



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Maximização da produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* visando o uso como  
bioinsumo agrícola

Maria Eduarda de Sousa Nogueira

Uberlândia – MG

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Maximização da produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* visando o uso como  
bioinsumo agrícola

Maria Eduarda de Sousa Nogueira

Orientador: Prof. Dr. Edgar Silveira Campos  
Coorientador: Dr. Guilherme Nunes Moreira Costa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Maximização da produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* visando o uso como  
bioinsumo agrícola

Maria Eduarda de Sousa Nogueira

Orientador: Prof. Dr. Edgar Silveira Campos  
Instituto de Biotecnologia

Coorientador: Dr. Guilherme Nunes Moreira Costa  
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso de  
Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia – MG  
2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

N778 Nogueira, Maria Eduarda de Sousa, 2001-  
2025 Maximização da produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  
visando o uso como bioinsumo agrícola [recurso eletrônico] / Maria  
Eduarda de Sousa Nogueira. - 2025.

Orientador: Edgar Silveira Campos.  
Coorientador: Guilherme Nunes Moreira Costa.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade  
Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia.  
Modo de acesso: Internet.  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Campos, Edgar Silveira, 1981-, (Orient.). II.  
Costa, Guilherme Nunes Moreira, 1990-, (Coorient.). III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia.  
IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Maximização da produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* visando o uso como  
bioinsumo agrícola

Maria Eduarda de Sousa Nogueira

Aprovado pela Banca Examinadora em: 16 / 05 / 2025      Nota: 95

Uberlândia – MG, 16 de Maio – 2025

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos - (IBTEC/UFU) – Orientador

---

Profa. Dra. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros (FEQUI/UFU) – Examinadora

---

Profa. Dra. Camila Souza Porto - (UFAL/ Unidade Penedo) – Examinadora

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, sobrinhos e avós, pelo estímulo, apoio, incentivo, carinho e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida, por ouvir minhas preces e fazer com que eu pudesse realizar meus sonhos. Obrigada, Nossa Senhora por ser minha intercessora e junto de Seu Filho me abençoarem, me protegerem e me iluminarem.

Aos meus pais, Paulo e Simone, muito obrigada por estarem junto de mim e fazerem o impossível para que o diploma estivesse em minhas mãos.

Aos meus irmãos, Danielle e Paulinho, obrigada por sempre me apoiarem, acreditarem no meu potencial e me incentivarem a buscar o melhor. Aos meus sobrinhos, Catarina e Joaquim, vocês são a razão do meu viver e o motivo para continuar em frente. Aos meus avós, obrigada por sempre me colocarem em suas orações, por compreenderem as ausências e pelo carinho de sempre.

Aos professores que ao longo da graduação contribuíram para minha formação, meus sinceros agradecimentos, vocês ensinaram lições importantíssimas para me formar como biotecnóloga e cidadã. Ao meu orientador Prof. Dr. Edgar, que me auxiliou na realização desse trabalho e sempre teve um carinho especial como professor, muito obrigada. Agradecimento, em especial ao Dr. Guilherme meu coorientador, sem seu auxílio e conselhos esse trabalho seria impossível de ser realizado.

Aos meus colegas de curso e profissão, obrigada pelos momentos que passamos juntos durante o período de graduação. Agradeço as minhas amigas por todo apoio e mesmo com a distância nunca nos distanciamos.

*Tudo quanto fizerdes, por palavra ou por obra, fazei-o em nome do Senhor Jesus, dando por ele graças a Deus Pai."*

Colossenses 3,17



## RESUMO

A produção agrícola vem aumentando expressivamente para acompanhar o crescimento da população mundial e alimentar a todos. Nesse sentido, a Biotecnologia tem ajudado a reduzir o uso dos agrotóxicos, a partir da utilização de bioinsumos. Um exemplo é a bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), estudada neste trabalho, que produz no momento de sua esporulação inclusões proteicas cristalinas conhecidas por  $\delta$ -endotoxinas, que atuam como bactericida e grande estimulante para o desenvolvimento do plantio, principalmente em condições estressantes. Diversos fatores podem influenciar a atividade enzimática e o crescimento dos microrganismos, tais como fonte de carbono e de nitrogênio e suas concentrações, oxigenação do meio de fermentação, temperatura, tempo, variação de pH, agitação e sais presentes no meio. No presente estudo, foram avaliadas alguns desses fatores, sendo assim, as melhores temperaturas para otimização de Btk são as de 28 e 30 °C, e os substratos energéticos mais adequados são sacarose e glicose.

**Palavras-chave:** Temperatura; bioinsumos; meios alternativos.

## ABSTRACT

Agricultural production has been increasing significantly to keep pace with global population growth and feed everyone. In this respect, biotechnology has helped to reduce the use of pesticides using bio-inputs. One example is *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), a Gram-positive bacterium studied in this work. It produces crystalline protein inclusions known as  $\delta$ -endotoxins during sporulation. These act as bactericides and stimulants for crop development, particularly under stressful conditions. The enzymatic activity and growth of microorganisms can be influenced by several factors, such as the concentrations of carbon and nitrogen sources, oxygenation, temperature, time, pH variation, agitation and salts present in the medium. This study evaluated some of these factors and found that the optimal temperatures for Btk are 28 and 30 °C and the most suitable energy substrates are sucrose and glucose.

**Keywords:** Temperature; bio inputs; alternative resources.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Área tratada com bioinsumos (em mi ha) e no Brasil, nas últimas três safras. ....	2
<b>Figura 2</b> - Mercado de bioinsumos comerciais (em Bi R\$) no Brasil, nas últimas três safras..	2
<b>Figura 3</b> – Expectativa no mercado global de bioinsumos em 2032.....	3
<b>Figura 4</b> - Colônia de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt). ....	5
<b>Figura 5</b> – Microscopia eletrônica de varredura de esporos e cristais de <i>Bacillus thuringiensis</i> . ....	6
<b>Figura 6</b> – Representação gráfica das fases de crescimento microbiano.....	9
<b>Figura 7</b> – Representação do funcionamento do espectrofotômetro e leitura da densidade óptica (DO).....	11
<b>Figura 8</b> – Demonstração da conservação por congelamento, usando glicerol como crioprotetor, da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> . ....	15
<b>Figura 9</b> – Preparo do meio principal de cultivo. ....	16
<b>Figura 10</b> – Meios testados com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. ....	17
<b>Figura 11</b> - Pré-inoculação de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	18
<b>Figura 12</b> - Inoculação de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> em meios testes com fontes de carbono e nitrogênio variáveis.....	19
<b>Figura 13</b> - Incubação da cultura bacteriana de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> em shaker com agitação orbital.....	19
<b>Figura 14</b> – Reagente de Biureto. ....	20
<b>Figura 15</b> - Microplaca usada para quantificação de proteínas. ....	22
<b>Figura 16</b> – Meios 9 a 12 com fontes variáveis de carbono e nitrogênio.....	24
<b>Figura 17</b> - Inoculação de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> em meios 9 a 12. ....	24
<b>Figura 18</b> – Meios testes de 1 a 8 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 1º teste em duplicata.....	26
<b>Figura 19</b> – Meios testes de 1 a 8 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 2º teste em duplicata.....	28
<b>Figura 20</b> – Meios testes de 9 a 14 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 1º teste em duplicata. ....	30
<b>Figura 21</b> – Meios testes de 9 a 14 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 2º teste em duplicata. ....	31
<b>Figura 22</b> – Gráfico demonstrativo do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var.	

kurstaki nos meios testes cultivados a 30 °C. ....	32
<b>Figura 23</b> – Gráfico demonstrativo da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> nos meios testes cultivados a 30 °C. ....	33
<b>Figura 24</b> – Gráfico do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> nos meios 9 a 12 cultivados a 28°C. ....	34
<b>Figura 25</b> – Gráfico do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 28°C. ....	34
<b>Figura 26</b> - Gráfico da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 28°C. ....	35
<b>Figura 27</b> – Gráfico da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 28°C. ....	36
<b>Figura 28</b> – Gráfico do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> nos meios 9 a 12 cultivados a 34°C. ....	37
<b>Figura 29</b> – Gráfico do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 34°C. ....	38
<b>Figura 30</b> – Gráfico da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 34°C. ....	39
<b>Figura 31</b> – Gráfico da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 34°C. ....	39
<b>Figura 32</b> – Gráfico comparativo do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 9, tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono. ....	40
<b>Figura 33</b> – Gráfico comparativo do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 10, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.....	41
<b>Figura 34</b> – Gráfico comparativo do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 11, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono.....	42
<b>Figura 35</b> – Gráfico comparativo do crescimento celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 12, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono. ....	42
<b>Figura 36</b> – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 9, tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose	

como fonte de carbono. ....	43
<b>Figura 37</b> – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 10, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono. ....	44
<b>Figura 38</b> – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 11, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono. ....	44
<b>Figura 39</b> – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> no meio 12, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono. ....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Meios testes usados com fontes de nitrogênio e carbono variáveis.....	16
<b>Tabela 2</b> – Meios testes selecionados com variáveis fontes de nitrogênio e carbono. ....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância  
BSA - Albumina sérica bovina  
Bt - *Bacillus thuringiensis*  
Btk - *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*  
CLB - Crop Life Brasil  
Cu - Cobre  
DO - Densidade óptica  
FGV - Fundação Getúlio Vargas  
g - Grama  
g/L - Grama por litro  
L - Litro  
LAPBIO - Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos  
LB - Luria Bertani  
mL - Mililitro  
mg - Miligrama  
mg/mL - Miligrama por mililitro  
NaCl - Cloreto de sódio  
NaOH - Hidróxido de sódio  
nm - Nanômetro  
rpm - Revoluções por minuto  
UFU - Universidade Federal de Uberlândia  
 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  - Micrograma por microlitro  
 $\mu\text{L}$  - Microlitro  
 $\mu\text{m}$  - Micrometro  
 $^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius  
 $\lambda$  - Lâmbda

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Importância dos bioinsumos.....	1
1.2	Uso de bioinsumos no Brasil e no mundo.....	1
1.3	Biotecnologia e o uso de microrganismos na agricultura.....	4
1.4	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	4
1.5	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Btk).....	6
1.6	Métodos de maximização .....	6
1.7	Fatores importantes para o crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	8
1.8	Fases de crescimento microbiano .....	9
1.9	Método de quantificação de crescimento microbiano .....	10
1.10	Método de dosagem de proteínas.....	12
1.11	Desenvolvimento e uso de métodos de produção mais sustentável.....	12
2.	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral .....	13
2.2	Objetivos específicos .....	13
3.	METODOLOGIA.....	14
3.1	Microrganismo.....	14
3.1.1	Manutenção e conservação da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	14
3.2	Meios de cultivo.....	15
3.2.1	Meio Luria Bertani.....	15
3.2.2	Meio de cultivo para produção de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	15
3.2.2.1	Meios testes com variáveis fontes de nitrogênio e carbono.....	16
3.3	Cultivo bacteriano.....	17
3.5	Método de dosagem de proteínas por Biureto .....	20



3.5.1 Preparo do reagente de Biureto .....	20
3.5.2 Curva padrão com proteína albumina sérica bovina (BSA) .....	21
3.5.2.1 Preparação da amostra de BSA a 2 mg/mL .....	21
3.5.2.2 Preparação das amostras da curva padrão.....	21
3.5.2.3 Elaboração da curva padrão para análise .....	21
3.5.3 Quantificação das proteínas nas amostras com o reagente de Biureto .....	21
3.6 Maximização da produção de biomassa e proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sob influência da temperatura .....	22
3.6.1 Meios testes com variáveis fontes de nitrogênio e carbono selecionados para avaliação da influência da temperatura.....	23
3.6.2 Cultivo para maximização da produção de biomassa e proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	23
3.7 Análise estatísticas .....	25
4. RESULTADOS .....	25
4.1 Meios testes 1 a 8 usados com variáveis fontes de nitrogênio e carbono .....	25
4.2 Meios testes 9 a 14 usados com variáveis fontes de nitrogênio e carbono .....	29
4.3 Crescimento celular e dosagem de proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> ....	32
4.3.1 Densidade óptica dos meios a 30°C .....	32
4.3.2 Dosagem de proteínas dos meios a 30°C .....	32
4.4 Maximização da produção de biomassa e proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sob influência da temperatura de 28°C .....	33
4.4.1 Crescimento celular dos meios a 28°C.....	33
4.4.2 Dosagem de proteínas dos meios a 28°C .....	35
4.5 Maximização da produção de biomassa e proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sob influência da temperatura de 34°C .....	37
4.5.1 Crescimento celular dos meios a 34°C.....	37
4.5.2 Dosagem de proteínas dos meios a 34°C .....	38

4.6 Comparação do crescimento celular dos meios testes em relação a temperatura.....	40
4.7 Comparação da dosagem de proteínas dos meios testes em relação a temperatura.....	43
5. DISCUSSÃO .....	45
6. CONCLUSÃO.....	49
7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Importância dos bioinsumos**

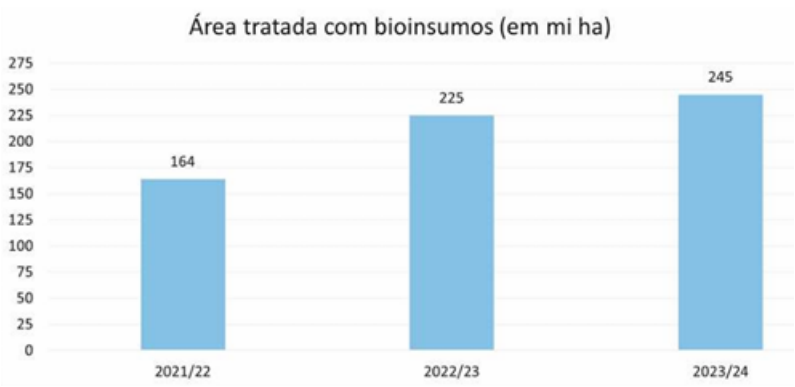
Com o crescimento da população mundial, a expansão agrícola vem aumentando expressivamente sua produção para poder alimentar toda comunidade. No entanto, para que seja possível controlar insetos em desequilíbrio ecológico, melhorar o crescimento das plantações e multiplicar a produção, são usados agrotóxicos, porém esses podem acarretar, direta ou indiretamente, em problemas maiores que vão desde o âmbito ecossistêmico até a saúde. Devido ao uso excessivo de pesticidas e herbicidas químicos, os solos para agricultura tornam-se inférteis, portanto, reduzem a produtividade e, conseqüentemente, podem contaminar as águas superficiais e os aquíferos. Logo, as conseqüências abrangem a contaminação dos solos e recursos hídricos, posteriormente, tais riquezas naturais são usadas pela sociedade, que também sofrem com os efeitos dos agroquímicos (Antar *et al.*, 2021; Monnerat *et al.*, 2018).

Ressalta-se que, o uso de inseticidas pode causar outro problema, o surgimento de insetos resistentes ao produto devido ao uso excessivo do mesmo, isto é, uma característica genética dos insetos é alterada através da seleção de genes que conferem resistência. O emprego de inseticidas a base de material biológico tem sido recomendado para diminuir os riscos de problemas ambientais e da saúde, e principalmente, em função do surgimento de resistência. Por isso, o uso de bioinseticidas vem sendo ampliado para controle a ataques de insetos, ao invés de produtos químicos (Silva, 2007). Os bioinsumos são mais seguros, uma vez que apresentam menor toxicidade, preservando as pessoas e organismos não alvo de maiores conseqüências. Além disso, os produtos biológicos são formados por compostos orgânicos, logo se decompõe mais rápido, reduzindo a poluição do solo e água. Ainda, os bioinsumos podem melhorar a saúde do solo, aumentando a atividade microbiana, e conseqüentemente, melhorando a saúde do solo e sua biodiversidade.

### **1.2 Uso de bioinsumos no Brasil e no mundo**

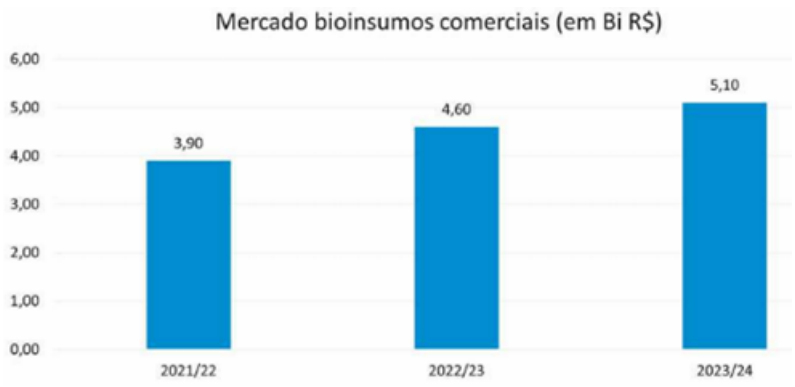
Um estudo realizado pela Fundação Getúlio Vargas (FGV) Agro mostra uma expansão de 50% da área cultivada com bioinsumos no Brasil entre as safras 2021/22 e 2023/24, demonstrado na Figura 1. A expansão desse mercado registrou R\$ 5 bilhões em vendas na safra 2023/24, de acordo com dados da CropLife Brasil (CLB) (Figura 2). Além do

crescimento econômico do setor, ressalta-se a importância da sinergia entre os bioinsumos e outras tecnologias agrícolas que garantem o aumento da eficiência e produtividade no campo. Os benefícios ambientais, como melhoria da qualidade do solo e promoção da biodiversidade, também são apontados como grandes diferenciais desse produto. No entanto, mesmo com o aumento do uso de bioprodutos, o setor enfrenta desafios significativos como capacitação técnica e a necessidade de investimentos em pesquisa e desenvolvimento (FGV; CLB, 2024).



**Figura 1** - Área tratada com bioinsumos (em mi ha) e no Brasil, nas últimas três safras.

**Fonte:** FGV; CLB, 2024.



**Figura 2** - Mercado de bioinsumos comerciais (em Bi R\$) no Brasil, nas últimas três safras

**Fonte:** FGV; CLB, 2024.

O Brasil está avançando nos investimentos em desenvolvimento de bioinsumos, porém continua atrás de países como, Estados Unidos, China e Coreia do Sul no número de patentes e inovações biotecnológicas no setor. Em 2023, segundo a CropLife, o valor do mercado mundial de insumos biológicos para a agricultura foi estimado entre US\$ 13 bilhões e US\$ 15 bilhões

(FGV; CLB, 2024). Nos próximos oito anos, com investimentos em pesquisas, o valor do mercado de bioinsumos no mundo pode chegar a US\$ 45 bilhões, uma projeção que, se confirmada, representará uma taxa de crescimento anual de 13% a 14% deste ano até 2032 (Figura 3).



**Figura 3** – Expectativa no mercado global de bioinsumos em 2032.

**Fonte:** CORTEVA Agriscience, 2025.

O Brasil ainda não é um grande produtor de Bt devido ao elevado custo de produção, a concorrência com os produtos químicos e a escassez de incentivo ao desenvolvimento de formulações e novos produtos. A conscientização do produtor perante o uso de bioinsumos consiste em um dos principais desafios apresentados para sucesso da alternativa ecologicamente correta (Pereira; Martins, 2016). O desenvolvimento de bioinsumos nacionais, adequados ao combate de realidades regionais, traz resultados mais eficazes, pois se desenvolvem soluções mais adaptadas às características da agricultura brasileira. Além disso, o uso de microrganismos e recursos biológicos nativos, exploram o potencial da rica biodiversidade brasileira de forma sustentável. Portanto, medidas de incentivo por parte dos órgãos governamentais e o interesse da iniciativa privada, com a parceria público-privada, devem ser intensificadas para o desenvolvimento de novas tecnologias e da produção comercial ampliando a disponibilidade e uso desses produtos no mercado interno (Figueiredo; Burity; Oliveira; Santos; Stamford, 2010).

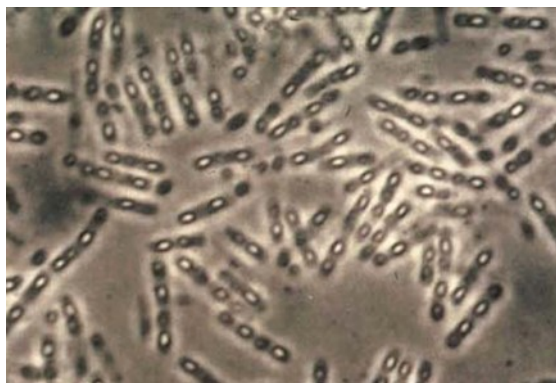
### 1.3 Biotecnologia e o uso de microrganismos na agricultura

Nesse sentido, a Biotecnologia tem ajudado de forma expressiva a melhorar a eficiência da agricultura, visto que os novos mecanismos propiciam a redução de uso de fertilizantes, e aumento da utilização de bioinsumos, produtos de origem biológica, usados para o controle de insetos em desequilíbrio ambiental. Esses avanços na área agrícola também ajudam na conservação dos recursos, uma vez que diminuem o uso dos recursos naturais, como a redução de aplicação de água, e igualmente na redução de danos ao ecossistema (Lima, 2010; Monnerat *et al.*, 2018). Em adição, o uso de microrganismos pode auxiliar na fertilidade do solo, pois bactérias, fungos e vírus possuem atividades biológicas que beneficiam as propriedades físicas e químicas das terras de produção.

Os microrganismos têm grande potencial para combater problemas fitossanitários, como os nematoides, assim permitem que a produção agrícola tenha maior rendimento em razão do melhor desenvolvimento das plantações. Os biofertilizantes são uma tecnologia com vários benefícios que vão desde a proteção da planta contra patógenos, até o aumento da produtividade. Destaca-se que, é de suma importância estudar e entender a inter-relação entre as propriedades das plantas e as atividades biológicas dos microrganismos, visto que são pontos cruciais para garantir uma boa prática agrônômica. Logo, as características dos nematoides que atacam as plantações, influenciam no desenvolvimento das culturas (Antar *et al.*, 2021; Harnpicharnchai *et al.*, 2016; Silva, 2007).

### 1.4 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Dentre os produtos para controle biológico de insetos, destacam-se os que têm a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Figura 4), como princípio ativo. A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi isolada em 1901, no Japão, e descobriu-se que ela é capaz de matar as larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Mas, apenas em 1911, que esta bactéria foi nomeada como *Bacillus thuringiensis*, em homenagem ao estado de Thüringen, na Alemanha, onde foi isolado este mesmo microrganismo em lagartas. A partir dos anos 60, os trabalhos de isolamento de Bt se intensificaram, e foi descoberto que existiam 40.000 estirpes conhecidas, entre estas, algumas são tóxicas a nematoides, trematoides, protozoários, himenópteros, homópteros, ortópteros e ácaros (Lima, 2010; Monnerat *et al.*, 2018; Silva, 2007).



**Figura 4** - Colônia de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

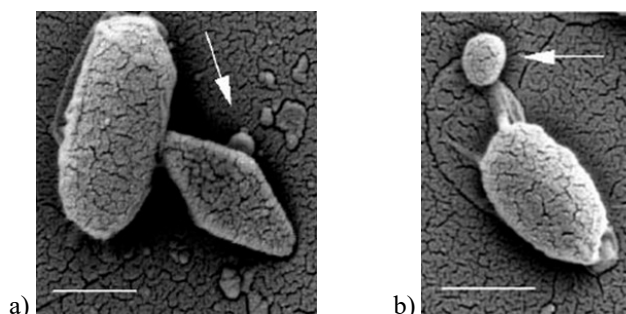
**Fonte:** Silva, 2007.

Devido às características biológicas, a Bt destacou-se como a principal bactéria utilizada no controle biológico, uma vez que protegem as plantas contra pragas e doenças ao inibir o crescimento de fungos e bactérias patogênicas. Ainda, os *Bacillus* estimulam o desenvolvimento radicular e melhoram a absorção de nutrientes, como também, melhoram a tolerância dos vegetais a condições adversas. Este gênero tem permitido reduzir efetivamente os danos causados por insetos, pragas e, conseqüentemente, redução do uso de produtos químicos, sem causar danos aos inimigos naturais e demais seres presentes no meio ambiente. Por isso, esses microrganismos são bactérias benéficas para a agricultura, pois possuem efeitos positivos no crescimento das plantas e na saúde do solo (Pereira; Martins, 2016).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizada como bioinseticidas para as lagartas de diferentes culturas como soja, milho, algodão, tomate, brássicas, frutas, etc, há mais de 30 anos. A Bt tem grande importância agrícola em nosso país, cerca de 30 pragas e mosquitos vetores de doenças são controlados por essa bactéria (Silva, 2007). Logo, motiva-se utilizá-la como nematocida, assim, sendo necessário desenvolver estudos para conhecer a relação da bactéria e às interações com pragas agrícolas. Nos últimos dez anos está acontecendo no Brasil a chamada produção “on farm”, quando os produtores rurais fabricam, em suas próprias fazendas, caldos fermentados contendo *Bacillus thuringiensis* e os aplicam nas lavouras para combater os patógenos (Li *et al.*, 2022; Monnerat *et al.*, 2018).

### 1.5 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk)

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) é uma bactéria Gram-positiva, da família *Bacillaceae*. Este é um microrganismo aeróbico facultativo que produz no momento de sua esporulação inclusões proteicas cristalinas conhecidas por  $\delta$ -endotoxinas, ou proteína Cry (Figura 5). Essas moléculas são importantes para atuação como bactericida, ou até mesmo, como fator de defesa a insetos suscetíveis. Insta salientar que, estas toxinas não são poluentes ao meio ambiente por serem completamente biodegradáveis, e não apresentam toxicidade às plantas. Este microrganismo é um grande estimulante para o desenvolvimento do plantio, principalmente em condições estressantes, que afetam a produção de biomassa. Outro ponto relevante de Btk para as plantas é devido ao seu efeito inibitório contra patógenos, por exemplo os nematoides, uma vez combatidos propicia-se que as culturas se tornem mais fortes e saudáveis. Por conseguinte, aumenta-se a resistência ao patógeno e beneficiando o crescimento da planta. O uso de inóculos da bactéria tem se mostrado como uma técnica positiva e promissora para melhorar o rendimento da produção agrícola e, também, reduzir os gastos com inseticidas e fertilizantes químicos, que são prejudiciais para o meio ambiente (Antar *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Lima, 2010; Monnerat *et al.*, 2018).



Barras: 1  $\mu$ m.

**Figura 5** – Microscopia eletrônica de varredura de esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis*.

a) cristais com formato bipiramidal; b) cristais com formato esférico.

**Fonte:** Silva, 2007.

### 1.6 Métodos de maximização

Quanto aos mecanismos de otimização, um método estudado e utilizado para otimizar o uso



de microrganismos, pode-se citar a utilização de meios alternativos de cultivo de bactérias e em diversas concentrações (Pereira; Martins, 2016). Os meios de cultivo empregados para a produção de endotoxinas de Btk são geralmente compostos por uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais. Este microrganismo possui a capacidade de metabolizar diferentes substratos energéticos fazendo com que seja possível utilizar diversas matérias primas sejam sintéticas, naturais ou resíduos agrícolas (Rocha, 2017). Diante disso, o uso dessas fontes de nutrientes, principalmente a utilização de materiais naturais ou residuais, para a formulação de meios de fermentação podem ser favoráveis devido ao baixo custo para o processo. Consequentemente, reduz-se os gastos e beneficia o meio ambiente com o uso de substratos alternativos. Sendo assim, a utilização de meios alternativos como fonte de nutriente para o crescimento desta bactéria, pode ser uma forma econômica para a produção de biopesticida (Baptista, 2024; Panarotto, 2006; Vieira *et al.*, 2006).

O Bt pode ser cultivado usando meios alternativos ou subprodutos da indústria e da agricultura, por isso para o crescimento desse microrganismo podem ser usadas várias fontes de carbono que são resíduos agrícolas ou industriais, tais como glucose de milho, melaço de cana, melaço de beterraba, farinha de trigo, água de batata, sacarose e amido de alguns cereais. Como fonte de nitrogênio, podem ser usadas farinha de soja, extrato de soja, peptona, extrato de levedura e água de maceração de milho. Os sais inorgânicos essenciais são cálcio, zinco, manganês e magnésio (Fernanda; Oliveira; Bezerra, 2020; Valicente, 2008). Desse modo, a composição química influencia no desenvolvimento dos meios de cultivo, pois a presença de nutrientes, em concentrações relevantes, é um fator importante, para que não ocorra inibição de crescimento (Dantas, 2020). Posto isso, os produtos agroindustriais são fontes alternativas de nutrientes, disponíveis com facilidade e possuem baixo custo, logo, são amplamente utilizados em bioprocessos (Baptista, 2024).

Resultados de pesquisa têm mostrado que *Bacillus thuringiensis* pode ser produzido em meios alternativos, resíduos da indústria e com materiais de baixo custo. O uso de um meio formulado com bioprodutos agroindustriais, utilizando resíduos e matérias primas naturais acarreta em decréscimo no custo do meio, uma vez que o custo do processo ainda é alto (Panarotto, 2006). A grande vantagem destes sistemas de produção é que este bioinsumo pode ser usado tanto por pequenos como por médios e grandes produtores rurais. Alguns métodos de produção do Bt podem ser realizados dentro da própria fazenda; para isto, basta obter a cepa de Bt específica conservada em ambiente estéril (Valicente, 2008).

Os fatores que influenciam a síntese de proteínas Cry e crescimento de microrganismos do gênero *Bacillus* dependem da natureza do substrato, da concentração de íons (nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês) presentes na composição do meio de cultura e das condições ambientais (Rocha, 2017). A metodologia de uso de diferentes fontes de carbono e nitrogênio intensifica a produção dos metabólitos dos microrganismos, além de possibilitar a avaliação simultânea do efeito da junção de diversos fatores e encontrar o valor ideal para obter bons resultados. Posto isso, diversos fatores podem influenciar a atividade enzimática e o crescimento do microrganismo, tais como a fonte de carbono e de nitrogênio, bem como suas concentrações, oxigenação do meio de fermentação, temperatura, variação de pH e sais presentes no meio. Dessa forma, essas condições de crescimento como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e agitação também afetam a produção de bioinsumos, dado o seu efeito sobre o crescimento e atividades celulares (Mantovan *et al.*, 2013).

### **1.7 Fatores importantes para o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

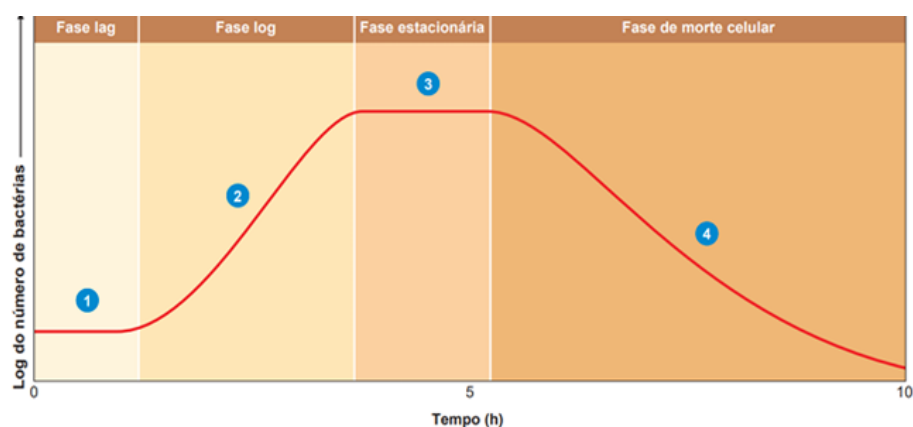
*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cresce na faixa de temperatura mesofílica entre 25 e 37°C e apresenta colônias com características morfológicas bastante variadas, essa diferenciação ocorre em decorrência da composição do meio no qual o microrganismo está se desenvolvendo (Rocha, 2017). Desse modo, a metodologia de maximizar a produção de proteínas e crescimento microbiano a partir da variação da temperatura é uma técnica muito utilizada para otimizar as condições necessárias para os microrganismos produzirem seus metabólitos que são usados nas mais diversas áreas, tais como antibióticos, biosurfactantes e bioinsumos. Logo, este método é empregado em experimentos para otimizar as condições indispensáveis do meio para a fermentação eficiente e produção do item desejado, sendo assim uma maneira eficaz de otimização (Latha; Sivaranjani; Dhanasekaran, 2017). De acordo com Pereira; Martins (2016) a fermentação deve ser conduzida em temperaturas entre 28 e 34°C. E o tempo de processo, dependendo das condições pode demorar de 24 a 72 horas. O crescimento de Btk em sua maioria ocorre na faixa ótima de pH entre 6,5 e 7,5 (Silva, 2007).

A fermentação microbiana é de suma importância para a produção de produtos usados nas mais diversas áreas. Destaca-se que, o rendimento desses está relacionado a parâmetros essenciais, como nutrientes, aeração, agitação, pH, temperatura, período de incubação do inóculo, dentre outros. Sendo assim, a otimização é necessária para favorecer os fatores que são

inevitáveis para aumentar a produção de biomassa na fermentação, do mesmo modo para ampliar o rendimento econômico dos produtos. Por isso, a técnica de variar a temperatura, e medir a densidade óptica e a dosagem de proteínas a cada 12 horas proporciona avaliar a relação entre os fatores, temperatura, nutrientes e tempo. As fases de crescimento acompanham as condições do meio, onde a quantidade de nutrientes diminui e de produtos do metabolismo aumentam com o passar do tempo. Essas modificações influenciam no comportamento e no ajuste das novas condições para o crescimento (Dantas, 2020). Dessa forma, este método é muito usado por pesquisadores para otimizar bioprocessos e analisar processos de fermentação. Tal metodologia não só analisa a relação entre os fatores, mas também investiga a influência e interação entre eles. Evidencia-se que este método é uma ferramenta que se alia ao bom rendimento e a qualidade do produto, além de minimizar a exposição do microrganismo ao estresse metabólico (Latha; Sivaranjani; Dhanasekaran, 2017).

### 1.8 Fases de crescimento microbiano

Fermentações bacterianas apresentam um crescimento linear ao longo do tempo, visto isso, a avaliação do crescimento microbiano a cada 12 horas propicia analisar mais detalhadamente o comportamento do microrganismo a cada fase. O crescimento microbiano é dividido em quatro fases: fase lag (1), log (2), estacionária (3) e de morte (4), que podem ser representadas graficamente em função do tempo exemplificado na Figura 6.



**Figura 6** – Representação gráfica das fases de crescimento microbiano.

**Fonte:** Tortora; Funke; Case, 2012.

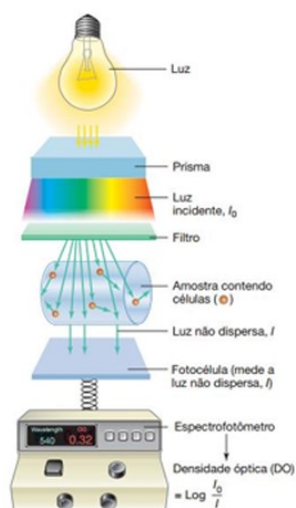
A fase lag é uma fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura, por isso não há crescimento significativo no número de células, porém há uma grande atividade metabólica envolvendo principalmente a síntese de enzimas e de moléculas necessárias para a divisão celular. A fase log é a fase em que ocorre um aumento exponencial no número de células, devido ao fato das bactérias se reproduzirem por divisão binária. A reprodução celular é mais ativa nesse período e o tempo de geração atinge um valor constante, logo, a representação logarítmica da fase log gera uma linha reta. Nesta fase ocorre a maior taxa de conversão de substrato em produto, conseqüentemente, o meio de cultura deixa de possuir um aspecto translúcido e se torna mais turvo, devido ao crescimento microbiano (Tortora; Funke; Case, 2012).

Na fase estacionária observa-se um equilíbrio do número de células formadas e de células mortas, fazendo com que a população microbiana se mantenha constante nesta etapa. Esgotamento de nutrientes e de O<sub>2</sub>, acúmulo de resíduos e mudanças de pH danosas à célula são as principais causas da redução na taxa de crescimento, onde a quantidade torna-se insuficiente para a população microbiana existente, afetando, assim, a velocidade de crescimento (Dantas, 2020). O início da fase estacionária coincide com o início da esporulação (Serrano *et al.*, 2001). Os endósporos são formados quando os nutrientes essenciais do meio de cultura se esgotam, e consistem em uma estrutura metabolicamente dormente e altamente resistente a diversos estresses ambientais, como falta de nutrientes, extremos de temperatura e pH e agentes químicos. A esporulação é um processo complexo e que requer da célula grande quantidade de energia e várias horas para ser completado (Bernardes, 2024). Em uma fermentação quando o número de células mortas ultrapassa o número de células formadas, a população entra na fase de morte, ou seja, ocorre uma redução na população microbiana (Tortora; Funke; Case, 2012).

### **1.9 Método de quantificação de crescimento microbiano**

Para analisar a qualidade do produto biológico e determinar a cinética de crescimento do microrganismo, deve-se fazer a quantificação através da turbidimetria, pois é de suma importância para verificar se a fermentação foi realmente efetiva. Sendo assim, para quantificar a *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* pode-se realizar o método indireto que mede a quantidade de massa bacteriana, em espectrofotômetro, através da absorbância que corresponde a luz

absorvida pelo meio. Os detectores ópticos como espectrofotômetros, relacionam a variação da intensidade do feixe de luz incidente com a solução em análise, onde a quantidade de luz absorvida é proporcional a concentração da amostra. Com progresso de um processo fermentativo, o meio de cultura, que no início se encontra translúcido tende a se tornar turvo à medida que as células se multiplicam. Quanto mais turvo estiver o meio de cultivo, menos luz atingirá o detector do equipamento, que ao final fornece um valor de absorbância (abs) ou densidade óptica (DO), que corresponde a quantidade de luz absorvida pela amostra. Os espectrofotômetros possibilitam a seleção do comprimento de onda ( $\lambda$ , lâmbda) de acordo com o componente em análise. Ressalta-se que, no caso de microrganismos a faixa está entre 590 a 600 nm (Dantas, 2020; Tortora; Funke; Case, 2012). O esquema de funcionamento do espectrofotômetro e leitura da densidade óptica (DO) está demonstrado na Figura 7.



**Figura 7** – Representação do funcionamento do espectrofotômetro e leitura da densidade óptica (DO).

**Fonte:** Mandigan *et al.*, 2016.

No entanto, por se tratar de um método quantitativo indireto, a leitura da absorbância de uma amostra não permite distinguir a contagem de microrganismos contaminantes, das células do microrganismo desejado. Além disso, o tamanho e forma das partículas, índice de refração, composição dos meios e a viscosidade da amostra podem interferir na leitura da DO (Bernardes, 2024).

### **1.10 Método de dosagem de proteínas**

Para dosar-se a quantidade de proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas produzida pela Btk pode-se realizar o método de Biureto. Este método foi inicialmente proposto por Autenrieth, em 1915, contudo, posteriormente diversos autores propuseram modificações do mesmo, isto posto, a proposta metodológica de Gornall, *et al.* (1949) atualmente é a mais utilizada. O método se baseia na reação do reativo do Biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio, com um complexante que estabiliza o cobre em solução, como o tartarato de sódio. A reação do íon  $\text{Cu}^{2+}$  com proteínas em meio alcalino, originam uma solução de cor azul, que é capaz de absorver luz a 540 nm. Os métodos de dosagem de proteínas usam reagentes químicos, que, ao interagir com elas, formam complexos coloridos, sendo a intensidade da cor diretamente proporcional à concentração da proteína. A intensidade da cor de uma solução é medida por meio da espectrofotometria, técnica pela qual a absorção ou transmissão da luz de dado comprimento de onda ( $\lambda$ , lâmbda), incidindo sobre a solução, é medida. Para a determinação da concentração de proteína solúvel por meio da espectrofotometria, consiste em lançar em uma curva-padrão de proteína a absorbância lida no espectrofotômetro para a amostra. Comumente, usa-se como proteína-padrão a albumina sérica bovina (BSA), cuja solução tem concentração compatível com a faixa de leitura do método empregado. Ressalta-se que, o método de Biureto normalmente é aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: soro ou plasma sanguíneo, líquido cérebro espinhal, urina, alimentos, saliva, fibrinogênio e tecido animal (Zaia; Zaia; Lichtig, 1998).

### **1.11 Desenvolvimento e uso de métodos de produção mais sustentável**

Faz-se necessário o desenvolvimento e uso de métodos de produção mais sustentável, para que seja possível ter uma economia mais verde. Essas tecnologias verdes são estratégias fundamentais para aumentar a produção e diminuir os efeitos ambientais indesejados. Desse modo, o uso de biomassas associadas aos microrganismos são boas formas para otimizar a prática de produção agrícola, uma vez que essa abordagem tem grande potencial para melhorar o rendimento das plantações, e conseqüentemente, ser capaz de alimentar toda a população mundial de forma sustentável. A técnica usando microrganismos tem mostrado grande potencial de expansão, visto que auxiliam no crescimento das plantas mesmo em condições adversas. Lamentavelmente, esse cenário estressante está cada vez mais presente devido as

mudanças ambientais e climáticas. Portanto, a utilização comercial de microrganismos nas culturas é benéfica para produzir mais e de uma forma mais sustentável, fortalecendo assim a bioeconomia agrícola (Antar *et al.*, 2021; Dilokpimol *et al.*, 2020).

As técnicas com uso de microrganismos são mecanismos eficazes para estimular o crescimento e aumentar a produção na agricultura, a melhoria da atividade dos microrganismos, ou seja, sua otimização pode ser uma estratégia eficiente para expandir significativamente o rendimento da cultura. Assim, o uso dos microrganismos e suas enzimas são uma forma dos agricultores obterem mais lucros, visto que se obtém uma produção agrícola maior, bem como reduzir os custos com processos ou procedimentos que possuem um valor econômico mais alto, e que podem até mesmo trazer problemas ambientais (Antar *et al.*, 2021). A hipótese do trabalho é maximizar a produção de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* que permitirá a aplicação nas culturas o bioinsumo. Logo, a otimização de Btk aumentará a produtividade, e assim, produzir um cultivo mais sustentável.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Maximizar a produção de biomassa e proteína Cry ou  $\delta$ -endotoxinas obtidas de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Btk).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar o crescimento de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* em meios com variáveis fontes de nitrogênio e carbono;
- Geração logarítmica da biomassa produzida por *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* em meios com variáveis fontes de nitrogênio e carbono;
- Produção de proteína Cry ou  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* em meios com variáveis fontes de nitrogênio e carbono;

- Caracterizar a curva de crescimento de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* em relação ao tempo e temperatura;
- Selecionar o melhor meio de cultura para produção de proteína Cry e biomassa produzida por *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*;
- Determinar as condições ideais de fermentação para máxima produção de biomassa e proteína Cry produzida por *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*.

### 3. METODOLOGIA

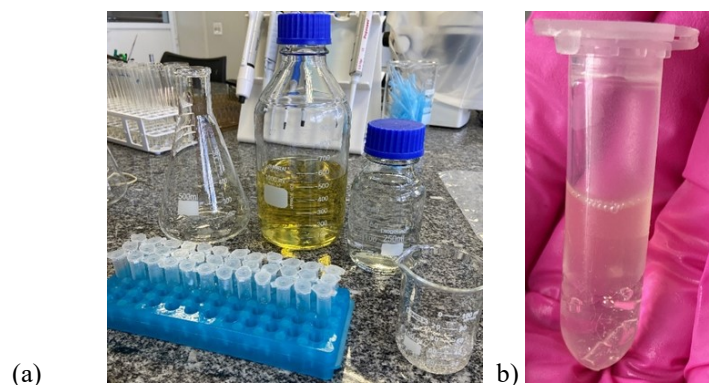
#### 3.1 Microrganismo

Para se desenvolver o projeto foram utilizadas cepas de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Btk) disponibilizadas pela biofábrica da empresa Prime Agro, propriedade privada, localizada no município de Uberlândia- MG. Ademais, o processo de trabalho de desenvolvimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos – LAPBIO, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, bloco 6Z, no campus Umuarama, na cidade de Uberlândia – MG.

##### 3.1.1 Manutenção e conservação da cultura de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*

Para a preparação do inóculo, foram usados papéis fixados com a cultura de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* fornecida pela empresa citada. As cepas usadas neste estudo foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio. Para crescimento das células os frascos foram submetidos a agitação por 48 horas a 150 rpm, em agitador orbital (Ion KLD-350). Após esse período, realizou-se a conservação dos microrganismos utilizando miçangas e glicerol, como crioprotetor, tal passo está representado na Figura 8. Assim, após esse passo as amostras foram devidamente conservadas a -20 °C, onde permaneceram até o período do procedimento (Silva, 2007; Singh *et al.*, 2015).





**Figura 8** – Demonstração da conservação por congelamento, usando glicerol como crioprotetor, da cultura de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*.

(a) materiais usados para conservação de Btk; (b) microtubo com cultura de Btk miçangas e glicerol para conservação da bactéria.

**Fonte:** Autoria própria, 2024.

## 3.2 Meios de cultivo

### 3.2.1 Meio Luria Bertani

Foram utilizadas as seguintes massas para produzir-se um litro do meio para o crescimento bacteriano, 10 g de bacteriológica peptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl.

A seguir, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 21 minutos.

### 3.2.2 Meio de cultivo para produção de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*

Para maximização da produção de biomassa de Btk, usaram-se 1 g de sulfato de amônia, 1 g de fosfato de potássio monobásico, 0,3 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,01 g de sulfato de manganês monohidratado, 0,1 g de cloreto de cálcio, 0,01 g de sulfato de ferro e 0,01 g de sulfato de zinco, para produzir-se um litro do meio. A Figura 9 demonstra o preparo deste meio.



**Figura 9** – Preparo do meio principal de cultivo.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### 3.2.2.1 Meios testes com variáveis fontes de nitrogênio e carbono

A seguir serão apresentadas as diversas fontes de nitrogênio e carbono que foram testadas.

**Tabela 1** – Meios testes usados com fontes de nitrogênio e carbono variáveis.

	<b>Fonte de nitrogênio (2 g/L)</b>	<b>Fonte de carbono (8 g/L)</b>
<b>Meio 1</b>	Nitrato de amônio	Glicose
<b>Meio 2</b>	Sulfato de amônio	Glicose
<b>Meio 3</b>	Peptona	Glicose
<b>Meio 4</b>	Extrato de levedura	Glicose
<b>Meio 5</b>	Nitrato de amônio	Acetato de sódio
<b>Meio 6</b>	Nitrato de amônio	Citrato de sódio
<b>Meio 7</b>	Nitrato de amônio	Extrato de levedura
<b>Meio 8</b>	Nitrato de amônio	Peptona
<b>Meio 9</b>	Farinha de soja	Glicose
<b>Meio 10</b>	Nitrato de amônio	Glicose
<b>Meio 11</b>	Nitrato de amônio	Sacarose
<b>Meio 12</b>	Nitrato de amônio	Melaço de cana
<b>Meio 13</b>	Nitrato de amônio	Farinha de trigo
<b>Meio 14</b>	Nitrato de amônio	Lavagem de batata

Após preparar o meio de cultivo para produção de Btk cada um dos meios testes tiveram a adição de fontes de carbono e nitrogênio em variáveis substâncias, exemplificado na tabela 1. Com o fim do preparo, cada um dos meios testes foram devidamente esterilizados em autoclave a 121°C por 21 minutos. A Figura 10 é a exemplificação dos meios testes com concentrações variáveis de carbono e nitrogênio.



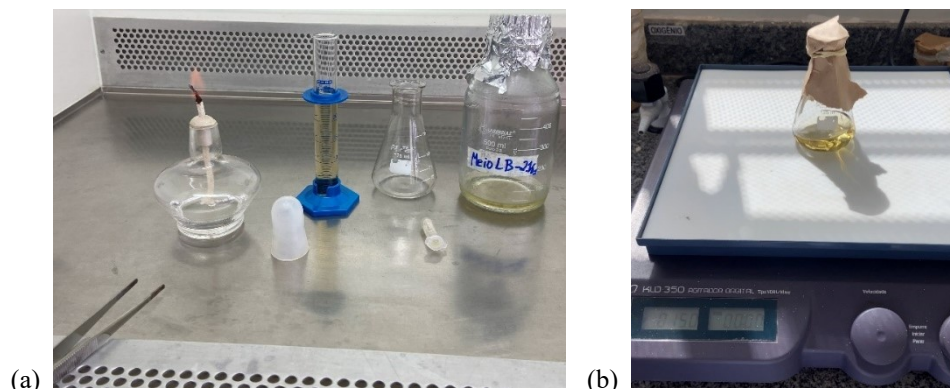
**Figura 10** – Meios testados com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

(a) meios de 1 a 8, usados para teste; (b) meios de 9 a 14, usados para teste.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### 3.3 Cultivo bacteriano

O *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foi utilizado como pré-inóculo a partir de sua reativação no meio LB, colocando uma miçanga em um Erlenmeyer de 100 mL, adicionando 25 mL de meio e levando para agitação por 48 horas a 150 rpm, em agitador orbital (Ion KLD-350), como ilustrado na Figura 11.



**Figura 11** - Pré-inoculação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

(a) preparo do pré-inóculo de Btk em fluxo laminar; (b) pré-inóculo de Btk em agitação, para reativação do mesmo.

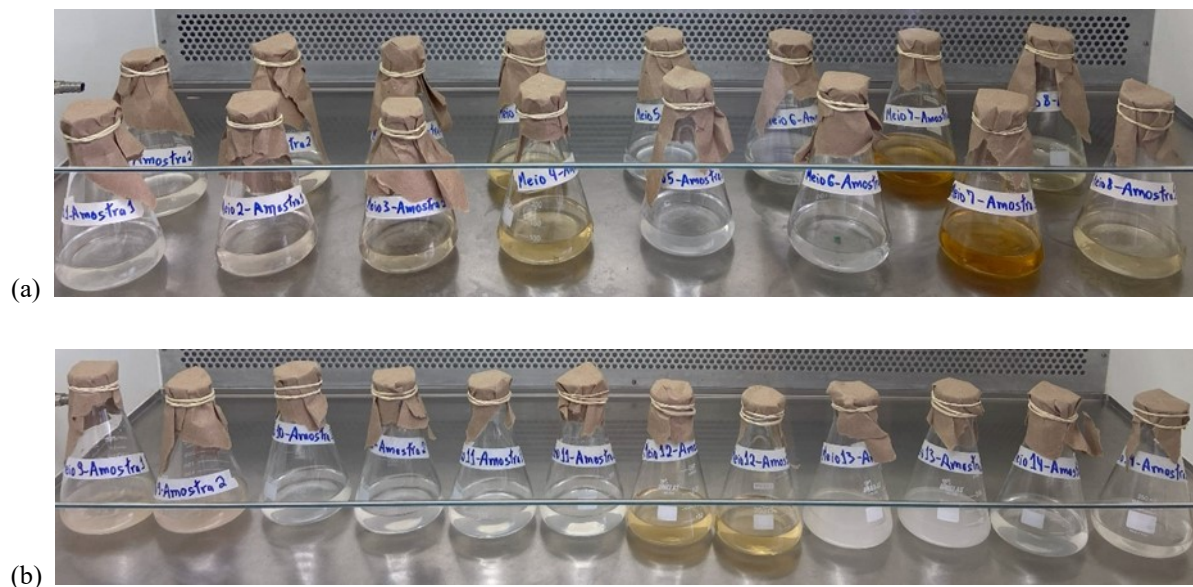
**Fonte:** Autoria própria, 2024.

Com o fim desse período foi medida a densidade óptica (DO) da cultura reativada em espectrofotômetro a partir da absorbância a 600 nm. Dessa forma, pode-se obter a quantidade de cultura utilizada para poder inocular os meios de maximização. Primeiramente, zerou-se o equipamento com 3 mL de água destilada, em segundo, adicionou-se 3 mL de meio LB para ser o branco. Por último, colocou-se 3 mL do pré-inóculo de Btk para se obter a DO desta amostra.

Em seguida, os meios de maximização com as variáveis fontes de nitrogênio e carbono, em duplicata, com 75 mL em cada Erlenmeyer de 250 mL, tiveram a inoculação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de acordo com a quantidade obtida pela DO encontrada. Na Figura 12 pode-se observar os meios inoculados com Btk.

Em seguida, a cultura bacteriana foi colocada em incubadora shaker com agitação orbital (MA 410 CFT - MARCONI) na temperatura de 30°C a agitação de 150 rpm por 72 horas para crescimento, representada na Figura 13. O shaker proporciona a agitação contínua do cultivo para distribuição mais eficiente dos nutrientes, assim como o controle da temperatura, promovendo o crescimento adequado dos microrganismos.





**Figura 12** - Inoculação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meios testes com fontes de carbono e nitrogênio variáveis.

(a) meios de 1 a 8 inoculados com Btk; (b) meios de 9 a 14 inoculados com Btk.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.



**Figura 13** - Incubação da cultura bacteriana de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em shaker com agitação orbital.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### 3.4 Método para análise de densidade óptica e dosagem de proteínas

Ao final do período de fermentação, mediu-se a densidade óptica dos meios testes, em espectrofotômetro a partir da absorbância a 600 nm, para analisar qual deles produziu maior biomassa de Btk. Para isso, foi feita a comparação da DO dos meios testes, sem inoculação, com a DO de cada tratamento após a fermentação. Com essa análise verifica se a maximização dos meios realmente foi efetiva.

Por fim, para análise dos meios testes de acordo com a produção de proteínas, principalmente, a proteína Cry ou  $\delta$ -endotoxinas produzida pela Btk, centrifugou-se 2 mL dos tratamentos por 15 minutos a 4000 rpm. Após esse procedimento, dosou-se a quantidade de proteínas totais realizando-se o teste de Biureto.

### 3.5 Método de dosagem de proteínas por Biureto

#### 3.5.1 Preparo do reagente de Biureto

Para preparar o reagente de Biureto dissolveu-se 1,5 g de sulfato de cobre e 6g de tartarato duplo de sódio e potássio em 500 mL de água destilada. Adicionou-se, sob agitação constante, 300 mL de solução de NaOH 10%, em seguida, adicionou-se 1g de iodeto de potássio. Por fim, completou o volume da solução para 1L com água destilada, filtrou-se e guardou o reagente em frasco âmbar longe da luz. O reagente de Biureto preparado é representado na Figura 14.



**Figura 14** – Reagente de Biureto.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### **3.5.2 Curva padrão com proteína albumina sérica bovina (BSA)**

A curva padrão permite determinar quantitativamente a propriedade de uma amostra desconhecida a partir do uso de concentração conhecida de BSA que será submetida à reações colorimétricas específicas, lendo-se a absorbância a 540 nm. A curva padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância e de concentração, assim é possível calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração.

#### **3.5.2.1 Preparação da amostra de BSA a 2 mg/mL**

Pesou-se 12 mg de BSA e solubilizou-se em 6 mL de água destilada, esta solução é considerada a solução mãe.

#### **3.5.2.2 Preparação das amostras da curva padrão**

Os pontos da curva padrão preparados na concentração de 2 mg/mL, variam de 0 a 1,4 µg/µL.

#### **3.5.2.3 Elaboração da curva padrão para análise**

Pipetou-se 200 µL de cada microtubo com a concentração específica de BSA previamente preparada, e adicionou-se 800 µL do reagente de Biureto, homogeneizou-se em vórtex e deixou-se a solução em repouso por 15 minutos. Por fim, com o fim deste período, pipetou-se 300 µL na microplaca, em duplicata, e fez-se a leitura da reação na leitora de microplaca (VERSA max - tunable) a 540 nm.

### **3.5.3 Quantificação das proteínas nas amostras com o reagente de Biureto**

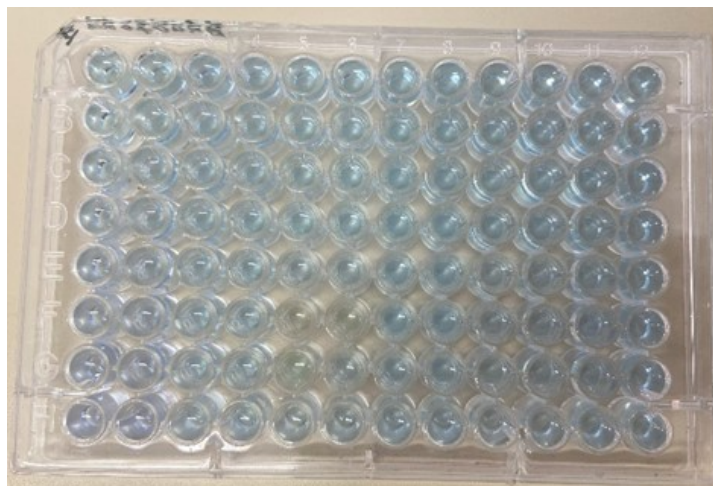
O método de Biureto consiste em retirar uma alíquota de 200 µL da solução proteica de Btk de cada tratamento de meio teste e adicionar 800 µL do reativo de Biureto, homogeneizar no vórtex e deixar a mistura em repouso por 15 minutos, para reação entre a amostra e o reagente. Após este período, pipetou-se 300 µL na microplaca, em duplicata, e fez-se a leitura espectrofotométrica para ver a intensidade da cor desenvolvida a 540 nm na leitora de microplaca (VERSA max - tunable).

Com os resultados obtidos compara-se com a curva padrão feita com albumina sérica bovina. Vale destacar que, quanto maior for a absorbância obtida, maior será a concentração

da proteína na amostra.

Caso os valores da absorbância medida no espectrofotômetro forem maiores do que os números mínimos e máximos da curva padrão de BSA, deve-se realizar a diluição das amostras em duas ou até quatro vezes, para que fiquem dentro da faixa estabelecida pela curva. No caso da diluição de duas vezes usa-se 150  $\mu\text{L}$  de água destilada e 150  $\mu\text{L}$  da amostra desejada, a seguir, homogeneiza-se no vórtex e repete-se o passo já citado acima. O mesmo acontece com a diluição de quatro vezes, porém, com a diferença de que se usa 200  $\mu\text{L}$  da amostra em questão e 600  $\mu\text{L}$  de água destilada. Ressalta-se que, caso as amostras forem diluídas, deve-se multiplicar a concentração obtida pelo fator de diluição para encontrar o valor efetivo da concentração de proteína na amostra.

A Figura 15 é uma representação de microplaca utilizada para quantificação de proteínas nas amostras com o reagente de Biureto.



**Figura 15** - Microplaca usada para quantificação de proteínas.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### **3.6 Maximização da produção de biomassa e proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sob influência da temperatura**

Após realizar os testes dos meios de cultura com variáveis fontes de nitrogênio e carbono a temperatura de 30°C por 72 horas, obteve-se os dados de acordo com a densidade óptica e a dosagem de proteínas. Posto isso, com os resultados encontrados fez-se uma seleção dos



melhores meios, ou seja, aqueles meios que obtiveram maior densidade óptica e produziram mais proteínas foram escolhidos para serem avaliados em relação à temperatura.

Sendo assim, por *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* ser uma bactéria mesofílica, isto é, que cresce entre 25 e 37°C (Rocha, 2017), foram selecionadas as temperaturas de 28 e 34°C para teste de maximização, pois são as temperaturas que estão na faixa ideal para o seu crescimento como sugere Monnerat *et al.* (2018); Panarotto (2006); Pereira; Martins (2016); Silva (2007). Em relação a maximização, para analisar-se o seu efeito, os tratamentos incubados foram verificados em intervalos regulares de 12 horas durante os tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas (Silva, 2007; Singh *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2006).

### 3.6.1 Meios testes com variáveis fontes de nitrogênio e carbono selecionados para avaliação da influência da temperatura

**Tabela 2** – Meios testes selecionados com variáveis fontes de nitrogênio e carbono.

	Fonte de nitrogênio (2 g/L)	Fonte de carbono (8 g/L)
<b>Meio 9</b>	Farinha de soja	Glicose
<b>Meio 10</b>	Nitrato de amônio	Glicose
<b>Meio 11</b>	Nitrato de amônio	Sacarose
<b>Meio 12</b>	Nitrato de amônio	Melaço de cana

### 3.6.2 Cultivo para maximização da produção de biomassa e proteínas de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*

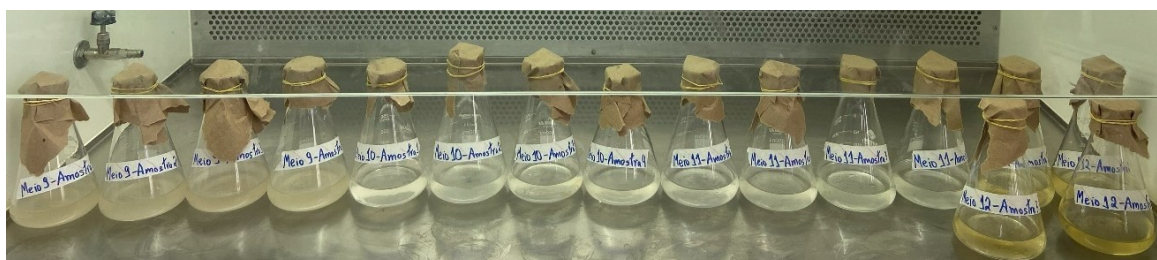
Após a seleção dos melhores meios testes, aqueles que obtiveram melhor crescimento microbiano e produção de proteínas, foi realizada a preparação do meio principal como descrito na seção 3.2.2, em seguida, cada um dos meios testes tiveram a adição de fontes de carbono e nitrogênio variáveis, conforme a tabela 2. Destaca-se que, cada meio teste foi esterilizado em autoclave a 121°C por 21 minutos. Na Figura 16 é demonstrado os meios testes com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.



**Figura 16** – Meios 9 a 12 com fontes variáveis de carbono e nitrogênio.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Ressalta-se que, a inoculação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foi realizada como descrito na seção 3.3. Posteriormente, os meios de maximização com as diferentes fontes de nitrogênio e carbono, em quaduplicata, com 75 mL em cada Erlenmeyer de 250 mL, tiveram a inoculação de Btk de acordo com a quantidade de DO encontrada. Na figura 17 podem ser vistos os meios inoculados com Btk.



**Figura 17** - Inoculação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meios 9 a 12.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Os tratamentos foram colocados em incubadora shaker com agitação orbital (MA 410 CFT - MARCONI) na temperatura de 28°C a agitação de 150 rpm por 72 horas para crescimento, o mesmo foi realizado com a temperatura de 34°C.

Ressalta-se que, a cada 12 horas amostras dos tratamentos foram coletadas, para medida da densidade óptica e quantificação da proteína produzida, seguindo-se os passos descritos na seção 3.4. A dosagem da quantidade de proteínas totais foi realizada a partir do teste de Biureto, como descrito nas seções 3.5.2.3 e 3.5.3.

Enfatiza-se que, os procedimentos citados nesta seção foram realizados tanto para os

tratamentos a 28°C como a 34°C.

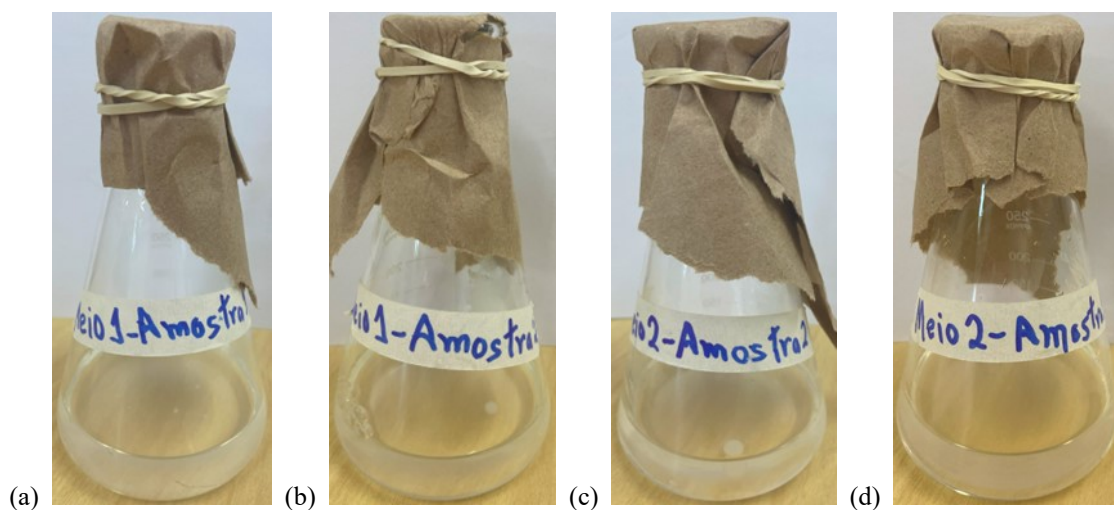
### 3.7 Análise estatísticas

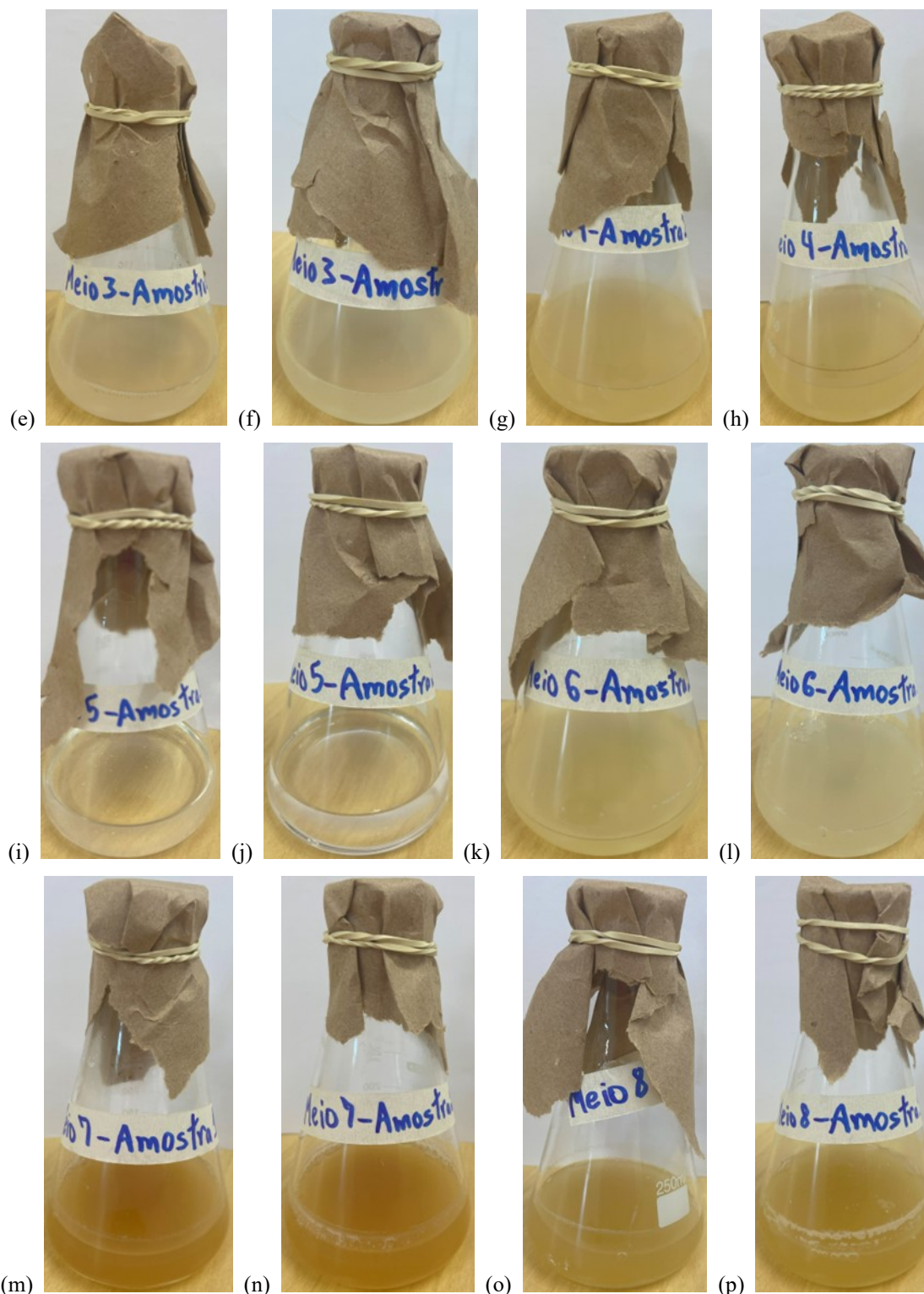
Para obter os resultados dos procedimentos realizados foi usado o software Microsoft Excel 365 versão 16, além disso os dados foram analisados estatisticamente por este mesmo software. Com os dados obtidos pelo Microsoft Excel 365, os gráficos foram elaborados usando o software GraphPad Prism versão 8.0.2, e também foram obtidos valores médios e desvio padrão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Meios testes 1 a 8 usados com variáveis fontes de nitrogênio e carbono

Nas Figuras 18 e 19 estão representados os meios testes de 1 a 8 com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, após fermentação de 72 horas a 30°C, em dois testes realizados em duplicatas.





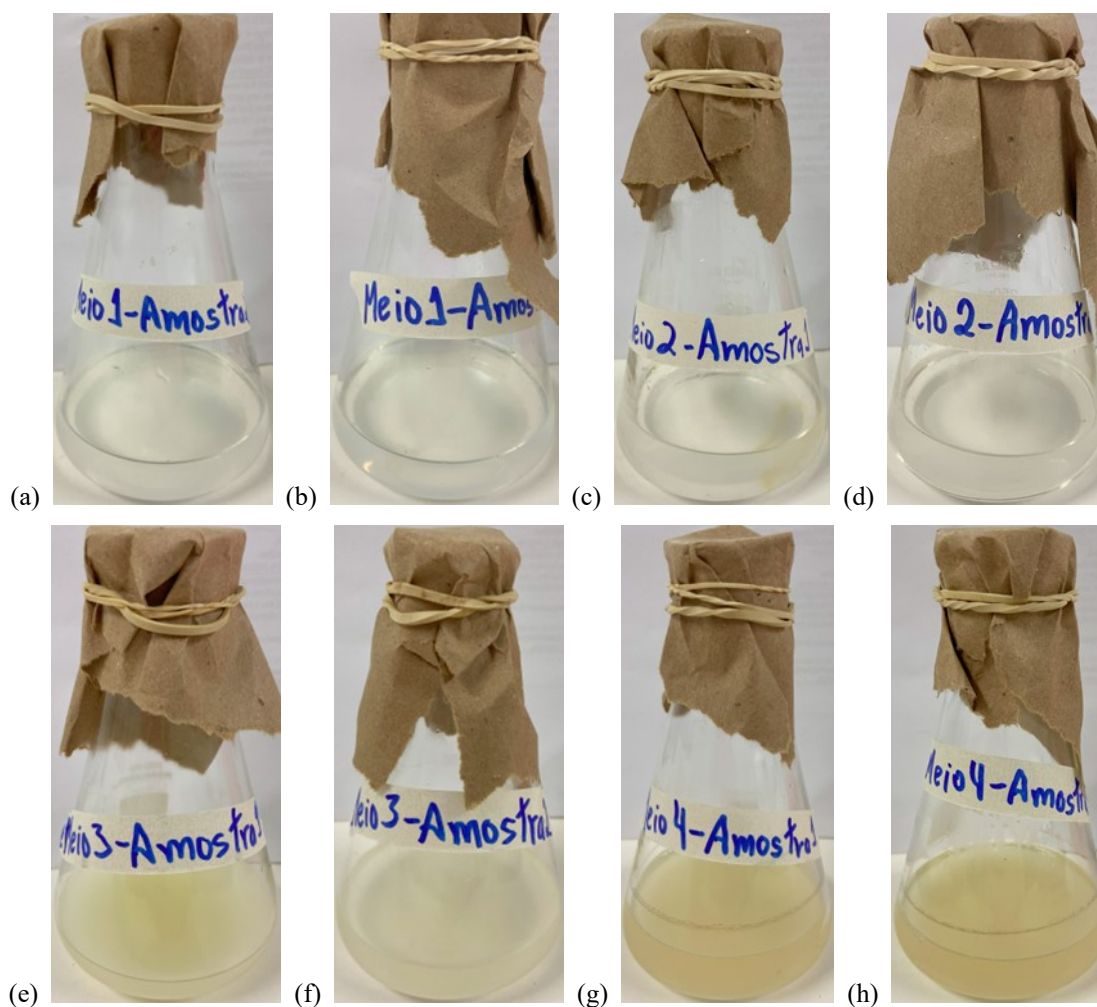
**Figura 18** – Meios testes de 1 a 8 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 1º teste em duplicata.

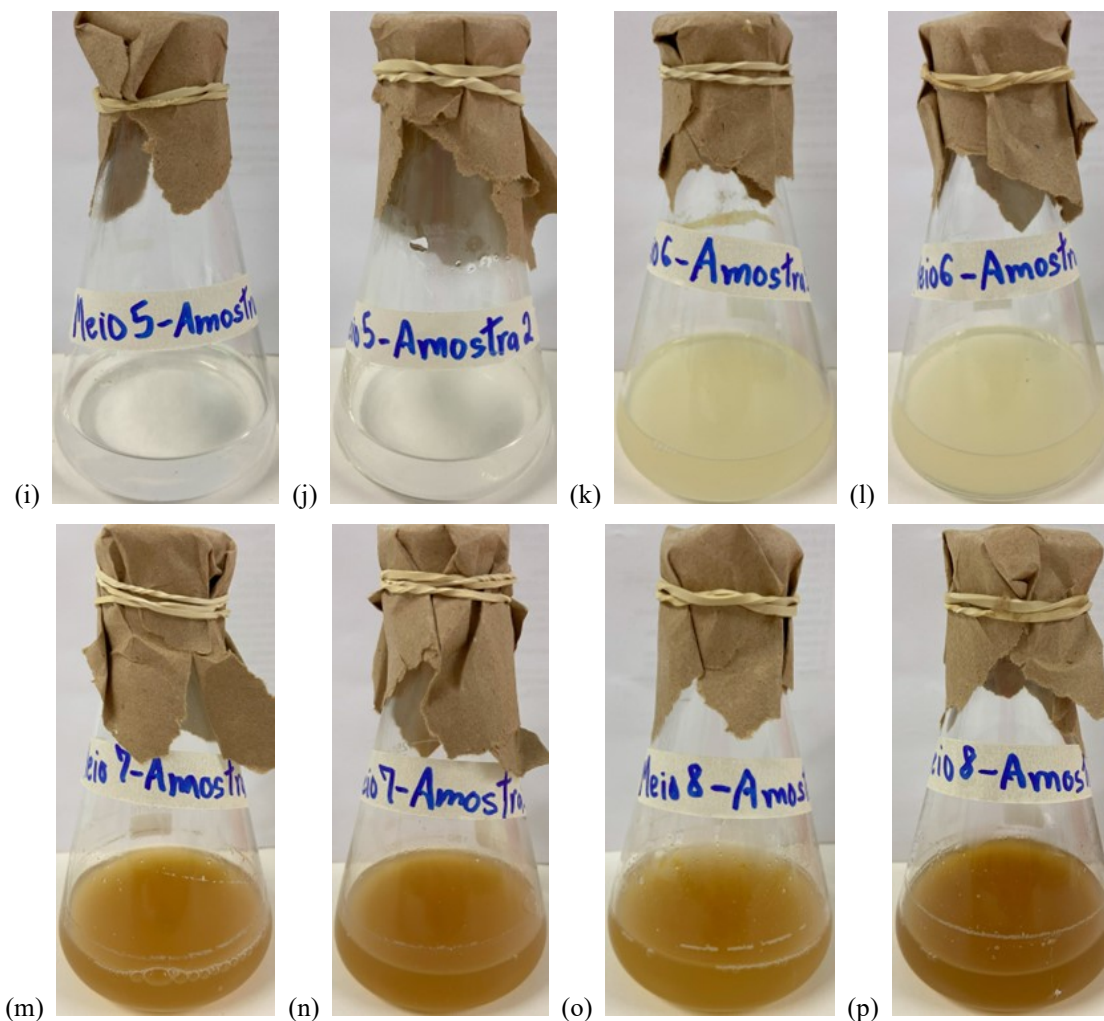
(a) e (b) meio 1 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (c) e (d) meio 2 (tendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (e) e (f) meio 3 (tendo peptona como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (g) e (h) meio 4 (tendo extrato de



levedura como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (i) e (j) meio 5 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e acetato de sódio como fonte de carbono); (k) e (l) meio 6 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e citrato de sódio como fonte de carbono); (m) e (n) meio 7 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e extrato de levedura como fonte de carbono); (o) e (p) meio 8 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e peptona como fonte de carbono).

**Fonte:** Autoria própria, 2025.





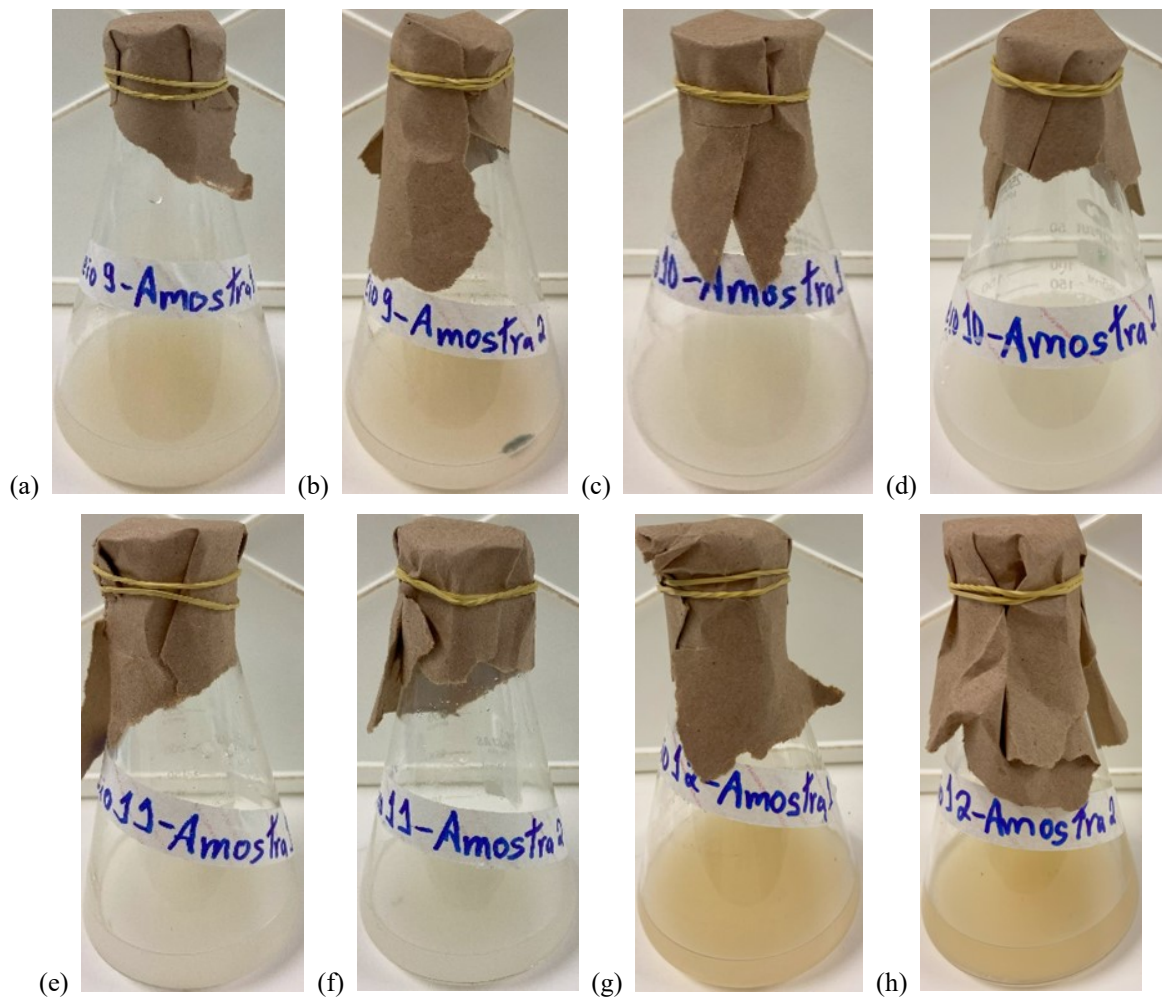
**Figura 19** – Meios testes de 1 a 8 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 2º teste em duplicata.

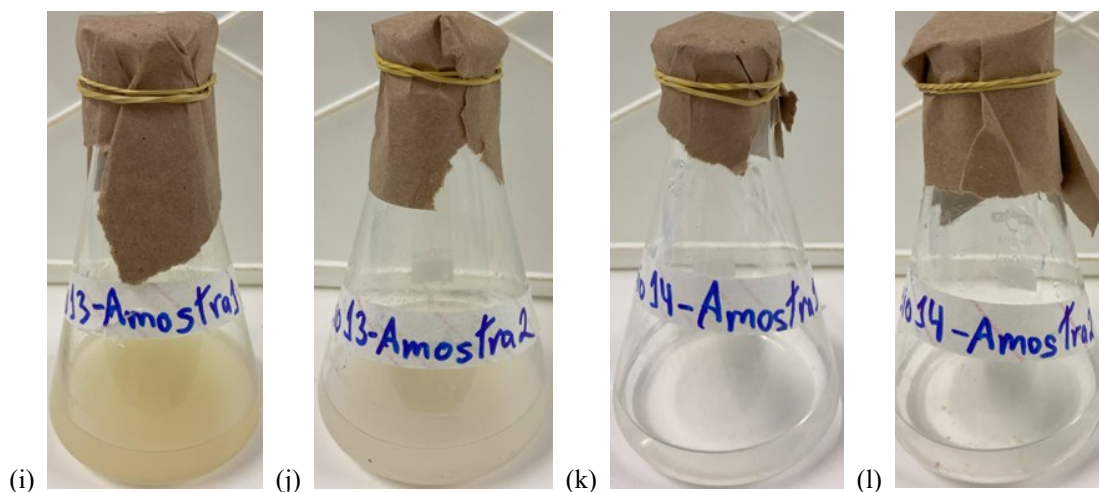
(a) e (b) meio 1 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (c) e (d) meio 2 (tendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (e) e (f) meio 3 (tendo peptona como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (g) e (h) meio 4 (tendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (i) e (j) meio 5 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e acetato de sódio como fonte de carbono); (k) e (l) meio 6 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e citrato de sódio como fonte de carbono); (m) e (n) meio 7 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e extrato de levedura como fonte de carbono); (o) e (p) meio 8 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e peptona como fonte de carbono).

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

#### 4.2 Meios testes 9 a 14 usados com variáveis fontes de nitrogênio e carbono

Nas Figuras 20 e 21 estão representados os meios testes de 9 a 14 com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, após fermentação de 72 horas a 30°C, em dois testes realizados em duplicatas.

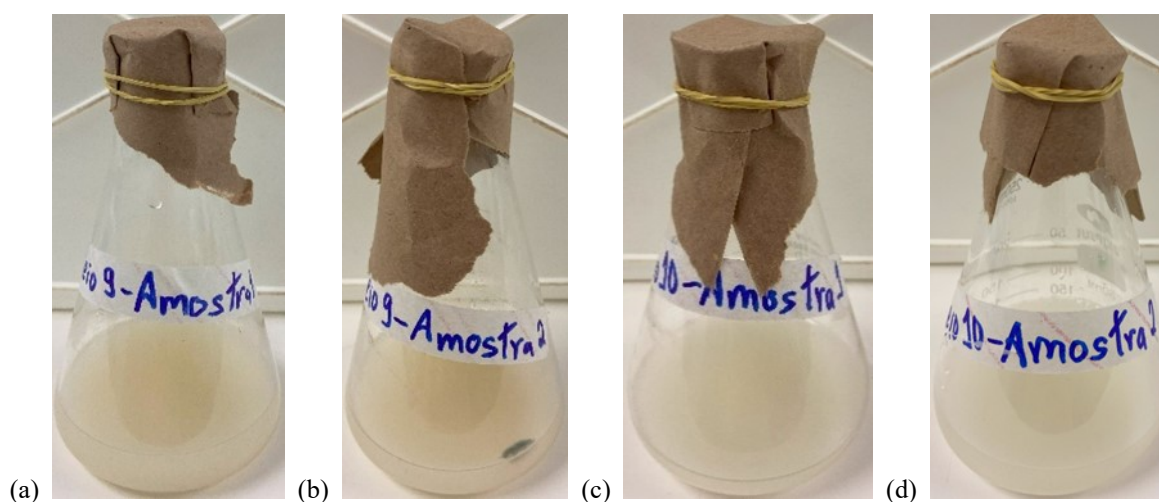




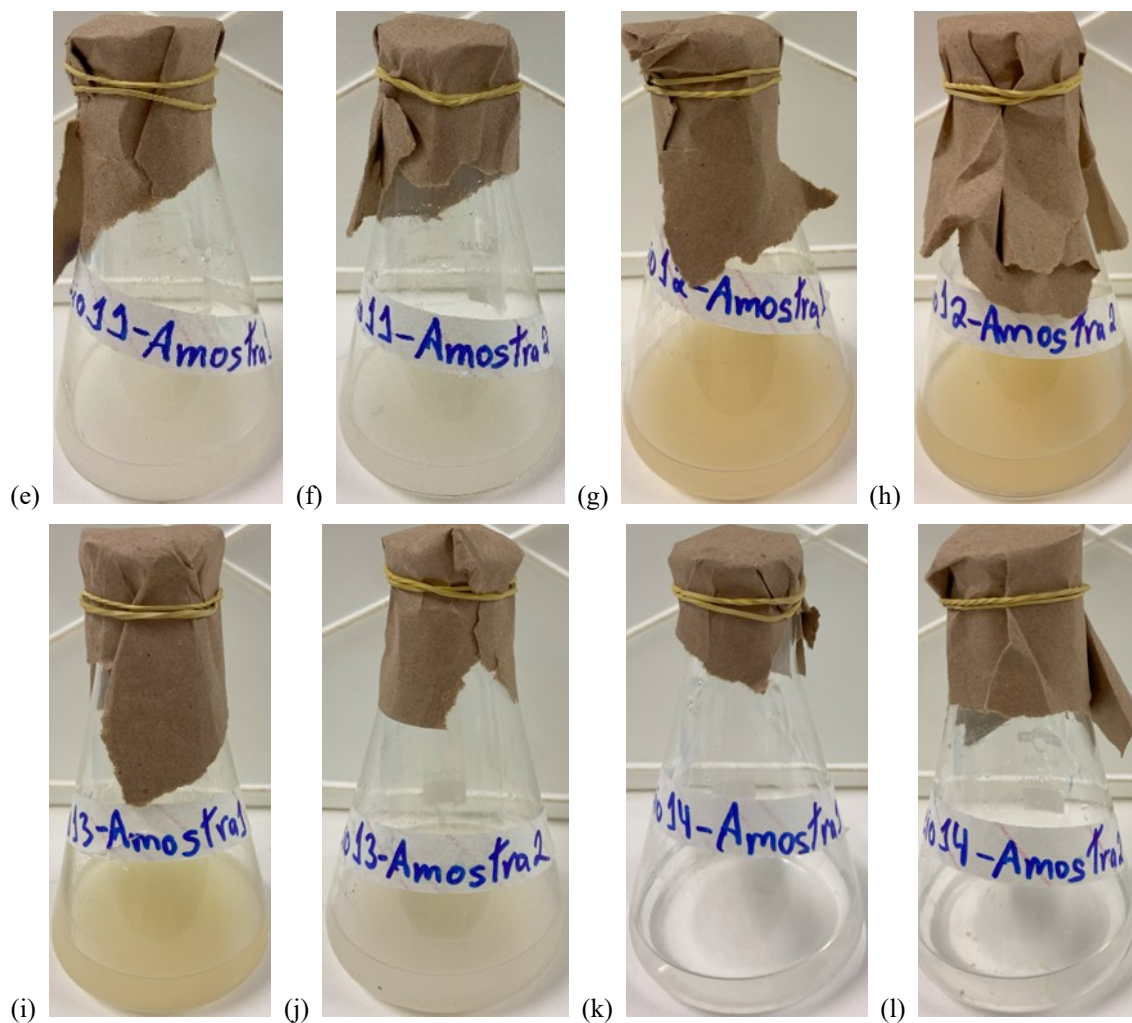
**Figura 20** – Meios testes de 9 a 14 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 1º teste em duplicata.

(a) e (b) meio 9 (tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (c) e (d) meio 10 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (e) e (f) meio 11 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono); (g) e (h) meio 12 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono); (i) e (j) meio 13 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e farinha de trigo como fonte de carbono); (k) e (l) meio 14 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e lavagem de batata como fonte de carbono).

**Fonte:** Autoria própria, 2025.







**Figura 21** – Meios testes de 9 a 14 com variáveis fontes de carbono e nitrogênio após 72 horas de fermentação a 30°C – 2º teste em duplicata.

(a) e (b)\* meio 9 (tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (c) e (d) meio 10 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono); (e) e (f) meio 11 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono); (g) e (h) meio 12 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono); (i) e (j) meio 13 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e farinha de trigo como fonte de carbono); (k) e (l) meio 14 (tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e lavagem de batata como fonte de carbono).

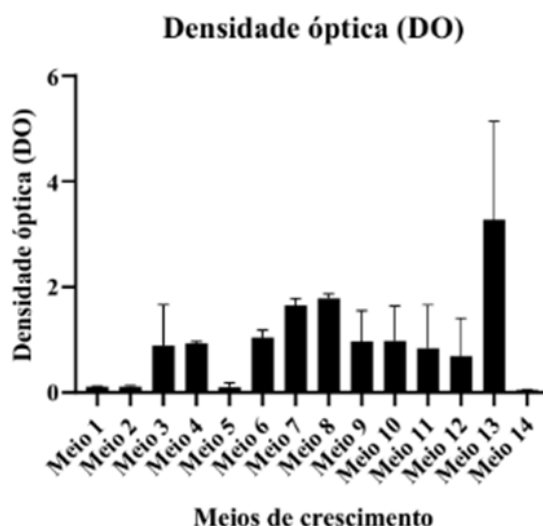
\*Meio contaminado com fungo.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

### 4.3 Crescimento celular e dosagem de proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

#### 4.3.1 Densidade óptica dos meios a 30°C

Após a fermentação de 72 horas a 30°C foi medida a densidade óptica dos tratamentos, os dados obtidos são representados na Figura 22.



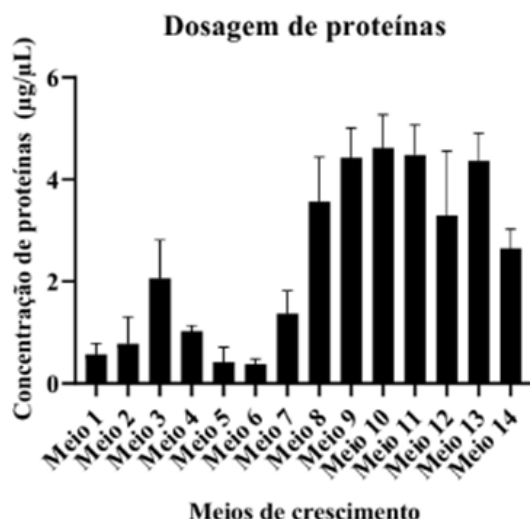
**Figura 22** – Gráfico demonstrativo do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* nos meios testes cultivados a 30 °C.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Como demonstrado na Figura 22, os melhores meios para crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foram os meios 7, 8 e 13. No entanto, estes meios não foram escolhidos para maximização em relação a temperatura, uma vez que o meio 13 teve interferências na medida de absorbância devido ser composto por farinha de trigo. Em adição, o meio 8 teve interferências na dosagem de proteínas, pois é um meio que contém peptona, dados de dosagem de proteínas serão mostrados na seção a seguir. Posto isso, os meios 9, 10, 11 e 12 foram selecionados para maximização em relação ao tempo e temperatura.

#### 4.3.2 Dosagem de proteínas dos meios a 30°C

Após a fermentação de 72 horas a 30°C, foi dosado a produção de proteínas dos meios. Na figura 23 há a demonstração gráfica dos dados obtidos por esta análise.



**Figura 23** – Gráfico demonstrativo da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* nos meios testes cultivados a 30 °C.

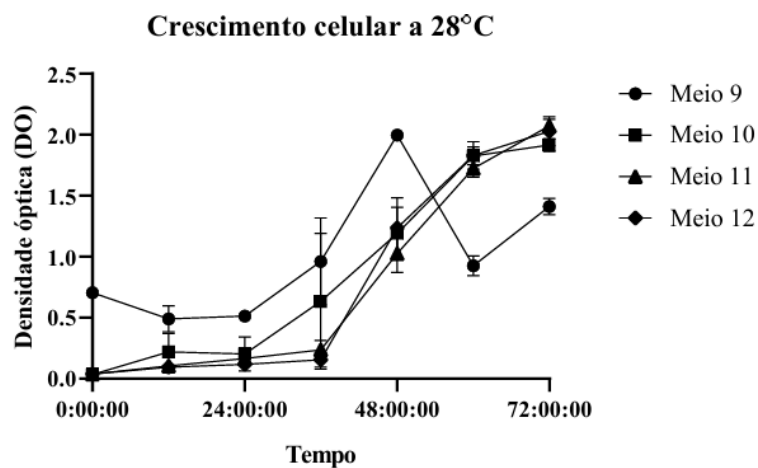
**Fonte:** Autoria própria, 2025.

De acordo com a figura acima, os melhores meios para produção de proteínas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foram os meios 9, 10, 11 e 13. Entretanto, o meio 13 não foi selecionado para maximização em relação a temperatura, uma vez que este meio teve interferências ao medir a absorbância devido ser composto por farinha de trigo. Dessa forma, os meios 9, 10, 11 e 12 foram selecionados para maximização em relação ao tempo e temperatura. Em adição, o meio 12 foi escolhido para ser otimizado, pois é um meio rico em nutrientes e pode ser reaproveitado de resíduos agrícolas e industriais, o que contribui para reduzir gastos com matéria prima e colaborar com o meio ambiente.

#### 4.4 Maximização da produção de biomassa e proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sob influência da temperatura de 28°C

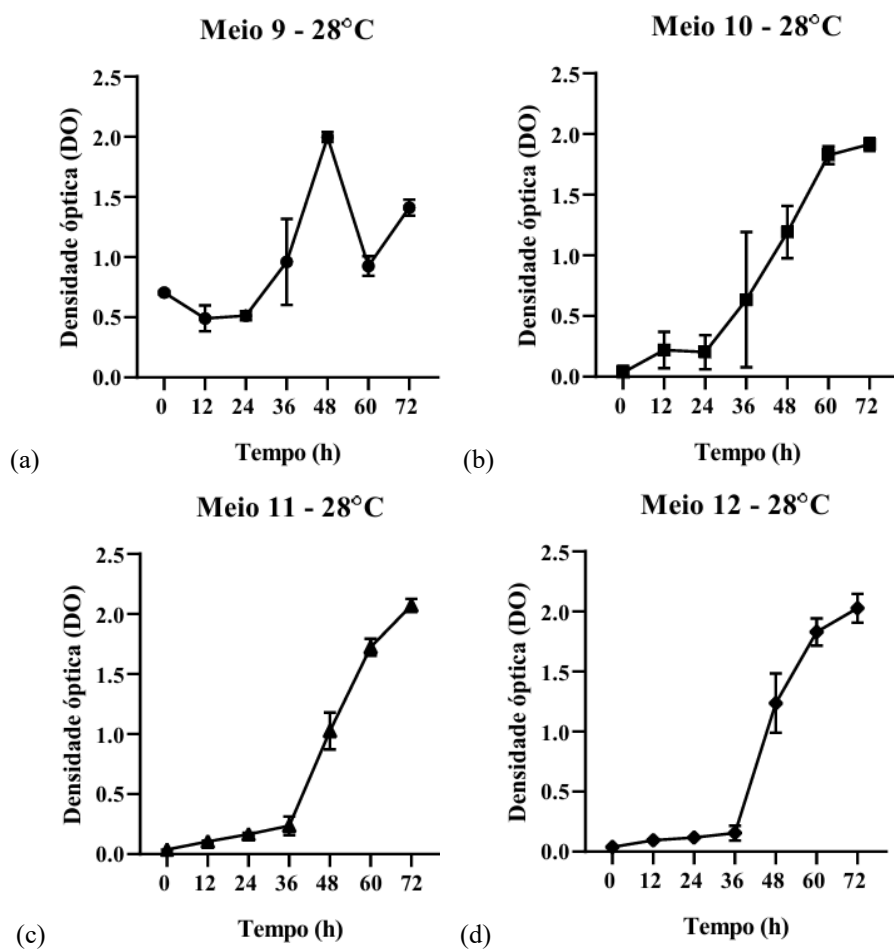
##### 4.4.1 Crescimento celular dos meios a 28°C

Os meios 9, 10, 11 e 12 foram submetidos a temperatura de 28°C para crescimento de Btk, os dados em relação a DO foram obtidos nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, representado na Figura 24. Para melhor visualização e identificação do meio mais favorável, foi elaborado gráficos separadamente do desempenho de cada um dos meios, como demonstrado na Figura 25.



**Figura 24** – Gráfico do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* nos meios 9 a 12 cultivados a 28°C.

Fonte: Autoria própria, 2025.



**Figura 25** – Gráfico do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 28°C.

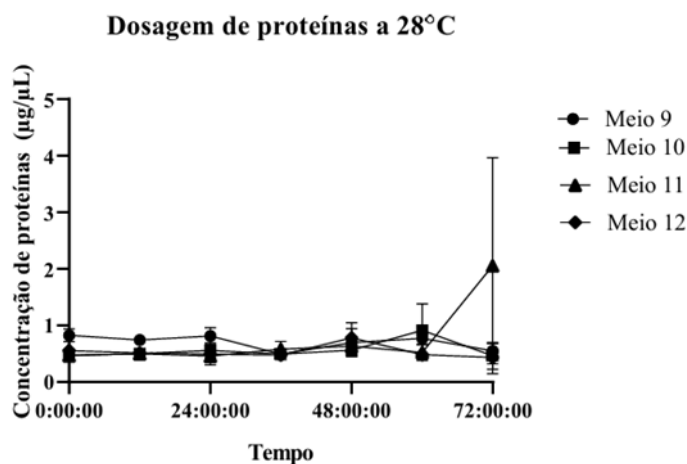
(a) gráfico do crescimento celular do meio 9 cultivado a 28°C; (b) gráfico do crescimento celular do meio 10 cultivado a 28°C; (c) gráfico do crescimento celular do meio 11 cultivado a 28°C; (d) gráfico do crescimento celular do meio 12 cultivado a 28°C.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Como demonstrado na Figura 25 o desempenho separadamente de cada um dos meios, pode-se afirmar que os meios 11 e 12 obtiveram melhores resultados de crescimento celular a 28°C no tempo de 72 horas, uma vez que o meio 11, tem nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono, e o meio 12, que tem nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono.

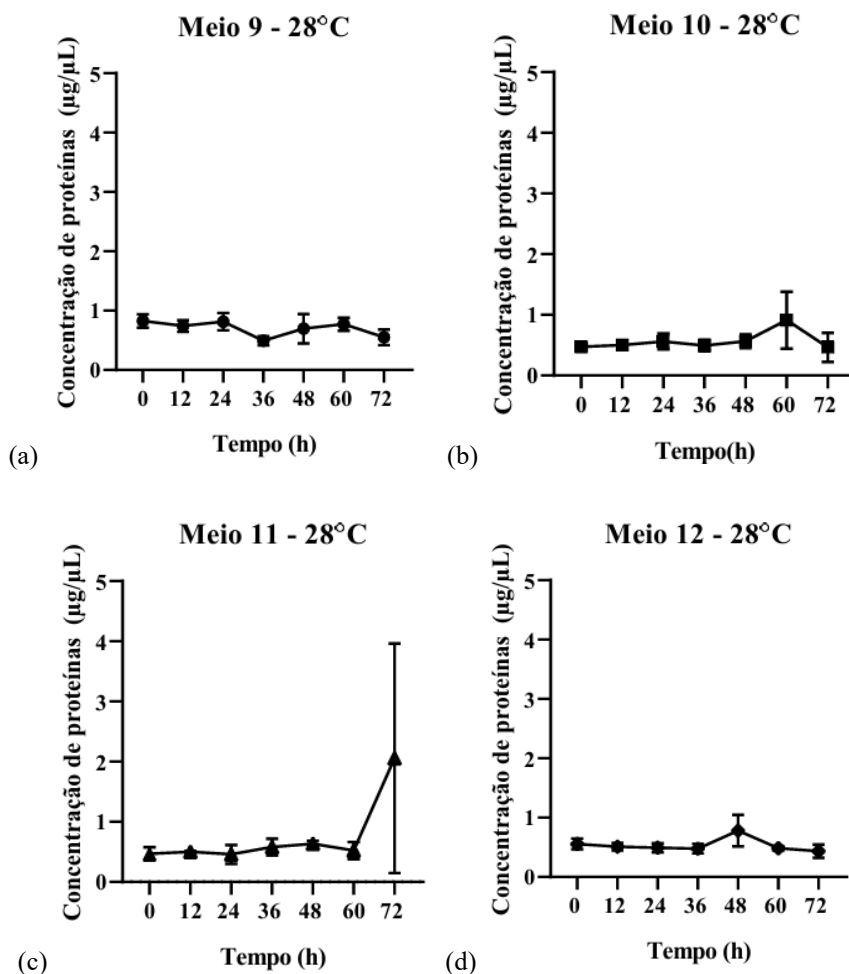
#### 4.4.2 Dosagem de proteínas dos meios a 28°C

Os meios 9, 10, 11 e 12 foram submetidos a temperatura de 28°C para maximização da produção de proteínas, os dados obtidos em relação a dosagem de proteínas nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas estão representados na Figura 26. Para melhor visualização e identificação do meio mais favorável, foi elaborado gráficos separadamente do desempenho de cada um dos meios, como demonstrado na Figura 27.



**Figura 26** - Gráfico da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 28°C.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.



**Figura 27** – Gráfico da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 28°C.

(a) gráfico da dosagem de proteínas do meio 9 cultivado a 28°C; (b) gráfico da dosagem de proteínas do meio 10 cultivado a 28°C; (c) gráfico da dosagem de proteínas do meio 11 cultivado a 28°C; (d) gráfico da dosagem de proteínas do meio 12 cultivado a 28°C.

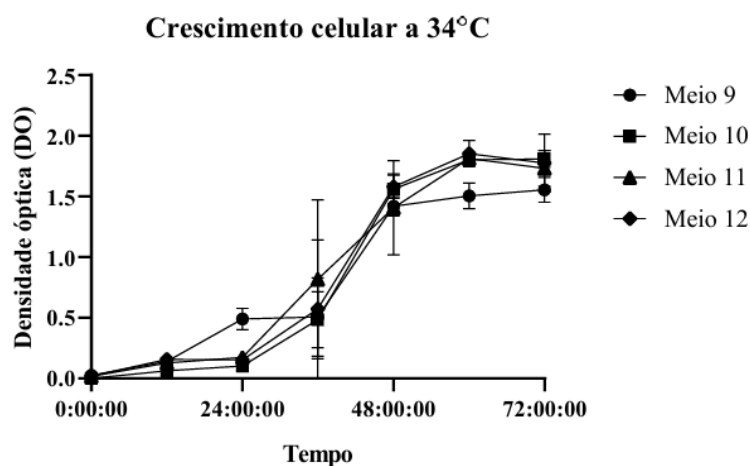
**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Como demonstrado na Figura 27 o desempenho separadamente de cada um dos meios, pode-se afirmar que os meios 10 e 11 obtiveram melhores resultados de produção de proteínas a 28°C, sendo que o meio 10 tem nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, e o meio 11, tem nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono.

## 4.5 Maximização da produção de biomassa e proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sob influência da temperatura de 34°C

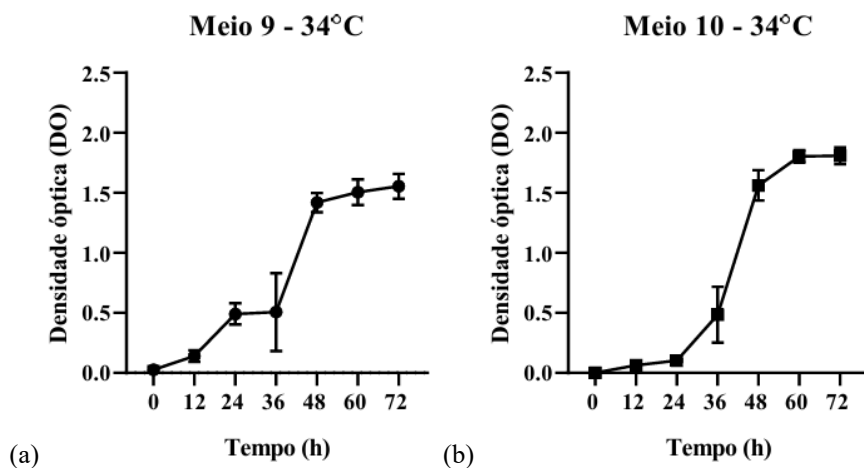
### 4.5.1 Crescimento celular dos meios a 34°C

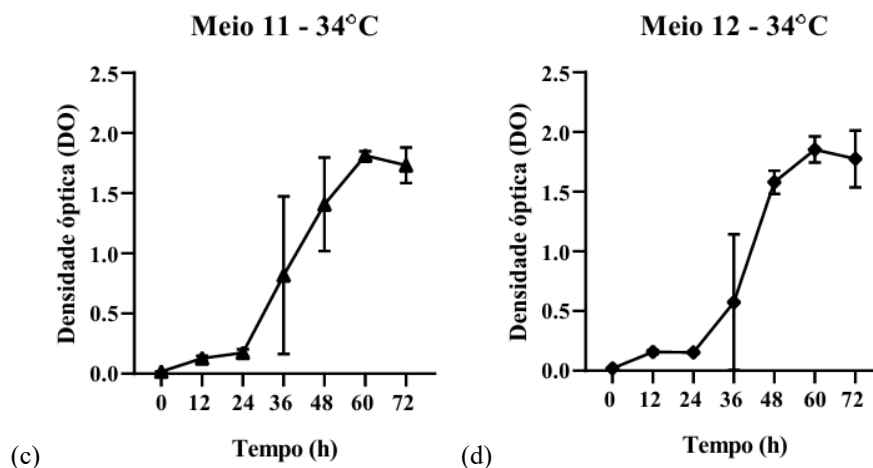
Os meios 9, 10, 11 e 12 foram submetidos a temperatura de 34°C para maximização da produção de biomassa de Btk, os dados em relação a DO foram obtidos nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, representado na Figura 28. Para melhor visualização e identificação do meio mais favorável para crescimento de Btk, foi elaborado gráficos separadamente do desempenho de cada um dos meios, como demonstrado na Figura 29.



**Figura 28** – Gráfico do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* nos meios 9 a 12 cultivados a 34°C.

Fonte: Autoria própria, 2025.





**Figura 29** – Gráfico do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 34°C.

(a) gráfico do crescimento celular do meio 9 cultivado a 34°C; (b) gráfico do crescimento celular do meio 10 cultivado a 34°C; (c) gráfico do crescimento celular do meio 11 cultivado a 34°C; (d) gráfico do crescimento celular do meio 12 cultivado a 34°C.

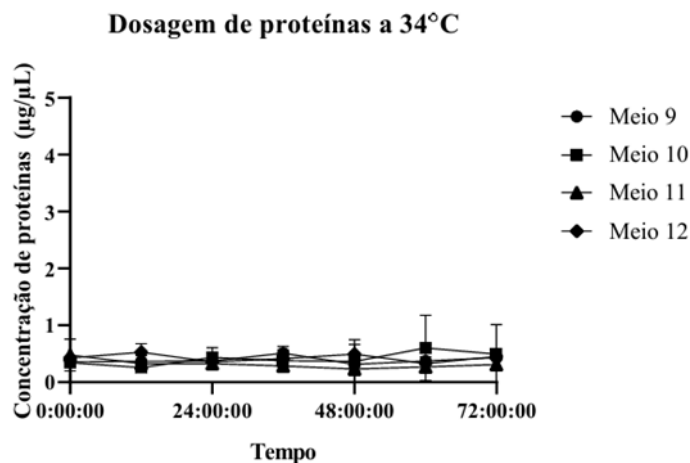
**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Como demonstrado na Figura 29 o desempenho separadamente de cada um dos meios, assim, pode-se afirmar que os meios 11 e 12 obtiveram melhores resultados de crescimento celular a 34°C. Destaca-se que, os meios 10, 11 e 12 após as 60 horas já entram em uma fase de declínio, isto é, ocorre uma redução na população microbiana.

#### 4.5.2 Dosagem de proteínas dos meios a 34°C

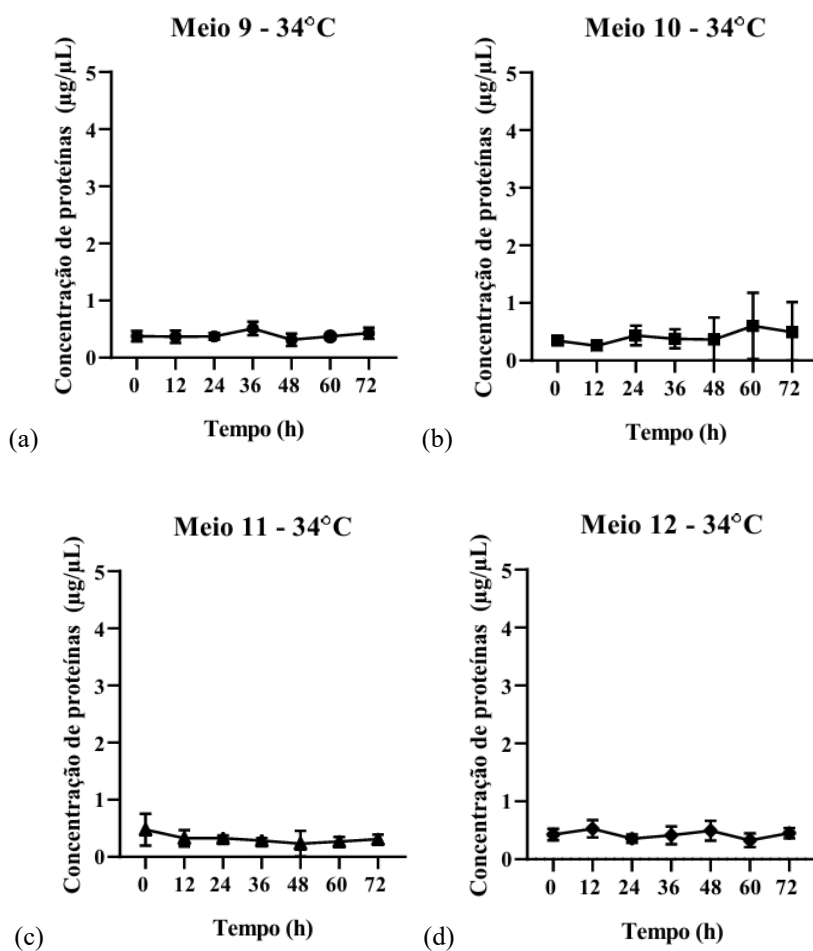
Os meios 9, 10, 11 e 12 foram submetidos a temperatura de 34°C para maximização da produção de proteínas, os dados obtidos em relação a dosagem de proteínas nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas estão representados na Figura 30. Para melhor visualização e identificação do meio mais favorável, foi elaborado gráficos separadamente do desempenho de cada um dos meios, como demonstrado na Figura 31.





**Figura 30** – Gráfico da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de cada um dos meios 9 a 12 cultivados a 34°C.

Fonte: Autoria própria, 2025.



**Figura 31** – Gráfico da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* de cada um dos

meios 9 a 12 cultivados a 34°C.

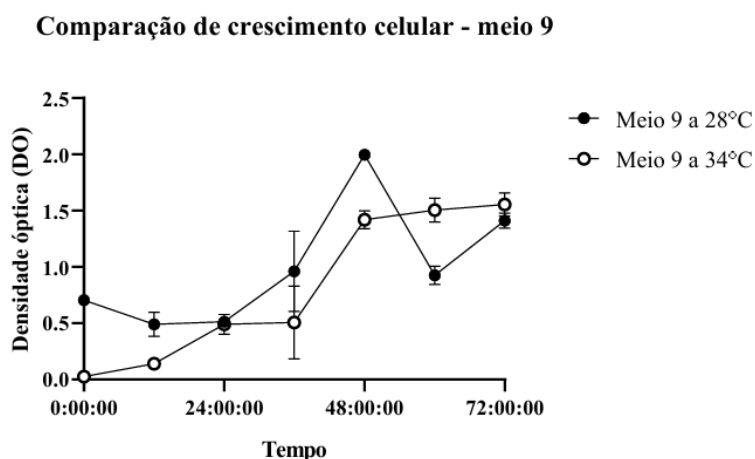
(a) gráfico da dosagem de proteínas do meio 9 cultivado a 34°C; (b) gráfico da dosagem de proteínas do meio 10 cultivado a 34°C; (c) gráfico da dosagem de proteínas do meio 11 cultivado a 34°C; (d) gráfico da dosagem de proteínas do meio 12 cultivado a 34°C.

Fonte: Autoria própria, 2025.

Como demonstrado na Figura 31 o desempenho separadamente de cada um dos meios, logo, pode-se afirmar que os meios 9, tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, e 10 tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, obtiveram melhores resultados de produção de proteínas a 34°C.

#### 4.6 Comparação do crescimento celular dos meios testes em relação a temperatura

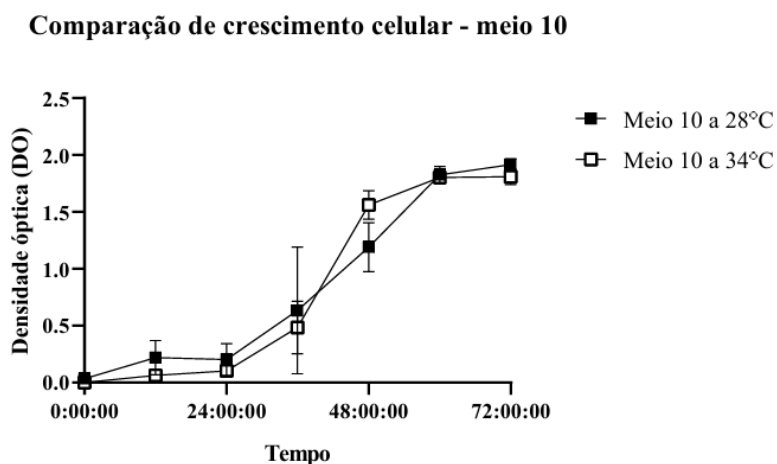
Na Figura 32 há a demonstração o crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meio 9. Posto isso, este microrganismo tem maior produção de biomassa neste meio quando está na temperatura de 34°C. Contudo, para evitar o estresse metabólico de Btk poderia crescer esta bactéria a 28°C, pois no período de 48 horas obteve-se a maior DO. Ou seja, neste tempo teve-se a maior produção de biomassa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.



**Figura 32** – Gráfico comparativo do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 9, tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

Fonte: Autoria própria, 2025.

A produção de biomassa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meio 10 está representada na Figura 33. A maior densidade óptica obtida neste meio foi na temperatura de 28°C no tempo de 72 horas. Porém, devido ao desvio padrão e margem de erro, não apresentou diferenças significativas nos valores avaliados. Sendo assim, este microrganismo tem produção de biomassa equivalente na temperatura de 28°C e a 34°C, quando em desenvolvimento neste meio.

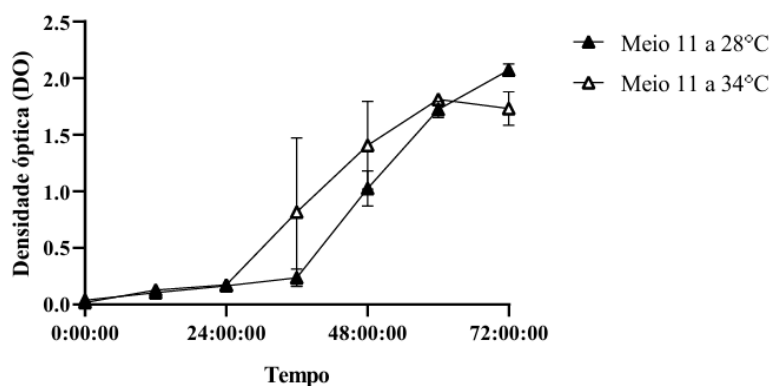


**Figura 33** – Gráfico comparativo do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 10, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

Em meio 11, a maior DO encontrada foi no período de 72 horas na temperatura de 28°C, como demonstrado na Figura 34. Quando se compara as temperaturas de 28 e 34°C, esta última temperatura tem um desempenho melhor no intervalo de 36 a 60 horas. No entanto, apresenta um desvio padrão e margem de erro maior, o que dificulta afirmar que a Btk teve maior produção de biomassa a 34°C neste período.

#### Comparação de crescimento celular - meio 11

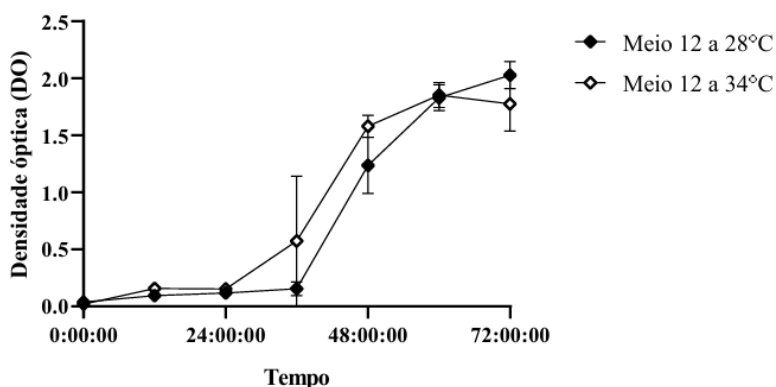


**Figura 34** – Gráfico comparativo do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 11, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono.

Fonte: Autoria própria, 2025.

O gráfico de comparação de densidade óptica do meio 12 está representado na Figura 35, desse modo, a maior DO obtida por este meio foi no período de 72 horas na temperatura de 28°C. Assim como no meio 11, o meio 12 apresenta maior produção de biomassa no intervalo de 36 a 60 horas na temperatura de 34°C. Mas também exibe um desvio padrão e margem de erro maior no tempo de 36 horas, o que dificulta afirmar que a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* poderia ter maior produção de biomassa a 34°C neste período, evitando o estresse metabólico desta bactéria.

#### Comparação de crescimento celular - meio 12

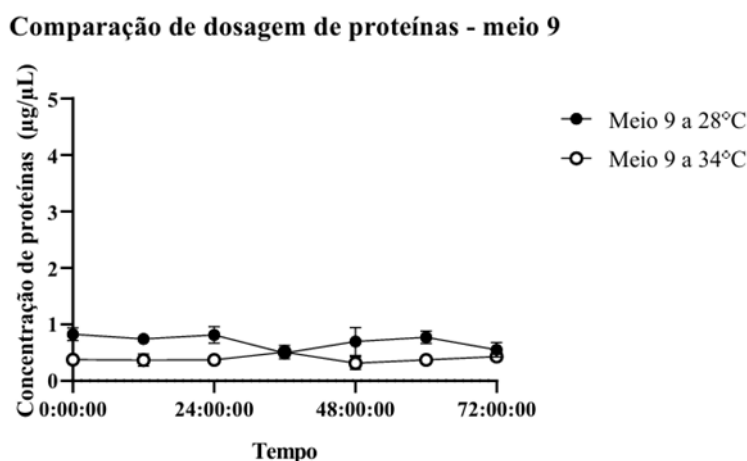


**Figura 35** – Gráfico comparativo do crescimento celular de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 12, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono.

Fonte: Autoria própria, 2025.

#### 4.7 Comparação da dosagem de proteínas dos meios testes em relação a temperatura

A dosagem de proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meio 9 é demonstrada na Figura 36. Sendo assim, este microrganismo tem maior produção de proteínas neste meio quando está na temperatura de 28°C. Porém, devido ao desvio padrão e margem de erro, este microrganismo tem produção de proteínas equivalente neste meio quando está a 34°C em 72 horas.

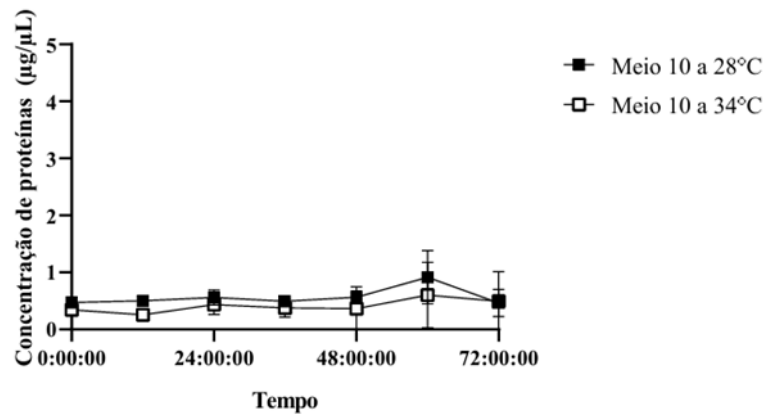


**Figura 36** – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 9, tendo farinha de soja como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

A produção de proteínas de Btk em meio 10 está representada na Figura 37. A maior dosagem de proteínas obtida neste meio foi na temperatura de 28°C no tempo de 60 horas. No entanto, para evitar o estresse metabólico de Btk poderia crescer esta bactéria a 28°C, até o período de 60 horas, pois obteve-se a maior dosagem de proteínas. Ressalta-se que, devido ao desvio padrão e margem de erro, este microrganismo tem produção de proteínas equivalente neste meio quando está a 28°C e 34°C em 72 horas.

#### Comparação de dosagem de proteínas - meio 10

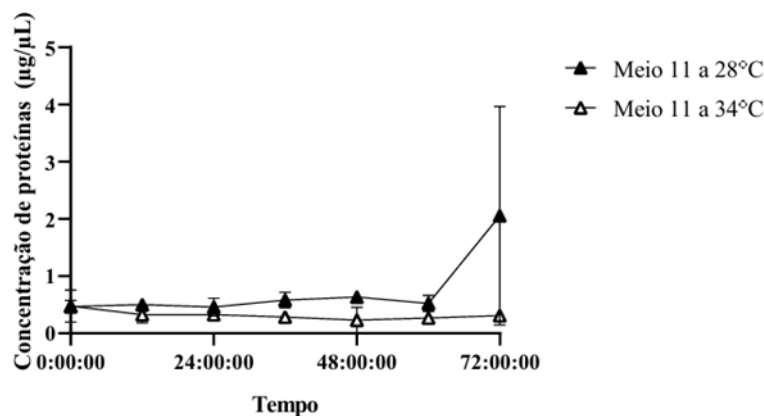


**Figura 37** – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 10, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

Fonte: Autoria própria, 2025.

Em meio 11, a maior produção de proteínas encontrada foi no período de 72 horas na temperatura de 28°C, demonstrado na Figura 38. Quando se compara as temperaturas de 28 e 34°C, a primeira temperatura tem um desempenho melhor principalmente no intervalo de 48 a 72 horas. No entanto, o período de 72 horas apresenta um desvio padrão e margem de erro maior, o que dificulta afirmar que a Btk teve maior produção de proteínas a 28°C neste período.

#### Comparação de dosagem de proteínas - meio 11

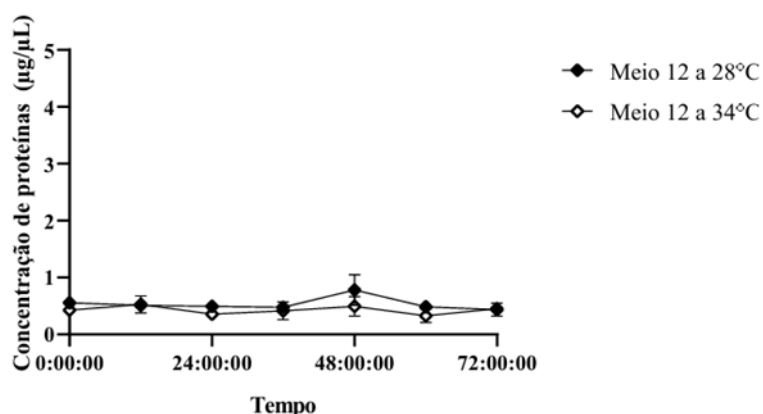


**Figura 38** – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 11, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e sacarose como fonte de carbono.

Fonte: Autoria própria, 2025.

O gráfico de comparação de dosagem de proteínas do meio 12 está representado na Figura 39, sendo assim, a maior produção de proteínas obtida por este meio foi no período de 48 horas na temperatura de 28°C. Contudo, exibe um desvio padrão e margem que dificulta afirmar que a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* poderia ter maior dosagem de proteínas a 28°C neste período. Assim, este microrganismo tem produção de proteínas equivalente neste meio quando está a 34°C.

**Comparação de dosagem de proteínas - meio 12**



**Figura 39** – Gráfico comparativo da dosagem de proteínas produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no meio 12, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono.

**Fonte:** Autoria própria, 2025.

## 5. DISCUSSÃO

Em relação a determinação do crescimento celular, temos dois pontos relevantes que podem afetar a medida da densidade óptica. O resultado desta leitura não mostra o número de células viáveis disponíveis no cultivo, bem como não pode medir se houve ou não a contaminação, pois toda a população microbiana é considerada na absorbância, independentemente da espécie e estado vegetativo. Além disso, o amido que compõe a farinha de trigo pode causar a precipitação de suas moléculas, que dificultam a medida da DO. Outro ponto relevante é a composição do meio de cultura, uma vez que os microrganismos crescem mais em meio rico em nutrientes, do que em um meio pobre em nutrientes. Valores elevados de absorbância podem ser observados na fase de crescimento exponencial em decorrência da

maior disponibilidade de substratos nesta etapa. O esgotamento de nutrientes após a fase logarítmica impacta na redução do crescimento celular, acarretando na queda dos valores de absorvância. Além disso, o esgotamento de nutriente é um sinalizador para as células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para o início do processo de esporulação, onde há uma perda citoplasmática gradual até a total lise celular e liberação do esporo. Destaca-se que, a natureza e as características dos substratos utilizados no meio de cultura interferem no metabolismo do microrganismo, incluindo a expressão de enzimas e metabólitos (Bernardes, 2024).

O método de Biureto está sujeito à interferência de substâncias que possam reagir com os íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Algumas delas são peptídeos e aminoácidos, os quais estão presentes na composição da peptona. Em adição, o amido que é um dos componentes da farinha de trigo, também pode reagir com os íons cobre (II) interferindo na determinação de proteínas. Sendo assim, justifica-se a interferência que os meios 8 e 13 sofreram na dosagem de proteínas por este método (Zaia; Zaia; Lichtig, 1998).

Portanto, ambas as técnicas, de dosagem de proteínas e de densidade óptica, apresentam dificuldades na determinação de concentrações celulares e na produção proteica uma vez que, na maioria dos casos, os meios de produção são compostos por matérias primas naturais e apresentam altos teores de sólidos em suspensão (Panarotto, 2006).

As fases de crescimento acompanham as condições do meio, onde a quantidade de nutrientes diminui e de produtos do metabolismo aumentam com o passar do tempo. Essas modificações influenciam no comportamento e nas condições para o crescimento (Dantas, 2020). As proteínas Cry são formadas principalmente no fim da fermentação, quando as condições do meio ficam desfavoráveis (Pereira; Martins, 2016).

As fontes de nitrogênio usadas neste trabalho são tanto orgânicas quanto inorgânicas. Ângelo *et al.* (2010) afirmam que não é aconselhável o uso apenas de nitrogênio inorgânicos, pois há diminuição do crescimento e da esporulação. Entre as fontes orgânicas de nitrogênio, o extrato de levedura é bastante utilizado, assim como peptona e farinha de soja apresentam bons resultados, principalmente a peptona e o extrato de levedura por serem ricos em vitaminas do complexo B, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, indispensáveis para promover o crescimento satisfatório dos microrganismos (Dantas, 2020; Pereira; Martins, 2016). No entanto, devido a composição dessas substâncias, como já mencionado



acima, ocorreram interferências na dosagem de proteínas por acontecer reações com íons cobre (II).

Os efluentes do processamento de batatas também se caracterizam como possíveis substratos para produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, pois possuem em sua composição 80% de água, 17% de carboidratos, 2% de proteínas, 0,1% de gordura e 0,9% de vitaminas, minerais inorgânicos e traços de micronutrientes. Por seu baixo custo, alta disponibilidade e elevado teor de açúcares fermentáveis, esta matéria prima vem sendo empregada como substrato para diferentes tipos de fermentação (Rocha, 2017). Contudo, quando comparada a outras matérias prima usadas neste estudo a água de batata não teve uma produção de proteínas e densidade óptica tão significativa quanto as demais. Ressalta-se que, na preparação usada neste trabalho as batatas ficaram mergulhadas na água por apenas 30 minutos, talvez para que pudesse ter melhores resultados seria preciso deixar a leguminosa de molho por mais tempo, ou até mesmo por dias. Entretanto, quando se deixa a batata por mais tempo pode acontecer a contaminação da água, que afetará nos dados a serem obtidos.

O melaço de cana é utilizado em formulações de meios alternativos por sua eficiência em produção de biomassa em diversos processos fermentativos. A composição química do melaço pode ser influenciada por diversos fatores, seja sua origem agrícola ou o seu processamento industrial. Os principais componentes do melaço de cana são a água, carboidratos, compostos de origem orgânica como os aminoácidos, ácidos carboxílicos, proteínas, vitaminas, fenóis e outros. O melaço possui composição média de 20% de água, 62% de açúcar, 10% de material nitrogenado e 8% de constituintes inorgânicos (Rocha, 2017).

O melaço de cana é um substrato com inúmeras aplicações industriais possíveis, por isso, é uma interessante alternativa para a produção de bioinsumos, já que, em comparação com outras 24 fontes de açúcares, possui um baixo custo, e ainda, apresenta vários outros compostos ricos em carbono, além da sacarose. O melaço, particularmente se destaca nos processos fermentativos, pelo fato de apresentar alto teor de açúcares fermentescíveis, compostos orgânicos, vitaminas e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio. Todos esses compostos são valiosos para os processos de fermentação, pois estes podem favorecer o crescimento do microrganismo (Baptista, 2024; Dantas, 2020).

A glicose possui em sua composição seis átomos de carbono, doze átomos de hidrogênio

e seis átomos de oxigênio. A sacarose é um dissacarídeo encontrado em abundância na cana de açúcar, frutas e na beterraba é formado por uma molécula de glicose e uma de frutose que se ligam através da ligação éter entre o C1 da unidade glucosil e o C2 da unidade frutosil (Dantas, 2020).

Meios contendo melaço de cana e sacarose favoreceram as altas densidades celulares de Btk, porém, a produção de proteínas Cry foi maior em meios contendo glicose e sacarose. Os meios formulados com glicose e sacarose apresentaram a produção proteica numa média de 0.914 e 2.057  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente na temperatura de 28°C. A sacarose mostrou-se o substrato energético mais acessível ao metabolismo de Btk, além de ser um carboidrato de custo relativamente baixo no Brasil. A glicose apresentou menor crescimento celular com relação à sacarose, entretanto pode ser utilizada como fonte de carbono por apresentar uma boa produção de proteínas, como visa o estudo. Esta bactéria necessita de um substrato energético para a produção de energia que influencia indiretamente o crescimento celular, a esporulação e a produção de endotoxinas. Sendo assim, a glicose é uma das principais fontes de energia utilizadas no cultivo deste microrganismo. Os resultados observados mostraram que *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* tem maior facilidade de metabolizar sacarose, sendo esta fonte de energia mais adequada para o crescimento deste tipo de *Bacillus*, confirmando os dados de Madigan *et al.* (1997); Panarotto (2006).

Os resultados até aqui discutidos indicam que Btk apresenta um melhor crescimento nas temperaturas de 28 e 30 °C. Estes dados confirmam os resultados já reportados por Bernhard & Utz (1993) que constatam que a maioria das linhagens de Bt cresce melhor na faixa de temperatura de 26 a 30°C. Apesar de İçgen *et al.* (2002) terem reportado que a 25 °C há a melhor produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*, no presente trabalho, uma maior expressão foi evidenciada nos cultivos em que a temperatura foi mantida a 28 ou 30 °C. Segundo Rowe *et al.* (1987) e Figueiredo; Burity; Oliveira; Santos; Stamford (2010) a temperatura deve ser mantida em 30 °C  $\pm$  2°C, pois valores maiores reduzem a produção de endotoxinas. Os resultados deste trabalho confirmam a grande influência da temperatura sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, como já reportado por Maldonado-Blanco *et al.* (2003). Portanto, as melhores temperaturas para crescimento celular e produção de endotoxinas foram as de 28 e 30 °C.

## 6. CONCLUSÃO

A Biotecnologia promove um futuro mais sustentável e uma agricultura mais eficiente e limpa. O uso de bactérias, a biotecnologia e o manejo biológico são estratégias essenciais para fortalecer a resiliência e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, assim como, os tornar mais eficientes e econômicos.

Desse modo, é possível concluir que diferentes fontes de carbono e nitrogênio em concentrações variáveis interferem de várias formas na qualidade e rendimento de uma fermentação. Quando a concentração de fonte de carbono é maior do que a fonte de nitrogênio, há um aumento na produção de biomassa de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, bem como na produção de proteínas Cry. Desse modo, com os estudos realizados, pode-se afirmar que a sacarose é o substrato energético mais adequado que a glicose, resultando em intenso crescimento celular e expressão de endotoxinas. Apesar da glicose apresentar um crescimento inferior, evidenciou-se uma boa produção de endotoxinas, assim, podendo ser utilizada como fonte de carbono para crescimento da bactéria. Em relação a temperatura, pode-se concluir que as melhores temperaturas para crescimento celular e produção de endotoxinas foram as de 28 e 30 °C.

Diante disso, é possível dizer que esta bactéria é uma boa produtora de bioinsumo, com boa capacidade de produzir endotoxinas, apresentando resultados satisfatórios. Os substratos utilizados indicam ser promissores na produção de bioinsumos, mas ainda necessitam de estudos mais aprofundados do cultivo. Estudos posteriores podem ser realizados para avaliação do comportamento desta bactéria a cada 12 horas durante as 72 horas de fermentação na temperatura de 30 °C. Assim, identificando a influência dessa temperatura na produção de proteínas e monitoramento do crescimento deste microrganismo a cada intervalo de tempo, nos meios 10 e 11 que possuem a glicose e sacarose como fontes de carbono. Em adição, são necessários mais estudos para poder determinar as condições ideais de fermentação, tais como, pH, aeração, agitação e suas influências para máxima produção de biomassa e proteína Cry produzida por *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para melhor entendimento do comportamento de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e comparação com a evolução deste microrganismo nas temperaturas de 28 e 34°C, espera-se fazer mais testes que possibilitem a avaliação desta bactéria a cada 12 horas durante as 72 horas de fermentação na temperatura de 30°C. Assim, identificando a influência dessa temperatura na produção de proteínas e monitoramento do crescimento deste microrganismo a cada intervalo de tempo, principalmente nos meios 10 e 11 que possuem a glicose e sacarose como fontes de carbono, os quais obtiveram melhor desempenho na produção de proteínas e crescimento celular bacteriano.

Em adição, são necessários mais estudos para poder determinar as condições ideais de fermentação, tais como, pH, aeração, agitação e suas influências para máxima produção de biomassa e proteína Cry produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÂNGELO, Elisângela A. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. Londrina: **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, out./dez, 2010.
- ANTAR, Mohammed *et al.* Biomass for a sustainable bioeconomy: An overview of world biomass production and utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, n. December 2020, p. 110691, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110691>. Acesso em: 15 abr. 2024.
- BAPTISTA, Camila Cristina X. **Crescimento do *Bacillus pumilus* em meios diversos para produção de biossurfactantes**. p. 40, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024.
- BERNHARD, Kadenbach; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* Inseticides for Experimental and Commercial Uses. ***Bacillus thuringiensis, An environmental biopesticide: Theory and Prattice***. 2 nd ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p. 256-267, 1993.
- BERNARDES, João Vitor A. **Cinética de fermentação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129**. p. 57, 2024. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Química) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2024.
- CORTEVA Agriscience. **Uso de bioinsumos global 2025**. 14 fev., 2025. Disponível em: <https://www.corteva.com/>. Acesso em: 07 mai. 2025.
- DANTAS, Fernanda M. A. L. **Utilização de Melaço de Cana-de-Açúcar em Meio Alternativo para Crescimento de Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas**. p. 51, 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.
- DILOKPI MOL, Adiphol *et al.* *Penicillium subrubescens* adapts its enzyme production to the composition of plant biomass. **Bioresource Technology**, v. 311, n. may, p. 123477, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123477>. Acesso em: 15 abr. 2024.
- FERNANDA, Caroline; OLIVEIRA, Bezerra De; BEZERRA, Raquel P. Uso de substratos agroindustriais para produção de delta-endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*. **Agroecologia e**

**Meio Ambiente**, v. 25, n. 2, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12661/pap.2020.007>. Acesso em: 15 abr. 2025.

FGV, Fundação Getúlio Vargas; CLB, Crop Life Brasil. **DESAFIOS E OPORTUNIDADES PARA O MERCADO PARA O MERCADO BRASILEIRO DE BRASILEIRO DE BIOINSUMOS**. [S.l: s.n.], 2024.

FIGUEIREDO, Márcia do V. B.; BURITY, Hélio A.; OLIVEIRA, José de P.; SANTOS, Carolina E. de R. e S.; STAMFORD, Newton. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura : textos de apoio e protocolos experimentais**. Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE : Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010.

GORNALL, Allan G. *et al.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Biology Chemical**, n. 177(2), p.751-66, 1949.

HARNPICHARNCHAI, Piyanun *et al.* Production of high activity *Aspergillus niger* BCC4525  $\beta$ -mannanase in *Pichia pastoris* and its application for mannooligosaccharides production from biomass hydrolysis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 12, p. 2298–2305, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1230003>. Acesso em: 15 abr. 2024.

IÇGEN, Yasemin *et al.* Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. **Research in Microbiology**, p.153:599 604, 2002.

LATHA, Selvanathan; SIVARANJANI, Govindhan; DHANASEKARAN, Dharumadurai. Response surface methodology: A non-conventional statistical tool to maximize the throughput of *Streptomyces* species biomass and their bioactive metabolites. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 567–582, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2016.1271308>. Acesso em: 15 abr. 2024.

LI, Yujie *et al.* Environmental Behaviors of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Insecticidal Proteins and Their Effects on Microbial Ecology. **Plants**, p. 1–18, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11091212>. Acesso em: 15 abr. 2024.

LIMA, Gláucia M. de S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 119–137, 2010.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**, 8 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., USA, p. 986, 1997.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016. eBooks Assinatura. (1 recurso online). ISBN 9788582712986. Disponível em: <https://www.sistemas.ufu.br/biblioteca-gateway/minhabiblioteca/9788582712986>. Acesso em: 15 ago. 2024.

MALDONADO-BLANCO, María Guadalupe *et al.* The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 671-674, 2003.

MANTOVAN, Janaina *et al.* Produção de Levana por *Bacillus subtilis natto* utilizando Melaço de Cana-de-Açúcar. **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**. p. 328–330, 2013.

MONNERAT, Rose *et al.* Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura, 2018. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, ISSN 0102-0110; 360. Disponível em: <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>. Acesso em: 15 abr. 2025.

PANAROTTO, Cíntia. **Influência de parâmetros operacionais, fontes protéicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis var. israelensi***. p. 99, 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

PEREIRA, Erlon L.; MARTINS, Bruna A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 714-734, ago./dez. 2016.

ROCHA, Patrícia M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como substrato**. p. 114, 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

ROWE, Gerald E. *et al.* Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 6, n. 1, p.

87-127, 1987.

SERRANO, Monica *et al.* Comunicação inter-celular durante a esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, v. 70, p. 22-32, 2001.

SILVA, Millena Da. Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. **Revista Brasileira de Ergonomia**. [S.l: s.n.], 2007. Disponível em:

<https://www.infodesign.org.br/infodesign/article/view/355%0Ahttp://www.abergo.org.br/revista/index.php/ae/article/view/731%0Ahttp://www.abergo.org.br/revista/index.php/ae/article/view/269%0Ahttp://www.abergo.org.br/revista/index.php/ae/article/view/106>. Acesso em: 15 abr. 2025.

SINGH, Samsheer *et al.* Valorization of sal deoiled cake as media for acidic amylase and invertase co-production by *Aspergillus niger* NJ-1: Optimization by response surface methodology and application in oligosaccharide synthesis. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2548–2561, 2015. Disponível em: <https://doi:10.1111/jfpp.12505>. Acesso em: 15 abr. 2024.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017. eBooks Assinatura. (1 recurso online). ISBN 9788582713549. Disponível em: [https://www.sistemas.ufu.br/biblioteca\\_gateway/minhabiblioteca/9788582713549](https://www.sistemas.ufu.br/biblioteca_gateway/minhabiblioteca/9788582713549). Acesso em: 15 ago. 2024.

VALICENTE, Fernando H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis* 105. p. 1–9, 2008. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, ISSN 1518-4269.

VIEIRA, Corina M. *et al.* Produção de biopesticida de *Bacillus thuringiensis* usando meio comercial de laboratório e meios alternativos agrícolas como fonte de nutrientes. v. 344, p. 1–5, 2006.

ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thaís B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 21, n. 2–3, p. 787–793, 1998.



