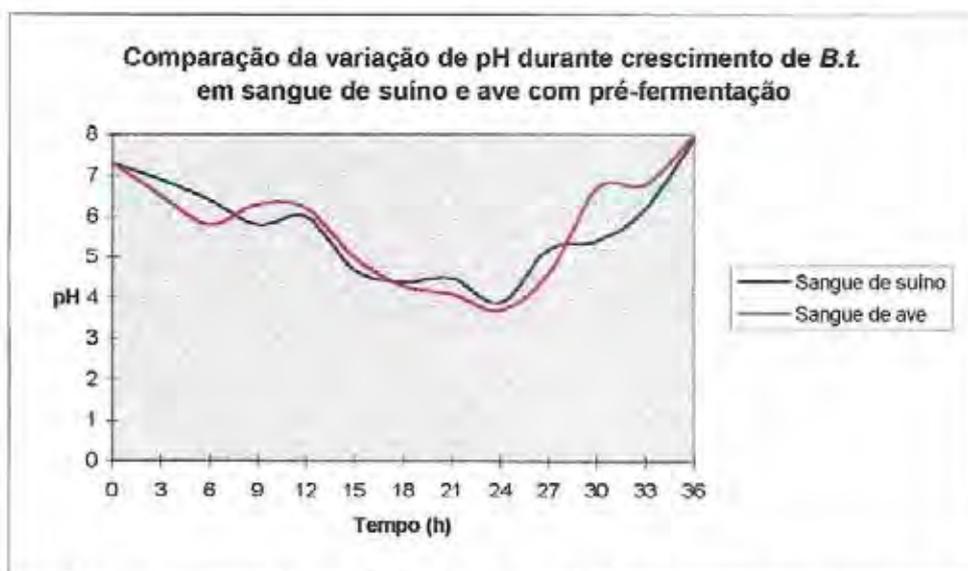


Figura V. 22. Comparação da variação de pH em meio de cultura composto por sangue de suíno e sangue de ave (100 g/l) e glicose (6 g/l) em experimentos com pré-fermentação.

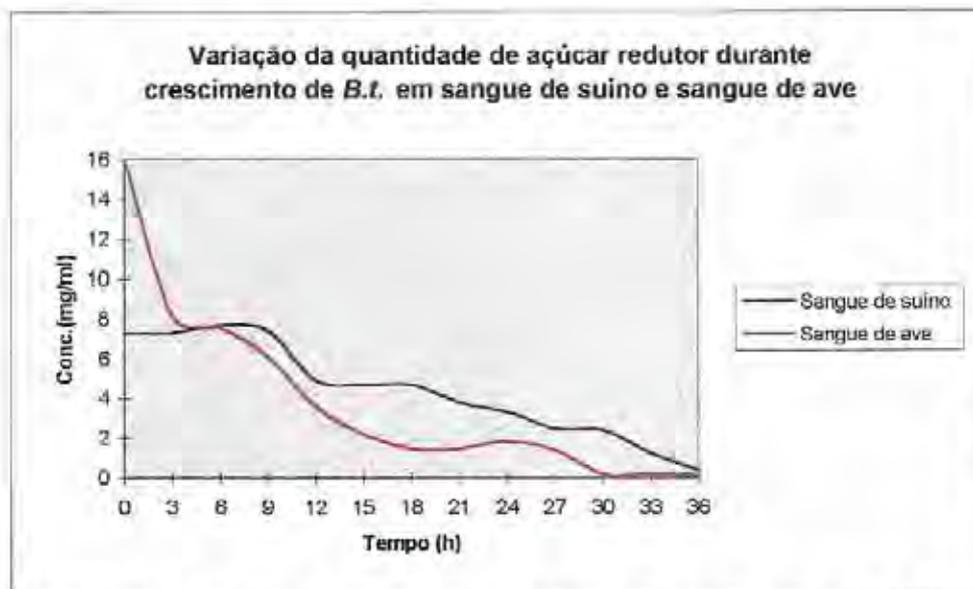


Figura V. 23. Variação na quantidade de açúcar redutor durante crescimento de *B.t.* em sangue de suíno e sangue de ave (100 g/l) e glicose 6 g/l em experimento com pré-fermentação.

As figuras apresentadas mostram em linhas gerais que a pré-fermentação não colaborou para um aumento de velocidade de crescimento ou produção. Isto reflete-se especialmente nos casos em que a fase de latência é bem reduzida, sendo dispensável acrescentar uma operação ao processo, uma vez que ela não apresenta nenhuma vantagem.

Os processos apresentam mesmo comportamento para ambos resíduos com vantagem para o de aves.

V.4. Estudos realizados com água de maceração de milho (milhocina).

Os experimentos realizados com este resíduo foram realizados para servir de comparação e corroboram os resultados obtidos por Moraes (1976), a qual constatou ser a milhocina um excelente substrato para a produção do inseticida bacteriano, usando *Bacillus thuringiensis*. Analisando a Fig. V. 24, observa-se que o crescimento celular é proporcional à concentração de resíduo utilizada. A fase logarítmica de crescimento inicia-se ao redor de 6 horas de fermentação, atingindo o seu pico por volta das 12 horas. A partir daí há uma pausa no crescimento, cuja duração é diversa para cada uma das concentrações. Este perfil sugere que o *Bacillus thuringiensis*, neste substrato, apresenta crescimento diáuxico, o qual caracteriza-se pelo crescimento do microrganismo primeiramente em uma fonte de energia, que exaurida, leva a uma pausa temporária, seguida de uma nova fase de crescimento, agora em outra fonte de energia.

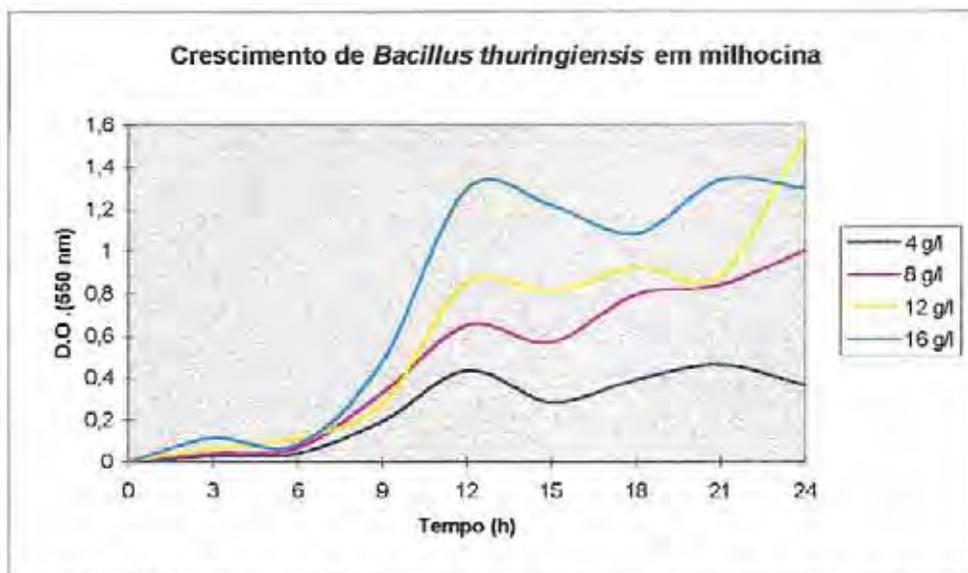


Figura V. 24. Crescimento de *B.t.* em milhocina nas concentrações de 4 g/l, 8 g/l, 12 g/l e 16 g/l.

Quanto ao comportamento do pH durante a fermentação, apresentado na Fig. V. 25, pode-se observar que este declina nas primeiras 6 horas, coincidindo com o início da fase logarítmica, que pode ser constatada na Fig. V. 24. O valor de pH mínimo atingido foi de 5,1, referente à concentração de 12g/l. A partir das 6 horas existe um aumento no pH, que no tempo de 24 horas atingiu 7,9 (referente à concentração de 16g/l), valor este maior que o pH inicial (7,3).

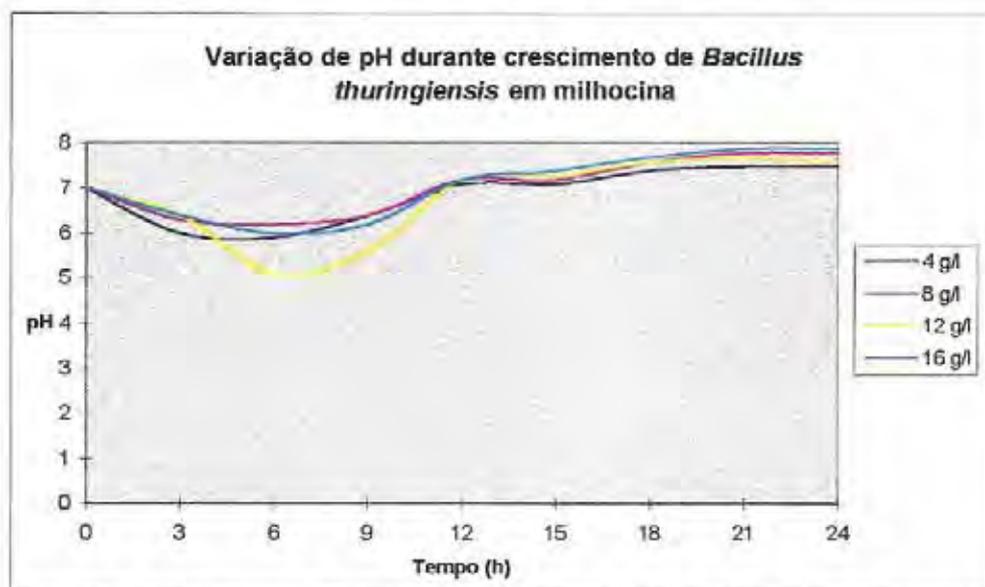


Figura V. 25. Variação de pH durante crescimento de *Bacillus thuringiensis* em água de maceração de milho ("milhocina"), nas concentrações de 4, 8, 12 e 16 g/l.

V.5. Estudos com efluente de indústria cervejeira.

Nos experimentos realizados com este residuo nenhum crescimento foi observado, tomando-se por base os valores de absorbância e pH.

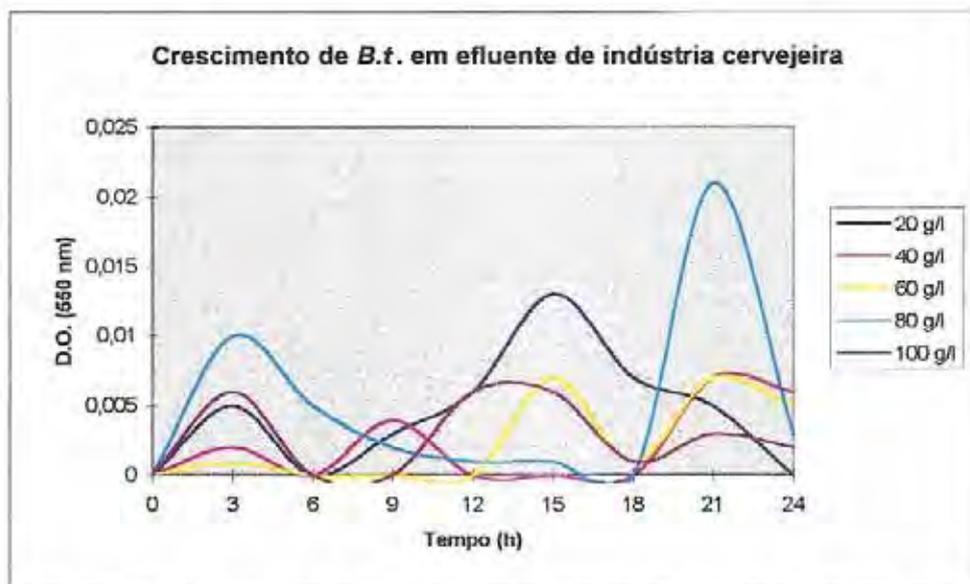


Figura V. 26. Crescimento de *B.f.* em efluente de indústria cervejeira, utilizado nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g/l.

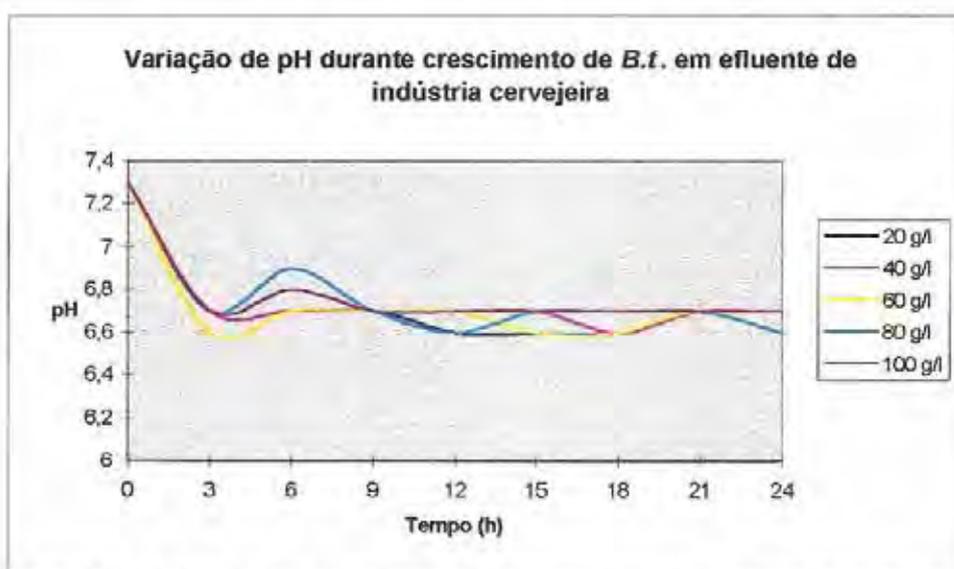


Figura V. 27. Variação de pH em meio de cultura composto por efluente de indústria cervejeira, utilizado nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g/l.

V.6. Estudos com soro de queijo.

Nas condições experimentais realizadas com este residuo observou-se um crescimento diminuto, com um pico ao redor de 15 horas, baseado nos valores de absorbância. Este comportamento pode estar associado ao baixo teor de proteínas existente, como pode ser evidenciado na tabela de composição química situada em material e métodos, bem como em análise do teor de nitrogênio realizada em laboratório. Observe-se que a escala das Ordenadas teve que ser expandida para poder mostrar algo.

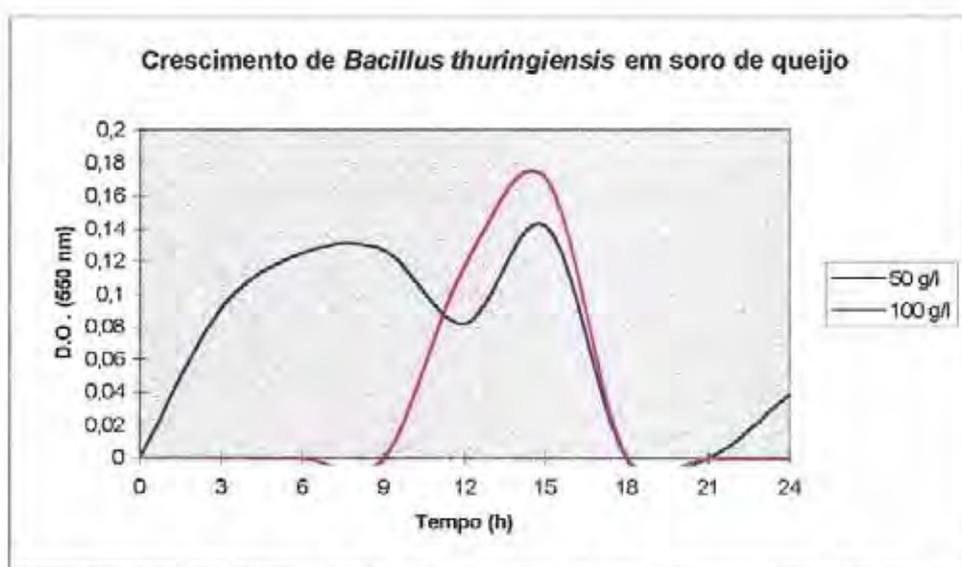


Figura V. 28. Crescimento de *B.t.* em soro de queijo nas concentrações de 50 e 100 g/L.



Figura V. 29. Variação de pH em meio de cultura composto por soro de queijo nas concentrações de 50 e 100 g/L.

V.7. Análise do teor de nitrogênio dos resíduos utilizados.

Tabela V.1: Análise do teor de nitrogênio dos resíduos utilizados

Através de análise das amostras pelo método de Kjeldahl, foram obtidos os seguintes resultados:

Amostra	Massa da amostra (g)	Volume de HCl (ml) (0,019 N)	% de Nitrogênio
Milhocina	0,14	13,6	26
Sangue de suíno	0,17	13,2	20,5
Sangue de ave	0,17	5,6	8,8
Soro de leite	0,15	1,2	2,1
Efluente de cervejaria	0,3	0,3	0,25

VI - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

C.1. Nas condições experimentais empregadas, pode-se concluir que os resíduos, sangue de aves e de suínos, utilizados neste trabalho podem ser usados em processos fermentativos para obtenção do bioinseticida de *Bacillus thuringiensis*.

C.2. Todos os experimentos realizados com sangue de aves (quatro concentrações) mostraram a viabilidade do uso do sangue em concentrações superiores a 100 g/l.

C.3. O uso de sangue de aves a concentração de 150 g/l, apresenta maior produtividade em 15 horas de fermentação, evidenciado pelo comportamento do pH (Figura V.15).

C.4. O uso do sangue de suíno é viável porém o rendimento em *Bacillus thuringiensis* é menor que em sangue de aves, à mesma concentração. O número de concentrações estudadas foi insuficiente para conclusões mais efetivas.

C.5. A realização de pré fermentação prévia ao processo não favoreceu os resultados para ambos os sangues estudados.

C.6. A esterilização do sangue animal prejudicou o crescimento bacteriano, mas a não esterilização demandou maiores cuidados assépticos, porém resultou em significativos resultados de crescimento e produção.

R.1. Recomenda-se um estudo multidisciplinar para estabelecer o volume de sangue de aves e suínos produzido no país, sua composição química antes e após esterilização a 121° C, 15 minutos, e a contribuição desse resíduo como poluente do meio ambiente (DQO, DBO)

R.2. Recomenda-se estudar um maior leque de concentrações do sangue animal para produção de *Bacillus thuringiensis*.

R.3. Recomenda-se que o estudo verifique DQO e DBO do sobrenadante da cultura (a água residuária), após a separação da Biomassa, para verificar se houve uma significativa redução na demanda de Oxigênio, o que favoreceria a qualidade do meio ambiente.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL HAMEED, A. Effect of amino acids in defined media on growth of *Bacillus thuringiensis* H-14. *Acta Pharmaceutica Fennica*, 101(4): 221-226.
2. ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.1, p. 21-37.
3. ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 11, p. 289-381.
4. ALVES, S. B., PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 27, p.845-867.
5. ALVES, S. B., MOINO JR., A., ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 40, p.1143-1162.
6. AVIGNONE ROSSA, C. A. et al. Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 27-31, 1990.
7. BATISTA FILHO, A. et al. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.31, p.917-956.
8. BREMNER, A. S. Higiene e inspeccion de carne de aves. 1ª ed. Zaragoza: Ed. Acibia, 1981. 210 pp
9. BROCK, T. D. *Biology of microorganisms*. Ed. Prentice Hall, 1994.
10. CHANG, C. L., CHEN, H. C. Development of nitrogen nutrient for microbial culture by utilizing waste swine blood. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 32(3): 227-244, 1994.
11. COMMANDEUR, P, KOMEN, J. Biopesticides: Options for biological pest control increase. *Monitor*, nº 13, pp. 6-8, 1992.

12. ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis, An environmental biopesticide. Theory and Practice*, England: Ed. John Wiley & Sons, 1993. pp. 311-4
13. ERNANDES, S., MORAES I. O. Estudo comparativo do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis* em fermentação submersa contendo sangue de ave e sangue de suíno. In: VI SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Rio de Janeiro. *Anais: Sessões de Pôsteres*/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1998. Pag 90
14. ERNANDES, S., MORAES, I. O. Estudos preliminares do efeito da fonte de nitrogênio no crescimento de *Bacillus thuringiensis*. In: 24º COLÓQUIO DE INCENTIVO À PESQUISA, São José do Rio Preto. *Caderno de Resumos*. 1997. Sessão B - Biológicas, pág. 36.
15. ERNANDES, S., MORAES, I. O. Verificação do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis*, obtido por fermentação submersa em meio de cultura composto por residuo agroindustrial. In: II SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas. *Anais*. 1997. Pag 104.
16. FALOCI, M. et al. 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, 32-38, 1990.
17. FRANCO, G.V.E. *Nutrição - Texto básico e tabela de composição química dos alimentos*, Livraria Atheneu Ltda. - 1982.
18. FRANKENHUYZEN, K. V. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis, an Environmental Pesticide: Theory and Practice*. England: John Wiley & Sons, 1993. Chap. 1, 1-35.
19. GARCIA-NAVARRO. *Manual de hematologia veterinária*, Livraria Varela, 1994. 169 pp.
20. HABIB, M. E. M., ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 12, p.383-432.

21. LERECLUS, D., DELECLUSE, A., LECADET, M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis*, Na Environmental Pesticide: Theory and Practice. England: John Wiley & Sons, 1993. Chap. 2, 37-69.
22. LIU, W. M., BAJPAI, R. K. A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Progress* 11(5): 589-591
23. MORAES, I.O. Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Campinas, 1973. 60 pp. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
24. MORAES, I. O. Ensaios de fermentação submersa para produção de inseticida bacteriano em minifermentador. Campinas, 1976. 76 pp. Tese de Doutorado.FEA/UNICAMP.
25. MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F., ARRUDA, R. O. M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 26, p.815-839.
26. NUMATA, M. et al. The properties of hidrolysates from porcine red blood cells as a peptone for bacterial media: Studies on enzymatic hydrolysate of porcine red blood cell to media material for bacteria: Part II. *Journal of the japanese society for food science and technology*, 39(2):142-150.
27. PARDI, M. C. *Ciência, higiene e tecnologia da carne: Tecnologia da carne e de subprodutos. Processamento tecnológico*. Goiânia: Ed. UFG, 1994. Vol.II, Parte VIII, pp. 1052-1072.
28. QUINLAN, R. J. and LISANSKY, S. G. Microbial Insecticides. In: REED, G. and REHM, H. -J.. *Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*. 1ª ed. Germany: Verlag Chemie, 1983. Vol. 8, Chap. 2e, pp. 233-254.
29. SALAMA, H. S., MORRIS, O. N. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis*, Na Environmental Pesticide: Theory and Practice. England: John Wiley & Sons, 1993. Chap. 11, 237-253.
30. SALVA, T. J. G. Processos fermentativos. In: 7º Curso de fundamentos de biotecnologia. Manaus, 1995. 36 pp. Universidade do Amazonas.
31. SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. Livraria Varela, 1996.

32. SOUZA, K. B. et al. Estudos dos efeitos da esterilização em meio de cultura composto de sangue de suíno na produção de *Bacillus thuringiensis* - Livro de Resumos. I ENEALI - Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia de Alimentos. Viçosa/MG 1998.
33. SRINIVAS, G. et al. Variations in the crystal morphology of *Bacillus thuringiensis* ssp. *yunnanensis* induced by medium composition *Microbios*, 81(328): 147-154.
34. SOLOMONS, G. L. Materials and methods in Fermentation, Academic Press, 1969.
35. UTZ, R. et al. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Pesticide: Theory and Practice. England: John Wiley & Sons, 1993. Chap. 12, 255-267.

Abstract

Bacterial Fermentation, using agroindustrial residues was studied, to get a biopesticide useful to control insect pests of the Agriculture or Public Health.

Literature deals with Biological Control and Microbial Control definitions, and this paper studied the development of *Bacillus thuringiensis* using animal blood as substrate, in order to compare its growth behavior with that over sugar cane molasses, corn steep liquor and glucose.

A rotary shaker was used and the growth conditions were: initial pH = 7.3; temperature at 30 ° C, agitation rate at 150 rpm and aeration at 1/5 volume media/nominal volume of the culture flask.

Best results using animal blood were get with no-sterilized blood, being the growth over chicken blood faster than in the pork blood. The pH behavior in this case was similar to that with culture media recognized as good sources. By microscopy it was followed the crystal and spores appearance, that are showed by photos.

It was concluded that the animal blood studied was a very good source to the development of the biopesticide using *Bacillus thuringiensis*, besides the advantage of the cost of this pollutant material.