

Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 360

Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura

Rose Monnerat
Lilian Botelho Praça
Ester Yoshie Yosino da Silva
Sandro Montalvão
Erica Martins
Carlos Marcelo Soares
Paulo Roberto Queiroz

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na: Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Presidente

Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros

*Antonieta Nassif Salomão; Bianca Damiani
Marques Silva; Diva Maria Alencar Dusi ;
Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista
Teixeira; João Batista Tavares da Silva
Maria Cléria Valadares Inglis; Rosameres
Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto

João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações

Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Adilson Werneck

Foto da capa

Acervo Embrapa - BME

1ª edição

1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura / Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes ... [et al.]. – Brasília - DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

34 p. : il. color. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110 ; 360).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web:

1. Controle microbiológico. 2. Insetos. 3. Bioinseticidas. I. Série. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CDD 632.96

Autores

Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes

Bióloga, PhD em Patologia de Invertebrados, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Lilian Botelho Praça

Engenheira Agrônoma, PhD Agronomia, técnica Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ester Yoshie Yosino da Silva

Engenheira de Alimentos, PhD Ciências da Saúde, colaboradora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sandro Coelho Linhares Montalvão

Engenheiro Agrônomo, PhD Fitopatologia, colaborador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Erica Soares Martins

Bióloga, PhD em Biologia Molecular, pesquisadora, Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt)

Carlos Marcelo Silveira Soares

Engenheiro Agrônomo, PhD Entomologia, colaborador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Paulo Roberto Queiroz

Biólogo, PhD em Biologia Animal, pesquisador, Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt)

Apresentação

O controle microbiológico de insetos vem ganhando mercado, em todo mundo, nos últimos anos. Prática utilizada desde meados do século XX, o interesse pelo uso de produtos biológicos é consequência de vários fatores, entre os quais podem ser apontados: a crescente resistência dos insetos-praga aos agrotóxicos, os custos da aplicação dos produtos químicos, os impactos negativos que esses produtos têm sobre o meio ambiente e os trabalhadores rurais, etc.

Dentre os produtos para controle biológico de insetos, destacam-se os que têm a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) como princípio ativo. No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, há cerca de 20 produtos comerciais registrados que têm Bt em sua formulação. Os principais insetos-alvo da utilização de bioinseticidas à base de Bt são as lagartas de diferentes culturas como soja, milho, algodão, tomate, brássicas, frutas, etc. Há interesse, também, em utilizar Bt para o controle de coleópteros e insetos sugadores.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia trabalha com Bt para controle de insetos-praga há mais de 30 anos. Nesse período: montou uma Coleção de Bactérias Entomopatogênicas que tem cerca de 3.000 isolados; desenvolveu estudos que motivaram avanço do conhecimento em relação às próprias bactérias e às interações com pragas agrícolas e insetos vetores de doenças que afetam seres humanos e animais de interesse zootécnico; efetuou o depósito de diferentes patentes de invenção; desenvolveu, em conjunto com empresas privadas, diversos bioinseticidas que já se encontram no mercado; e também contribuiu para a formação de muitos mestres e doutores e concedeu estágios de iniciação científica a inúmeros estudantes.

Nos últimos cinco anos está acontecendo no Brasil a chamada produção “on farm”, quando os produtores rurais fabricam, em suas próprias fazendas, caldos fermentados contendo *Bacillus thuringiensis* e os aplicam, sem formulação, nas lavouras. A aplicação é feita em, no máximo, 2 a 3 dias após o término do processo fermentativo.

A produção “on farm” de Bt apresenta algumas vantagens sobre o uso de produtos comerciais. A maior delas é a diminuição dos custos para o fazendeiro, devido à fabricação própria e à inexistência dos custos de transporte e armazenagem. Entretanto, essa fabricação também importa em alguns riscos, sendo o maior deles, o da contaminação do caldo fermentado com microrganismos patogênicos ao ser humano. Também pode acontecer que, devido a condições inapropriadas de produção, o desenvolvimento do Bt resulte em baixa concentração de cristais proteicos, os verdadeiros princípios ativos contra os insetos.

O Manual de Produção e Controle de Qualidade de Produtos Biológicos à Base de *Bacillus thuringiensis* Para Uso na Agricultura, elaborado por equipe multi-institucional liderada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tem o duplo objetivo de incentivar a utilização de bioinseticidas à base de Bt e orientar empresas e agricultores na produção segura e eficaz desses produtos.

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-geral

Sumário

1. Introdução	07
2. Objetivo	08
3. A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i>	08
4. Produção e formulação de produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
5. Controle de qualidade de bioinseticidas	12
5.1. Procedimento para determinação de pH de produtos biológicos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
5.2. Procedimento para determinação do teor de ingrediente ativo de produtos biológicos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
5.3 Procedimento para determinação da CL ₅₀ de produtos biológicos a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> a larvas de lepidópteros	15
5.4. Procedimento para avaliação da eficácia de produtos biológicos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> para o controle de larvas de lepidópteros	22
5.5. Procedimento para determinação de contaminantes em produtos biológicos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
6. Equipamentos básicos para produção de <i>Bacillus thuringiensis</i> finais	26
7. Referência Bibliográfica.....	28

1. Introdução

O controle de pragas é um processo de grande valia, tanto na saúde humana quanto na produção agrícola e pecuária. Cerca de 20% das safras de alimentos do mundo são perdidas devido ao ataque de pragas nas lavouras. Vale salientar que alguns insetos e fitopatógenos, além de causar danos diretos às plantas, são também vetores de vírus e bactérias. Os danos provocados por esses agentes podem variar de uma região para outra, e os gastos com seu controle podem alcançar até 30% do custo de produção (Castelo Branco et al., 2001; Monnerat et al., 2004).

A importância do controle de pragas e aumento da consciência da população acerca dos efeitos diretos e indiretos dos pesticidas convencionais sobre a saúde pública e ambiente em geral tem demandado novas formas de controle que sejam economicamente viáveis e menos danosas ao ecossistema. Uma alternativa para o controle de pragas é a utilização de produtos de origem biológica.

Um dos agentes de controle biológico mais utilizados no mundo é a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Este microrganismo apresenta uma grande diversidade biológica e pode sintetizar diferentes proteínas tóxicas a diversas pragas. Produtos que utilizam este agente como princípio ativo estão disponíveis no mercado desde os anos 70, controlando com sucesso diversos insetos da ordem Lepidoptera, Diptera e Coleoptera.

No Brasil, existem cerca de 30 empresas produzindo biopesticidas, entretanto, seguindo a tendência mundial, empresas nacionais e internacionais estão interessadas nesta tecnologia.

No Brasil, o uso de bioinseticidas comerciais à base desta bactéria aumentou a partir da safra 2013/2014, devido aos prejuízos causados por *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em diversas culturas. Entretanto, o alto custo e escassez de produtos fizeram com que os produtores iniciassem a produção de bioinseticidas na própria propriedade rural, abordagem esta conhecida como produção “on farm”. Por se tratar de um microrganismo cujas condições inadequadas de multiplicação podem gerar produtos de baixa qualidade, que além de apresentarem pouca eficiência podem estar contaminados e causar danos ao ambiente e à população em geral, este manual foi elaborado visando fornecer informações básicas sobre a bactéria, sua produção e controle de qualidade.

2. Objetivo

Este manual tem como objetivo orientar empresas e agricultores, que produzem bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, quanto à produção e à realização de testes de controle de qualidade, gerando produtos seguros, eficazes e que atendam às expectativas do usuário.

3. A bactéria *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, da família Bacillaceae, que produz no momento de sua esporulação inclusões proteicas cristalinas conhecidas por δ -endotoxinas (Monnerat e Bravo, 2000; Bravo et al., 2005) (Figura 1). Estas toxinas são altamente específicas aos seus insetos-alvo, inócuas ao ser humano, vertebrados e plantas, e têm efeito não poluente ao meio ambiente por serem completamente biodegradáveis (Whiteley e Schnepf, 1986; Bravo et al., 2005; Monnerat et al., 2007).

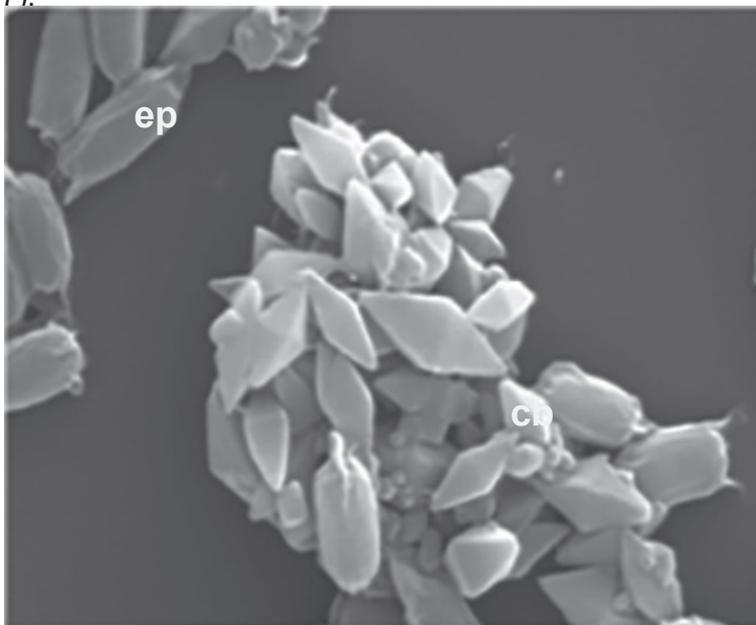


Figura 1 – Esporos (ep) e inclusões proteicas cristalinas bipiramidais (cb) de *B. thuringiensis*.

As vantagens da utilização de *B. thuringiensis* são a especificidade aos organismos susceptíveis, o efeito não poluente ao meio ambiente, a inocuidade aos mamíferos e invertebrados e ausência de toxicidade às plantas (Whiteley e Schnepf, 1986; O.M.S., 1987). Esta bactéria foi isolada em 1901, no Japão, pelo bacteriologista Ishiwata, que descobriu ser ela a responsável pela mortalidade de larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Em 1911, Berliner, na Alemanha, descreveu a mesma bactéria, isolada de lagartas mortas da traça da farinha, *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), e a chamou *B. thuringiensis* em homenagem ao estado de Thuringen, na Alemanha, onde foram coletadas as lagartas. Em 1915, este mesmo autor notou presença de inclusões parasporais nas células de *B. thuringiensis* e associou a toxicidade à presença dessas estruturas, fato que foi confirmado posteriormente.

Em 1938 uma formulação à base desta bactéria, a Sporeine foi produzida na França e, a partir dos anos de 1950, diversos países como a URSS, antiga Tchecoslováquia, França, Alemanha e Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* (Weiser, 1986).

A partir dos anos 60, os trabalhos de isolamento de *B. thuringiensis* se intensificaram. Nesta época foi descoberta a estirpe de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, chamada HD-1 (Dulmage, 1970), que apresentava toxicidade 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. Posteriormente, se isolou uma estirpe eficaz contra dípteros (Goldberg e Margalit, 1977) e uma estirpe patogênica a coleópteros (Krieg et al, 1983). Estima-se que existam 40.000 estirpes conhecidas, entre estas, algumas são tóxicas a nematoides (Edwards et al., 1988), trematoides, protozoários, himenópteros, homópteros, ortópteros e ácaros (Feiltelson, 1994).

B. thuringiensis produz diferentes tipos de toxinas: as δ -endotoxinas, α -exotoxina, β -exotoxina, VIP (vegetative insecticidal proteins) e SIP (secreted insecticidal proteins) (Estruch et al., 1996; Hofte e Whiteley, 1989; Warren et al., 1998; Hansen e Salamiou, 2000). As mais utilizadas são as toxinas Cry, que estão no cristal produzido pela bactéria durante a fase de esporulação. Essas toxinas têm um amplo espectro de ação, sendo tóxicas a insetos de diversas ordens. As toxinas VIP e SIP são produzidas na fase de crescimento vegetativo e atuam sobre insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera. A α -exotoxina apresenta atividade citolítica e é tóxica a ratos e outros vertebrados, e a β -exotoxina, por apresentar efeito teratogênico e mutagênico, não deve ser utilizada como base de produtos comerciais. Além destas, algumas estirpes podem produzir moléculas bioestimuladoras e biofertilizadoras, como fitohormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Cherif et al., 2003; Raddadi et al., 2008), além de proteínas parasporinas, as quais exibem atividade citotóxica específica contra células cancerígenas de humanos (Ohba et al., 2009, Okumura et al., 2010).

A ação das toxinas Cry ocorre após a sua ingestão pelos insetos. Os sintomas de intoxicação são a perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte (Aronson et al., 1986). As larvas perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escuro. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib e Andrade, 1998; Monnerat e Bravo, 2000).

Bacillus thuringiensis é o principal princípio ativo de natureza biológica produzido e utilizado, ocupando 2% do total de inseticidas vendidos no mundo (Estruch et al., 1996; Baum et al., 1999; Raymond et al., 2010). As formulações da maior parte dos produtos biológicos agrícolas existentes no mercado são baseadas nas estirpes das subespécies *kurstaki* HD-1 (Harrison e Bonning, 2000) e *aizawai* (Bravo et al., 2011).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2018), existem 20 produtos à base de *B. thuringiensis* no mercado para o controle de pragas agrícolas: Able, Agree, Bac-Control Max WP, Bac-Control WP, BTControl, COSTAR, Crystal, Dipel, Dipel ES-NT, Dipel WG, Dipel WP, Helymax EC, Helymax WP, Javelin WG, Ponto Final, Tarik WP, Thuricide, Thuricide SC, Winner Max EC e Xentari. Estes produtos comerciais têm como princípios ativos as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e ainda uma estirpe recombinante *B. thuringiensis* *kurstaki* e *B. thuringiensis* *aizawai* que são utilizados no controle de lagartas como: *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) e *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) (Lepidoptera: Gelechiidae), *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas) (Lepidoptera: Plutellidae), entre outras espécies pertencentes à Ordem Lepidoptera.

4. Produção e formulação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis*

Em todo o mundo, a produção comercial de *B. thuringiensis* se dá através do cultivo líquido agitado, também conhecida como fermentação submersa descontínua ou batelada (Hurtado, 2004). Entretanto, alguns países como a China empregam o cultivo estacionário ou fermentação semi-sólida.

A fermentação em batelada consiste na disponibilização inicial de um meio de cultura para que o microrganismo aumente em número de forma exponencial até que se esgotem os nutrientes e o substrato torne-se limitante ao crescimento. Durante o processo, pode-se acrescentar algum nutriente específico ou o meio de cultivo completo, ao que se denomina de batelada alimentada. Ambas as formas de fermentação são conduzidas em biorreatores ou fermentadores que, além de permitir o cultivo da estirpe do microrganismo selecionado, possibilitam o controle da espuma, pH, temperatura, agitação e saturação de oxigênio (Soares, 2006).

O processo de multiplicação bacteriana sempre inicia-se em laboratório com a produção do pré-inóculo, a partir de uma estirpe comprovadamente pura, geralmente em recipientes do tipo Kitazato ou Erlenmeyer, que é transferido para o pré-fermentador, cujo volume útil varia de 2 a 10% do volume do cultivo final. A principal finalidade do pré-inóculo no processo fermentativo é reduzir o período de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo adotado, diminuindo o tempo total de fermentação (Couch, 2000).

Alguns processos fermentativos “on farm” têm adotado como inóculo produtos comerciais. Cabe destacar que essa é uma prática temerária, visto que algumas etapas do processo fabril podem propiciar certo grau de contaminação. Ainda que esses contaminantes não afetem a eficácia do mesmo, quando introduzidos no início do processo fermentativo, crescem mais rápido que a estirpe desejada e afetam a qualidade do produto final. Além disso, os produtos comerciais contêm estabilizantes e conservantes que podem interferir no processo fermentativo.

Hurtado (2004) divide didaticamente o processo fermentativo para *B. thuringiensis* em três etapas: A primeira é o crescimento vegetativo caracterizado pela produção de lactato, piruvato e acetatos, sendo os últimos responsáveis pela diminuição do pH do meio de cultura. A segunda etapa, chamada de transição, inicia-se com o consumo de acetato, à medida em que o β -hidroxibutirato é armazenado como um polímero (poli- β -hidroxibutirato) em forma de grânulos no meio de cultivo. A terceira e última etapa, caracterizada pela esporulação, envolve o consumo do poli- β -hidroxibutirato para formação do esporo, provavelmente para suprir a energia necessária. Além disso, nessa etapa, ocorre a síntese de ácido dipicolínico e aminoácidos que se incorporam como sais de cálcio dentro do esporo. Ainda nessa fase, conjuntamente com o desenvolvimento do esporo, ocorre a formação em múltiplas etapas do cristal proteico.

O complexo de ácidos formados pelo metabolismo bacteriano nas etapas iniciais da fermentação indica que o pH deve ser monitorado e, conforme a concentração de nutrientes no meio de cultura, necessita ser regulado pela adição de bases. Por outro lado, valores alcalinos são vistos no terço final do processo. Neste momento a regulação de pH se faz com ácidos. A elevação do pH no final do processo se dá em função do metabolismo bacteriano das fontes proteicas, resultante da liberação de amônia pela desaminação dos aminoácidos (Saksinchai et al., 2001). Este perfil de variação de pH, ácido no início e básico ao final, foi demonstrado por Abdel-Hameed (2001). De maneira geral, o pH inicial do meio de cultivo se encontra entre 6,8 e 7,2 e deve ser mantido próximo à neutralidade durante boa parte da fermentação para se evitar a baixa produção de toxinas (Sikdar e Majumdar, 1991).

As fermentações de *B. thuringiensis* são extremamente aeróbicas, sendo que o grande consumo de oxigênio é característica intrínseca ao processo. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) é um dos fatores mais importantes para a síntese do cristal proteico (Holmberg et al., 1980). Conforme Couch (2000), para uma boa síntese das proteínas Cry, a saturação do oxigênio dissolvido no meio de cultivo não deve ficar abaixo de 20%. Já Maldonado-Blanco et al. (2003) indicam que há incremento na produção de δ -endotoxina quando o oxigênio dissolvido é mantido acima de 26%. Na prática, isso indica que os fermentadores deverão ser dotados de impelidores, para que haja uma correta transferência de oxigênio ao meio de cultivo.

A temperatura considerada mais adequada ao cultivo está entre 28 e 32 °C, sendo que temperaturas inferiores retardam a cinética e aumentam em muito o tempo do processo, ao passo que temperaturas muito elevadas podem interferir na formação das proteínas Cry (Couch, 2000).

O ponto de colheita ou momento de parada do processo fermentativo é determinado pela presença de esporos livres, correspondendo a mais de 90% das células bacterianas presentes no mosto, dependendo para tanto cerca de 28 a 36 horas. Neste ponto, o teor de sólidos totais, usualmente, varia de 6 a 8% e estima-se que metade disso corresponda ao complexo esporo-cristal.

Os meios de cultivo para *B. thuringiensis* devem prover ao microrganismo todas as substâncias requeridas para a síntese do material celular e para a geração de energia (Hurtado, 2004). Arcas (1996) acrescenta que na seleção dos componentes que constituirão determinado meio devem ser considerados três fatores principais: a disponibilidade, o custo e a habilidade dos microrganismos em utilizá-los. Outro ponto muito importante é a quantidade de possíveis contaminantes presentes nos componentes do meio de cultura. Uma maior contaminação necessita de um maior tempo de esterilização, onerando o processo.

Os requerimentos nutricionais da bactéria consistem basicamente de uma fonte de carbono para o suprimento de energia e para os constituintes celulares. Como fontes de carbono normalmente empregadas citam-se a sacarose, amido, melaços, glicose e glicerol. Outro requerimento importante é o nitrogênio, que deve ser satisfeito com fontes orgânicas e inorgânicas concomitantemente. Dentre as orgânicas, figuram o extrato de levedura, farinha de soja, farinha de peixe, farinha de sangue, aminoácidos, peptonas e proteínas isoladas. Já entre as fontes inorgânicas, destacam-se os sais de amônio. Também os minerais, tais como fósforo, potássio, cálcio, ferro, sódio, magnésio, cobalto, molibdênio e zinco, são essenciais às funções celulares. Avignone-Rossa et al (1992) acrescentam que, para boas produções de *B. thuringiensis*, deve-se observar uma relação C:N (relação carbono/nitrogênio) entre 0,66 e 1.

A escolha dos componentes do meio de cultura é estratégica para uma produção economicamente viável do bioinseticida e não deve ultrapassar 30% do custo total de produção.

Após a fermentação, torna-se necessário recuperar o ingrediente ativo, o complexo esporo-cristal, do meio de cultivo (Hurtado, 2004). Vários são os métodos empregados de forma combinada ou não, em plantas industriais, mencionando-se a centrifugação, sedimentação, flotação e microfiltrações (Soares, 2006). Os processos “downstream” fornecem um concentrado cremoso (caldo técnico, mosto concentrado ou lodo) que poderá ser seco, obtendo-se o pó técnico ou formulado (Arcas, 1996).

A formulação é a última etapa do processo de produção, antecedendo ao envase. Pode ser compreendida como qualquer combinação do caldo ou pó técnico bacteriano (ingrediente ativo) com um ou mais materiais. Dependendo da apresentação desejada (líquida, gel ou sólida), são escolhidos diferentes adjuvantes, como adesivos, aglutinantes, emulsificantes, conservantes, molhantes, fa-

goestimulantes, desagregantes, etc. Há ainda elementos inertes, também conhecidos por veículos ou enchimentos (Soares, 2006).

A função primordial de uma formulação para produtos biológicos é preservar o ingrediente ativo vivo, conferindo vida de prateleira ao produto. Especificamente para o *B. thuringiensis*, a formulação deve ser capaz de preservar a δ -endotoxina, que é uma glicoproteína. Concomitantemente, deve facilitar o armazenamento e transporte, melhorar a aplicação, aumentar o poder residual após a aplicação e, em decorrência, a eficiência de controle. Via de regra, as formulações são segredos industriais e muito pouca informação encontra-se disponível, não obstante muitas vezes a formulação é a etapa mais cara do processo de produção podendo superar 50% do custo final do produto.

5. Controle de qualidade de bioinseticidas

O controle de qualidade dos bioinseticidas é uma etapa fundamental do processo de produção, seja em laboratórios, biofábricas “on farm” ou nas empresas de grande porte. O controle de qualidade visa avaliar as características do bioinseticida sob diferentes aspectos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia (Yousten, 1984; Alves e Moraes, 1998; OECD, 2013).

5.1. Procedimento para determinação de pH de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis*

O pH pode ser determinado através do uso de equipamento pHmetro, indicadores ou fitas de pH.

5.1.1. Determinação do pH utilizando pHmetro: Utilizar o pHmetro de acordo com o manual de instruções de uso, calibrando-o antes de sua utilização.

- a) separar em torno de 100 mL da amostra, utilizando proveta, para determinação de pH;
- b) no caso de amostras sólidas, pesar 1,0 grama em béquer e diluir em 100 mL de água destilada (caso seja necessário, outras diluições poderão ser feitas de acordo com a concentração do produto, exemplo: 1,0 grama em 1.000 mL); colocar uma barra magnética (bailarina ou peixinho) na amostra, deixando a(s) amostra(s) sob agitação constante até a sua homogeneização ;
- c) retirar o eletrodo da solução de KCl, lavar com água destilada, secar com papel macio sem esfregar o eletrodo;
- d) inserir o eletrodo na amostra;
- e) aguardar a estabilização da leitura no mostrador do pHmetro;
- f) registrar o valor do pH em caderno-ata ou formulário próprio.

5.1.2. Determinação de pH, utilizando-se indicadores de pH ou fitas:

- a) preparar a amostra como no item anterior;
- b) inserir o indicador de pH na amostra, aguardar que a cor da fita estabilize;

d) conferir a cor do indicador com a tabela de cores e pH referência (fita padrão) e registrar o valor do pH em caderno-ata ou formulário próprio.

5.1.3. Valores de referência e de criticidade

No caso da determinação de pH de produtos biológicos, aceita-se a variação de 5% no resultado.

5.2. Procedimento para determinação do teor de ingrediente ativo de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis*

O método consiste em determinar a concentração de ingrediente ativo através da determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

5.2.1 Preparo de meio de cultura sólido (Meio Embrapa Sólido):

a) para preparar 1 litro de meio de cultura, pesar separadamente os reagentes abaixo em béqueres de 100 mL:

extrato de levedura.....1,0 g

KH₂PO₄.....1,0 g

b) colocar os ingredientes pesados em um béquer de 2.000 mL, completar o volume para 1.000 mL de água destilada e 10 mL de sais minerais (Tabela 1) misturar os reagentes com uma espátula;

c) introduzir uma barra magnética (bailarina ou peixinho) no béquer e homogeneizar no agitador magnético;

d) ajustar o pH para $7,0 \pm 0,2$, adicionando NaOH 5 M, como solução básica ou HCl 6 M, como solução ácida;

e) pesar 10 gramas de Ágar nutritivo, por duas vezes e colocar cada uma das 10 gramas pesadas em dois Erlenmeyers de 1.000 mL;

e) passar 500 mL de meio para cada um dos erlenmeyers e agitar levemente para a homogeneização do meio com o Ágar;

f) tampar os frascos com rolha de algodão e papel alumínio ou papel pardo;

g) esterilizar, os frascos com meio de cultura, em autoclave a 120°C por 20 min;

h) os meios de cultura poderão ser vertidos em placas de Petri assim que forem retirados da autoclave ou dias depois, dentro da capela de fluxo laminar;

i) colocar as placas na estufa incubadora empilhadas com as tampas voltadas para a superfície da estufa, a 30 °C por, no mínimo, 48 h e até 72 h;

j) ao final do tempo, verificar a presença de crescimento microbiano. Utilizar apenas as placas que não apresentarem nenhum tipo de crescimento.

5.2.2. Preparo da suspensão bacteriana a partir de amostras sólidas ou líquidas:

Antes de iniciar a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC), esterilizar todo o material a ser utilizado: ponteiras, tubos de ensaio ou de centrifugação de 15 mL e recipientes de vidro com água destilada suficiente para realização das diluições.

- a) enumerar, de 1 a n, os tubos de ensaio e colocá-los no suporte;
- b) colocar 9 mL de água destilada estéril em cada um dos tubos quando as amostras a serem quantificadas forem amostras líquidas ou 10 mL no primeiro quando forem amostras sólidas e 9 mL nos tubos restantes;
- c) no caso das amostras líquidas, retirar 1 mL da amostra com micropipeta P1000 e colocar no tubo com 9 mL de água destilada ou pesar 0,01 g em tubo de polipropileno de 1,5 mL em balança de precisão (esta quantidade pode variar conforme a especificação do produto) e transferir para o tubo de ensaio com 10 mL de água destilada, em seguida homogeneizar a solução no agitador de tubos;
- d) para o cálculo do número de esporos, as amostras devem ser submetidas a choque térmico (80°C por 12 minutos e gelo por 5 minutos) antes de serem diluídas;
- e) trocar a ponteira por outra estéril. Independente de a amostra ser sólida ou líquida, transferir 1 mL da solução do tubo 1 para o tubo 2. Homogeneizar no agitador de tubos;
- f) repetir este procedimento até o último tubo, sempre homogeneizando cada solução antes da transferência para o próximo tubo. A cada tubo trocar a ponteira por outra estéril;
- g) depois de realizada todas as diluições, semear em placas de Petri com meio de cultura, 100 µL de cada uma das diluições;
- h) espalhar, com alça de Drigalsky, a solução sobre toda a superfície do meio de cultura;
- i) fechar a placa de Petri e vedar com filme plástico;
- j) identificar as placas com nome da amostra, número da diluição, se foi ou não realizado choque térmico na amostra e data do plaqueamento;
- k) colocar as placas em estufa incubadora sob temperatura de 30 °C;
- l) deixar incubando por 12 a 16 horas;
- m) retirar as placas da estufa e contar o número de colônias de cada uma das diluições, a fim de calcular o número de células viáveis do produto ou amostra em análise;
- n) para calcular o número de unidades formadoras de colônia por mL, deve-se multiplicar o nº de colônias pela diluição que a placa representa pela quantidade de suspensão semeada na placa;
- o) outra forma de realizar a determinação da UFC de forma simplificada é preparar as diluições como descrito anteriormente e, em seguida, inocular cada uma das diluições em seis ou nove pontos na superfície do meio de cultura, no volume de 10 µL por ponto, tendo-se o cuidado de deixar as placas abertas dentro da capela até completa secagem da suspensão, ou seja, das gotinhas;
- p) em seguida, colocar as placas a 30 °C durante 12 a 16 horas;
- q) decorrido o tempo, retirar as placas da estufa e efetuar a contagem das colônias;
- r) exemplo do cálculo:

- contagem de 180 colônias a partir do método do plaqueamento em apenas uma placa na quantidade de 100 µL a partir da diluição 10⁻³, o cálculo será: 180 (número de UFC por placa) x 1.000 (fator de diluição) x 10 (conversão de µL para mL) = 1,8 x 10⁶ colônias/mL;

- contagem de 20 colônias a partir do método do plaqueamento em seis ou nove pontos em apenas uma placa, na quantidade de 10 µL a partir da diluição 10⁻³, o cálculo será: 20 (número de UFC por placa) x 1.000 (fator de diluição) x 100 (conversão de µL para mL) = 2 x 10⁶ colônias/ponto, faz-se a média dos pontos e dá-se o resultado final em colônias/mL.

Tabela 1: Receita da solução de sais

CaCO ₃	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1g
Água destilada	1 L

- depois de pesados todos os ingredientes, adicionar a água destilada, fechar o béquer com papel de alumínio e deixar homogeneizando por 16 horas em agitador magnético com bailarina;

- colocar a data de fabricação, a validade e registrar em caderno-ata.

5.2.3. Valores de referência e de criticidade

Apenas é possível calcular as unidades formadoras de colônia se durante a leitura das placas com as colônias, as mesmas estiverem entre 30 e 300 unidades, para a semeadura a partir de 100 δL e entre 3 e 30 colônias para a semeadura a partir de 10 δL. Baseia-se na contagem de colônias viáveis de amostras de produtos biológicos a partir de diluição seriada e semeadura em placas com meio de cultura.

5.3- Procedimento para determinação da CL50 de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* a larvas de lepidópteros

5.3.1. Preparo da suspensão bacteriana a partir de amostras sólidas ou líquidas:

Este ensaio deve ser realizado na capela de fluxo laminar.

- a) enumerar de 1 a 10 os tubos de ensaio e colocá-los no suporte;
- b) no caso de análises de amostras líquidas, retirar 1 mL da amostra e colocar em 9 mL de água destilada estéril no primeiro tubo, homogeneizar a amostra, obtendo-se dessa forma a primeira diluição. No caso de amostras sólidas, pesar em balança a substância-teste em tubo de polipropileno de 1,5 mL até completar 0,01 g (esta quantidade pode variar conforme a especificação do produto ou eficácia da amostra) e colocar em tubo de ensaio com 10 mL de água destilada, homogeneizar a amostra até que não haja mais material particulado, obtendo-se dessa forma a primeira diluição (se precisar, utilizar pérolas de vidro);
- c) trocar a ponteira por outra estéril a cada nova diluição e fazer as diluições restantes, retirando 1 mL da solução do tubo 1 (amostra sólida ou líquida), primeira diluição, e colocar no tubo 2, obtendo-se a segunda diluição. Homogeneizar no agitador de tubos;
- d) repetir este procedimento para todas as diluições até o último tubo.

5.3.2. Preparo da dieta dos insetos-alvo e realização do bioensaio:

- a) pesar os ingredientes das dietas artificiais em béqueres identificados (o volume do béquer dependerá da quantidade de dieta a ser elaborada), segundo a indicação abaixo. A parte não au clavável da dieta deve ser pesada separadamente, em um copo plástico de 50 mL;

I. Dieta para bioensaio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

autoclavável	
Feijão cru triturado	82,5 g
Levedo de cerveja	25,3 g
Gérmen de trigo	39,6 g
Ágar-Ágar*	15 g
Água destilada	800 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	2,6 g

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

II. Dieta para bioensaio de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae)

autoclavável	
Feijão cru triturado	29,6 g
Levedo de cerveja	14,8 g
Gérmen de trigo	23,7 g
Proteína de soja	23,7 g
Leite em pó	37,5 g
Ágar-Ágar*	14,9 g
Água destilada	450 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	1,4 g
Solução vitamínica	2,4 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

III. Dieta para bioensaio de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

autoclavável	
Açúcar	54 g
Farelo de soja	42 g
Gérmen de trigo	32 g
Ágar-Ágar*	19 g
Água destilada	1.000 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	1,2 g
Solução vitamínica	12 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

IV. Dieta para bioensaio de *Spodoptera cosmiodes* (Lepidoptera: Noctuidae)

autoclavável	
Feijão branco	69,3 g
Levedo de cerveja	34,7 g
Gérmen de trigo	55,6 g
Proteína de soja	55,6 g
Leite em pó	83,3 g
Ágar-Ágar*	22,2 g
Água destilada	1.000 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	4,89 g
Solução vitamínica	5,3 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

V. Dieta para bioensaio de *Helicoverpa* sp. (Lepidoptera: Noctuidae)

autoclavável	
Feijão cru triturado	37,5 g
Levedo de cerveja	18,8 g
Gérmen de trigo	30 g
Proteína de soja	15 g
Leite em pó	15 g
Ágar-Ágar*	15 g
Água destilada	700 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	1,8 g
Solução vitamínica	4,5 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

VI. Dieta para bioensaio de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae)

autoclavável	
Farinha de milho	168 g
Levedo de cerveja	50,5 g
Gérmen de trigo	42 g
Ágar-Ágar*	30 g
Água destilada	1.400 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	6 g
Solução vitamínica	9 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

- b) misturar a dieta com uma espátula, e fechar o béquer com folha de alumínio e filme de polietileno;
- c) colocar o béquer contendo a dieta, béquer de 100 mL fechados com folha de alumínio e espátula embrulhada em folha de alumínio, e esterilizar em autoclave a 120 °C por 20 min;
- d) enquanto a dieta é autoclavada, colocar na capela, placas de cultivo de célula com 24 poços, tampas de acrílico, pincel ou pinça entomológica, micropipeta automática (de volume necessário ao bioensaio), ponteiras estéreis, para volumes de 2-200 uL e de 100-1000 uL, e recipiente para descarte de ponteiras, e submeter à luz UV por 20 min. Decorrido o tempo, desligar a luz UV e ligar a luz branca;
- e) após a esterilização da dieta, levar o béquer para a capela e adicionar os ingredientes que não foram esterilizados, misturando com uma espátula estéril;
- f) distribuir as dietas em placas para cultivo de células, já devidamente identificadas ou identificá-las. Para auxiliar na distribuição, utilizar béqueres de 100 mL estéreis. A quantidade de dieta deve ser colocada, preferencialmente, até o meio do poço;
- g) ao final da distribuição da dieta nas placas, expor à luz UV por 20 min e em seguida proceder à distribuição das diluições:
- h) deixar uma placa sem a adição da substância-teste para servir como controle negativo;
- i) cada tubo, contendo uma diluição da substância-teste, corresponde a uma placa de cultivo de célula contendo 24 poços. As placas devem ser previamente identificadas de acordo com as diluições;
- j) antes e durante a distribuição, homogeneizar a suspensão bacteriana com o agitador de tubos;
- k) espalhar, com auxílio da micropipeta P100, 35 μ L de cada uma das diluições da substância-teste sobre a dieta de cada uma das placas identificadas com as informações correspondentes às diluições dos tubos, ou seja, uma diluição para cada placa;

- l) após a absorção das diluições pela dieta, colocar, com o auxílio de um pincel ou pinça entomológica, uma lagarta de 2º instar do inseto lepidóptero em cada poço;
- m) limpar o pincel com álcool 70% a cada troca de placa;
- n) fechar as placas com tampas de acrílico retangulares vedando totalmente a saída das lagartas e, prender com no mínimo cinco ligas elásticas. Colocar as placas em bandeja(s);
- o) levar a bandeja com as placas para a sala de acondicionamento de bioensaios à temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas.
- p) após 48 horas do início do bioensaio, retirar as placas da sala de acondicionamento de bioensaios para realização da troca do mesmo (item 5.3.3 – confeccionar a dieta com antecedência).
- q) a troca é o momento em que, com o auxílio de um pincel ou pinça entomológica, as lagartas vivas são transferidas para copos plásticos de 50 mL, identificados com as informações da placa correspondente;
- r) os copos, colocados em bandejas de isopor e/ou MDF, devem conter dieta de troca isenta de qualquer substância em teste cortada com uma espátula em cubos de aproximadamente 2 cm;
- s) fechar os copos com tampas de acrílico redondas ou utilizar suas próprias tampas;
- t) retornar o bioensaio, em bandejas de isopor e/ou MDF, para a sala de bioensaio;
- u) fazer a segunda/última leitura no sétimo dia do ensaio para *Spodoptera* sp., *D. saccharalis*, *Helicoverpa* sp., *Heliothis* sp. e no quinto dia para *A. gemmatilis*;
- v) retirar as placas da sala de acondicionamento de bioensaio, levar para a bancada para realização da leitura;
- w) observar e anotar o número de lagartas vivas e mortas;
- x) somar o número de lagartas mortas por diluição das duas leituras;
- y) registrar todos os dados de acordo com a sugestão a seguir:

Diluição	Concentração	Nº lagartas vivas	Nº lagartas mortas
----------	--------------	-------------------	--------------------

- z) finalizar o bioensaio, analisando os dados de mortalidade obtidos em cada uma das concentrações por meio de análise de Probits (LeOra-Software, 2002), e calcular a concentração letal (CL50).

5.3.3. Receitas das dietas para troca de bioensaios de lepidópteros

I. Receita da dieta de troca de bioensaio de *S. frugiperda*

autoclavável	
Feijão cru triturado	165 g
Levedo de cerveja	50,5 g
Gérmen de trigo	79,2 g
Ágar-Ágar*	30 g
Água destilada	1.200 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	5,2 g
Ácido sórbico	1,6 mL
Nipagin	3,2 g
Formol 10%**	12,5 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

**A concentração de formol pode variar de 36,5 a 38%; ao fazer os cálculos para 10%, utilizar a menor concentração citada na embalagem do reagente.

II. Receita da dieta de troca de bioensaio de *A. gemmatalis*

autoclavável	
Feijão cru triturado	62,5 g
Levedo de cerveja	31,2 g
Gérmen de trigo	50 g
Proteína de soja	50 g
Leite em pó	75 g
Ágar-Ágar*	14,9 g
Água destilada	800 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	3 g
Solução vitamínica	5 mL
Nipagin	2,5 g
Formol 36,5 – 38%	3 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

III. Receita da dieta de troca de bioensaio de *D. saccharalis*

autoclavável	
Açúcar	54 g
Farelo de soja	42 g
Gérmen de trigo	32 g
Ágar-Ágar*	19 g
Água destilada	1.000 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	1,2 g
Solução vitamínica	12 mL
Formol 36,5 – 38%	13 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

IV. Receita da dieta de troca de bioensaio de *S. cosmiodes*

autoclavável	
Feijão branco	69,3 g
Levedo de cerveja	34,7 g
Gérmen de trigo	55,6 g
Proteína de soja	55,6 g
Leite em pó	83,3 g
Ágar-Ágar*	22,2 g
Água destilada	1,000 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	4,89 g
Solução vitamínica	5,3 mL
Ácido sórbico	1,58 g
Nipagin	2,63
Formol 36 – 38 %	3,16 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

V. Receita da dieta de troca de bioensaio de *Helicoverpa* sp.

autoclavável	
Feijão cru triturado	75 g
Levedo de cerveja	37,5 g
Gérmen de trigo	60 g
Proteína de soja	30 g
Leite em pó	30 g
Ágar-Ágar*	30 g
Água destilada	1,200 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	3,6 g
Solução vitamínica	9 mL
Ácido sórbico	1,8 g
Nipagin	3
Formol 36,5 – 38%	3,6 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

VI. Receita da dieta de troca de bioensaio de *H. virescens*

autoclavável	
Farinha de milho	168 g
Levedo de cerveja	50,5 g
Gérmen de trigo	42 g
Ágar-Ágar*	30 g
Água destilada	1.400 mL
não autoclavável	
Ácido ascórbico	6 g
Ácido sórbico	9 mL
Nipagin	1,2 g
Formol 36,5 – 38%	3,6 mL

*a quantidade de Ágar-Ágar pode variar conforme o fornecedor do produto.

5.3.4. Valores de referência e de criticidade

Quando for realizado o cálculo da CL50 de uma mesma amostra de *B. thuringiensis* em triplicata, os intervalos de confiança da CL50 devem se sobrepor. Caso haja mortalidade superior a 15% no tratamento controle, todo o ensaio deve ser descartado.

5.4. Procedimento de avaliação da eficácia de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de lepidópteros

5.4.1. Avaliação da eficácia de produtos biológicos à base de *B. thuringiensis* a larvas de *A. gemmatalis*.

- a) preparar a dieta de *A. gemmatalis* (item 5.3.2.II);
- b) colocar o béquer contendo a dieta, béquer de 100 mL fechados com folha de alumínio e espátula embrulhada em folha de alumínio, e esterilizar em autoclave a 120 °C por 20 min;
- c) enquanto a dieta é autoclavada, colocar na capela, copinhos de plástico de 50 mL, tampas de acrílico, pincel ou pinça entomológica, micropipeta automática (de volume necessário ao bioensaio), ponteiras para volumes de 2-200 uL estéreis e recipiente para descarte de ponteiras, e submeter à luz UV por 20 min. Decorrido o tempo, desligar a luz UV e ligar a luz branca;
- d) após a esterilização da dieta, levar o béquer para a capela e adicionar os ingredientes que não foram esterilizados, misturando com uma espátula estéril;
- e) distribuir as dietas em copinhos plásticos de 50 mL, já devidamente identificados ou identificá-los. A quantidade de dieta deve ser colocada, preferencialmente, até a altura de 1 cm;
- f) ao final da distribuição da dieta, expor à luz UV por 20 min e, em seguida, adicionar 150 µL da substância a ser testada, sem diluir. Preparar 6 copinhos para cada substância-teste;
- g) deixar seis copinhos, sem a adição da substância a ser testada, para servir como controle negativo;

- h) antes e durante a distribuição, homogeneizar a substância a ser testada com o agitador de tubos;
- i) após a absorção das substâncias a serem testadas, pela dieta, colocar, com o auxílio de um pincel ou pinça entomológica, dez lagartas de 2º instar em cada copinho;
- j) limpar o pincel com álcool 70% a cada troca de copinho;
- k) fechar os copinhos com tampas de acrílico, vedando totalmente a saída das lagartas. Colocar os copinhos em bandeja(s);
- l) levar a bandeja com os copinhos para a sala de acondicionamento de bioensaios à temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 14 horas;
- m) após 48 horas do início do bioensaio, retirar as placas da sala de acondicionamento de bioensaios;
- n) registrar em caderno-ata o(s) responsável (eis) pelo bioensaio e o número de lagartas vivas e mortas em cada copinho;
- o) determinar a porcentagem de mortalidade;
- p) finalizar o bioensaio.

5.4.2. Valores de referência e de criticidade

Se a testemunha apresentar mortalidade acima ou igual a 15%, o bioensaio deve ser repetido. Deve-se avaliar a eficácia de uma amostra de produto biológico comercial juntamente com o controle negativo para avaliar a qualidade das larvas.

5.5 - Procedimento de determinação de contaminantes em produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis*

5.5.1- Preparo dos meios de cultivo

O meio para detecção da presença de *B. thuringiensis* deve ser preparado de acordo com o item 5.2.1.

O preparo dos outros meios de cultura como: Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro, Ágar MacConkey, Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro, Ágar Confirmatório para Enterococos, Ágar Seletivo para Streptococos, Ágar Verde-Brilhante e Ágar Sabouraud 4%, dependerão da recomendação do fabricante, em função da quantidade de reagente a ser utilizado para confeccionar 1 litro de meio e do ajuste de pH. É importante para o técnico que for preparar os meios, conferir no rótulo/bula do reagente a quantidade a ser utilizada para um litro de meio e o valor do pH a ser ajustado.

5.5.2. Realização de análise microbiológica dos biolarvicidas

Esta avaliação será realizada para detecção de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* e fungos através da determinação da concentração total

de células viáveis pela técnica de semeadura em meio de cultura sólido, e posterior contagem das unidades formadoras de colônia.

5.5.2.1 Análise da presença de *B. thuringiensis*:

- a) depois do meio Ágar Embrapa pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas;
- b) no caso da análise da presença de *B. thuringiensis* nos produtos, deve-se:
 - no caso de produto biológico sólido, preparar suspensão, pesando 0,01g do produto em tubo de polipropileno – tipo Eppendorf de 1,5 ou 2 mL e, em seguida, com auxílio de uma micropipeta P5000, colocar 10 mL de solução salina (8,5 g/L) em tubo de ensaios e, em seguida, verter o produto pesado no tubo de ensaio;
 - no caso de produto biológico líquido, colocar 9 mL de solução salina (8,5 g/L) em tubo de ensaio com auxílio da P5000 e 1 mL do produto, utilizando a P1000.
- c) homogeneizar as suspensões, utilizando agitador de tubos;
- d) submeter as amostras a choque térmico (80°C por 12 minutos e gelo por 5 minutos);
- e) em seguida, semear 100 µL das suspensões em cada placa de Petri;
- f) espalhar com alça de Drigalsky a suspensão sobre toda a superfície do meio de cultura;
- g) colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 30 °C (± 2 °C);
- h) qualquer quantidade de unidades formadoras de colônia é considerado um resultado adequado, pois importa a presença da bactéria, que está sendo utilizada como controle.

5.5.2.2 Análise da presença de Coliformes termotolerantes:

- a) depois do meio Ágar Bile cristal-violeta vermelho neutro pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas. No caso de produto biológico sólido, preparar suspensão, pesando 0,01g do produto em tubo de polipropileno – tipo Eppendorf de 1,5 ou 2 mL e, em seguida, colocar no tubo de ensaio 10 mL de solução salina (8,5 g/L) com auxílio da P5000, depois verter no tubo de ensaio o produto biológico; no caso de produto biológico líquido, colocar 9 mL de solução salina (8,5 g/L) em tubo de ensaio com auxílio da P5000 e 1 mL do produto, utilizando a P1000.
- b) homogeneizar as suspensões, utilizando o agitador de tubos;
- c) em seguida, numerar todos os outros tubos de ensaio que serão utilizados nas diluições seriadas e colocar 9 mL de solução salina estéril em cada um deles, com auxílio de micropipeta P5000. Numerar de 1 a 3 (realizar 3 diluições, incluindo a suspensão-mãe);
- d) transferir com micropipeta P1000 1 mL de cada uma das suspensões-mãe (amostra a ser avaliada) para o tubo 1;
- e) homogeneizar bem a nova suspensão, utilizando agitador de tubos;
- f) transferir 1 mL do tubo 1 para o tubo 2 e homogeneizar;
- g) repetir a operação sucessivamente, até a última diluição desejada, homogeneizando bem cada suspensão antes da transferência para outro tubo;

- h) marcar as placas de Petri contendo meio de cultivo estéril, usar três placas para cada diluição;
- i) homogeneizar a suspensão antes de utilizá-la, semear 100 µL de cada uma das diluições em cada placa de Petri;
- j) espalhar com alça de Drigalsky a suspensão sobre toda a superfície do meio de cultura;
- k) colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 36 °C (± 2 °C);
- l) após 12 a 18 horas de incubação, contar o número de colônias nas diversas diluições;
- m) cálculo: média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10ⁿ+1 (n + 1 = diluição do tubo + diluição do plaqueamento). O resultado será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL);
- n) no caso dos coliformes tolerantes, o resultado aceito é: ≤ 500 UFC (Tabela 2).

5.5.2.3 Análise da presença de *Escherichia coli*:

- a) depois do meio Ágar MacConkey pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas, e semear no meio de cultivo, conforme descrito o item 5.5.2.2;
- b) colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 36 °C (± 2 °C);
- c) após 12 a 18 horas de incubação, contar o número de colônias nas diversas diluições;
- d) no caso da determinação da presença de *Escherichia coli*, o resultado aceito é: ≤ 400 UFC (Tabela 2).

5.5.4.2.4 Análise da presença de Enterococcus:

- a) depois do meio Ágar Confirmatório para Enterococcus pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas, e semear no meio de cultivo, conforme descrito o item 5.5.2.2;
- b) colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 45 °C (± 2 °C);
- c) após 12 a 18 horas de incubação, contar o número de colônias nas diversas diluições;
- d) no caso da determinação da presença de Enterococcus, o resultado aceito é: ≤ 50 UFC (Tabela 2).

5.5.2.5 Análise da presença de *Streptococcus*:

- a) depois do meio Ágar Seletivo para *Streptococcus* pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas, e semear no meio de cultivo, conforme descrito o item 5.5.2.2;
- b) colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 36 °C (± 2 °C);
- c) após 12 a 18 horas de incubação, contar o número de colônias nas diversas diluições;
- d) no caso da determinação de *Streptococcus* (Tabela 2), o resultado aceito é zero.

5.5.2.6 Análise da presença de *Salmonella*:

- depois do meio Ágar Verde Brilhante pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas, e semear no meio de cultivo, conforme descrito o item 5.5.2.2;
- colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 36 °C (± 2 °C);
- após 12 a 18 horas de incubação, contar o número de colônias nas diversas diluições;
- no caso da determinação de *Salmonella* (Tabela 2), o resultado aceito é zero.

PS: Apesar de o meio ser seletivo para *Salmonella*, alguns outros Enterococcus podem crescer.

5.5.2.7 Análise da presença de Fungos:

- depois do meio Ágar Sabouraud 4% pronto e vertido, preparar as suspensões-mãe para realizar as diluições seriadas, e semear no meio de cultivo, conforme descrito o item 5.5.2.2;
- colocar as placas em estufa incubadora à temperatura de 25 °C (± 2 °C);
- após 12 a 18 horas de incubação, contar o número de colônias nas diversas diluições;
- no caso da determinação de fungos (Tabela 2), o resultado aceito é zero.

Tabela 2 – Tabela dos Meios de Cultura para *Bacillus thuringiensis* e contaminantes a serem detectados no Controle de Qualidade dos produtos biológicos.

Microrganismo	Especificação	Meio de cultura
<i>B. thuringiensis</i>	Controle	Ágar nutritivo
Coliformes termotolerantes	≤ 500 UFC	Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro
<i>Escherichia coli</i>	≤ 400 UFC	Ágar MacConkey
Enterococos	≤ 50 UFC	Ágar Confirmatório para Enterococos
Estreptococos	0	Ágar Seletivo para Estreptococos
<i>Salmonella</i>	0	Ágar Verde-Brilhante
Fungos	0	Ágar Sabouraud 4%

5.5.3. Valores de referência e de criticidade

Para a contagem das colônias viáveis, devem-se selecionar as placas que apresentarem de 10 a 500 colônias para a semeadura a partir de 100 δ L e entre 1 e 50 colônias para a semeadura a partir de 10 δ L.

6- Equipamentos básicos para a instalação de uma estrutura de produção de *Bacillus thuringiensis*

Recomenda-se que a estrutura seja composta por cinco ambientes: área de utilidades, laboratório de controle de qualidade e processo, sala de fermentação, sala de estoque de insumos e sala para armazenamento de produto acabado.

1- Área de utilidades: A área de utilidades pode-se restringir a uma cobertura sob a qual se disponham um gerador de vapor, compressor de ar e sistema de resfriamento (torre de resfriamento e/ou água gelada).

2- Laboratório de controle de qualidade e processo: Este espaço deve conter capela de fluxo laminar, sistema de inoculação, microscópio de contraste de fases, placa aquecedora ou banho-maria, autoclave pequena, estufa de secagem, estufa de crescimento, incubador rotativo, pipetas de precisão.

3- Salão de fermentação: neste ambiente, serão colocados os reatores esterilizáveis.

4- Sala de estoque de insumos: nesta sala, deverão ser colocados todos os materiais que serão empregados no processo de fermentação.

5- Sala de armazenamento de produto acabado: nesta sala, será estocado o produto acabado e de preferência deverá ser refrigerada.

Todas as áreas deverão ser passíveis de limpeza e desinfecção, com acabamento impermeável. de outras combinações de plantas em consórcio deve ser pesquisado e devidamente avaliado para que possam ser adotados com sucesso.

7. Referência Bibliográfica

- ABDEL-HAMID, M. E.; NOVOTNY, L.; HAMZA, H. J. Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 587- 594, 2001.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 4).
- ARCAS, J. A. Producción de Bacterias Entomopatogenicas. In: LECUONA, R. E. (Ed.) **Microorganismos patógenos empleados em el control microbiano de insectos plagas**. Buenos Aires: Roberto Eduardo Lecuona, 1996. p. 208-222.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Reviews**, v. 50, n. 1, p. 1-24, 1986.
- AVIGNONE-ROSSA, C.; ARCAS, J.; MIGNONE, C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 301-304, 1992.
- BAUM, J. A.; JHONSON, T. B.; CARLTON, B. C. *Bacillus thuringiensis*: natural and recombinant bioinsecticide products. **Methods Biotechnology**, v. 5, p. 189-209, 1999.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTEMBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). **Agrofit**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. 2018. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. In: GILBERT, L. I.; GILL, S. S. **Insect control: biological and synthetic agents**. London: Elsevier, 2005. p. 247-280.
- BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7. p. 423-431, 2011.
- CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M. A. Impacto de inseticidas sobre parasitóides de traça-das-crucíferas em repolho, no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2001.
- CHERIF, A.; CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD9. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 990-1000, 2003.
- COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications**. New York: Kluwer Academic Publishes, p. 297-316, 2000.
- DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesti. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, p. 232-239. 1970.
- EDWARDS, P.; PULLIN, R. S. V.; GARTNER, J. A. **Research and development of integrated croplives-tock-fish farming systems in the tropics**. Manila, Philippines: ICLARM, 1998. 53 p. (ICLARM Studies and Reviews, 16).
- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.
- FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27, Montpellier, France. **Proceedings...** Montpellier, France: Society for Invertebrate Pathology, 1994. 184p.
- GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, v. 37, p 355-358, 1977.

- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.
- HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. 2000. Charles, J. F.; Delécluse, A.; Nielsen-le Roux, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 200. p.41-64.
- HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Genetic engineering of biocontrol agentes for insects In: RECHCIGL, J. E.; RECHCIGL, N. A. (Ed.) **Biological and biotechnological control of insect pests**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p. 243-280.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.
- HOLMBERG, A.; SIEVANEN, R.; CARLBERG, G. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxi production: Process analysis study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 1707-1724, 1980.
- HURTADO, G. B. La producción de ingredientes activos com *Bacillu thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. **Bacillus thuringiensis en el control biológico**. Bogotá: Buena Semilla, 2004. p. 233-273.
- KRIEG, A.; HUNGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNEITER, W. *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. **Entomology**, v. 96, p. 500-508, 1983.
- LEORA-SOFTWARE: **POLO-Plus**, POLO for Windows computer program, version 2.0. 2002. Petaluma, CA.: LeOra-Software.
- MALDONADO-BLANCO, M. G.; SOLIS-ROMERO, G.; GALÁNWONG, L. J. The effect of oxigen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subs. israelensis toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 671-74, 2003.
- MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCAO, R.; BROD, C. S.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.
- MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p.163-200, 2000.
- MONNERAT, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M.; BORDAT, D. 2004. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 607-609, 2004.
- OECD. Test 122: **Determination of pH, acidity and alkalinity**. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 1. Paris-Fr: OECD Publishing, 2013. 6 p.
- OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**, v. 29, p. 427-433, 2009.
- OKUMURA, S., OHBA, M.; MIZUKI, E.; CRICKMORER, N.; CÔTÉ, J. C.; NAGAMATSU, Y.; KITADA S.; SAKAI, H.; HARATA, K.; SHIN, T. "**Parasporin nomenclature**". 2010. Disponível em: <<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>>. Acesso em: 13 jan. 2015.
- PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, 2006. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2015.
- RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals of Microbiology**, v. 58, n.1, p.47-52, 2008.
- RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN, L. RUX C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends Microbiology**, v. 18, p. 189-194, 2010.
- SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 307-316, 2001.
- SIKDAR, D. P.; MAJUMBAR, M. K.; MAJUMBAR, S. K. Effect of Minerals on th production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 7, p. 511-517, 1991.

SOARES, C. M. S. Produção, formulação e aplicação de bactérias. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Eds.) **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília-DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 219-238.

WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CARR, B.; DESAI, N. M.; KOSTICHKA, K.; DUCK, N. B.; ESTRUCH, J. J. **Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins**. Patent Number: 5,770,696. (6 jun. 1995) (23 de jun. 1998).

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in the Soviet Union. In: Krieg, A.; Huger, A. M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land**. Heft, v. 233, p. 37-50, 1986.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p.315-343, 1984.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*