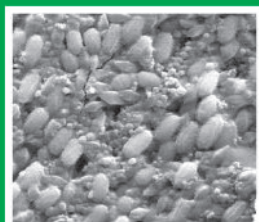
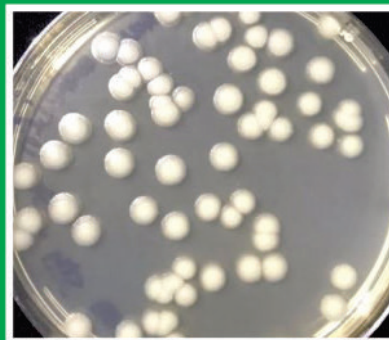
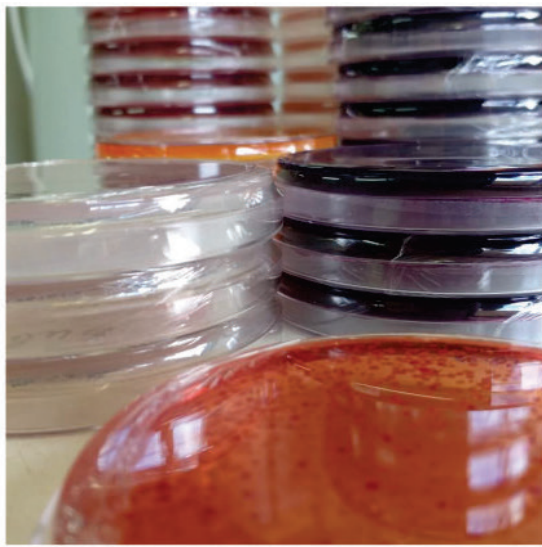


Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura



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

DOCUMENTOS 369

Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura

Rose Monnerat
Sandro Coelho Linhares Montalvão
Erica Soares Martins
Paulo Roberto Martins Queiroz
Ester Yoshie Yosino da Silva
Aline Rafaela Moura Garcia
Marcelo Tavares de Castro
Gabriela Teodoro Rocha
Antônia Débora Camila de Lima Ferreira
Ana Cristina Meneses Mendes Gomess

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

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

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Milene Castellen Sather

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanches; Sérgio Eustáquio de Noronha

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Normalização bibliográfica
Rosamares Rocha Galvão

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Fotos da capa
Rose Monnerat

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 bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura / Rose Monnerat... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

46 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 369).

1. Controle biológico. 2. *Bacillus*. I. Monnerat, R. II. Montalvão, S. III. Queiroz, E. M. IV. Queiroz, P. M. V. Silva, E. Y. Y. da. VI. Garcia, A. VII. Castro, M. VIII. Rocha, G. T. IX. Ferreira, A. D. C. de. X. Gomes, A. C. M. XI. Série

Rosamares Rocha Galvão

CDD 632.96

© Embrapa, 2020

Autores

Rose Monnerat

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

Sandro Coelho Linhares Montalvão

Engenheiro Agrônomo, PhD em Fitopatologia

Erica Soares Martins

Bióloga, PhD em Biologia Molecular

Paulo Roberto Queiroz

Biólogo, PhD em Biologia Animal

Ester Yoshie Yosino da Silva

Engenheira de Alimentos, PhD em Ciências da Saúde

Aline Rafaela Moura Garcia

Bióloga, PhD em Entomologia

Marcelo Tavares de Castro

Engenheiro Florestal, PhD em Agronomia

Gabriela Teodoro Rocha

Engenheira Florestal, mestre em Produção Vegetal

Antônia Débora Camila de Lima Ferreira

Engenheira Agrônoma, mestre em Fitotecnia

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes

Bióloga, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

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 seleção de populações de insetos-praga resistentes aos inseticidas, o custo dos produtos químicos, os impactos negativos que esses produtos têm sobre o meio ambiente e os trabalhadores rurais, etc.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia trabalha com bactérias do gênero *Bacillus* para controle de pragas e doenças há mais de 30 anos. Nesse período: montou uma Coleção de Bactérias Patogênicas a Invertebrados 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 bioprodutos 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 produzem, em suas próprias fazendas, caldos fermentados contendo microrganismos 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” 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, os microrganismos estejam em baixa concentração, o que diminuiria a eficácia dos produtos.

O Manual de Produção e Controle de Qualidade de Produtos Biológicos à Base de Bactérias do gênero *Bacillus* para Uso na Agricultura, elaborado por equipe multi-institucional liderada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tem o duplo objetivo de orientar empresas e agricultores na produção segura e eficaz desses produtos.

Maria Cleria Valadares Inglis
Chefe-geral

Sumário

1. Introdução	07
2. Objetivo	08
3. Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> utilizadas em controle biológico de pragas e doenças agrícolas	08
3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	08
3.2 <i>Bacillus subtilis</i>	10
3.3 <i>Bacillus pumilus</i>	10
3.4 <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	11
3.5 <i>Bacillus licheniformis</i>	12
3.6 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	12
4. Produção e formulação de produtos	13
4.1 Estrutura física	13
4.2 Meios de cultura para produção em larga escala	14
4.3 Coleção de trabalho – material biológico	15
4.4 .Cultivo dos microrganismos em escala	20
5. Controle de qualidade de bioprodutos	25
5.1. Procedimento para identificação morfológica das bactérias	25
5.2. Procedimento para determinação de pH	26
5.3 Procedimento para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)	27
5.4. Procedimento para avaliação da eficácia de produtos para controle de lagartas	28
5.5. Procedimento para avaliação da presença de beta exotoxinas	32
5.6. Procedimento para determinação de contaminantes	34
6. Agradecimentos	37
7. Literatura Recomendada	37
Anexo 1: Lista de reagentes	41
Anexo 2: Material de laboratório	42
Anexo 3: Meio Embrapa Líquido	44
Anexo 4: Meio Embrapa Sólido	45
Anexo 5: Dieta artificial para lagartas	46

1. Introdução

O Brasil é um país de clima tropical, cuja economia está intimamente ligada à agricultura. Esta condição climática é extremamente favorável ao cultivo de diversas culturas durante todo o ano. Contudo, a produtividade agrícola é constantemente ameaçada por inúmeros fatores abióticos e bióticos, dentre os quais estão as pragas e doenças. A ausência de invernos rigorosos, a abundância de água e luz condicionam a ocorrência massiva dessas pragas e doenças, fazendo com que o país seja um dos líderes mundiais em consumo de agrotóxicos, fato este duramente criticado por muitos mercados internos e externos.

Uma alternativa viável para o controle de pragas e de doenças é o controle biológico. Ele é definido como o uso de organismos vivos para suprimir a população de uma praga ou doença específica, tornando-a menos abundante ou menos danosa. Trata-se de um fenômeno natural, pois quase todas as espécies têm inimigos naturais que regulam suas populações. Tem sido utilizado desde o século III, quando os chineses observaram que formigas podiam controlar pragas dos citros. Muitos anos mais tarde, em 1888, os Estados Unidos iniciaram o uso de *Rodolia cardinalis*, um besouro originário da Austrália para controlar o pulgão branco dos citros, *Icerya purchasi*. O trabalho foi pioneiro e tão bem-sucedido que a Califórnia é considerada o berço do Controle Biológico no mundo. No Brasil, a primeira introdução de um agente de controle biológico aconteceu em 1921, quando um parasitóide, *Encarsia berleseii*, foi utilizado para controlar a cochonilha-branca-do-pessegueiro, *Pseudaulacaspis pentagona*. A partir de 1970 o tema controle biológico começou a fazer parte dos estudos de entomologia e o conceito de manejo integrado de pragas começou a ser implementado.

Segundo a ABCBio (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico), instituição criada em 2007 para congregar as empresas produtoras e comerciantes de produtos biológicos para controle de pragas, atualmente Crop Life, o mercado de bio defensivos no Brasil está estimado em US\$ 95,6 milhões (1% do mercado de agrotóxicos) e a taxa de crescimento anual prevista é de 20%. Em 2021, o mercado deverá ser de US\$ 237,8 milhões. Comparada à indústria de agrotóxicos convencionais, a indústria de biocontrole está crescendo 5,3 vezes mais rápido.

O Brasil está acompanhando a tendência de mercado mundial, inclusive com o apoio governamental, a exemplo de outros países. Um levantamento internacional destaca que o Brasil é o quarto país com melhor desempenho na produção de bioprodutos, respondendo por 7% da comercialização mundial. Entretanto, o setor biológico é liderado pelos Estados Unidos (37%), Espanha (14%) e Itália (10%).

Dentre os fatores que podem explicar o rápido crescimento do mercado de bioprodutos, destacam-se: (1) o custo de desenvolvimento de um produto biológico, estimado em 2 a 10 mil dólares, comparado ao químico com custo estimado em 250 mil dólares, (2) a especificidade dos agentes de controle biológico que atuam apenas no alvo, (3) a sustentabilidade do método por apresentar menor impacto ambiental e aos seres vivos, além de não ser poluente, (4) a seleção de pragas resistentes aos produtos químicos e aos cultivos transgênicos, (5) a baixa probabilidade de seleção de insetos resistentes aos agentes de controle biológico, e (6) a exigência do mercado consumidor, preocupado com os efeitos adversos dos produtos químicos e seus resíduos.

Um outro fato muito importante, e de certa forma decisivo para a expansão do mercado de bio defensivos, foi a mudança de comportamento do agricultor. Esses agricultores começaram a aprofundar os conhecimentos e trocar informações por meio de grupos organizados em redes sociais, formando verdadeiras redes de pesquisa e informação. Exemplo dessas iniciativas foi a criação do Grupo Associado de Agricultura Sustentável (GAAS), que de forma nacional e regional tem contribuído para o ganho e troca de informações e experiências entre profissionais de ciências agrárias e biológicas e produtores rurais, auxiliando, assim, a transmitir a importância do manejo racional de pragas e doenças, onde se insere o conceito de controle biológico no país.

Em função desta alta demanda e pela falta de produtos disponíveis no mercado, alguns microrganismos têm sido produzidos nas propriedades, muitas vezes em condições inadequadas, o que pode acarretar em um produto final de baixa qualidade, bem como proporcionar a proliferação de patógenos (contaminantes) indesejáveis ao meio ambiente, seres humanos e animais.

As bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas em controle biológico. Elas têm ocorrência cosmopolita e são encontradas em todas as partes do mundo, em vários substratos como solo, superfície de plantas, rizosfera, grãos armazenados, insetos mortos, dentre outros. São bactérias Gram-positivas e aeróbicas, podendo facultativamente crescer em anaerobiose.

Em vista deste cenário, este manual foi elaborado visando fornecer informações básicas sobre as bactérias do gênero *Bacillus*, sua produção e controle de qualidade.

2 - Objetivo

Este manual tem como objetivo orientar empresas e agricultores, que produzem bioprodutos à base de bactérias do gênero *Bacillus* quanto à produção e controle de qualidade, gerando produtos seguros, eficazes e que atendam às expectativas dos usuários.

3 - Bactérias do gênero *Bacillus* utilizadas em controle biológico de pragas e doenças agrícolas

Nesse gênero estão incluídas as espécies *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefasciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylotrophicus*.

3.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria que produz no momento de sua esporulação inclusões proteicas cristalinas conhecidas por δ -endotoxinas. As mais conhecidas e utilizadas são as toxinas Cry, que formam um cristal proteico durante a fase de esporulação (Figura 1).

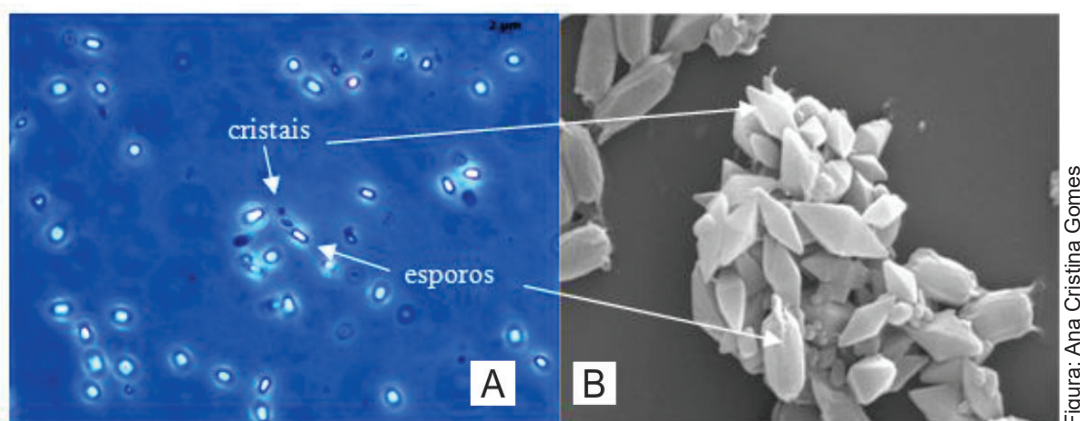


Figura 1 – Esporos e inclusões proteicas cristalinas bipiramidais de *B. thuringiensis*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura.

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.

Bacillus thuringiensis produz diferentes tipos de toxinas: as δ -endotoxinas, α -exotoxina, β -exotoxina, VIP (vegetative insecticidal proteins) e SIP (secreted insecticidal proteins). 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 além de proteínas parasporinas, as quais exibem atividade citotóxica específica contra células cancerígenas de humanos.

A ação das toxinas Cry se inicia 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. As larvas perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Agrofit, existem no mercado vinte e cinco produtos/formulações comerciais à base de *B. thuringiensis* para o controle de pragas agrícolas: Able, Agree, Bac-Control Max EC, Bac-Control WP e Bac-Control Max WP, BTControl, BT-Turbo Max, Costar, Crystal, Dipel, Dipel ES-NT, Dipel WG, Dipel WP, Helymax EC, Helymax WP, Javelin WG, Ponto Final, Stregga EC, Super-Bt, Tarik EC, Tarik WP, Thuricide, Thuricide SC, Winner Max EC e Xentari. Estes produtos comerciais têm como princípios ativos as estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, que são utilizados no controle de lagartas, como *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja)

Spodoptera frugiperda (lagarta-do-cartucho), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) e *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas).

Existem duas cepas de *Bacillus thuringiensis* descritas na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de números 28 e 34).

3.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria móvel que forma esporos centrais com formato cilíndrico ou elipsoidal (Figura 2). As colônias podem ter diferentes colorações, variando do esbranquiçado ao preto, a depender do meio de cultura empregado.

Bacillus subtilis é encontrada principalmente no solo e na rizosfera, o que proporciona proteção contra vários agentes causadores de doenças em plantas. O grande interesse nessa espécie bacteriana consiste nos inúmeros metabólitos secundários que ela produz, podendo ser utilizada no âmbito agrícola e medicinal. Além disso, essa bactéria é capaz de produzir biofilmes que proporcionam uma colonização preventiva e benéfica para as raízes de inúmeras plantas.

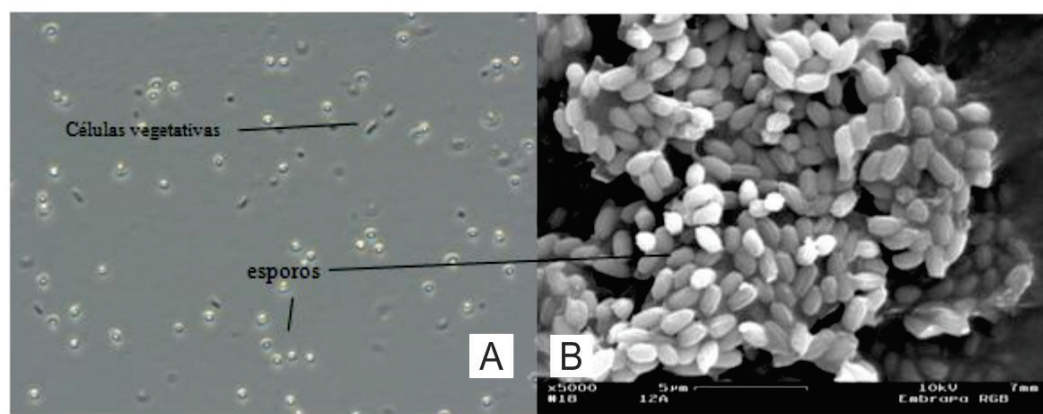


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 2 – Esporos e células vegetativas de *B. subtilis*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura.

Existem seis produtos registrados no MAPA à base de *B. subtilis* para controle de fungos, bactérias e nematoides: Rizos®, RizosOG® e Biobaci® (bionematicidas); Bio-Imune® e Biobac® (biofungicidas); e Serenade® (biofungicida e biobactericida).

Existe uma cepa de *Bacillus subtilis* descrita na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de número 25).

3.3. *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus é uma bactéria formadora de esporos (Figura 3), encontrada em vários tipos de ambientes, como solo (principalmente), água, ar e tecidos vegetais em decomposição. Essa bactéria é amplamente utilizada em processos industriais, fabricação de alimentos fermentados, tratamento de água e de ambientes contaminados.

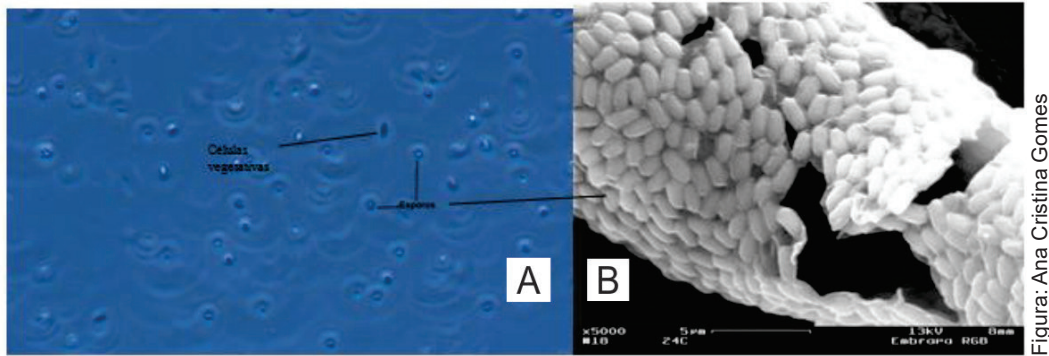


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 3: Esporos e células vegetativas de *B. pumilus*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura.

Na agricultura, *B. pumilus* está sendo empregado para o controle de diversos fungos, além de promover o crescimento de plantas.

Existe um produto no MAPA à base de *B. pumilus* para controle de fungos: Sonata® (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Alternaria porri*, *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Sphaerotheca macularis*, *Uncinula necator*, *Alternaria solani* e *Cryptosporiopsis perennans*).

3.4. *Bacillus amyloliquefasciens*

Bacillus amyloliquefasciens (Figura 4) é uma bactéria móvel, muito semelhante a *B. subtilis*. A forma mais utilizada para diferenciá-la é através de métodos moleculares.

Bacillus amyloliquefasciens pode ser isolado de vários ambientes distintos, inclusive alimentos e solo, produz dezenas de enzimas de interesse industrial e possui grande atividade microbiana, podendo ser utilizada no controle de fungos, bactérias e também de nematoides.

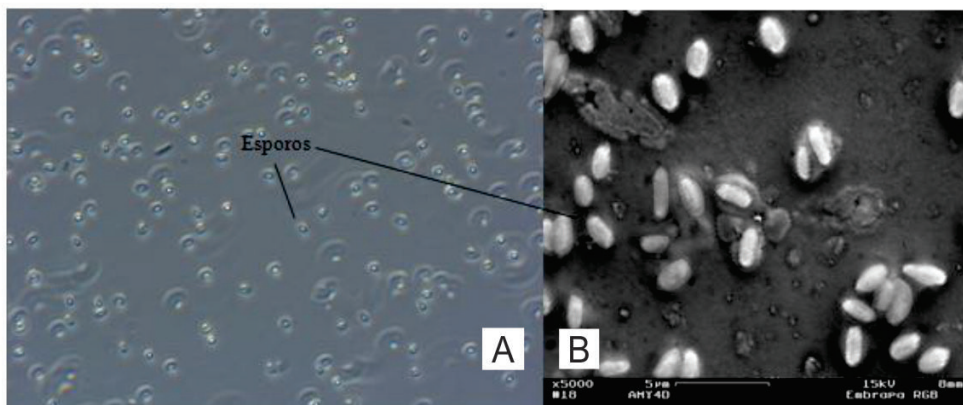


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 4: Esporos do *B. amyloliquefasciens*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura.

Existem sete produtos registrados no MAPA à base de *B. amyloliquefasciens* para controle de fungos, oomicetos, bactérias e nematoides: Eficaz Nema®, PFC-Control®, Nemacontrol® e No-nema® (bionematicidas); Quartzo SC®, Serifel/Duravel® e Ecoshot® (biofungicidas).

Existe uma cepa de *Bacillus amyloliquefasciens* descrita na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de número 37).

3.5. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis é uma bactéria móvel que forma esporos na porção sub-terminal ou no centro da célula com formato elipsoidal a cilíndrico (Figura 5). A coloração da colônia em meio de cultura normalmente é esbranquiçada e possui formato arredondado a irregular.

Bacillus licheniformis não causa doenças em plantas, tem sido extensamente utilizada na medicina humana e veterinária como probióticos e na produção de detergentes. É muito eficaz para controlar nematoides. Estudos mostram que a mistura entre *B. licheniformis* e *B. subtilis* promoveu o crescimento de plantas de soja.

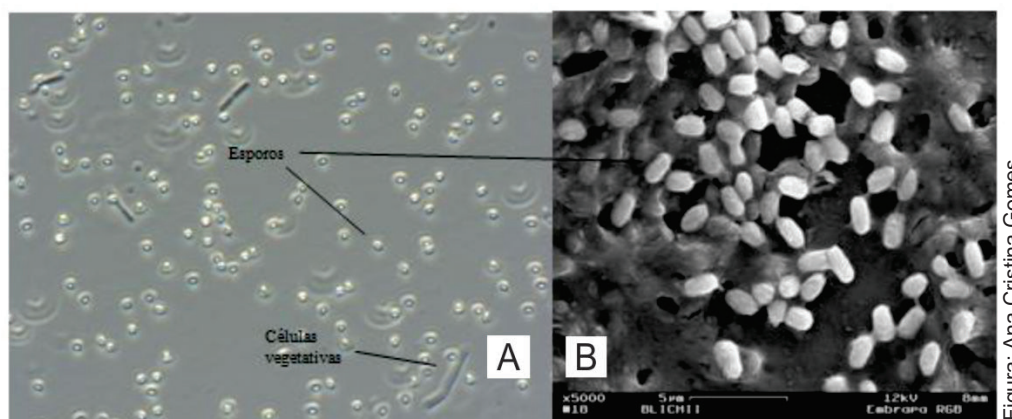


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 5: Células vegetativas e esporos do *B. licheniformis*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura.

Ainda não existe um produto comercial exclusivo à base de *B. licheniformis* disponível no mercado. Os produtos Presence® e Quartzo® são nematicidas biológicos que contém uma mistura entre *B. subtilis* e *B. licheniformis* com múltiplos mecanismos de ação.

3.6. *Bacillus methylotrophicus*

Bacillus methylotrophicus é uma bactéria encontrada na rizosfera e apresenta grande potencial de promoção de crescimento de plantas. *B. methylotrophicus* é aeróbica, móvel, com endósporos em formato de bastão (Figura 6).

O grande interesse nessa espécie bacteriana consiste justamente na sua interação benéfica com plantas, promovendo o seu crescimento. Além disso, produz bacteriocinas, possui capacidade de biorremediar solos e age no controle de doenças.

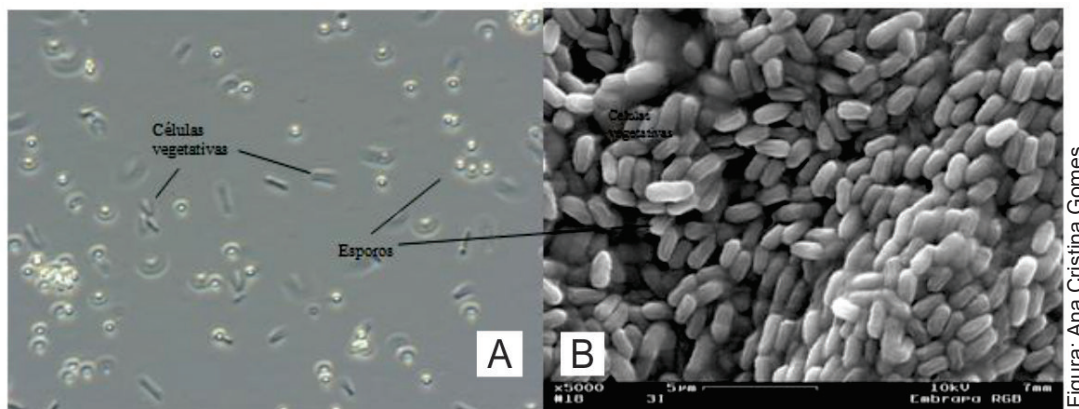


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 6: Células vegetativas e esporos do *B. methylotrophicus*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura.

Existem dois produtos registrados no MAPA à base de *B. methylotrophicus*, ambos para controle de nematoides: Onix® e OnixOG® (*Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica*).

Existe uma cepa de *Bacillus methylotrophicus* descrita na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de número 27).

4- Produção e formulação de produtos

Para que os produtos biológicos sejam feitos com qualidade é necessário dispor de: (1) estrutura física adequada, contendo equipamentos e insumos de boa qualidade, (2) meio de cultura adequado, (3) coleção de trabalho contendo os microrganismos bem identificados e preservados e (4) metodologia de produção bem estabelecida.

4.1. Estrutura física

Recomenda-se que a estrutura física de uma unidade de produção seja composta minimamente por 4 áreas: a) área de utilidades; b) área de fermentação; c) área de estoque de insumos e d) área de armazenamento de produto acabado. É importante contar com um laboratório de controle de qualidade (e), podendo este ser na própria propriedade terceirizado.

a - Área de utilidades: A área de utilidades pode-se restringir a uma cobertura sob a qual se disponham equipamentos que dão suporte a unidade de produção. No caso da produção ser realizada em fermentador, os equipamentos devem ser: um gerador de vapor, compressor de ar e sistema de resfriamento (torre de resfriamento e/ou água gelada).

b - Área de fermentação: ambiente destinado ao (s) reator (es) ou outro equipamento semelhante para produção dos microrganismos.

c - Área de estoque de insumos: área destinada aos materiais que serão empregados no processo de fermentação. Esta área deverá ser arejada. Nos Anexos 1 e 2 estão listados alguns dos principais insumos (reagentes e materiais de laboratório) necessários para a produção.

d - Área de armazenamento de produto acabado: nesta área será estocado o produto acabado e de preferência deve possuir um sistema de refrigeração.

e - Área de processo e controle de qualidade: Este espaço será destinado aos ensaios de controle de qualidade. Este espaço deve conter os seguintes equipamentos:

- Agitador de tubos vortex
- Agitador magnético
- Autoclave vertical analógica 100 litros
- Balança de precisão
- Cabine de segurança biológica ou Capela de Fluxo Laminar
- Capela de exaustão
- Estufa incubadora microbiológica
- Estufa para secagem de material
- Freezer frost free
- Incubador rotativo (shaker) de solo com refrigeração, e plataforma com garras para frascos tipo erlenmeyer de 2000 L, 1000 L, 500 mL, 250 mL e 50 mL
- Microscópio de contraste de fase
- Phmetro digital
- Micropipetas automáticas de precisão
- Placa aquecedora ou banho-maria
- Purificador de água por osmose reversa
- Refrigerador frost free
- Termobloco com temperatura de 28 °C a 100 °C
- Termômetro de máxima e mínima com cabo

Todas as áreas deverão ser mantidas limpas, livres de resíduos e sujeiras para evitar a presença de insetos e roedores e devem ser periodicamente higienizadas e desinfetadas com produtos apropriados.

4.2. Meios de cultura para produção em larga escala

Para cultivar as bactérias do gênero *Bacillus*, é fundamental dispor de um meio de cultura adequado. Os meios de cultivo para essas bactérias geralmente possuem uma fonte de nitrogênio (extrato de caseína, caseína hidrolisada, peptona), outra de carbono (glicose, dextrose, amido) e sais minerais (micro e macro elementos). Algumas vezes se adicionam ao meio alguns tampões (fosfato) e antiespumantes a fim de facilitar o processo. A fonte de carbono, além de fornecer matéria prima para muitos compostos celulares, serve como fonte de energia. O nitrogênio é requerido principalmente para síntese de proteínas e ácidos nucléicos. Os sais minerais atuam como cofatores e são também importantes no controle da osmolaridade celular. Existem diversos meios de cultura disponíveis no mercado. É recomendável conhecer a procedência e qualidade dos mesmos, pois muitas empresas comercializam meios de cultura fabricados a partir de resíduos ou subprodutos que apresentam variação nos teores de carboidratos e proteínas entre diferentes lotes. Desta forma, o produto final resultante poderá apresentar diferentes rendimentos e consequentemente eficácia.

4.3. Coleção de trabalho – material biológico

Para o correto funcionamento de uma biofábrica, a qualidade dos microrganismos (material biológico) é fundamental. O primeiro passo é dispor de uma “Coleção de trabalho”. Para isso, bactérias do gênero *Bacillus* podem ser multiplicadas e armazenadas em tiras de papel filtro, a partir de uma estirpe pura conforme procedimento abaixo:

4.3.1- Multiplicação de *Bacillus*

As estirpes puras de *Bacillus*, armazenadas em papel de filtro ou por outro método de preservação, devem ser multiplicadas por meio de inoculação em um erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL do meio Embrapa líquido (Anexo 3) em capela de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e esterilizada por 20 min em luz UV. Em seguida, as amostras inoculadas devem ser colocadas para crescer em incubador rotativo a 200 rpm, $28 \pm 4^\circ\text{C}$ por 72 horas (até a completa esporulação). Depois de 72 horas, as amostras devem ser identificadas morfolologicamente e testadas quanto à pureza.

4.3.2- Identificação dos *Bacillus*

Para a identificação morfológica, as amostras contidas no erlenmeyer devem ser analisadas em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x. Para isso, deve-se levar o erlenmeyer para a capela de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e esterilizada por 20 min em luz UV. Com uma micropipeta ou pipeta estéril, colocar uma gota da bactéria em lâmina e cobrir com uma lamínula. Adicionar uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula e realizar a visualização das amostras sob microscópio.

As principais características que devem ser checadas no microscópio de contraste de fase são: célula vegetativa, forma e posição do esporo, motilidade e no caso

do *B. thuringiensis*, também, a presença de corpos paraesporais/cristais. As informações referentes a cada espécie do gênero *Bacillus* estão especificadas na Tabela 1.

Características morfológicas	<i>B.thuringiensis</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i>	<i>B.licheniformes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B.methilotrophicus</i>	<i>B. pumillus</i>
Largura da célula vegetativa (µm)	1-1,2 (Largo)	0,7-0,9 ¹ Estreito	0,6-0,8 (Estreito)	0,7-0,8 (Estreito)	0,63-0,64 ² (Estreito)	0,6-0,7 (Estreito)
Comprimento da célula vegetativa (µm)	3-5 (célula pequena a grande)	1,8-3,0 ¹ (célula pequena)	1,5-3 (célula pequena)	2-3 (célula pequena)	1,8-2,7 ² (célula pequena)	2-3 (célula pequena)
Forma do esporo	Elíptico, lembrando grão de feijão	Elípticos, mais alongados	Elíptico, quase cilíndricos	Elíptico, mais arredondado	Tipo um bastonete curto	Elíptico, mais arredondado e pequeno
Posição do esporo	Subterminal	Central	Subterminal	Subterminal	Central	Subterminal
Presença de cristais	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Motilidade	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

Tabela 1: Características morfológicas visualizadas no microscópio contraste de fase dos principais bacilos utilizados na agricultura.

As amostras viáveis deverão apresentar esporos. No caso de *Bacillus thuringiensis* deve ser considerada também a presença de cristais. Caso a amostra apresente células vegetativas, esporângios ou ausência de esporos e cristais será considerada não viável, pois ao final de 72 horas, todas devem apresentar estas características (Figura 7).

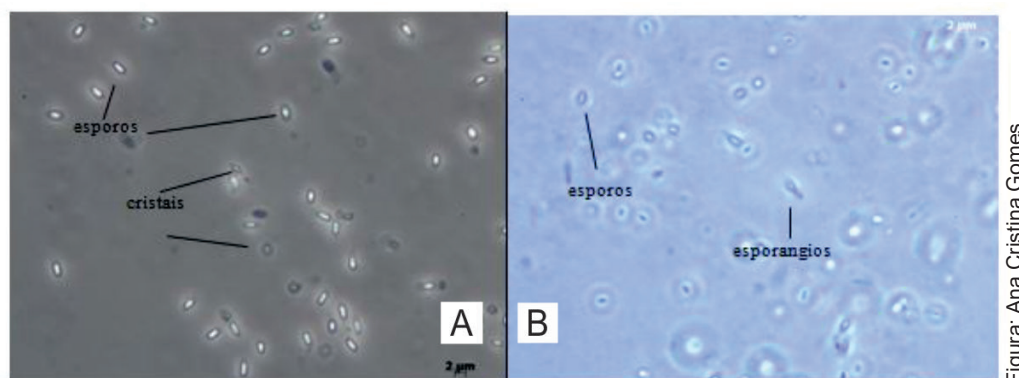


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 7: Microscopia de contraste de fase de esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* (a) e esporos e esporângios do *B. licheniformis* (b)

4.3.3 - Testes de pureza

Para confirmar a pureza, as amostras devem ser semeadas em forma de estrias, com uma alça estéril, em placas contendo meio Embrapa sólido (Anexo 4) (Figura 8). Em seguida, devem ser fechadas com filme plástico e incubadas em estufa de crescimento à temperatura de $30 \pm 4^\circ\text{C}$ por 72 horas.

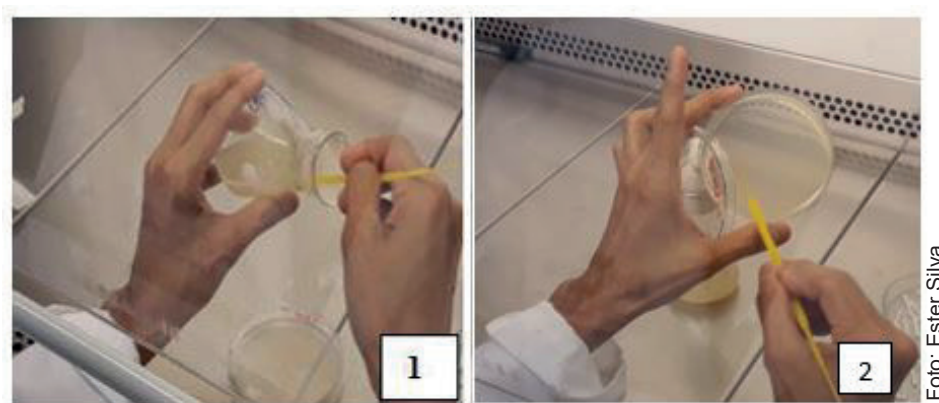


Figura 8: Amostra de estirpe de *Bacillus thuringiensis* sendo coletada (1) semeada em forma de estrias ou por espalhamento (2), em placa de Petri contendo meio Embrapa com uma alça estéril.

Após 72 horas, as colônias devem ser observadas nas placas de Petri para verificação da presença de colônias típicas de cada espécie de *Bacillus* (Figura 9).

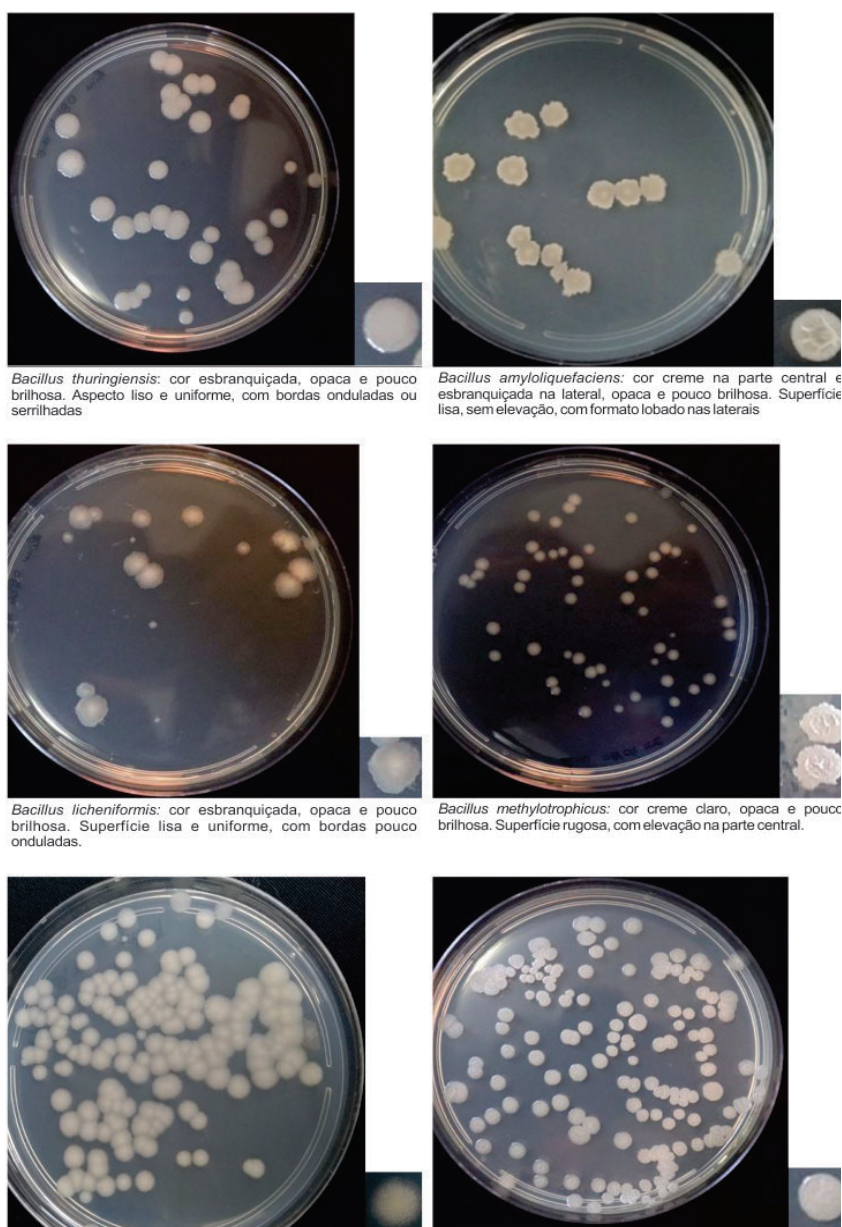


Figura 9: Aspecto das colônias dos *Bacillus* utilizados em controle de pragas e doenças. (1) *Bacillus thuringiensis*; (2) *Bacillus amyloliquefaciens*; (3) *Bacillus licheniformis*; (4) *Bacillus methylotrophicus*; (5) *Bacillus subtilis*; (6) *Bacillus pumilus*

Caso os dois testes comprovem a identidade e pureza das bactérias, elas podem ser preservadas.

4 - Preservação das amostras de *Bacillus*

Inicialmente deve-se separar todo o material necessário para a preservação das bactérias: Papel mata borrão, tubos criogênicos de 5,0 mL, pinças de inox com ponta serrilhada reta, placas de Petri em vidro, papel pardo, fita crepe, béquer de plástico de 2.000 mL, papel alumínio e liga elástica.

Cortar as tiras de papel filtro Mata Borrão (0,3 cm de largura x 2,0 cm de comprimento) e colocar aproximadamente 50 tirinhas em cada uma das placas de Petri. Embrulhar as placas e as pinças com papel pardo e fita crepe. Preparar os tubos criogênicos, colocando-os dentro do béquer de plástico de 2 L, fechar com papel alumínio e, por cima, colocar papel pardo e fechar com liga elástica. Identificar e marcar todos os materiais com fita de autoclave. Esterilizar em autoclave a 120 °C por 20 min. Após a esterilização, retirar da autoclave os materiais e colocar em estufa de secagem (40 - 50°C) por no mínimo 2 dias ou até que todo material esteja seco.

Para realizar a preservação, limpar a capela de fluxo laminar com álcool 70%, colocar todo material dentro da capela e esterilizar os materiais por 20 min em luz UV. Em seguida, desligar a UV e ligar a luz branca, acender o bico de Bunsen, desembulhar as placas de Petri, identificar as placas com o número das amostras e iniciar o processo de preservação. Flambar a pinça e transferir as tiras de papel filtro previamente esterilizadas para os erlenmeyers contendo as bactérias crescidas. Deixar os papéis-filtro imersos por no mínimo meia hora (30 minutos) nas soluções bacterianas. Decorrido o tempo de imersão, transferir as tiras de papéis-filtro de cada erlenmeyer, com uma pinça flambada para suas respectivas placas de Petri de vidro, espalhando as tiras uma a uma ao longo das placas. Deixá-las secar por cerca de 5 horas em capela de fluxo laminar (ligada) com ambas as luzes desligadas.

Depois de secas (observar se as tiras soltam facilmente das placas) e transferi-las para os tubos criogênicos, colocando quatro tiras por tubo (Figura 10). Em seguida, identificar os tubos criogênicos com o n° das amostras e a data da preservação. Deixar na placa pelo menos duas tiras de papel para serem utilizadas no teste de pureza. Semear as tiras em meio Embrapa sólido, guardar as amostras, enquanto aguarda o resultado do teste.

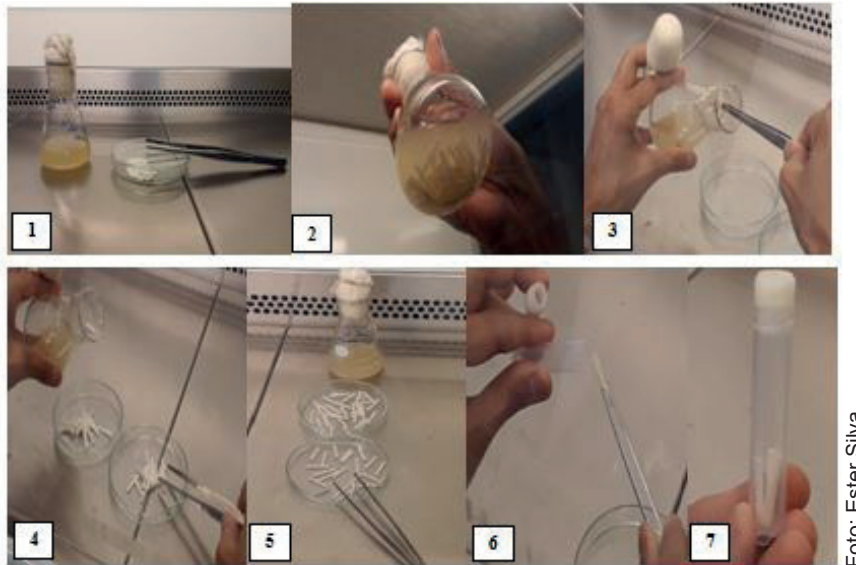


Figura 10: Etapas para a preservação de amostras de *Bacillus* spp.: (1) adicionar as tiras de papel filtro no erlenmeyer contendo as estirpes cultivadas, (2) deixar as tiras de papel de filtro imersas por 30 minutos, (3) coletar as tiras de papel embebidas, (4) depositar as tiras em placas de Petri, (5) espalhar as tiras de papel e deixar secar por cerca de 5 horas, (6) transferir as tiras de papel para os tubos criogênicos e (7) armazenar 4 tiras de papel por tubo criogênico.

5 - Testes de pureza Pós-armazenamento

As amostras devem ser semeadas em placas de Petri, previamente identificadas, contendo meio Embrapa sólido. Para isso, deslizar as tiras de papel de filtro, com auxílio da pinça flambada no meio Embrapa sólido (Anexo 4). Em seguida, fechar as placas com filme plástico e incubar em estufa de crescimento a temperatura de $30 \pm 4^\circ\text{C}$ por 72 horas. Todo procedimento deverá ser realizado no interior de capela previamente limpa com álcool 70% e esterilizada sob luz UV por 20 min.

Decorridas as 72 horas, as amostras semeadas em meio Embrapa sólido (Anexo 4) devem ser analisadas com relação ao crescimento bacteriano, consideradas puras (amostra com uma única cor e aspecto) e com ausência de contaminantes, devem ser etiquetadas e armazenadas a temperatura ambiente de até 28°C , em armário apropriado, compondo a “Coleção de Trabalho” (Figura 11).

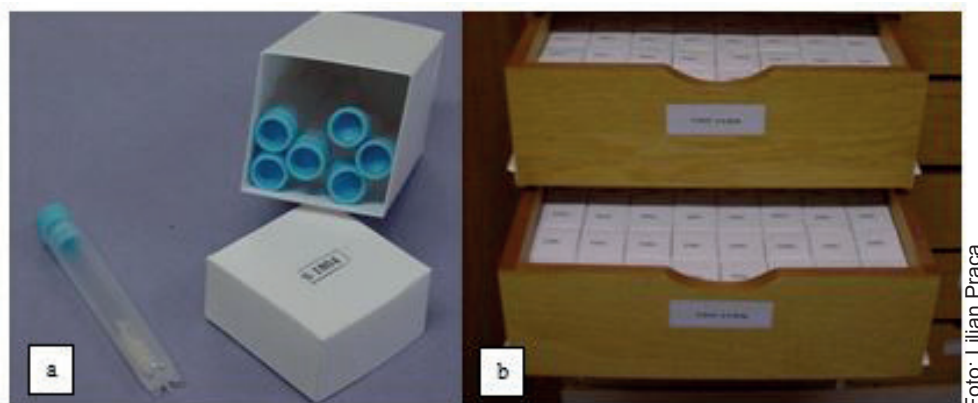


Figura 11: Coleção de trabalho de estirpes de *Bacillus* spp. (a) material em tubos criogênicos guardados em caixas de papel identificadas, (b) Armário para estocar as caixas de papel (Coleção de trabalho)

Quando a amostra apresentar contaminantes, é possível observar diferentes colônias na placa de Petri (Figura 12), as amostras devem ser descartadas.

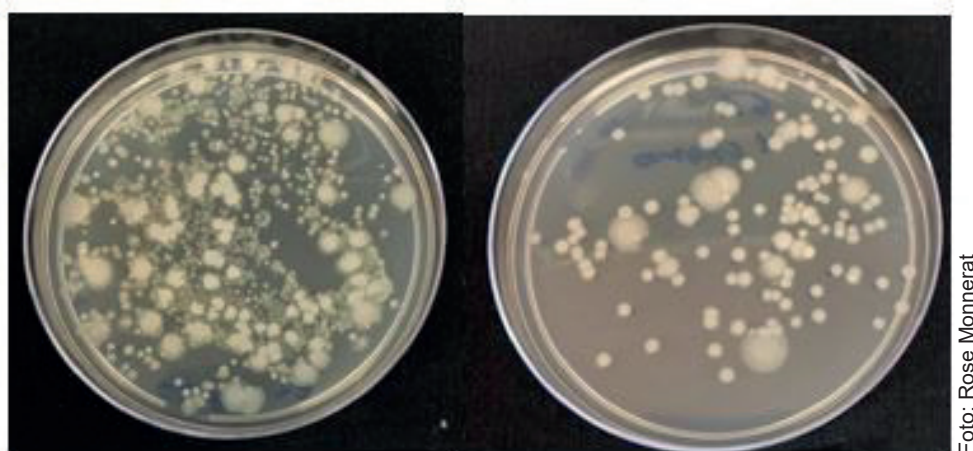


Figura 12: Presença de diferentes colônias em duas placas de Petri inoculadas com *Bacillus*, indicando contaminação.

4.4. Cultivo dos microrganismos em larga escala

Para se cultivar as diferentes espécies de *Bacillus* utilizadas em controle biológico devem ser obedecidas várias etapas, onde algumas podem acontecer simultaneamente.

4.4.1. Preparo do pré-inóculo

A partir das bactérias armazenadas em tiras de papel da “Coleção de trabalho” (item 4.3) inicia-se a multiplicação para posterior inoculação do biorreator, para isso, colocar em capela de fluxo laminar, para esterilização em UV por 20 minutos, todos os materiais a serem utilizados: Erlenmeyer de 150 mL com meio de cultura Embrapa Líquido (Anexo 3); Pinça metálica; Filme plástico e Pincel permanente. Depois de 20 minutos de UV, levar o tubo com tirinhas para a capela e com uma peça metálica flambada, pegar todas as tirinhas do tubo e inocular no erlenmeyer. Identificar o erlenmeyer com os dados da estirpe, data e responsável. Fechar o erlenmeyer com rolha de algodão e filme plástico e acondicionar em incubador rotativo 200 rpm a 28 ± 2 °C por 72 horas. Realizar uma nova microscopia para verificar a qualidade da amostra (deve apresentar boa taxa de esporulação e ausência de contaminantes). Para isso, preparar a capela de fluxo laminar e ligar a luz UV por 20 minutos com todos os materiais a serem utilizados: filme plástico, lâminas e lamínulas, micropipeta 20 μ L, ponteiras para 20 μ L, pincel permanente, microtubo de 1,5 ou 2,0 mL, micropipeta 1.000 μ L, ponteira P 1000 e recipiente para descarte. Em seguida, desligar a luz UV e levar o erlenmeyer com a bactéria cultivada para análise. Utilizando uma micropipeta ou pipeta Pasteur, retirar uma gota e depositar sobre a lâmina e cobrir com a lamínula e levar ao microscópio com contraste de fase para visualização da presença de esporos e avaliação da presença ou ausência de contaminantes.

2. Preparo do inóculo

Após confirmação da pureza, o cultivo poderá ser utilizado para preparar o inóculo. Para isso o cultivo puro deve ser submetido a choque térmico que poderá ser em todo o erlenmeyer ou alíquotas de 1 mL em microtubos, submetendo-os em banho-maria a 80 °C por 12 minutos e em gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, em ambiente estéril transferir 1 mL da amostra para erlenmeyer de 2.000 mL contendo 600 mL do meio de cultura selecionado para o cultivo em grande escala (item 4.2). Fechar o erlenmeyer com rolha de algodão e levar para o incubador rotativo (shaker) sob agitação de 200 rpm e temperatura de 28 ± 2 °C por um período de 10 horas. Passado esse período de incubação o inóculo estará pronto para transferência para o biorreator.

3. Preparo de ácido, base e antiespumante

A fim de se controlar parâmetros de pH e produção de espuma durante o processo fermentativo, faz-se necessário o preparo de alguns reagentes que serão utilizados para esse propósito, tais como o ácido fosfórico, hidróxido de sódio e antiespumante.

a- Preparo de um litro de ácido fosfórico a 50%

Em capela de exaustão colocar o béquer contendo 500 mL de água destilada sobre um agitador magnético, colocar uma bailarina dentro do béquer, liga-se o agitador em aproximadamente 200 rpm, acrescenta-se aos poucos 500 mL de ácido fosfórico P.A. Quando todo o ácido tiver sido adicionado e a solução estiver translúcida transferir o conteúdo para frasco de vidro com tampa de rosca.

Obs: esse ácido é o mais recomendado para o processo devido ao fato de ser menos agressivo, o que aumenta a vida útil de mangueiras, além de agredir menos as células multiplicadas. É importante lembrar ainda que se trata de uma reação exotérmica e cuidados devem ser tomados para se evitar queimaduras. Portanto, todo o procedimento deve ser realizado em capela de exaustão, devendo-se adicionar sempre o ácido fosfórico aos poucos na água, nunca o contrário, e usar sempre EPIs – equipamentos de proteção individual.

b- Preparo de um litro da solução de hidróxido de sódio a 20%

Em capela de exaustão, colocar o béquer contendo 800 mL de água destilada sobre um agitador magnético; colocar uma bailarina dentro do béquer; ligar o agitador em aproximadamente 200 rpm; acrescentar aos poucos as 200 g de pérolas de hidróxido de sódio. Quando todo o hidróxido de sódio tiver sido adicionado e a solução estiver translúcida, transferir o conteúdo para frasco de vidro com tampa de rosca.

Obs: essa é uma reação exotérmica e cuidados devem ser tomados para se evitar queimaduras. Portanto, todo o procedimento deve ser realizado em capela de exaustão, devendo-se adicionar sempre a base aos poucos na água, nunca o contrário, e usar sempre EPIs – equipamentos de proteção individual.

c- Preparo de um litro de antiespumante a 50%

O antiespumante é um produto destinado a controlar a formação de espuma durante o processo de produção. Os mais utilizados nos processos biológicos são os siliconados.

Para o preparo deve-se misturar 500 mL de antiespumante siliconado comercial em 500 mL de água destilada. Homogeneizar a mistura e distribuir 500 mL em frascos boeco de para autoclavagem.

4. Preparo do biorreator e início do processo

O meio de cultura é um insumo de grande importância no processo fermentativo, pois, caso não tenha boa qualidade poderá comprometer a qualidade do produto ou até mesmo inviabilizar todo o processo produtivo (item 4.2). Este deve fornecer todos os nutrientes necessários para multiplicação do microrganismo de interesse, assim como, dar suporte para que este produza com qualidade o seu produto final (metabólitos, cristais proteicos, esporos etc.).

Com um meio de cultura de qualidade em mãos, este deve ser colocado no biorreator e diluído de acordo com as instruções do fabricante do meio de cultura. Em seguida, os sensores de pH, oxigênio, temperatura e espuma devem ser checados e calibrados.

O próximo passo consiste em esterilizar o biorreator, de preferência por autoclavagem, ou de acordo com o método recomendado pelo fabricante do biorreator. Finalizada a esterilização, caso tenha sido realizada por autoclavagem, o biorreator deverá ser resfriado até que se alcance a temperatura de trabalho de 30 ± 2 °C. As soluções de ácido, base e antiespumante deverão ser conectados ao biorreator a fim de que estejam disponíveis para serem utilizadas quando requeridas durante o processo.

A partir desse momento pode-se iniciar a aeração da calda que consiste na introdução de ar filtrado ao processo (é de fundamental importância a presença de elementos filtrantes de preferência autoclaváveis de $0,2 \mu\text{m}$ na entrada e na saída de ar no vaso, para se evitar entrada de contaminantes. O pH da calda deve ser ajustado para 7,0.

Ajustados os parâmetros de temperatura, pressão e pH, adicionar o microrganismo ao processo. É recomendável que o volume do inóculo seja de aproximadamente 2% do volume da calda a ser inoculada, isto é, se a calda a ser inoculada for de 100 litros, o inóculo deve ter volume de 2 litros.

Introduzido o microrganismo de interesse, ajustar e ligar os controladores automáticos, caso o equipamento os possua, mantendo assim os parâmetros de temperatura, pressão, pH e oxigênio dissolvido sempre dentro dos intervalos ótimos de crescimento da bactéria.

Dos parâmetros a serem controlados:

► pH: entre 6,8 e 7,2 no início do processo (é importante lembrar que quando nos referimos a *B. thuringiensis*, esse não pode chegar a valores superiores a 8,5 o que pode favorecer a solubilização das proteínas Cry);

► Temperatura: deve ser mantida entre 28 e 32 °C;

► Oxigênio dissolvido: não dever chegar a valores inferiores a 20% devendo ser mantido em torno de 40%, isso porque à medida em que se avança com o processo fermentativo, as bactérias exigirão mais oxigênio e o seu fornecimento deve ser progressivo atendendo às exigências de cada microrganismo.

Iniciado o processo de fermentação, este deverá ser conduzido até a total esporulação da bactéria o mais próximo de 100% possível.

Com o exaurimento das fontes nutritivas do meio de cultura o microrganismo entra em uma fase estacionária onde não justifica continuar o processo. Nesse ponto chega-se ao término da fermentação.

5. Retirada de amostras do biorreator:

Durante o processo fermentativo é necessário a retirada de amostras para se avaliar a qualidade da fermentação. Essa amostragem deve ser realizada através do registro saca amostras, normalmente localizada ao lado do vaso do biorreator. Para retirada das amostras deve-se:

- Abrir o registro saca amostra por alguns segundos, a fim de se eliminar qualquer resto de cultivo na tubulação;
- Coletar a amostra imediatamente após a limpeza da tubulação;
- Para a retirada da amostra, deve-se limpar o bico do coletor com álcool 70% e em seguida flambar o bico.

Obs: deve-se evitar coletar amostras se a velocidade de rotação do misturador estiver muito baixa, pois pode levar a erros na leitura de concentração.

É recomendado a retirada de amostras nos seguintes momentos:

- 1- Após esterilização do reator contendo o meio de cultura;
- 2- A cada 12 horas até que os microrganismos atinjam 90% de esporulação.

Essas amostras devem ser observadas à fresco, em microscópio de contraste de fases com aumento de 1000 vezes para observação das fases de crescimento bacteriano, ou seja, se apresentam células vegetativas, esporângios, esporos, e no caso de *B. thuringiensis*, os cristais.

6. Limpeza do reator

Ao final da fermentação, todo o material cultivado deverá ser esgotado do reator para que este seja esterilizado, de preferência por autoclavagem eliminando resíduos biológicos evitando-se com isso, contaminações por dispersão destes, sem tratamento, no ambiente.

Como nesse processo não há a necessidade dos sensores de pH e oxigênio, esses podem ser removidos para preservá-los aumentando sua vida útil.

Obs: todo o processo de esterilização deverá ser acompanhado para prevenir eventuais contratempos, possibilitando, assim, ações corretivas imediatas e em tempo hábil quando necessárias.

Depois que o equipamento resfriar, a água residual deve ser descartada e o equipamento estará pronto para lavagem, e deve ser lavado de forma manual ou automatizada, dependendo da configuração do equipamento.

É importante que limpezas, mais criteriosas, com desmontagem de parte do equipamento sejam também realizadas periodicamente, ou sempre que houver mudança do organismo a ser multiplicado.

7. Limpeza de periféricos (barriletes, mangueiras de titulação de reagentes e sensores)

Antes do início de outra fermentação os periféricos utilizados também devem ser higienizados prevenindo assim futuras contaminações.

- Limpeza de barriletes:
 - Levar à pia onde serão destampados;
 - Depois de abertos, lavar com bucha e sabão tanto interna quanto externamente;
 - Lavar a tampa dos barriletes com água e sabão;
 - Devido à impossibilidade de se lavar internamente a mangueira, esta deve ser lavada externamente e em seguida acoplada a torneira para que se passe água, sobre pressão, por seu interior (aproximadamente um minuto) – esse procedimento além de retirar resíduos sólidos também irá auxiliar na localização de pontos de vazamento;
 - Após lavagem, o barrilete deve ser novamente fechado com sua tampa;
 - A ponta da mangueira e o filtro de ar devem ser recobertos com papel alumínio e o conjunto deve ser colocado em um saco de autoclavagem;
 - O conjunto deve ser levado para autoclave, onde será esterilizado (período de 20 minutos, temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e pressão de 1 atm);
- Limpeza de mangueiras de titulação de reagentes:
 - Assim como as mangueiras dos barriletes, as de titulação devem ser lavadas;
 - Após esses procedimentos as mangueiras e filtros de ar devem ter suas extremidades recobertas com papel alumínio;
 - Coloca-se o conjunto em sacos de autoclavagem;
 - Leva-se para autoclave onde serão esterilizados (período de 20 minutos, temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de 1 atm);
- Limpeza dos sensores:

- O sensor de espuma deve ser desconectado do reator, levado a torneira e lavado com água e sabão. Após lavagem pode novamente ser acoplado ao biorreator;
- Limpeza do sensor de pH:
 - Este deve ser cuidadosamente desacoplado do biorreator e lavado com água destilada;
 - Após lavagem deve ser seco com papel macio (higiênico dupla face) e colocado em sua capa contendo solução de cloreto de potássio 3M;
- Limpeza do sensor de oxigênio:
 - Esse sensor também deve ser cuidadosamente desacoplado do biorreator, lavado com água destilada e seco com papel macio;
 - Após lavagem o sensor deve ser armazenado próximo ao biorreator.

5 - Controle de qualidade de bioprodutos

O controle de qualidade dos bioprodutos 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 dos bioprodutos sob diferentes aspectos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia.

5.1- Procedimento para identificação morfológica das bactérias

O crescimento das bactérias do gênero *Bacillus* é descrito em quatro fases: uma fase de adaptação ao meio de cultura (fase Lag), uma fase vegetativa com crescimento exponencial (fase Log), uma fase transitória onde ocorre a formação do esporo e por último a fase de esporulação onde a célula se rompe e ocorre a liberação do esporo. No caso do *B. thuringiensis*, concomitantemente a formação do esporo, acontece a formação do cristal, que é liberado quando a célula se rompe.

É possível acompanhar essas fases através da observação à fresco em microscópio de contraste de fases, com aumento de 1.000 vezes.

Para isso é necessário que uma gota do cultivo seja coletada e colocada sobre uma lâmina de microscopia. Em seguida a amostra deve ser coberta com uma lamínula e imediatamente observada ao microscópio de contraste de fases com a objetiva de 100 x. Como a ocular do microscópio tem aumento de 10 x, a resolução final é de 1.000 x.

As principais características da morfologia que são visualizadas no microscópio de contraste de fases são: célula vegetativa, forma e posição do esporo, presença de corpos

paraesporais (cristais) e motilidade. As informações referentes a cada espécie de *Bacillus* estão especificadas na Tabela 1, seção 4.3.

5.2 - Procedimento para determinação de pH

O pH é uma determinação eletrométrica que avalia a concentração de íons hidrogênio em uma amostra. Ele pode ser determinado através do uso de equipamento pHmetro, indicadores ou fitas de pH.

5.2.1. Determinação do pH utilizando pHmetro:

Utilizar o pHmetro de acordo com o manual de instruções de uso, calibrando-o antes de sua utilização.

No caso de amostras líquidas, coletar 100 mL da amostra. No caso de amostras sólidas, pesar 1 grama em béquer e diluir em 100 mL de água destilada (caso necessário, colocar uma barra magnética (bailarina) na amostra, deixando-a sob agitação constante até a completa homogeneização.

Em seguida, retirar o eletrodo da solução de KCl (onde ele é normalmente conservado), lavar com água destilada, secar com papel macio (sem esfregar) e inseri-lo na amostra. Fazer a leitura após a estabilização no mostrador do pHmetro.

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

Coletar a amostra de acordo com o item 5.2.1. Inserir a fita ou indicadores na amostra e aguardar que a cor da fita estabilize. Conferir a cor do indicador com a tabela de cores e pH referência (fita padrão).

Observação: A fita indicadora é recomendada para situações corriqueiras onde apenas uma breve checagem é exigida.

5.3 - Procedimento para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

O objetivo deste procedimento é a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus*. Espécies deste gênero produzem esporos e a forma mais correta de avaliar a qualidade dos produtos à base destas bactérias é determinando a UFC através do número de esporos. Essas estruturas são resistentes à temperatura de 80°C por 12 minutos.

5.3.1. Ensaio a partir de amostras sólidas ou líquidas

Antes de iniciar a determinação de UFC, esterilizar por meio da autoclavagem, todo o material a ser utilizado: ponteiras, tubos de ensaio ou de centrifugação de 15 mL e um vidro com tampa de rosca com água destilada suficiente para realização das diluições.

Em seguida ligar a capela de fluxo laminar e limpar com álcool 70%. Colocar dentro da capela, 10 tubos de ensaio estéreis de aproximadamente 15 cm de comprimento, suporte para tubos de ensaio, solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v) a temperatura ambiente (400 mL), micropipetas automáticas (P5000, P1000, P100, P20) e suas respectivas ponteiras estéreis, recipiente para descarte de ponteiras, marcador permanente, agitador de tubos (Vortex), filme plástico, alças de Drigalsky estéreis. Deixar tudo sob luz UV por aproximadamente 20 min.

Após esse período, enumerar, os tubos de ensaio e colocá-los no suporte.

Com uma micropipeta P5000; colocar 9 mL de solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v) estéril em cada tubo, quando as amostras a serem quantificadas forem amostras líquidas ou quando amostras sólidas, 10 mL de solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v) no primeiro tudo e nos demais 9 mL.

No caso de amostras sólidas pesar 0,01 g em balança de precisão e transferir o conteúdo pesado para o tubo de ensaio com 10 mL de solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v) que se encontra no interior da capela de fluxo laminar. Homogeneizar bem com agitador de tubos.

Após homogeneização, retirar uma alíquota de 1 mL da diluição 01, acondicionar em microtubo tipo eppendorf e submeter a choque térmico em placa aquecedora ou banho maria por 80° C por 12 minutos seguido de banho de gelo por 5 minutos. Desta forma, todas as células vegetativas irão morrer e apenas os esporos continuarão viáveis.

Após o choque térmico, transferir 1 mL da amostra com o auxílio da P1000 e colocar no tubo com 9 mL de solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v), em seguida homogeneizar a solução no agitador de tubos. Trocar a ponteira por outra estéril. Transferir 1mL da solução do tubo 1 para o tubo 2. Homogeneizar no agitador de tubos. 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. Depois de realizadas todas as diluições, semear 100 µL de cada uma das diluições em placas de Petri com meio Embrapa sólido (Anexo 4). Para cada diluição devem ser semeadas 2 placas. Finalmente espalhar, com alça de Drigalsky, a solução sobre toda a superfície do meio de cultura, fechar a placa de Petri e vedar com filme plástico (Figura 13).

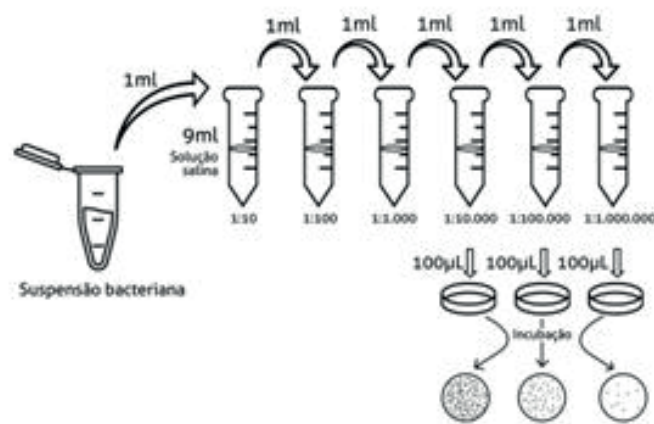


Imagem: Rose Monnerat

Figura 13: Esquema do preparo das diluições seriadas decimais e inoculação em placas de Petri.

Incubar as placas em estufa bacteriológica à temperatura de 30 ± 4 °C por 16 a 24 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de colônias de cada uma das diluições, a fim de calcular o número de esporos (unidades formadoras de colônias). Apenas as placas que apresentarem de 30 a 300 colônias de bactérias devem ser contadas.

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônia por mL, deve-se multiplicar o n° de colônias pela diluição que a placa representa e pela quantidade de suspensão semeada na placa. Por exemplo: na diluição 10^{-3} foram contadas 180 colônias. O cálculo será: 180 (número de UFC por placa) x 1.000 (fator de diluição) x 10 (conversão de μL para mL) = $1,8 \times 10^6$ colônias/mL.

As duas placas devem ser contadas e o resultado final será a média dos valores.

5.4 - Procedimento para avaliação da eficácia de produtos para controle de lagartas

Este procedimento visa avaliar eficácia de produtos biológicos à base de *B. thuringiensis* a larvas de lepidópteros. Sugere-se que o bioensaio seja realizado com larvas da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Figura 14) pois este inseto é de fácil manutenção em laboratório ou pode ser adquirido em empresas nacionais que a comercializam.

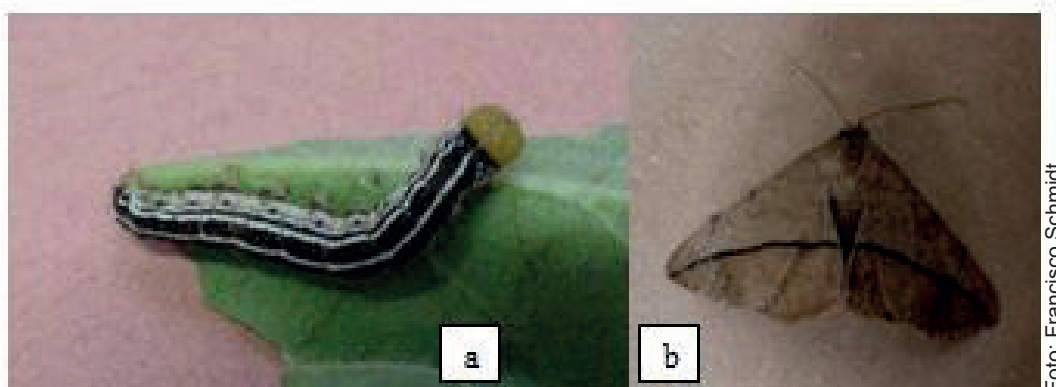


Foto: Francisco Schmidt

Figura 14: Larva (a) e adulto (b) de *Anticarsia gemmatalis*

5.4.1. Criação de *Anticarsia gemmatalis*

Os insetos devem ser mantidos em sala climatizada, a temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 14 horas de claro e 10 horas de escuro e no máximo 70% de umidade. É necessário a utilização de uma lâmpada de 30w para simular a situação de luminosidade em que os adultos de *A. gemmatalis* acasalam.

- Coleta e esterilização externa dos ovos

Deve-se revestir as gaiolas das mariposas com papel sulfite, para que as mesmas realizem as posturas, devendo ser trocados diariamente (Figura 15a). Após a retirada do papel contendo os ovos, transferir para um recipiente contendo água e deixa-lo submerso até que os ovos comecem a desprender do papel. Um pincel de cerdas macias poderá ser utilizado para auxiliar a liberação dos ovos (Figura 15b). Depois de soltos, os ovos devem ser coados em peneira de malha fina (Figura 15c) e esterilizados, por imersão em solução

de formaldeído 5% durante cinco minutos, água destilada por dois minutos e por último em solução de sulfato de cobre 1% durante dois minutos.

Após desinfecção dos ovos, levá-los para capela de fluxo laminar e distribuí-los com o auxílio de um outro pincel fino, uniformemente em fitas de papel estéril (3 x 6 cm). As fitas de papel impregnadas com os ovos devem ser fixadas na face interna do copo plástico transparente de 250 ml, com 2 cubos (2 x 2 x 2 cm) de dieta artificial (Anexo 5), e cuja tampa é perfurada ($\varnothing = 1\text{cm}$) e vedada com algodão para ventilação (Fig.15d).

Obs: Deve-se evitar o contato do papel, contendo os ovos, com a dieta para diminuir os riscos de contaminação.

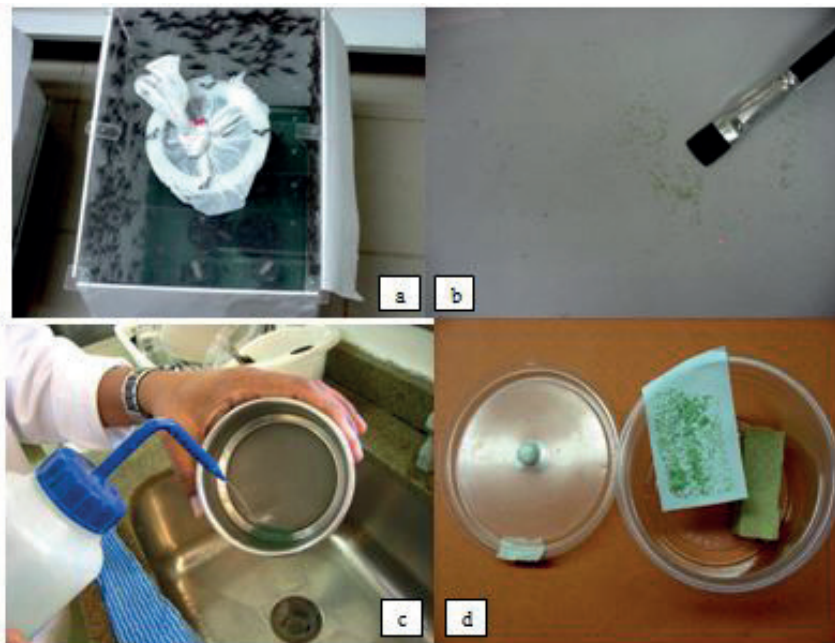


Foto: Francisco Schmidt

Figura 15: Gaiolas das mariposas revestidas de papel sulfite, para que as fêmeas realizem as posturas (a), Liberação dos ovos do papel com auxílio de pincel de cerdas macias (b), ovos sendo coados em peneira de malha fina (c), Fitas de papel impregnadas com os ovos fixadas na face interna do copo plástico transparente contendo dieta artificial, com tampa perfurada e vedada com algodão para ventilação (d).

- Manejo de lagartas

Após aproximadamente 3 dias ocorre a eclosão das lagartas que se alimentarão da dieta e permanecerão neste recipiente até o sétimo dia, quando deverão atingir o estágio L3-L4 (cerca de 1.5 cm de comprimento). Nesta fase as lagartas são repicadas, quatro para cada copo de 50 ml contendo um cubo de aproximadamente 2 x 2 x 2 cm de dieta artificial (Anexo 5), onde permanecerão até a fase de pré-pupa. Fechar os copos com tampas de acrílico transparente (Figura 16) esterilizadas em hipoclorito e/ou luz UV.

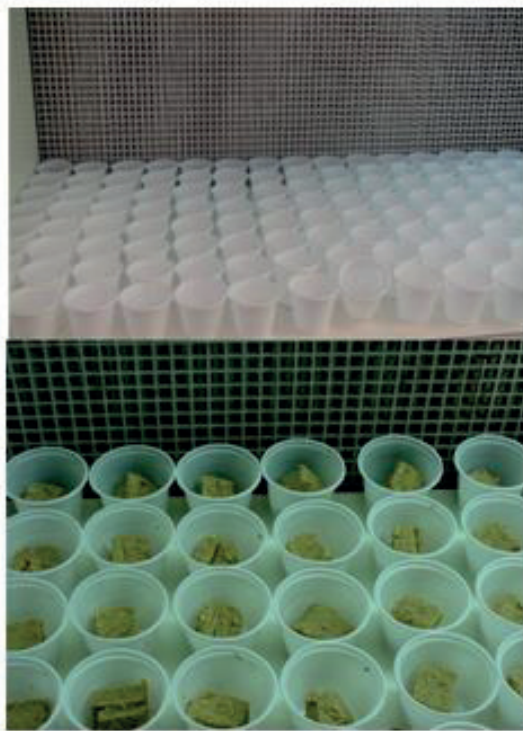


Foto: Francisco Schmidt

Figura 16: Repique das lagartas no estágio L3-L4 em copos de 50 ml contendo um cubo de dieta artificial.

- Manejo das pupas e adultos

De 7 a 10 dias após repique as lagartas entram na penúltima fase de metamorfose, ou seja, transformam-se em pré-pupas. As pupas obtidas são sexadas sob lupa, observando-se a região ventral. Nas proximidades da região posterior percebe-se o dimorfismo sexual (Figura 17). As pupas são transferidas para a gaiolas de adultos afim de que ocorra a emergência dos adultos (Figura 18). Revestir as gaiolas com papel sulfite onde as fêmeas depositam seus ovos. Alimentar os adultos com algodão embebido em solução de mel (10 g), ácido sórbico (1 g), sacarose (60 g), cerveja sem álcool (10 mL) e H₂O destilada estéril (1000 mL).

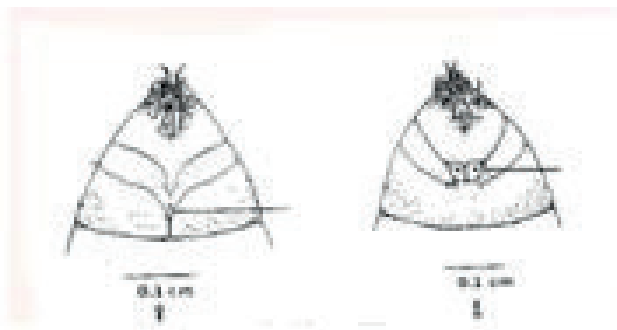


Imagem: Francisco Schmidt

Figura 17: Dimorfismo sexual de pupas de *A. gemmatalis*.



Figura 18: gaiola de adultos recém emergidos.

5.4.2. Preparo do bioensaio

O bioensaio deve ser realizado em capela de fluxo laminar, que deverá ser limpa com álcool 70%.

Preparar a dieta artificial da mesma forma que para a criação massal, (Anexo 5). Esta dieta não deve levar formol, ácido sórbico e nipagin. Preparar a dieta em um béquer para que depois possa ser distribuída diretamente em copinhos de 50 mL, dentro da capela de fluxo laminar.

Ao mesmo tempo em que a dieta é preparada, preparar capela de fluxo laminar com os copinhos de plástico de 50 mL e suas tampas de acrílico, pincel ou pinça entomológica, béquer estéril (para a distribuição da dieta), micropipeta automática, ponteiras para volumes de 40-200 μ L estéreis, misturador de tubos, recipiente para descarte de ponteiras e submeter a luz UV por 20 min. Decorrido o tempo, desligar a luz UV e ligar a luz branca. Ainda com a dieta quente (recém tirada da autoclave), fazer então a distribuição da dieta auxílio os béqueres estéreis até a altura de 1 cm (basicamente só o fundo do copinho de 50 mL será coberto).

Em seguida, expor os copinhos à luz UV por 20 min e depois ligar a luz branca. Deixar 6 copinhos sem a adição do produto para servir como controle negativo e distribuir sob a dieta 150 μ L do produto a ser testado em mais 6 copinhos. Homogeneizar a suspensão bacteriana com o agitador de tubos, antes e durante a distribuição.

Após a completa absorção do produto pela dieta, colocar, com um pincel ou pinça entomológica, dez lagartas de 2º instar de *A. gemmatilis* em cada copinho (Figura 19). Fechar os copinhos com tampas de acrílico, vedando totalmente a saída das lagartas. Colocar os copinhos na sala de condicionamento de bioensaios à temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 14 horas.

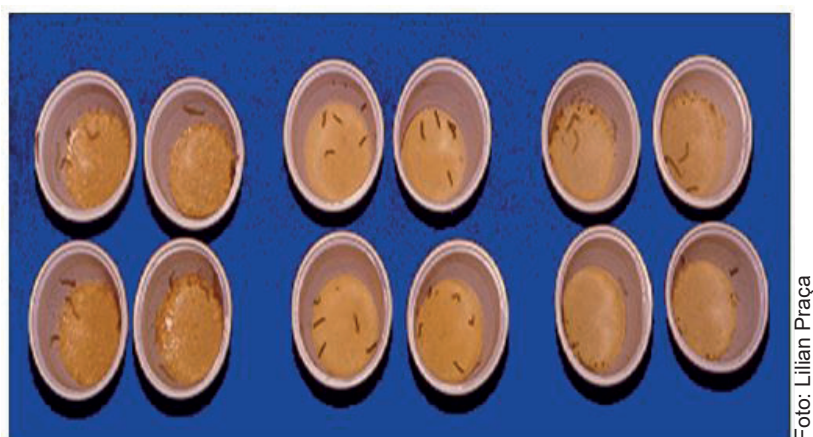


Foto: Lilian Praça

Figura 19: Larvas de *A. gemmatilis* colocadas em copinhos de 50 mL contendo dieta e bactéria.

Após 48 horas do início do bioensaio, retirar as placas da sala de acondicionamento de bioensaios e contar o número de lagartas vivas e mortas em cada copinho, determinando assim a porcentagem de mortalidade causada pelo produto.

Caso a testemunha apresente mortalidade acima ou igual a 15%, o bioensaio deve ser repetido.

5.5- Procedimento para avaliação da presença de beta exotoxinas

Algumas estirpes de *B. thuringiensis*, em função do meio de cultura e condições fermentativas, podem produzir a β -exotoxina, uma toxina descrita como tóxica a vertebrados. Assim, essas estirpes não podem ser utilizadas como base de produtos biológicos. A β -exotoxina é tóxica a larvas de *Musca domestica*, mesmo depois que o produto é autoclavado, pois esta toxina é termo tolerante. Desta forma, para verificar a presença dessa toxina, realiza-se um bioensaio com larvas deste inseto.

5.5.1. Criação de *Musca domestica*

Os adultos de *Musca domestica* devem ser mantidos em gaiola entomológica contendo algodão embebido em água, açúcar como fonte de carboidratos e leite líquido como fonte de proteínas.

Para que haja oviposição, preparar 50 mL de leite para umedecer um chumaço de algodão. Depositar o algodão em uma placa de Petri ou outro recipiente para oferecer aos adultos. Após 24 horas, retirar o algodão, que já conterà os ovos e colocar em um pote plástico com 200 g de ração para aves, previamente umedecida. Fechar o pote com voil e elástico e aguardar a eclosão das larvas (Figura 20).



Figura 20: Criação de *Musca domestica*: (a) gaiola entomológica contendo algodão embebido em água, açúcar e leite líquido, (b) pote plástico contendo ração para aves e os ovos, (c) pote coberto com voil e elástico para evitar fuga das larvas.

5.5.2. Preparação da amostra

Em capela de fluxo laminar, colocar 10 mL da amostra do produto em tubo Falcon de 15 mL, e em seguida centrifugar à velocidade de 11.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Após centrifugação, com uma pipeta, retirar o sobrenadante e transferi-lo para outro tubo Falcon de 15 mL. Esterilizar o sobrenadante a 120 °C por 20 min e, após resfriamento, utilizá-lo para o bioensaio ou armazená-lo a -20 °C até a realização dos testes.

5.5.3. Preparo da dieta artificial e montagem do bioensaio

Enquanto a dieta é esterilizada, colocar na capela de fluxo laminar, copinhos de plástico de 50 mL, tampas de acrílico, pincel ou pinça entomológica, micropipeta automática, ponteiras para volume de 150 µL estéreis e recipiente para descarte de ponteiras e submeter à luz UV por 20 min.

Distribuir 20 mL da dieta nos copos descartáveis e submeter novamente à luz UV por 20 minutos, tempo em que a dieta irá esfriar. A dieta é a mesma utilizada para o bioensaio da *A. gemmatalis* (Anexo 5). Esta dieta não deve levar formol, ácido sórbico e nipagin. Preparar em um Becker para que depois possa ser distribuída diretamente em copinhos de 50 mL, dentro da capela de fluxo laminar.

Em seguida, distribuir 150 µL do produto que será testado sob a superfície da dieta e aguardar até que esta seja absorvido pela dieta. Quando a superfície da dieta estiver seca, depositar, com um pincel ou pinça entomológica, 20 larvas de 1° instar (L1) de *M. domestica* em cada copo e, em seguida, fechar os copos com tampas de acrílico. As larvas L1 aparecem de 2-3 dias após a coleta dos ovos.

Fazer 5 repetições para cada amostra. Para a testemunha, utilizar 150 µL de água estéril. Os tratamentos devem permanecer em incubadora ou sala de bioensaio com temperatura controlada 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 14 horas.

Após 5 dias do início do bioensaio, retirar os copos da sala de acondicionamento de bioensaios e contar o número de larvas vivas e mortas em cada copinho, determinando

assim a porcentagem de mortalidade causada pelo produto. Caso a testemunha apresente mortalidade acima ou igual a 15%, o bioensaio deve ser repetido.

5.6 - Procedimento para determinação da presença de contaminantes

Alguns microrganismos devem ser evitados quando se produz um bioproduto. Existem meios de cultivo seletivos que podem rapidamente detectar a presença desses microrganismos. Na tabela 2 estão listados quais microrganismos devem ser investigados, quais os meios de cultivo apropriados para sua detecção e qual a quantidade aceitável para estar presente nos produtos.

Esta avaliação será realizada através da determinação da concentração total de células viáveis pela técnica de semeadura em diferentes meios de cultivo seletivos, e posterior contagem das unidades formadoras de colônia.

Tabela 2: microrganismos indesejáveis, quantidade aceitável para estar presente nos produtos e meios de cultivo apropriados para sua detecção.

Microrganismo	Especificação	Meio de cultura
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
Salmonella	0	Ágar Verde-Brilhante
Fungos	0	Ágar Sabouraud 4%

5.6.1. Preparo de meios de cultura

O preparo dos meios de cultura como: Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro, Ágar MacConkey, Ágar Confirmatório para Enterococos, Ágar Seletivo para Estreptococos, Ágar Verde-Brilhante e Ágar Sabouraud 4%, dependerá da recomendação dos diferentes fabricantes.

5.6.2. Preparo das diluições dos bioprodutos

Inicialmente, preparar as suspensões-mãe para realizar a diluição do bioproduto. No caso de produto biológico sólido, preparar suspensão, diluindo 0,01g do bioproduto em 10 mL de solução salina. No caso de produto biológico líquido, diluir 1 mL do bioproduto em 9 mL de solução salina. Homogeneizar bem as suspensões, utilizando o agitador de tubos.

Antes de iniciar as diluições, esterilizar todo o material a ser utilizado: ponteiros, tubos de ensaio de 15 mL e recipientes de vidro com água destilada suficiente para realização das diluições.

Em seguida limpar a capela de fluxo laminar com álcool 70% e ligar o fluxo laminar. Colocar dentro da capela, 3 tubos de ensaio estéreis de aproximadamente 15 cm de comprimento, suporte para tubos de ensaio, água destilada estéril (400 mL) em recipiente de vidro, micropipetas automáticas (P5000, P1000, P100) e ponteiras estéreis de acordo com o volume das ponteiras e recipiente para descarte de ponteiras. Ligar a luz UV por aproximadamente 20 min.

Após esse período, enumerar, os tubos de ensaio e colocá-los no suporte. Em seguida colocar 9 mL de água destilada estéril em cada um dos tubos. Transferir 1 mL da amostra com o auxílio da P1000 e colocar no tubo com 9 mL de água destilada, em seguida homogeneizar a solução no agitador de tubos. Trocar a ponteira por outra estéril. Transferir 1 mL da solução do tubo 1 para o tubo 2. Homogeneizar no agitador de tubos. Repetir este procedimento até o terceiro tubo, sempre homogeneizando cada solução antes da transferência para outro tubo. A cada tubo trocar a ponteira por outra estéril. Depois de realizadas todas as diluições, semear 100 µL das diluições 10^{-3} em placas de Petri com o meio de cultura específico para a detecção de cada microrganismo. Semear 3 placas, ou seja, realizar 3 repetições para a diluição 10^{-3} . Finalmente espalhar, com alça de Drigalsky, a solução sobre toda a superfície do meio de cultura, fechar a placa de Petri e vedar com filme plástico e incubar em temperatura apropriada.

5.6.3. Análise da presença de Coliformes termo tolerantes

Para a detecção da presença de coliformes termo tolerantes, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.6.2 devem ser semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 36 °C (± 2 °C) por 12 a 18 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) da diluição 10^{-3} . O resultado final será a média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10^{n+1} ($n + 1 =$ diluição do tubo + diluição do plaqueamento) e será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

No caso dos coliformes tolerantes, o resultado aceito é quando o número de UFC está abaixo de 500.

5.6.4. Análise da presença de *Escherichia coli*

Para a detecção da presença de *Escherichia coli*, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.6.2 devem ser semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 36 °C (± 2 °C) por 12 a 18 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) da diluição 10^{-3} . O resultado final será a média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10^{n+1} ($n + 1 =$ diluição do tubo + diluição do plaqueamento) e será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

No caso deste ensaio, o resultado aceito é quando o número de UFC está abaixo de 400.

5.6.5. Análise da presença de Enterococcus

Para a detecção da presença de Enterococcus, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.6.2 devem ser semeadas em placas de Petri Para a detecção da presença de Enterococcus, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.8.2 devem ser semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar confirmatório para Enterococcus e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 45 °C (± 2 °C) por 12 a 18 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) da diluição 10^{-3} . O resultado final será a média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10^{n+1} ($n + 1 =$ diluição do tubo + diluição do plaqueamento) e será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

No caso deste ensaio, o resultado aceito é quando o número de UFC está abaixo de 50.

5.6.6. Análise da presença de Streptococcus

Para a detecção da presença de Streptococcus, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.6.2 devem ser semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Seletivo para Streptococcus e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 36 °C (± 2 °C) por 12 a 18 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) da diluição 10^{-3} . O resultado final será a média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10^{n+1} ($n + 1 =$ diluição do tubo + diluição do plaqueamento) e será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

No caso deste ensaio, o resultado aceito é quando o número de UFC deve ser 0.

5.6.7. Análise da presença de Salmonella

Para a detecção da presença de Salmonella, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.6.2 devem ser semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Verde Brilhante e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 36 °C (± 2 °C) por 12 a 18 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) da diluição 10^{-3} . O resultado final será a média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10^{n+1} ($n + 1 =$ diluição do tubo + diluição do plaqueamento) e será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

No caso deste ensaio, o resultado aceito é quando o número de UFC deve ser 0.

5.6.8. Análise da presença de Fungos

Para a detecção da presença de Fungos, as suspensões preparadas de acordo com o item 5.6.2 devem ser semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud 4%, acrescido de 0,25 g/L de Cloranfenicol e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 25 °C (± 2 °C) por 12 a 18 horas. Em seguida, retirar as placas da estufa e contar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) da diluição 10^{-3} . O resultado final será

a média do número de colônias contadas nas três placas multiplicado por 10^{n+1} ($n + 1 =$ diluição do tubo + diluição do plaqueamento) e será expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

No caso deste ensaio, o resultado aceito é quando o número de UFC deve ser 0.

6. Agradecimentos

Os autores expressam seus sinceros agradecimentos a Dra. Lilian Botelho Praça, técnica do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE), pela dedicação e sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

7. Literatura Recomendada

ABCBio. **Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. Biodefensivos registrados no Brasil desde 2005.** 2020. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/biodefensivos-registrados/>. Acesso em: março de 2020.

ABDEL-HAMID, M. E.; NOVOTNY, L.; HAMZA, H. J. Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 587-594, 2001.

ABRIOUEL, H.; FRANZ, M. A. P. C.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 201-232, 2011.

AGROFIT. **Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** 2020. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22 março 2020.

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, B. S. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777.

ARCAS, J. A. Producción de bacterias entomopatogênicas. In: LECUANA, R. E. (Ed.). **Microorganismos patógenos empleados em el control microbiano de insectos plagas.** Buenos Aires: E. R.Lecuona Ed., 1996. p. 208-222.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. In: INGRAHAM, J. L. (Ed.). **Microbiological reviews.** Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 1-24.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, p. 307-319, 2004.

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.

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.

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, 2000. p. 297-316.

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.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 269-275, 2008.

EDWARDS, P.; PULLIN, R. S. V.; GARTNER, J. A. **Research and education for the development of integrated crop-livestock-fish farming systems in the tropics**. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1988. 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.

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.

GUIDELINES for the testing of chemicals. Determination of pH, acidity and alkalinity. OECD, 2013. 6 p.

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.; LE ROUX, C. N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 41-64.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Genetic engineering of biocontrol agents for insects. In: RECHCIGL, J. E.; RECHCIGL, N. A. (Ed.). **Biological and biotechnological control of insect pests**. [S.l.]: CRC Press, 2000. p. 243-280.

HOLMBERG, A.; SIEVANEN, R.; CARLBERG, G. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 1707-1724, 1980.

HURTADO, G. B. La producción de ingredientes activos con *Bacillus 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.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINCY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 21-128.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16, p. 165-182, 2012.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.-W.; SA, T.-M. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2490-2495, 2010.

MALDONADO-BLANCO, M. G.; SOLIS-ROMERO, G.; GALÁNWONG, L. J. The effect of oxygen 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.

MEDICE, R. **Efeito de produtos alternativos no controle de oídio e *Bacillus spp.* como promotores de crescimento da soja.** 2012. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3. p. 163-200.

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. Screening of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

MUKHERJ, S.; DAS, P.; SEM, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11. p. 509-515, 2006.

NWOKORO, O.; DIBUA, M. E. U. Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 113-119, 2014.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**, v. 29, n. 1, p. 427-433, 2009.

OMS. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio-control agents of disease vectors.** Geneva, 1987. 41 p. UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3.

PARK, J. K.; ANTONIO, G. C. **Análise de materiais biológicos.** Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 21 p.

PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 711-753, 1977.

RABINOVITCH, L. E.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos.** Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160 p.

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.

ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. **Polo Plus: Probit and logit analysis user's guide.** Petaluna: LeOra Software, 2002.

ROOSDIANA, A.; PRASETYAWAN, S.; MAHDI, C. Production and Characterization of *Bacillus firmus* Pectinase. **The Journal of Pure and Applied Chemistry Research**, v. 2, n. 1, p. 35-41, 2013.

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, n. 3, p. 307-316, 2001.

SARANYA, P.; KUMARI, H. S.; RAO, B. P.; SEKARAN, G. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 3907-3919, 2014.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. da S. **Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SIKDAR, D. P.; MAJUMBAR, M. K.; MAJUMBAR, S. K. Effect of minerals on the 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. (Ed.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: Embrapa Cerrados, 2006. p. 219-238.

TUMBARSKI, Y.; PETKOV, E.; DENKOVA, Z. Study on the influence of the cultural conditions and the composition of the culture medium on the antimicrobial activity of *Bacillus methylotrophicus* BM47 against some fungal phytopathogens. **Journal of Global Biosciences**, v. 4, n. 8, p. 2990-2996, 2015.

WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CARR, B.; DESAI, N. M.; KOSTICHKA, K.; DUCK, N. B.; ESTRICH, J. J. **Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins**. US5770696A. 1998. v. 5. p. 696-770.

WEISER, J.; KRIEG, A.; HUGER, A. M. **Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union**. Berlin: Paul Parey, 1986. p. 37-50. (Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft).

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.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**. v. 91, n. 2, p. 181-187, 2001.

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.

Anexo 1: Lista de Reagentes

Ácido clorídrico
Agar bacteriológico
Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho Neutro
Ágar Verde-Brilhante
Ágar Confirmatório para Enterococos
Ágar MacConkey
Ágar Sabouraud 4%
Agar Seletivo para Streptococos
Caldo nutritivo
Carbonato de cálcio
Cloreto de sódio
Extrato de levedura
Fosfato de potássio monobásico-KH₂PO₄
Hidróxido de sódio
Hipoclorito de sódio
Kit solução tampão pH 4,0 - 7,0 - 10,0
Sulfato de ferro hepta hidratado- FeSO₄.7H₂O
Sulfato de magnésio hepta hidratado - MgSO₄.7H₂O
Sulfato de manganês hidratado – MnSO₄.H₂O
Sulfato de zinco hepta hidratado- ZnSO₄.7H₂O
Tween 80

Anexo 2: Material de laboratório

Alça descartável com loop graduado de 10 µL estéril, individualizada
Algodão hidrófilo pacote grande
Balarina de tamanhos diferentes
Barbante de algodão

Barrilete de 100 L para armazenar água

Barrilete de 20 L para armazenar água

Bastão de vidro maciço \varnothing 8 x 300 mm

Béquer de plástico de 2.000 mL

Bico bunsen com registro uso laboratorial

Caixa para armazenamento de tubos de 2,0 mL

Copo becker griffin fb grad. (forma baixa graduado - 100 mL)

Copo becker griffin fb grad. (forma baixa graduado - 1000 mL)

Copo becker griffin fb grad. (forma baixa graduado - 2000 mL)

Cubas para lavagem de material

Espalhador de células em L ou T, estéril embalado individualmente

Espátula com cabo de poliestireno

Espátula com colher 15 cm

Estante dupla face para microtubos 0,5 e 1,5/2,0 mL extrato de levedura

Fita crepe

Fita de autoclave

Frasco erlenmeyer boca estreita graduado 2000 mL

Frasco erlenmeyer boca estreita graduado 250 mL

Frasco erlenmeyer boca estreita graduado 50 mL

Gaze em rolo tipo queijo

Lâminas para microscopia

Lamínulas para microscopia

Liga elástica.

Lixeiras para segregação de materiais

Luva de borracha

Luva de procedimento

Luva térmica

Marcador permanente

Micropipeta monocanal volume variável 20.0-100 μ L

Micropipeta monocanal volume variável 200-1000 μ L

Micropipeta monocanal volume variável 40-200 μ L

Micropipeta monocanal volume variável 1000-5000 µL

Microtubo eppendorf 1,0 mL graduado tampa lisa

Microtubo eppendorf 2,0 mL graduado tampa lisa

Óleo de imersão

Papel alumínio

Papel mata borrão

Papel pardo

Pinça de ponta serrilhada de 20 cm

Pinças de inox com ponta serrilhada reta

Pipeta Pasteur descartável estéril

Pisseta grad 500 mL polietileno para água

Pisseta grad 500 mL polietileno para álcool 70%

Placa de Petri 90x15 mm estéril descartável

Placas de Petri 90x15 mm em vidro

Ponteiras 500-5000 µL sem filtro pct 1000 un

Ponteiras 100-1000 µL azul sem filtro pct 1000 un

Ponteiras 1-200 µL amarela com filtro pct 1000 un

Proveta graduada base sextavada polipropileno 1000 mL

Proveta graduada base sextavada polipropileno 100 mL

Proveta graduada base sextavada polipropileno 500 mL

Rack para 100 ponteiras 1000 uL material pp (polipropileno) autoclavável

Rack para tubo de ensaio

Rolo de papel craft

Sacos de autoclave de 20 L

Sacos de autoclave de 50 L

Tubo boeco de tampa azul 100 mL

Tubo boeco de tampa azul 250 mL

Tubo boeco de tampa azul 500 mL

Tubo criogênico de 5 mL

Tubo de ensaio de 50 mL

Tubo falcon de 15 mL estéril

Tubo falcon de 50 mL estéril

Anexo 3: Meio Embrapa Líquido

Ingredientes:

Extrato de levedura (1 g) fosfato de potássio monobásico- KH_2PO_4 (1 g), caldo nutriente (10 g), sais minerais (10 mL/litro de meio de cultura) e água destilada (1 L).

Preparo dos sais minerais:

Carbonato de cálcio – CaCO_3 (10 g), sulfato de magnésio hepta hidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g), sulfato de ferro hepta hidratado- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g), Sulfato de manganês hidratado – $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 g), sulfato de zinco hepta hidratado- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g) e água destilada (1 L). Depois de pesados todos os ingredientes adicionar a água destilada em um béquer, fechar com papel alumínio e deixar homogeneizando por 16 horas em agitador magnético com uma barra magnética (bailarina ou peixinho). Armazenar o produto em vidro fosco em temperatura ambiente.

Preparo do meio de cultura:

Colocar os ingredientes pesados, com exceção dos sais minerais em um béquer e completar o volume com água destilada (conforme volume a ser preparado). Adicionar os sais minerais (10 mL/L de meio). Introduzir uma barra magnética no béquer e homogeneizar no agitador magnético. Ajustar o pH para $7,0 \pm 0,2$, adicionando NaOH 6M como solução básica ou HCl 6M como solução ácida.

Distribuir 40 mL do meio de cultura nos erlenmeyer de 125 mL com auxílio de uma pipeta de 25 mL acoplada ao dispensador de líquidos. Tampar os frascos com rolha de algodão e cobrir a rolha com papel alumínio ou papel pardo. Fixar o papel com uma liga elástica e colocar uma fita de autoclave com identificação do material. Esterilizar os frascos com meio de cultura em autoclave a 120°C por 20 min. Após retirar da autoclave, guardar em temperatura ambiente e aguardar por 72 horas para ser utilizado, para verificar se não há nenhuma contaminação.

Anexo 4: Meio Embrapa Sólido

Ingredientes:

Extrato de levedura (1 g), fosfato de potássio monobásico- KH_2PO_4 (1 g), ágar nutritivo (10 g), sais minerais (10 mL/L de meio de cultura) e água destilada (1 L).

Preparo de 1 litro do meio de cultura sólido:

Colocar os ingredientes pesados (extrato de levedura e fosfato de potássio monobásico) em um béquer de 2.000 mL, completar o volume para 1.000 mL de água destilada e adicionar 10 mL de sais minerais. Introduzir uma barra magnética no béquer e homogeneizar no agitador magnético. Ajustar o pH para 7,0+0,2 adicionando NaOH 6M como solução básica ou HCl 6M com solução ácida. Pesar o ágar nutritivo por duas vezes colocando cada uma das 10 gramas pesadas em dois erlenmeyers de 1.000 mL. Transferir 500 mL do meio preparado para cada um dos erlenmeyers com auxílio de proveta de 500 mL e agitar levemente e manualmente até a completa homogeneização do meio com o ágar. Tampar os frascos com rolha de algodão, e cobrir a rolha com papel alumínio ou papel pardo. Fixar o papel com uma liga elástica e colocar uma fita de autoclave com identificação do material. Esterilizar, os frascos com meio de cultura, em autoclave a 120 °C por 20 min.

Os meios de cultura poderão ser distribuídos em placas de Petri assim que forem retirados da autoclave ou dias depois, dentro da capela de fluxo laminar previamente limpa e preparada (20 min na luz UV). Colocar as placas na estufa incubadora empilhadas com tampas voltadas para a superfície da estufa, a temperatura de 28 ± 4 °C por 72 h. Após esse período, deve-se verificar a presença de crescimento microbiano (contaminação). As placas contaminadas devem ser descartadas. Deve-se utilizar apenas as placas que não apresentarem nenhum tipo de contaminação.

Anexo 5: Dieta artificial para lagartas

(rendimento aproximado: 5 litros)

Ingredientes: Feijão carioca* (328,5 g), Levedo de cerveja* (164 g), Agar* (165 g), Água* (5000 mL), Proteína de soja* (263 g), Leite em pó* (416,6 g) Gérmen de trigo* (263 g), Formol** 40% (15 mL), Ácido ascórbico** (15 g), Ácido sórbico** (7,5 g), Nipagin** (12.5 g), solução vitamínica*** (25 mL).

Preparação: colocar os componentes marcados com um asterisco (*), em um bequer. Em seguida, autoclavar estes componentes por 20 minutos a 120 °C sob pressão de 1 atmosfera. Retirar o bequer da autoclave, colocar em capela de fluxo laminar e homogeneizar com uma espátula (que também deverá ter sido previamente autoclavada).

Quando a temperatura destes componentes estiver a 60 °C, adicionar primeiramente os anticontaminantes e conservantes marcados com dois asteriscos (**) misturando-os bem. Por último adicionar a solução vitamínica marcada com 3 asteriscos (***) e misturar bem antes de acondicionar a dieta em bandejas ou caixas plásticas esterilizadas previamente em U.V.

A solução vitamínica é composta por: Ácido ascórbico (12 g), Pantotenato de cálcio (0,30 g), Niacina (0,5 g), Riboflavina (0,08 g), Tiamina HCL (0,04 g), Piridoxina HCL (0,04 g), Ácido fólico (0,08 g) e H₂O destilada e esterilizada (1000 mL).



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE: 15980