



V.3, N.1, 2019

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE ATIVAÇÃO DO INÓCULO SÓLIDO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *ISRAESENSIS*, PARA USO EM FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.****APPRAISAL OF METHODS FOR ACTIVATION OF SOLID INOCULUM *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR *ISRAESENSIS*, FOR USE IN FERMENTATION SEMISOLID.**Juliana Soato Arana<sup>1</sup>, Regina de Oliveira Moraes Arruda<sup>2</sup>, Rodrigo de Oliveira Moraes<sup>3</sup>,  
Maria Josiane Conti Moraes<sup>4</sup>

**RESUMO:** *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido utilizado na produção de inseticidas biológicos para o controle de pragas agrícolas e contra larvas de insetos vetores de doenças pelo fato de ser inócuo a mamíferos e outros vertebrados e possuir um amplo espectro de ação com alta especificidade e reduzida resistência a insetos. O Bt produz durante a sua fase de esporulação um cristal protéico o qual é tóxico a larvas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera. A fermentação semissólida (FSS) tem como vantagem a produção de microorganismos em meio reduzido de água, levando a uma operação industrial limpa, ou seja, com baixo conteúdo de águas residuais e também utiliza resíduos agroindustriais e regionais, barateando a produção do Bt. Experimentalmente foram realizados métodos de ativação com microondas e ultrassom. A fermentação semissólida do *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) que foi utilizada como inóculo teve como substrato a quirera de milho (60%) bagaço de cana (25%) e farelo de soja (15%), com 10% de inóculo líquido, a fermentação foi realizada durante 72 h a 30°. Após a fermentação o material sofreu uma secagem a 50°C, por 24 h. Depois de fermentado e seco foi feita a ativação em forno microondas por 10 segundos em alta potência e ultra-som por 10 minutos, após ativação foram inoculados em meio Agar nutriente em placas de petri com 1 mL do ativado e levados a estufa em temperatura de 30°C por 24h. O acompanhamento foi feito em grau de opalescência o qual demonstrou que ambos os tratamentos foram eficientes em relação à ativação de esporos de Bti, porém o tratamento em microondas foi mais eficiente, pois além de mais rápido utiliza menos água no processo, o que é interessante em FSS.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bacillus thuringiensis*. Fermentação semissólida. Ativação. Cultura iniciadora.

**ABSTRACT:** *Bacillus thuringiensis* (Bt) has been used in the production of biological insecticides to control agricultural pests and insect larvae against disease vectors because it is harmless to mammals and other vertebrates and possess a broad spectrum of action with high specificity and low-resistance insects. Bt produces during its sporulation phase of a crystal protein which is toxic to larvae of Lepidoptera, Coleoptera, Diptera. The semisolid fermentation (SSF) has the advantage of producing microorganisms in the midst of low water, with a clean industrial operation, or with low content of wastewater and also uses and regional agro-industrial residues, reducing the production of Bt. Experimentally activation methods were performed with microwave and ultrasound. The semisolid fermentation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) that was used as inoculum substrate is broken corn (60%), sugar cane bagasse (25%) and soybean meal (15%), with 10% inoculum liquid fermentation was performed for 72 h at 30 °. After fermentation, the material has a drying at 50°C for 24 h. When fermented and dry the activation was done in the microwave for 10 seconds on high power and ultra-sound for 10 minutes after activation were inoculated on nutrient agar in petri dishes with 1 mL of activated and brought into the greenhouse temperature 30°C for 24h. The monitoring was done on the degree of opalescence, which demonstrated that both treatments were effective for activation of spores of Bti, but the microwave treatment was more effective, because in addition to faster using less water in the process, which is interesting in FSS.

**KEYWORDS:** *Bacillus thuringiensis*. Semisolid fermentation. Activation. Starter culture.

1 <sup>1</sup> Farmacêutica2 <sup>2</sup> Engenharia Agrônoma – Docente do Mestrado em Análise Geoambiental – Universidade UNG3 <sup>3</sup> Engenheiro de Alimentos – Probiom – Tecnologia Ltda.4 <sup>4</sup> Cientista de Alimentos – Coleção de Culturas Tropical - FAT



## INTRODUÇÃO

A utilização indiscriminada de inseticidas para controle de pragas desperta o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de métodos alternativos não poluentes.

O controle microbiano é um dos mais estudados visando à formulação de inseticidas a base de entomopatógenos para utilização em programas de manejo integrado de pragas. A bactéria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido usada no controle de insetos praga da agricultura e também em vetores da saúde pública.

O Bt destaca-se como a principal bactéria utilizada no controle biológico de insetos e pragas, portanto a utilização de produtos derivados desse entomopatógeno é pouco difundida no Brasil por isso, se faz necessário a divulgação desses produtos bem como a implementação de produções regionais que diminuam o custo de produção (ANGELON; VILAS-BOAS; CASTRO-GOMEZ; 2010).

Os bioinseticidas possuem uma grande vantagem se comparados aos inseticidas químicos, por serem inócuos a mamíferos e outros vertebrados, possuindo um amplo espectro de ação com alta especificidade e reduzida resistência a insetos.

O Gênero *Bacillus* constitui um grupo homogêneo de bactérias em forma de bastonetes. As células de *Bacillus*, aeróbica estritas ou aeróbicas facultativas, produzem endósporos via uma completa série de eventos de diferenciação celular, que inicia quando o crescimento vegetativo é interrompido por escassez de fonte de carbono ou nitrogênio. O Bt foi descoberto no início do século e com a constatação de seu efeito entomopatógeno e das toxinas por ele produzidas contra Lepidoptera – pragas da agricultura e Díptera – pragas da saúde pública, a sua importância ficou comprovada (ARRUDA, 1999).

A Fermentação semi-sólida (FSS) tem como ponto forte a heterogeneidade microscópica do substrato, o que tem favorecido crescentes rendimentos e mudanças de fisiologia celular de organismos microbianos apropriadamente escolhidos. Os microorganismos adaptados a baixos níveis de atividade de água crescem seletivamente em muitos processos de FSS, isso induz a um reduzido conteúdo de água na massa de fermentação levando a uma operação industrial limpa, ou seja, com baixo conteúdo de águas residuais (VINIEGRA, 1997).

Para fermentação semi-sólida podem ser utilizados substratos oriundos de resíduos agro-industriais, que passaram a ser estudados como fontes alternativas para obtenção de energia e biomassa (ARRUDA, 1999).

Outros resíduos como penas de galinha descartados como resíduo industrial e farelo de arroz podem ser utilizados como meio de cultura para a produção do Bti, os estudos bioquímicos realizados demonstraram que a quantidade de esporos (toxinas) obtidos a partir deste novo meio foi maior que a do meio convencional (extrato de leveduras) (POOPATHI; ABIDHA, 2009).

Existe no Brasil quatorze formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*, porém todos os produtos são importados. O custo de produção e a concorrência com os produtos químicos bem como a falta de investimentos dos setores públicos e privados são as causas principais de limitação para a sua produção (SILVA, 2007).

Este projeto de iniciação científica faz parte de uma Linha de Pesquisa para Produção de *Bacillus thuringiensis*, var. *israelensis*, por Fermentação Semi-Sólida, que tem sido desenvolvido por vários alunos de PIBIC, na Universidade Guarulhos.

## OBJETIVO

Avaliar métodos de ativação dos esporos de *Bacillus thuringiensis var israelensis*, para uso em Fermentação Semissólida.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

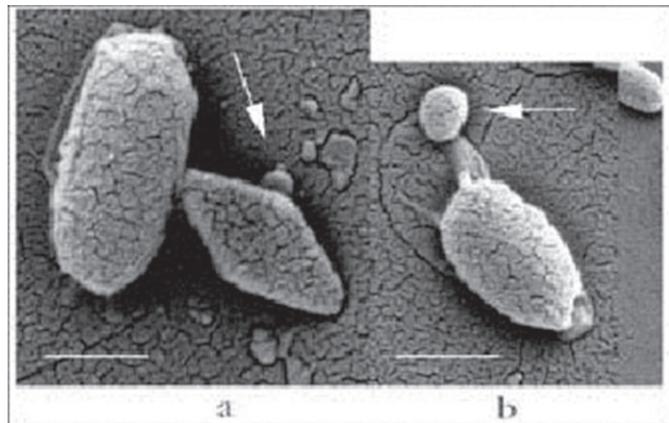
O controle microbiano de insetos, pragas ou vetores utiliza microorganismos patogênicos isolados de insetos vetores doentes durante epidemias epizootias, que ocorrem naturalmente. Estudaram-se o desenvolvimento de um microorganismo, o *Bacillus thuringiensis*, por fermentação submersa e semi-sólida, usando resíduos da agroindústria, bagaço e quirela de milho e da pecuária, sangue de aves, como principal substrato fermentativo, com a finalidade de obtenção de um bioinseticida para o uso contra pragas da Saúde Pública (MORAES, ARRUDA; ERNANDES, 2000).

Os bacilos são encontrados na natureza vivendo como saprófitas de solo, que funciona como reservatório de esporos destes microorganismos, depositados por cadáveres de insetos infectados ou por folhas de

vegetais que acumulam os esporos carregados pelo vento; ou como invasores de larvas de insetos das espécies susceptíveis. O gênero *Bacillus* possui a habilidade de formar endósporos que são resistentes à inativação por calor, dissecação, solventes orgânicos, ácidos e radiações (STHALY; ANDREWS; TOUSTENM, 1990; BERBET, 1998).

Simultaneamente ao processo de esporulação, ocorre produção de uma inclusão cristalina a qual é tóxica a larvas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e ainda nematóides e ácaros FEITELSON,; PAYNE; KIM, 1992, FEITELSON, 1994). (Fig. 1) Vários genes estão envolvidos no mecanismo de esporulação do Bt, a regulação e expressão desses genes resultam em uma grande produção de proteína Cry que é a responsável pela morte das larvas de diversos mosquitos (GUIDELLI-THULER.; ABREU; LEMOS, 2009).

**Figura 1:** Microscopia eletrônica de varredura de esporos e cristais (setas) de *Bacillus thuringiensis*. a) cristais com formato bipiramidal e b) cristais com formato esférico. Barras: 1 µm.



Fonte: CABALBO *et al*, 2005.

Os esporos depois de formados podem voltar à forma vegetativa se encontrar um ambiente apropriado, esta quebra de dormência é conhecida como ativação ou choque térmico. Uma forma comum de ativar um esporo é submetê-lo ao calor. Curran e Evans (1954) foram os primeiros a demonstrar sistematicamente que o calor subletal de 62°C a 95°C poderia induzir a germinação de esporos dormentes.

Quando as condições para o crescimento bacteriano não são favoráveis o Bt, como muitas bactérias, se esporula. Os esporos são um estágio dormente do ciclo da vida bacteriana, quando o microorganismo espera

circunstâncias melhores para o seu crescimento.

Ao contrário de muitas outras bactérias, quando o Bt esporula ocorre à formação de um cristal de proteínas. Este cristal é o componente tóxico do *Bacillus thuringiensis*. Tais esporos são ricos em ácido dipicolínico, componente que na forma de sal de cálcio e desempenha papel na termorresistência e que não é encontrado na forma vegetativa (ABDEL-HAMEED; CALBERG; EL-TAYEB, 1991).

Outro uso para o Bt é o controle de moscas no esterco acumulado em granjas tem sido feito com o uso de inseticidas químicos, reguladores de crescimento. A resistência de *Musca doméstica L.*, e outras pragas à inseticidas químicos, tem criado a necessidade de implantação de métodos de controle mais eficientes, mais como o manejo integrado e controle biológico. *Bli* e *Bs* são promissores agentes de controle microbiano para uso em programas integrados com participação da comunidade. Seguros para humanos, para o ambiente e inoculas para materiais domésticos, sua aplicação, fermentação e formulação comercial podem ocorrer com custo baixo, dependendo da disponibilidade de substratos, além disso, agentes de controle microbiano são componentes convenientes para programas integrados (ARRUDA, 1999).

Observou-se a influência do oxigênio sobre a formação de endotoxinas de Bt. Apesar da esporulação e síntese de endotoxinas serem ambas grandemente afetadas pelo suprimento de oxigênio, uma vez iniciada a esporulação ela será completada, mesmo que o fornecimento de oxigênio seja interrompido. Entretanto, a síntese de endotoxina é afetada por tal interrupção e apenas uma fração do rendimento esperado será atingida. Assim, o oxigênio deve ser continuamente suprido se for desejado atingir um alto rendimento de endotoxinas, principalmente quando se lembra que a endotoxinas é responsável por grande faixa de atividade do Bt. (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 2001).

O *Bacillus thuringiensis* tem seu crescimento ocorrendo na faixa de pH entre 5,5 a 8,5, sendo a faixa ótima entre 6,5 e 7,5. A temperatura ideal para o crescimento de Bti é entre 26° C e 37° C (LIMA *et al*, 2008), tendo a capacidade de crescer numa faixa entre 15° C e 45° C.

Segundo Nascimento *et al* (2004), na experiência realizada em seu trabalho de pesquisa observou-se alto grau de contaminação ao se utilizar soja com granulometria variada. Após a padronização dos grãos e uni-



formidade das partículas essa contaminação teve uma redução significativa (NEVES *et al*, 2001). A utilização de água estéril no biorreator contendo o substrato sólido facilita a transferência de calor, quando se utiliza o forno microondas para o tratamento térmico.

Silva (2005) concluiu em sua experiência de produção do *Bacillus thuringiensis var. israelensis* em estado sólido que o inóculo proveniente do processo fermentativo descontínuo e concentrado duas vezes apresentou melhores resultados na produção de esporos ( $7,8 \times 10^{12}$  UFC/KG) em comparação ao concentrado quatro vezes e puro.

O processo de germinação de esporos bacterianos envolve alterações da permeabilidade da membrana, íons e ativação de enzimas que degradam as camadas externas da semente. Uma série de componentes nos esporos que são necessários para germinação e foram identificados, incluindo uma família de esporos específicos de proteínas receptoras (a família Gera), um transportador de íons e córtex enzimas líticas (MOIR ; CORFE; BEHRAVAN, 2011).

Os esporos podem ser ativados com tratamento térmico breve subletal em banho maria a 70°C por 20min e também por pré-incubação em ambiente alcalino. O tratamento em meio alcalino é mais utilizado atualmente nos laboratórios, o pH estimula a germinação. Na ativação alcalina, os esporos são colhidos e lavados duas vezes com água estéril e após são ressuspensos em "spore pellets" com carbonato de sódio a 0,1M (pH 10) e incubados em temperatura ambiente por 30min com balanço suave em plataforma de agitação. Antes do teste de germinação os esporos são centrifugados e lavados por três vezes em Solução de Ringer ¼ shength (ABDOARRAHEM, 2009). A germinação dos esporos de *Bacillus* também pode ser desencadeada por L-alanina que estimula os receptores específicos, a L-alanina induzida em esporos podem germinar mais rapidamente do que os esporos não tratados (LIANG *et al* 2008).

O *Bti* possui três diferentes toxinas Cry (cristal tóxico), e uma Cyt (citolítica e hemolítica). Esta quantidade de toxinas reduz a probabilidade do desenvolvimento da resistência (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003)

Pesquisas recentes demonstram que o *Bacillus thuringiensis* pode ser utilizado como anti-helmíntico nematóide. A experiência realizada em camundongos demonstrou que a proteína Bt Cry5B é capaz de reduzir a produção de ovos do parasita em aproximadamente

98% e dos vermes intestinais em 70% após uma dose única. Em comparação com a eficácia do Cry5B com os anti-helmínticos utilizados atualmente sugere que sua atividade é tão boa e talvez melhor visto que esta proteína é rapidamente digerida pelo suco gástrico, sugerindo que a sua proteção contra o suco gástrico revelaria em anti-helmíntico superior (YAN *et al* 2010).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

- Microorganismos. *Bacillus thuringiensis var israelensis*, obtido inicialmente por pré-fermentação líquida (caldo nutriente) e depois inóculo sólido.
- Reator: embalagens plásticas esterilizadas, com bocal hermético, da empresa EMBAQUIM Com. Ind. Ltda., as dimensões dos sacos plásticos utilizados correspondem a 26,0 cm x 22,5 cm, com bocal de 5,5 cm de diâmetro e capacidade total de um litro.
- Substratos: Farelo de soja, quirera de milho e bagaço de cana de açúcar.

### Equipamentos.

- Câmara de germinação,
- Forno de Microondas
- Ultrassom: ULTRA SONIC CLEANER
- Estufa de secagem e esterilização
- Estufa retilínea
- Estufa de cultura bacteriológica
- Câmara de Fluxo Laminar
- Autoclave vertical
- Banho termostático
- Agitador magnético
- Reagentes, Vidrarias

### Métodos

Inicialmente foi feita a fermentação inicial com o *Bacillus thuringiensis var israelensis* que foi adquirido da Coleção de Culturas da Fundação André Toselo, na forma liofilizada, a própria coleção reativou o microorganismo e nos encaminharam em placas petri e tubo de ensaio em meio sólido Agar Nutriente. O Meio de Pré-fermentação encontra-se no Quadro 1.

V.3, N.1, 2019

**Quadro 1.** Meio de pré-fermentação para volume de 150 mL

Na <sub>2</sub> H Po <sub>4</sub>	0,705g
Na cl	0,75g
Glicose	0,30g
Triptose	3,0g
Água destilada	150,0ml

Com o *Bti* em tudo, iniciou-se o processo de produção do entomopatígeno. Em um erlenmeyer foi colocado 150 ml de água e adicionado os reagentes descritos acima (Quadro. 2). Após procedimento acima o meio foi esterilizado. Em seguida foi inoculado o *Bacillus thuringiensis var israelensis* com o auxílio de uma alça de platina em câmara de fluxo laminar (para evitar contaminação com outros microorganismos). Logo após o material foi levado para agitação no agitador magnético para 24 horas, (Fig.2)



**Figura 2:** Meio para pré-fermentação líquida.

Após o preparo desse inóculo, foi feita a fermentação semissólida inicial (ou “starter”) que será utilizada como inóculo para as demais. Para essa fermentação usamos a meia quirera de milho (60%) bagaço de cana (25%) e farelo de soja (15%), esse material foi levado ao tratamento térmico em forno microondas por dois minutos em alta potencia e dois minutos em espera após o tratamento inoculou-se o material com 10% de inóculo líquido, e o tempo de fermentação foi de 72h, a 30C, em estufa, (ARRUDA *et al* 2003).



**Figura 3:** Reactores com substratos.

Após a fermentação, o material sofreu uma secagem a 50 °C, por 24 h. Essa secagem faz com que as células vegetativas do *Bti* se transformem em esporos, pois há uma diminuição da água disponível para a célula, além da temperatura sair do seu ótimo que é próximo de 30 oC.

Esse material fermentado e seco é que foi utilizado para os testes de ativação de esporos. Para posterior uso em FSS.

### Métodos de Ativação

O método tradicional de ativação de esporos é o choque térmico, que é feito colocando os tubos de ensaio com as amostras sólidas, que devem conter também água até a altura do sólido, com banho maria a 80°C por 10 min. seguido de choque térmico em banho de gelo por 5 min (CURRAN; EVANS, 1954).

Outra maneira utilizada para ativação de esporos é o choque por alcalinidade (ABDOARRAHEM, 2009), onde se eleva o pH com soluções e com isso promove uma ativação desse esporo, porém como nosso objetivo é colocar esse material como inóculo em FSS, teríamos que depois acertarmos novamente o pH para continuáramos o processo.

Como alternativa aos dois processos já estabelecidos para a ativação dos esporos, foram avaliados os tratamentos com microondas e com ultra-som.

### Micro-ondas

Para cada teste em micro-ondas foram colocados 20g de inoculo sólido de cada experimento A, B, C e D e 5mL de água estéril em béquer de vidro, os béqueres foram vedados com película plástica (para evitar a evaporação da água). Estes sofreram tratamento térmico de 10s em potência alta, e após o resfriamento foram acrescentados mais 35mL de água estéril, foram feitos os testes em duplicata, Fig. 4.



Figura 4: Ativação em micro-ondas.

### Ultrassom

Em ultrassom o procedimento foi realizado em tubos de ensaio nos quais onde foram adicionadas 5g de inoculo sólido de cada experimento A, B, C e D e 17 mL de água destilada, os mesmos sofreram tratamento no ultra-som por 10min, Fig. 5.



Fig. 5: Ativação em ultrassom.

### Avaliação da ativação dos esporos

Após o tratamento todas as amostras foram plaqueadas, em sementeira de profundidade (*pour plate*), usando o meio Agar nutriente (10 mL) com 1 mL do meio ativado e incubados a 30°C por 24h, Fig. 6.

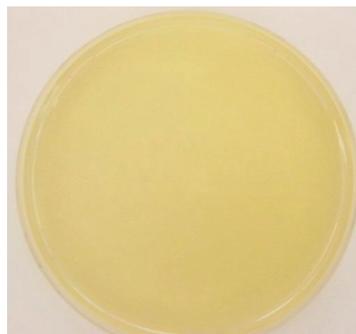
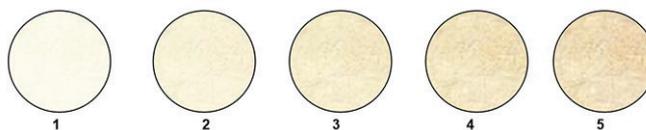


Figura 6: Placa petri com Agar nutriente.

O acompanhamento do processo foi através de Graus de Opalescência, em uma escala onde a transparência foi medida, quanto mais opaco ou leitoso mais esporos foram ativados sendo utilizado uma escala de 1 a 5, como pode ser observado no esquema abaixo, onde:

- 1 = 100 % de transparência (não há esporos ativados)
- 2 = 80 % de transparência
- 3 = 60 % de transparência
- 4 = 40 % de transparência
- 5 = 20 % de transparência (há muitos esporos ativados)



### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ativação é um método utilizado para acelerar o processo de germinação de bactérias, quando estas estão em forma de esporo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os métodos de ultrassom e micro-ondas como meios de ativação para o Bti para que este possa ser utilizado em meio sólido, como cultura iniciante e que possa ter um bom desempenho em relação a sua produção em grande escala como alternativa para uma produção industrial limpa.



V.3, N.1, 2019

O resultado obtido foi medido através da transparência/opalescência utilizando uma escala de 1 a 5 (onde o 1 é transparente e 5 leitoso).

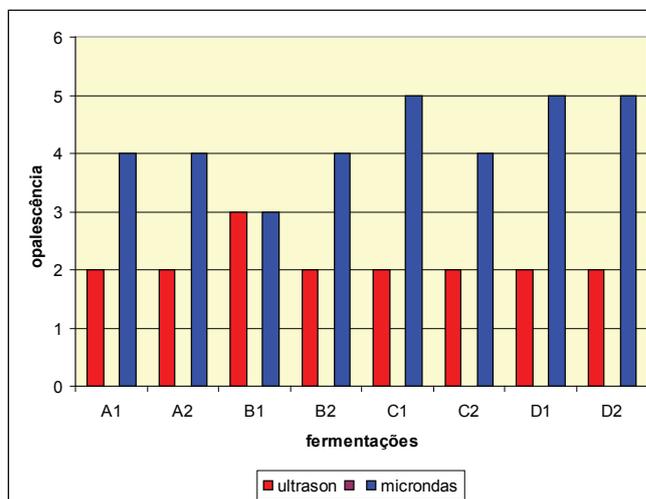
Graus de opalescência do transparente ao leitoso, opalescência é a propriedade óptica de um material transparente ou translúcido que lhe dá um aspecto ou uma tonalidade leitosa. Quanto mais leitosos mais microrganismos presentes, ou seja, mais esporos foram ativados. A tabela 1 e o gráfico 1 contém os resultados do experimento.

**Tabela 1.** Resultados de leitura de opalescência, das ativações de esporos de *Bacillus thuringiensis, var israelensis* usando ultrassom e micro-ondas.

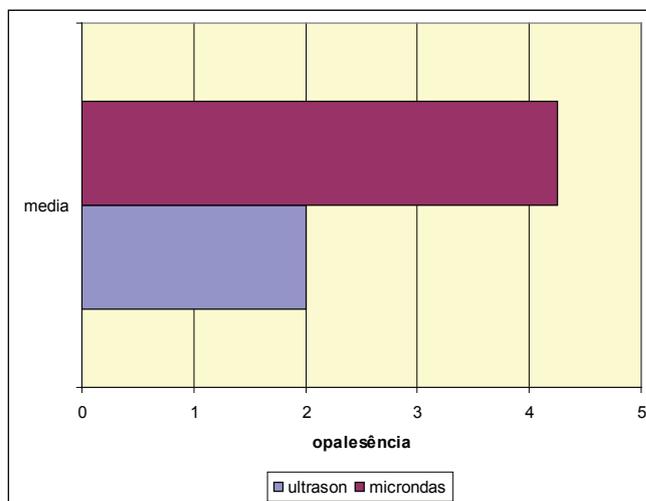
Experimento	Duplicata	Graus de opalescência	
		Ultra-som	Microondas
A	A1	2	4
	A2	2	4
B	B1	3	3
	B2	2	4
C	C1	2	5
	C2	2	4
D	D1	2	5
	D2	2	5
Média		2,00	4,25

Observa-se que houve maior crescimento bacteriano no experimento submetido ao tratamento de forno micro-ondas, mas deve-se levar em consideração que o experimento ativado em ultrassom está mais diluído em relação ao que sofreu tratamento em micro-ondas. No Gráfico 2 temos a média de crescimento dos experimentos medido em opalescência, onde é demonstrado que houve ativação em ambos os tratamentos.

**Gráfico 1.** Resultado da ativação de esporos de FSS de *Bacillus thuringiensis, var israelensis*, após tratamento com ultrassom e com micro-ondas.



**Gráfico 2.** Média de ativação de esporos de *Bacillus thuringiensis, var israelensis*, após o tratamento com ultrassom e micro-ondas.





## CONCLUSÃO

Tanto o processo por ultrassom como o de micro-ondas se mostraram efetivos na ativação de esporos de *Bacillus thuringiensis, var israelensis*, para posterior aplicação como inóculo em Fermentação semissólida (FSS), em contrapartida com o método normalmente utilizado através de choque térmico, que é feito com banho maria a 80°C seguido de choque térmico em banho de gelo. O choque térmico tem como desvantagens a utilização de banho a 80°C, que acaba por gelificar o amido presente no substrato dificultando o processo de semeadura em placa. Além do tempo total do tratamento ser maior que os outros dois.

Através dos resultados obtidos no experimento conclui-se que o melhor método de ativação de esporos foi o realizado por tratamento em micro-ondas sendo

que este ainda poderá ser otimizado nos próximos experimentos, podendo ser avaliado o melhor tempo para ativação. O tratamento por micro-ondas também possui a vantagem de utilizar o mínimo de água para ativação enquanto que o ultrassom é necessário preencher todo o conteúdo, pois o ultrassom só é transmitido em meio líquido. Em FSS usa-se o mínimo de líquido sendo necessário apenas para atingir uma atividade de água próxima a 0,93, o que significa perto de 20% do peso seco.

O método em forno micro-ondas se mostrou mais eficiente sendo assim pode ser utilizado como uma alternativa para ativação dos esporos de *Bacillus thuringiensis, var israelensis*, na produção em processo de fermentação semissólida e produzir o entomopatógeno para uso como bioinseticida no combate e controle de diversos insetos praga da agricultura e também vetores da saúde pública.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O. M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt—V. Composition and toxicity of the mosquito-cidal parasporal inclusions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 237-243, 1991. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/u378674m5820314h> Acesso em: 18 nov 2019.
- ABDOARRAHEM, M. M. *et al.* Genetic basis for alkaline activation of germination in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 19, p. 6410-6413, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2753073/> Acesso em 12 nov 2019
- ANGELO, E. A; VILAS-BÔAS, G. T; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/7599/6690>. Acesso em 02 de ago de 2019.
- ARRUDA, R. O. M. **Estudo da fermentação em estado sólido para produção de *Bacillus thuringiensis***, (Tese) Dourado em Tecnologia das Fermentações USP/FCF, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999.
- ARRUDA, R.O.M; MORAES I.O.; MORAES R.O.; BENITENDE, G; ROBERT, R, LAURENTS, CAPALBO, D. M. F. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* em reator plástico. In: XVI RAIB- Reunião Anual do Instituto Biológico. **Anais**. São Paulo, 2003.
- BERBET, M. A. **Estudo da Influência do suprimento de oxigênio e da concentração de glicose sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis israelensis* IPS82 em regime descontínuo**. (Tese) Doutorado em Tecnologia das Fermentações. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998.
- CAPALBO, DMF, VILAS-BOAS, GT, ARANTES, OMN, SUZUKI, MT, *Bacillus thuringiensis*, formulações e plantas transgênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 34, jan-jun, 2005.
- CURRAN, Harold R.; EVANS, Fred R. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 49, n. 4, p. 335, 1945.
- FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. **Proceedings [...]** Montpellier, France, p. 184, 1994.
- FEITELSON, Jerald S.; PAYNE, Jewel; KIM, Leo. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/technology**, v. 10, n. 3, p. 271, 1992.
- GUIDELLI-THULER, Ana Maria; ABREU, Irlan Leite de; LEMOS, Manoel Victor Franco. Expression of the sigma35 and cry2ab genes involved in *Bacillus thuringiensis* virulence. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 403-409, 2009. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162009000300016&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162009000300016&lng=pt&nrm=iso). Acesso em: 28 ago 2019.
- HU, Yan *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e614, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2830470>. Acesso em 12 nov 2019.
- LIANG, L. *et al.* The gerA operon is required for spore germination in *Bacillus thuringiensis*. **Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica**, v. 48, n. 3, p. 281-286, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479051>. Acesso em: 18 nov 2019.
- MOIR, Anne; CORFE, B. M.; BEHRAVAN, J. Spore germination. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 3, p. 403-409, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964118>. Acesso em 12 nov 2019.



V.3, N.1, 2019

- MORAES, I.O., ARRUDA, R.O.M; ERNANDES, S. Produção de *Bacillus thuringiensis* para o controle de pragas da saúde pública. In: XXVII Congresso Internacional de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais [...]**. Porto Alegre, 2000.
- MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F., ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas, In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. & SCHIMIDELL, W. 2001. **Biotecnologia Industrial**. Vol. 3, São Paulo, Editora Edgard Blücher, 2008.
- NASCIMENTO, S. A.; SANTOS, J.; BRITO FILHO, J. L.; MORAES, J. O; ARRUDA, R. O. M. Fermentação semi-sólida: influência da granulometria do substrato microondas. In: 7º Congresso da Produção Científicas. 6º Seminário de Extensão da Universidade Metodista. **CD – Room** – São Paulo: 2004.
- NEVES, E. C. R., OLIVEIRA, F. R. R., FONTANELE, J. C; ARRUDA, R. O. M. ZORZETO, V. S. Uso de microondas para o tratamento térmico do substrato sólido para fins fermentativos. In: II Encontro de Iniciação Científica e V Amostra de Pós-graduação da Universidade Presbiteriana Mackenzie. **Anais[...]** São Paulo, 2001.
- POLANCZYK, Ricardo Antonio; GARCIA, Marcelo de Oliveira; ALVES, Sérgio Batista. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. **Revista de saúde pública**, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102003000600020](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102003000600020). Acesso em 12 nov 2019.
- POOPATHI, Subbiah; ABIDHA, S. A Medium for the Production of Biopesticides (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*) in Mosquito Control. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 4, p. 1423-1430, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736752>. Acesso em 15 ago 2019.
- SILVA, M. Alternativas para a produção de bioinseticida *Bti*: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. (Dissertação) Mestrado em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007. Disponível em: <http://www2.enq.ufsc.br/teses/m187.pdf>. Acesso em: 15 ago 2019.
- STHALY, P.; ANDREWS, R.E. TOUSTEN, A.A. **The Genus Bacillus. Insect Pathogens. The Procarvates**. 2º ed., [s.l.] 1990.
- VINIEGRA G. Solid state fermentation: characteristics, limitations and monitoring, In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Netherlands. Kuwer Academic Publishers, 1997. p.5-22.