

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANA CAROLINA CAVALCANTE XAVIER

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE MANUTENÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* var.
*israelensis***

RECIFE

2018

ANA CAROLINA CAVALCANTE XAVIER

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE MANUTENÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* var.
israelensis**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel, orientado pela Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e co-orientado pelo Dr. José de Paula Oliveira.

RECIFE

2018

Bt; conservação; viabilidade.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

X3a Xavier, Ana Carolina Cavalcante
Avaliação de métodos de manutenção de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* / Ana Carolina Cavalcante Xavier. - 2018.
39 f.: il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. *Bacillus thuringiensis* 2. Microorganismos 3. Inseticidas
4. Pragas – Controle I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orient. II. Título

CDD 574

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE MANUTENÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* var.
*israelensis***

ANA CAROLINA CAVALCANTE XAVIER

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel. Defesa e aprovação em ___ / ___ / _____.

Doutora Ana Lúcia Figueiredo Porto
Professora associada da UFRPE

Doutor José de Paula Oliveira
Responsável Técnico do Laboratório de Biotecnologia do Instituto Agrônomo
de Pernambuco - IPA

Doutor José Manoel Wanderley Duarte Neto
Pesquisador Colaborador do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Wilson Xavier da Silva (*in memoriam*) e Maria do Socorro Oliveira, amados avós, que sempre me incentivaram a alçar voos mais altos e me ofereceram todas as possibilidades educacionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por toda educação, amor e fibra moral que me deram ao longo de toda minha vida;

A toda minha família, pelo amor, apoio e compreensão;

A Bruno Barros por não permitir que eu deixasse de acreditar em mim mesma e em tudo que eu sou capaz de fazer;

Aos meus amigos, por compreenderem e perdoarem minhas ausências em prol da minha graduação;

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) por me conceder todo o espaço e material necessários à conclusão do presente trabalho;

Ao Doutor José de Paula Oliveira por toda empatia, auxílio e paciência, e principalmente por me acolher tão gentilmente no laboratório de biotecnologia;

A Prof^a. Dra. Ana Porto, por toda gentileza e disponibilidade;

A Demócrito Barbosa por toda ajuda, conselhos e momentos de descontração;

A Maria Luiza Bastos por contribuir tão gentilmente com a obtenção dos resultados deste trabalho;

A minha estimada tutora e amiga Gilvanda Ribeiro, por ter sido minha fada madrinha, meu guia e amparo durante esse percurso.

RESUMO

Devido a crescente poluição ambiental e aumento de casos de problemas de saúde pelo uso indiscriminado de pesticidas químicos, inseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* vem sendo amplamente utilizado como um método alternativo de combate a pragas e vetores. *Bacillus thuringiensis* (ou Bt) é uma bactéria produtora de inclusões proteicas cristalinas que são tóxicas a várias espécies de insetos vetores e pragas, e inócuas aos seres humanos e animais. A manutenção adequada deste micro-organismo é fundamental para o sucesso das formulações, para tanto, o método deve garantir o maior rendimento de biomassa e deve ainda as proteínas por ele produzidas. Os métodos mais utilizados de manutenção são com o Bt mantido na superfície de discos de papel, em pellet congelado, repicagens contínuas, com a cultura liofilizada, e com a cultura mantida submersa em óleo mineral. Este trabalho teve por objetivo determinar o método que proporciona maior rendimento de biomassa bacteriana. Assim sendo, avaliou-se neste trabalho três métodos de manutenção de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (cepa H-14/ IPA-CAV-Bti-0008): em discos de papel, por congelamento do pellet a -20 °C e sob óleo mineral. Foram realizados cultivos em biorreator operando em batelada descontínua para cada um dos métodos avaliados. Amostras foram retiradas a cada duas horas para determinação da curva de crescimento do micro-organismo por densidade óptica (D.O). Os parâmetros analisados de pH, oxigênio dissolvido foram monitorados automaticamente por meio de eletrodos acoplados ao equipamento e inseridos no cultivo. O rendimento total da biomassa bacteriana foi determinado por meio do processo de floculação/sedimentação, com posterior secagem e determinação da massa seca. Ao final dos cultivos realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida para verificar o perfil das proteínas produzidas pelo bacilo em cada um dos três métodos. Obteve-se que o método de preservação em óleo mineral foi o mais eficiente no que concerne o maior rendimento de biomassa, apesar de os métodos de manutenção em disco de papel e do pellet congelado terem a vantagem de necessitar de menor espaço de armazenamento, risco de contaminação e custo.

Palavras-chave: Bt, preservação; rendimento de biomassa.

ABSTRACT

Due to the rising environment pollution and growth in the cases of health problems through the indiscriminate use of chemical pesticides, *Bacillus thuringiensis* based insecticides have been widely used as an alternative method to combat pests and vectors. *Bacillus thuringiensis* (also known as Bt) is a bacterium that produces crystalline protein inclusions which are very toxic to many insect vectors and pests, and harmless to humans and animals. The proper maintenance of this microorganism is fundamental for the formulation success, therefore, the method must guarantee the highest yield of biomass and must also preserve the proteins produced by it. The most commonly used maintenance methods are with the Bt kept on the surface of paper disks, in frozen pellet, continuous filings with the lyophilized culture, and with the culture kept submerged in mineral oil. This work had as objective to determine the method that provides greater yield of bacterial biomass. Thus, three methods of maintaining *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (cepa H-14/ IPA-CAV-Bti-0008): in paper disks, by freezing the pellet at -20 °C and under mineral oil. Cultures were carried out in a bioreactor operating in batch discontinuous for each of the evaluated methods. Samples were taken every two hours to determine the growth curve of the microorganism by optical density (O.D). The analyzed parameters of pH, dissolved oxygen were automatically monitored by means of electrodes coupled to the equipment and inserted in the culture. The total yield of the bacterial biomass was determined by means of the flocculation / sedimentation process, with subsequent drying and determination of the dry mass. At the end of the cultures a polyacrylamide gel electrophoresis was performed to verify the profile of the proteins produced by the bacillus in each of the three methods. It was obtained that the method of preservation in mineral oil was the most efficient with regard to the higher yield of biomass, although the methods of maintenance in paper disc and the frozen pellet have the advantage of needing less storage space, risk contamination and cost.

Keywords: *Bt*; preservation; biomass yield.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 METODOLOGIA.....	17
2.1 MICRO-ORGANISMO.....	17
2.2 REATIVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO.....	17
2.3 MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO.....	17
2.3.1 Preparo dos discos de papel.....	17
2.3.2 Preparo do pellet congelado.....	17
2.3.3 Manutenção da cultura em óleo mineral.....	18
2.4 PREPARO DO INÓCULO.....	18
2.4.1 Preparo do inóculo a partir da cultura mantida em disco de papel.....	18
2.4.2 Preparo do inóculo a partir da cultura mantida em pellet congelado.....	18
2.4.3 Preparo do inóculo a partir da cultura mantida em óleo mineral.....	19
2.5 PRODUÇÃO DA BIOMASSA.....	19
2.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	19
2.6.1 Determinação da concentração da suspensão bacteriana.....	20
2.6.2 Determinação do rendimento total de biomassa.....	20

2.7	AVALIAÇÃO PROTÉICA.....	20
2.7.1	Extração de proteínas.....	20
2.7.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1	ANÁLISE DO INÓCULO.....	22
3.2	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO.....	24
3.3	ACOMPANHAMENTO DAS VARIAÇÕES DE PH.....	28
3.4	RENDIMENTO DE BIOMASSA TOTAL.....	31
3.5	AVALIAÇÃO PROTÉICA	33
4	CONCLUSÃO.....	36
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Há mais de uma década que o Brasil vem sofrendo com surtos de enfermidades como Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela, Filariose e Malária. Males que causam grandes desconfortos e redução da qualidade de vida da população, sendo, portanto de grande interesse para a saúde pública. Tais doenças são veiculadas por insetos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, respectivamente (FORTTINI, 2002).

Além do interesse epidemiológico, há insetos que despertam ainda grande interesse agrícola e econômico, visto que, causam grandes perdas na produção de alimentos (ESTRUCH et al., 1997). Os danos à lavoura, causados por estes artrópodes, correspondem a uma redução de 20 a 30% na produção mundial de alimentos. As plantações que mais sofrem são as situadas em zonas tropicais, que contam com cerca de 67.000 espécies de insetos-praga (BOBROWSKI et al., 2003).

Os elevados índices de ocorrência desses vetores e pragas são ocasionados por diversos fatores como aspectos climáticos, geográficos, sócio-culturais e biológicos, com destaque para: curto ciclo de vida, alta capacidade reprodutiva e adaptação ao ambiente, que favorecem durante todo o ano o rápido desenvolvimento e proliferação desses insetos (REGIS, 2001).

O principal método empregado no controle das populações desses insetos a fim de proteger a população e as lavouras gira em torno do uso de inseticidas químicos (ANGELO et al., 2010). O investimento em inseticidas químicos para a proteção de plantações no mercado mundial é em torno de US\$ 28 bilhões, enquanto que no Brasil o custo aproximado é US\$ 9,7 bilhões, tendo sido vendidos 823 mil toneladas de agrotóxicos no ano de 2012 (ANVISA, 2009; SINDIVEG, 2016). O uso de tais sintéticos perdura há meio século, o que tem causado grandes prejuízos à saúde humana e ambiental (GILL et al., 1992). Ademais, há também prejuízos econômicos, pois mesmo com a grande movimentação no mercado de inseticidas, há ainda grandes perdas agrícolas (PEFERÖEN, 1997). Para minimizar estes danos, os setores da indústria e da pesquisa vem buscando alternativas para combater pragas e vetores, sem que estas causem males aos ecossistemas e à saúde pública.

O controle biológico foi utilizado pela primeira vez em 1919 por H.S. Smith, em que designou o uso de inimigos naturais para combater insetos-praga. Anos mais tarde, o termo aplicou-se a todas as formas de controle alternativas aos inseticidas químicos (FRANCO; CORRÊA, 2012). O controle biológico realizado por micro-

organismos tem se mostrado promissor no combate à proliferação de pragas e vetores, com a utilização destes entomopatógenos, nas formulações dos bioinseticidas. Esta alternativa resulta em menor risco para a saúde humana e ambiental, devido à alta especificidade pelo alvo, com baixa taxa de resistência (GALZER; AZEVEDO-FILHO, 2016).

Por outro lado, os inseticidas a base de microrganismos são mais susceptíveis aos fatores ambientais, como a rápida degradação do microrganismo pela luz UV, havendo também perda de estabilidade e limitada capacidade de ação. Essas desvantagens podem ser mitigadas com o desenvolvimento de boas formulações e estudos para aumentar a vida útil do produto (ALVES, 1998).

O principal microrganismo utilizado na produção de bioinseticidas é o *Bacillus thuringiensis* (Bt) (MONTIEL et al., 2001). O Bt foi descrito por Berliner em 1911, o isolou de cadáveres de traças-da-farinha (*Anagasta kuhniella*). Nomeou a bactéria como *Bacillus thuringiensis* em homenagem à província de Turíngia, na Alemanha, onde o bacilo foi encontrado e reportou a existência de cristais, porém a atividade destes ainda era desconhecida (POLANCZYK; ALVES, 2003; (UCSD, 2014).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria pertencente à família *Bacillaceae*, que conglomerada todas as espécies formadoras de esporos, como por exemplo *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. mycoides* (POLANCZYK; ALVES, 2003; ANGELO et al., 2010). É uma bactéria anaeróbia facultativa, quimioheterotrófica, que se desenvolve em temperaturas mesófilas (PEREIRA; MARTINS, 2016). Naturalmente, o bacilo pode ser encontrado no solo, em cadáveres de larvas de insetos, em ambientes aquáticos e folhas em decomposição (ARAÚJO, 2006).

Morfologicamente, a célula vegetativa é um bastonete móvel, gram positivo, com cerca de 1 µm de largura e aproximadamente 3 µm de comprimento. (ANGELO et al., 2010), que apresenta duas principais fases de ciclo de vida: a primeira consiste no crescimento, no qual as células vegetativas multiplicam-se por fissão binária; a segunda caracteriza-se pela fase de esporulação, em que as células vegetativas diferenciam-se em esporo que são a forma de resistência do bacilo (SABIÁ JUNIOR, 2015). Estes esporos apresentam formato ovóide, ficando geralmente na região para-central da célula-mãe (ANGELO et al., 2010).

Quando os esporos estão em um ambiente favorável ao crescimento celular, eles germinam e iniciam a multiplicação das células vegetativas (SABIÁ JUNIOR, 2015). Um evento importante da fase de esporulação de *Bt* é a formação do endósporo

e de cristais parasporais proteicos, que são fontes da entomopatogenicidade de *B. thuringiensis* (PEREIRA; MARTINS, 2016). Estes cristais foram denominados proteínas Cry, e são liberados ao final da esporulação, correspondendo cerca de 20 ou 30% do peso seco da célula (ARANTES et al., 2002; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Além das proteínas Cry, o Bt produz outras proteínas com atividade inseticida, tais como as proteínas Cyt e as proteínas VIP, que podem atuar isoladamente como toxina ou podem aumentar a toxicidade das proteínas Cry. Verificou-se que os esporos também podem auxiliar na patogenicidade das proteínas Cry, através de ações sinérgicas (LIMA, 2012).

Segundo Bechtel *et. al.* (1976), a fase III (Figura 1) marca o início da atividade entomopatogênica de *B. thuringiensis*. A formação do esporo e síntese das proteínas Cry seguem até o final da fase de esporulação, etapas que podem ser observadas na Figura 1.

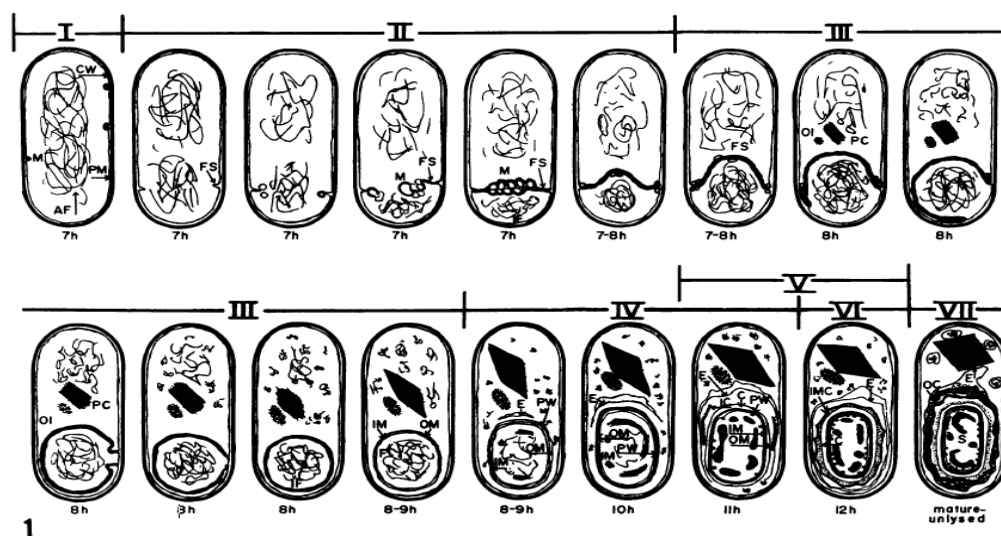


Figura 1. Diagrama esquemático das etapas de esporulação de *B. thuringiensis* (I - Formação dos filamentos axiais; II - Formação dos septos que envolvem o mesossomo; III - engulfamento do mesossomo e primeira aparição do cristal parasporal; IV a VI - Formação do exósporo, da parede celular primordial, do córtex e das camadas do esporo, seguidas da transformação do nucléolo; VII - Maturação do esporo). Fonte: Bechtel *et al.* (1976).

As proteínas Cry são geralmente codificadas por genes localizados nos plasmídeos bacterianos, raramente no cromossomo. Existe um banco de dados periodicamente atualizado, que classifica e define nomenclaturas para os atuais 436 tipos de proteína Cry. Somente no ano de 2008, foram descritos mais de 42 tipos de tais inclusões proteicas (CRICKMORE et al., 1998). Para que a proteína seja considerada como Cry, ela deve apresentar a formação do cristal parasporal, bem

como apresentar atividade tóxica no inseto alvo e ter sequências genéticas semelhantes a das proteínas Cry já descritas (ANGELO *et. al.*, 2010).

As proteínas Cyt, possuem atividade citolítica, apresentando afinidade para ácidos graxos insaturados na porção lipídica da membrana celular. Em outras palavras, as proteínas Cyt estão envolvidas com a formação de poros na membrana celular. São constituídas pelos grupos Cyt1 e Cyt2, onde a classe Cyt1 apresenta três tipos: Cyt1Aa, Cyt1Ab e Cyt1Ba, e a classe Cyt2 possui cinco subtipos: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca. Todas estas proteínas possuem atividade tóxica contra insetos da ordem Diptera, porém a proteína Cyt2Ca possui adicionalmente toxicidade contra coleópteros (LIMA, 2010).

As proteínas VIP ou proteínas inseticidas vegetativas (do inglês – “vegetative insecticidal proteins”) não formam cristais durante a fase de esporulação, nem são secretadas. Apesar do modo de ação não ser totalmente conhecido, sabe-se que a VIP3a se une às células do epitélio intestinal dos insetos na porção média e provoca a lise (LIMA, 2010).

Geralmente, a ação tóxica das proteínas Cry inicia-se quando o inseto alvo ingere o *Bt*. Os cristais são solubilizados no pH alcalino do intestino médio do artrópode, e liberam as proteínas na forma de protoxina. Estas são convertidas em polipeptídeos que atravessam a membrana peritrófica e se ligam a receptores específicos da membrana apical das microvilosidades do intestino. Esta interação resulta em um desequilíbrio osmótico e iônico do intestino, que tem sua permeabilidade aumentada pela formação de poros na membrana. O resultado é a lise celular pela grande absorção de água e a ruptura das células do intestino médio. Finalmente, ocorre a morte do hexápode devido a paralisação do aparelho digestório, inanição e sepse (GILL *et. al.*, 1992; ANGELO *et. al.*, 2010; POLANCZYK, 2003).

Até meados da década de 70, acreditava-se que o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) possuía espectro de ação restrito a lepidópteros, sendo usados exclusivamente contra pragas agrícolas. No entanto, em 1977, foi descoberto que o *B. thuringiensis* variedade *israelenses* (*Bti*) possuía atividade tóxica contra insetos da ordem Diptera, pela experimentação com larvar de mosquitos e de borrachudos. Após esta descoberta, houve um aumento na procura de estirpes que possuíssem toxinas ativas contra outras espécies de insetos (KIM, 1993). Hoje sabe-se que ação tóxica de *Bacillus thuringiensis* possui amplo espectro, afetando as ordens Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, e ainda alguns nematóides, ácaros e protozoários (LIMA,

2010). Incluem-se dentro da atividade tóxica de *Bt*, as pragas agrícolas *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Plutella xylostella* e vetores de doenças de importância mundial pertencente aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (SABIÁ JUNIOR, 2015; BOBROWSKI, 2003).

Em virtude dos benefícios biológicos demonstrados com os estudos acerca da atividade tóxica de *Bt* contra pragas e vetores, inúmeras indústrias do ramo de agrotóxicos e biotecnologia concentraram seus esforços em pesquisa e desenvolvimento de produtos à base de *B. thuringiensis*. (CAPALBO *et. al.*, 2005). Para o sucesso das formulações, a produção de *Bt* deve seguir alguns critérios indispensáveis, como a escolha da linhagem ideal, a estocagem adequada, o tipo de processo fermentativo, a recuperação dos cristais e esporos, a formação do produto final com posterior análise de qualidade (COUCH, 2000; ANGELO *et. al.*, 2010).

Diante do desenvolvimento biotecnológico e científico que gira em torno da produção de bioinseticidas e das pesquisas que utilizam o *Bacillus thuringiensis*, nota-se uma necessidade de garantir a sobrevivência das culturas, conservar suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas por meio de métodos adequados de manutenção. Neste contexto, a manutenção de *Bt* em coleções laboratoriais vem garantindo a sobrevivência, a estabilidade e pureza de linhagens durante longos períodos, empregando diversos métodos de manutenção e principalmente disponibilizando as culturas para a comunidade científica e tecnológica de diversos países (SOLA *et. al.*, 2012).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada pelas características do agente em estudo, assim como pelas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Para o estudo com células, tecidos e alguns microrganismos, há o desenvolvimento de metodologias mais adequadas à sua conservação, porém, observa-se um número reduzido de estudos abordando a manutenção de bactérias, principalmente para *Bacillus thuringiensis*.

O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo ao isolamento, pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características. Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de conservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da

técnica, da importância do acervo e principalmente na capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos (ABREU;TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Segundo COSTA e FERREIRA (1991), os métodos de manutenção de microrganismos podem ser classificados de acordo com tempo máximo de preservação, podendo ser de curto, médio ou longo prazo.

A manutenção em óleo mineral é considerada uma alternativa de médio prazo, que reduz o metabolismo celular pela redução do oxigênio dissolvido, através da adição de uma camada de óleo mineral estéril. Além de minimizar a taxa reprodutiva, este método reduz o ressecamento do meio de cultura e conserva os microrganismos por dois a três anos. No entanto, tem por desvantagens a facilidade de contaminação, dificuldades na esterilização e manuseio do óleo e instabilidade gênica. (SOLA, 2012).

O congelamento é um método de manutenção simples, eficiente e de baixo custo, que consiste em preservar o micróbio em temperaturas entre -4° C e -20° C. É um processo que não requer equipamentos sofisticados ou preparo prévio de material. Além de não causar grandes danos ao microrganismo, preservando a célula de três meses a dois anos através da redução de seu metabolismo. (SOLA, 2012).

A manutenção em papel é um tipo de preservação em longo prazo que mantém microrganismos esporuladores na superfície de discos ou tiras de papel. O método consiste na impregnação dos discos de papel com uma suspensão da bactéria de interesse e posterior secagem. É um método de baixo custo, de fácil manuseio e que exige poucos materiais e espaço para a estocagem. Por outro lado, pode haver limitações quanto à viabilidade dos microrganismos. (FINKLER, 2010).

Todos estes métodos permitem a elaboração de estudos retrospectivos e prospectivos, elucidando o estado biológico, etiologia e aspectos epidemiológicos. Entretanto, a escolha adequada de procedimentos de preservação, incluindo a aplicação de um ou a combinação de mais métodos, permite uma análise fenotípica e genotípica mais satisfatória, quando se pensa na conservação de microrganismos a longo prazo (GIRÃO et al., 2004). Independentemente do método adotado para a manutenção do microorganismo, existirão problemas de manutenção das linhagens. Haja vista, mostra-se essencial o monitoramento durante o cultivo e a busca de formas mais eficientes de manutenção, pois é de grande importância que a linhagem conserve seu potencial tóxico e velocidade de crescimento (LIMA et al, 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Comparar, entre três métodos, o mais adequado para a manutenção de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, visando à obtenção do maior rendimento de biomassa celular.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar três métodos de manutenção da cepa H-14 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, de acordo com a disponibilidade de equipamentos e capacidade laboratorial, que busquem assegurar a viabilidade do microrganismo;
- Realizar acompanhamento cinético dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* em biorreator, inoculados a partir dos diferentes métodos de conservação;
- Determinar, através de eletroforese, o perfil das proteínas do Bt em cada um dos métodos avaliados.
- Avaliar o rendimento total da biomassa obtida em cada método avaliado.

2. METODOLOGIA

2.1 MICRO-ORGANISMO

O trabalho foi realizado utilizando-se a linhagem H-14 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (IPA-0008-Bt-israelensis-CAV), pertencente ao Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Biotecnologia do Instituto Agrônomo de Pernambuco (LB/IPA), obtida do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV/UFPE).

2.2 REATIVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

A cepa H-14 de Bti, foi reativada no meio de cultura habitualmente utilizado pelo Laboratório de Biotecnologia do IPA, que se constitui de peptona de carne, sais e glicose. A composição do meio de cultivo utilizado está contida na Tabela 1. O cultivo foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, contendo 125mL de meio de cultura. A incubação ocorreu em mesa agitadora TECNAL® a 200 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 30 °C ± 1 °C, durante 72 horas. Após o crescimento e esporulação, iniciaram-se as manutenções do bacilo nos métodos selecionados: discos de papel, pellet congelado e submerso em óleo mineral.

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE PARA 100 ML
Peptona de carne	0,75 g
KH ₂ PO ₄	0,68 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0123 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,00017 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0014 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,002 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0147 g
Glicose 1%	1 g
Água destilada	Ajustar volume para 100 mL

Tabela 1. Composição do meio de cultura habitualmente utilizado no LB/IPA.

2.3 MANUTENÇÕES DO MICRORGANISMO

2.3.1 Manutenção da cultura em discos de papel

A manutenção em discos ou tiras de papel foi descrita por FINKLER (2010). Os discos de papel (gramatura ~200g/m²) com 0,5 cm de diâmetro, foram transferidos para placas de Petri e esterilizados em autoclave a 121°C durante 60min., posteriormente foram secos em estufa com ventilação Nova Ética® a 110°C por 2 horas. O ciclo de esterilização e secagem dos discos foi repetido por três dias consecutivos. A cultura foi mantida sob a forma de esporos na superfície dos discos de papel, impregnados com alíquotas de 20 µL da suspensão bacteriana (1,1x10¹⁰ esporos/mL), secos em estufa a 35 °C ± 1 °C durante 24 horas e mantidos sob refrigeração a 5 °C ±1 °C, durante cerca de 2 meses.

2.3.2 Manutenção da cultura Pellet Congelado

O líquido metabólico de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, obtido da reativação, foi centrifugado a 3074,5 xg por 25 minutos a 20°C. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em glicerol a 60% v/v esterilizado. A suspensão resultante foi submetida a choque térmico, de acordo com RIOS (1998), que consiste em banho-maria a 80° C durante 12 minutos, seguido por banho de gelo durante 5 minutos. Alíquotas de 1mL da suspensão bacteriana foram mantidas em tubos de polipropileno de 2mL, sob refrigeração a - 20°C, durante aproximadamente 2 meses (TORTORA et al., 2011).

2.2.3 Manutenção da cultura em Óleo mineral

Para a manutenção da cultura de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* submersa em óleo mineral, seguiu-se a metodologia descrita por FINKLER (2010). As colônias isoladas e puras do microrganismo foram repicadas em meio de cultura Ágar Nutritivo (AN) inclinado em tubos de ensaio (1.0 g/L extrato de carne, 5.0 g/L de peptona de carne, 25 g/L de agar, pH=7,0) e incubados em estufa (30°C) durante 72 horas. Após incubação e verificação da sua pureza, recobriu-se o cultivo com uma camada de aproximadamente 2 cm de óleo mineral esterilizado e a cultura foi mantida em temperatura ambiente (28 ± 1°C), por aproximadamente 15 dias antes da reativação.

2.3 PREPARO DO INÓCULO

A etapa de preparação do inóculo é de grande importância para o sucesso de um cultivo bacteriano. O preparo do inóculo na produção de *Bacillus* entomopatogênicos em larga escala necessitam de estágios múltiplos de crescimento e nesta etapa inicial deve garantir um bom crescimento vegetativo em um curto período de tempo a fim de diminuir o tempo da fase *lag*, caracterizada pelo período de adaptação do microrganismo às condições de cultivo. Geralmente os inóculos possuem a mesma composição do meio de cultivo dos fermentadores e em média representam 5% do volume total (ANGELO, 2010; FINKLER, 2010).

2.3.1 Preparo do inoculo a partir da cultura mantida em discos de papel

O inóculo foi preparado partindo-se de um disco de papel impregnado com a cultura esporulada. Foram utilizados frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 500 mL contendo 125 mL do mesmo meio de cultura utilizado na etapa de reativação, a pH 7,4. O inóculo foi cultivado durante 15 horas em mesa agitadora a 200 rpm e temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, como descrito por FINKLER (2010).

2.3.2 Preparo do inoculo a partir da cultura mantida em pellet congelado

Uma alíquota de 20 μL ($1,1 \times 10^{10}$ esporos/mL) da suspensão previamente descongelada foi transferida para frascos tipo Erlenmeyer (500mL) contendo 125 mL do meio de cultura contendo Peptona de carne, sais e glicose. O inóculo foi cultivado durante 15 horas, sob agitação de 200 rpm em mesa agitadora, a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Preparo do inoculo a partir da cultura mantida em óleo mineral

O óleo mineral foi vertido e descartado e, em seguida, a cultura foi inoculada em placa de Petri contendo meio Ágar Nutriente (AN). Após 72 horas de incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a cultura foi resuspensa em solução salina 0,85% esterilizada até atingir a concentração número 4 da escala de MacFarland. Em seguida, a alíquota de 20 μL ($1,9 \times 10^9$ esporos/mL) foi inoculada em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade para 500 mL contendo 125 mL do meio de cultura UG. O inóculo foi cultivado em mesa agitadora durante 15 horas, sob agitação de 200 rpm, a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.4 PRODUÇÃO DA BIOMASSA

A produção da biomassa e as condições de cultivo foram realizadas de acordo com o proposto por FINKLER (2010), com modificações. O cultivo de células do micro-organismo foi realizado em biorreator Tecnal[®] (modelo Bio-Tec-Pro), operando em batelada. Foi utilizado o mesmo meio de cultivo do inóculo, nas seguintes condições: $30 \pm 1^\circ\text{C}$, aeração de 1 vvm, agitação de 300 rpm, com monitoramento de pH, com controle de espuma e com uma concentração de inóculo de 5% (v/v). O tempo de cultivo foi de 72h. Amostras foram retiradas a cada 2 horas para determinação da concentração de células totais, esporos viáveis por meio de leitura em espectrofotômetro, enquanto que a variação de pH e DO_2 foi monitorada no próprio biorreator por meio de eletrodos imersos no meio de cultivo. Não foram realizadas réplicas devido à grande demanda de tempo e disponibilidade do equipamento.

2.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.5.1 Determinação da concentração da suspensão bacteriana

Para determinar as concentrações de células durante o cultivo de *B. thuringiensis*, realizou-se leituras em espectrofotômetro Gehaka[®] devidamente calibrado para as amostras coletadas. As absorbâncias das amostras foram medidas utilizando o comprimento de onda de 600nm, como o realizado por CAPALBO (2007).

2.5.3 Determinação do rendimento total

O cultivo bacteriano foi submetido ao processo de floculação/sedimentação pela redução do pH, conforme descrito por LUNA (2004). Um volume de 1L da biomassa floculada/sedimentada foi concentrado por centrifugação sob refrigeração na centrífuga Hermle[®] modelo Z513, a 1408,68 xg, 24°C durante 25 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi submetido ao processo de secagem em estufa OdontoBras[®] modelo EL 1.3, a 110°C durante 24h. Posteriormente, foi determinada a massa total do cultivo.

2.6 ANÁLISE PROTÉICA

Ao final de cada cultivo, foram reservados 50 mL do líquido metabólico em tubos de polipropileno com capacidade para 55 mL. Os tubos com as amostras foram mantidos a -80 °C em Nitrogênio líquido, para posterior extração de proteínas.

2.6.1 Extração de proteínas

As amostras previamente descongeladas foram submetidas à extração de suas proteínas de acordo com a metodologia de NETO et al. (2014), com modificações. Resumidamente, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 20min. a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e sedimento foi lavado com 2 mL de água Milli-Q estéril, centrifugado novamente e ressuspensão com 200 µL de água Milli-Q estéril. Adicionou-se 200 µL de uma solução de NaOH (0,6 M) e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas com 200 µL do tampão (60 mM Tris-HCl – pH 6,8; Glicerol a 5% v/v; 2-mercaptoetanol 4%; 2% SDS; azul de bromofenol 0,0025%) e tratadas termicamente em banho-maria durante 3 minutos. Após uma centrifugação a 5000 rpm por 5 min., o sobrenadante foi transferido a um novo tubo de polipropileno de 2 mL e mantido a 4 °C. O pellet resultante foi submetido ao procedimento anterior para obter-se um maior volume de material proteico. As proteínas foram precipitadas com acetato de amônio 10 mM gelado e centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos. As proteínas obtidas foram lavadas duas vezes com acetona a 80% e uma vez com etanol a 70%. O material foi seco em temperatura ambiente overnight. Após a secagem o pellet foi solubilizado em 200 µL do tampão contendo Ureia (8 M) e Tiourea (2 M). O material protéico foi mantido congelado a -20 °C, até o momento da eletroforese.

2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com LAEMMLI (1970). Os géis de poliacrilamida e as amostras preparadas foram inseridos em cuba de eletroforese vertical Loccus Biotecnologia® conectada a sua respectiva fonte elétrica. As composições dos géis de poliacrilamida estão contidas na Tabela 2.

Composição	Volume	
	Gel de separação	Gel de corrida
Água Milli-Q	12,35 mL	8,4 mL
Acrilamida	14,1 mL	1,3 mL
Tampão Thris-HCl 1,5 M; pH 8,8	8,8 mL	---
Tampão Thris-HCl 0,5 M; pH 6,8	---	3,2 mL
APS 10%	350uL	134 uL
Temed	35uL	13,4 uL

Tabela 2. Composição dos géis de poliacrilamida.

Das proteínas extraídas e armazenadas, retirou-se a alíquota de 20 μ L e transferiu-se para tubos de polipropileno com capacidade de 0,5 mL. Foram acrescentados 10 μ L do corante azul de Bromofenol e em seguida as amostras foram submetidas a 10 minutos de banho-maria a 80 $^{\circ}$ C. Em um dos poços formados, foram adicionados 4 μ L de um marcador de baixo peso molecular (14,4 – 97 kDa) e nos demais, adicionou-se 30 μ L de cada uma das amostras, em duplicata para cada método avaliado. A cuba de eletroforese foi preenchida até o nível máximo (aproximadamente 4,5 L) com a solução de corrida, composta pelo tampão de corrida e água destilada. A fonte elétrica foi ajustada para 400 V e 17mA na primeira meia hora, e em seguida ajustou-se para 400 V e 34mA, como recomendado pelo manual da cuba Loccus Biotecnologia[®].

Ao final da corrida, o gel foi retirado da cuba e lavado com a solução de fixação por 30 minutos. Em seguida, o gel foi transferido para a solução corante contendo azul de Coomassie, onde permaneceu durante 15 horas. Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada para retirar a solução corante. Não foi utilizada solução descorante. Por fim, o gel foi mantido em solução de preservação contendo ácido acético a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DO INOCULO EM ESPECTROFOTÔMETRO

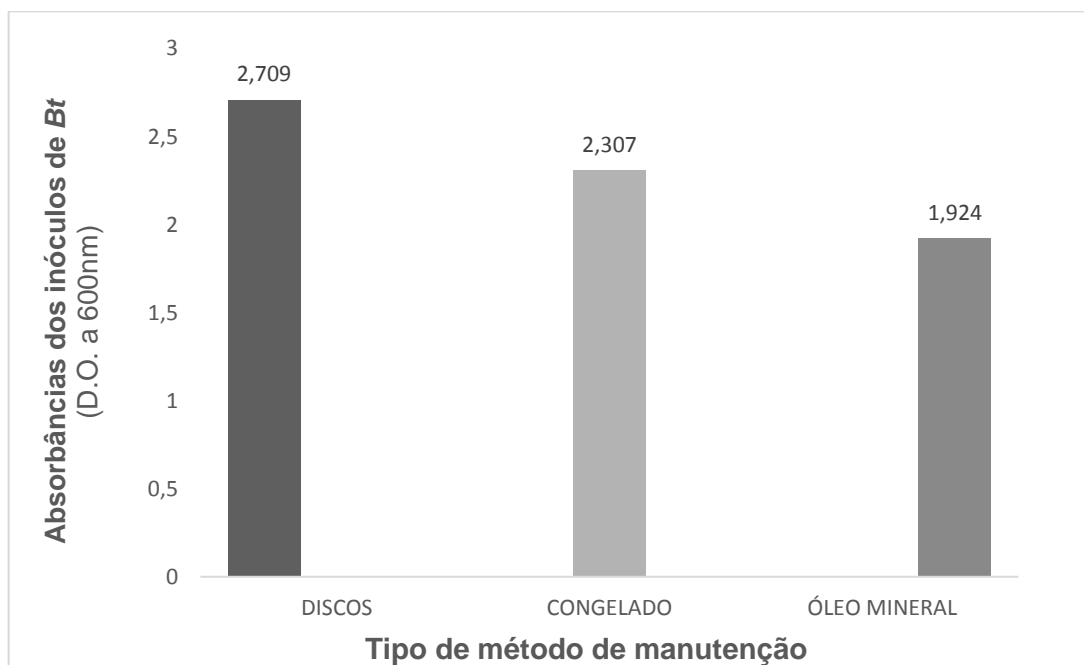


Figura 2. D.O. dos inóculos de *Bacillus thuringiensis* partindo-se dos diferentes métodos de conservação após 15h de fermentação em meio de cultura a base de Peptona de carne, sais e glicose.

A Figura 2 demonstra os valores em absorbância dos inóculos de *Bacillus thuringiensis* partindo-se dos diferentes métodos de conservação após 12h de fermentação em meio UG. Observa-se que o inóculo proveniente da cultura mantida em discos de papel obteve uma concentração (absorbância de 2,709 a 600nm) maior que a observada nos demais métodos, ao passo que o inóculo proveniente da cultura mantida submersa em óleo mineral obteve o menor valor de absorbância entre os três métodos. Os métodos de manutenção em discos de papel e em pellet congelado apresentaram valores de absorbância aproximados possivelmente porque as células partiram do mesmo cultivo.

Cordeiro (2009) realizou estudos sobre a obtenção de mutantes de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade contra larvas da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), e utilizou para os inóculos concentrações celulares com absorbâncias iniciais entre 0,2 e 2,0. A autora afirmou que alguns estudos consideram uma D.O de aproximadamente 2,0 como sendo a ideal para o cultivo de *B. thuringiensis*.

3.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EM BIORREATOR

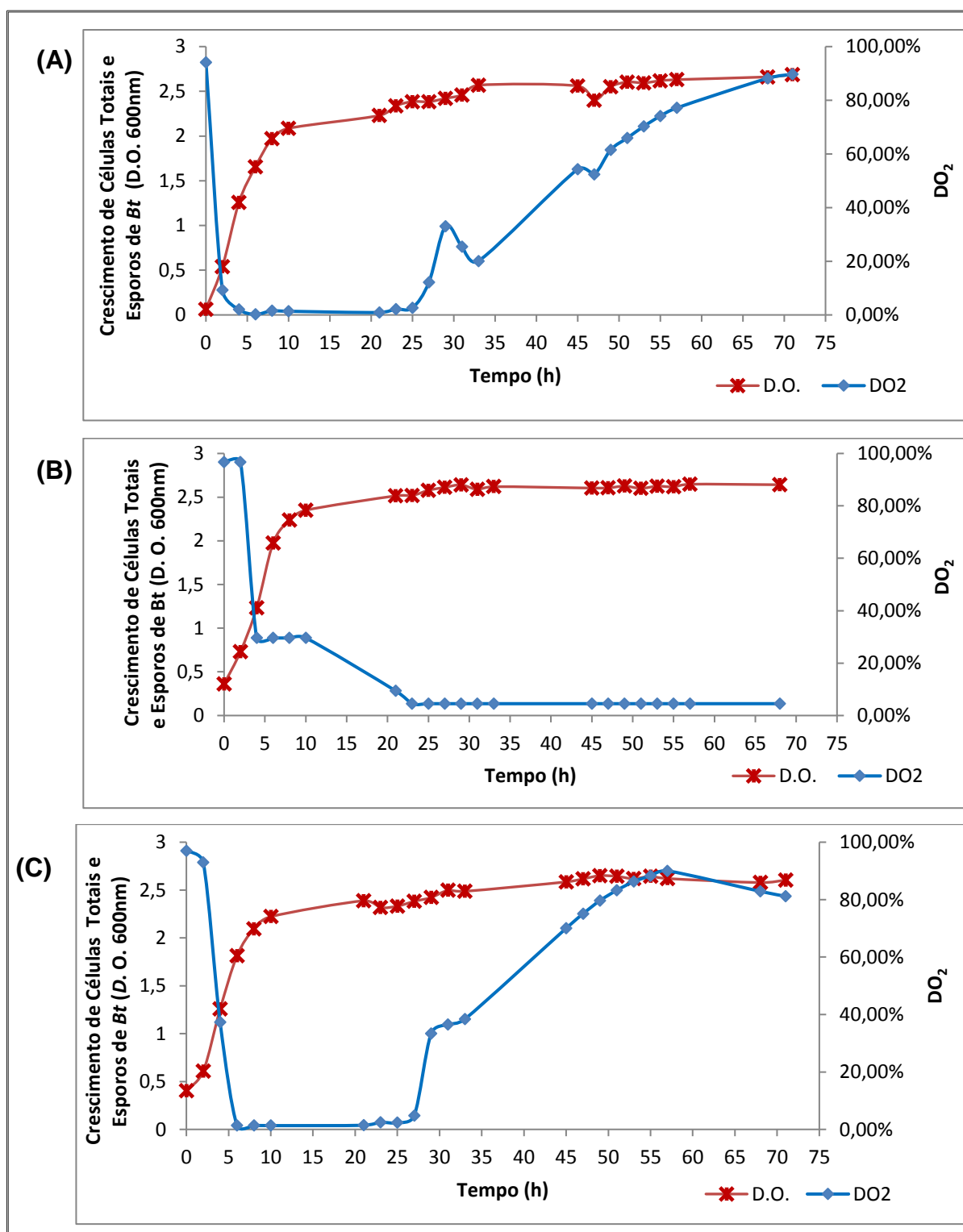


Figura 3. Taxas de oxigênio dissolvido (D.O₂) e cinéticas de crescimento dos cultivos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em meio de cultura a base de peptona de carne, sais e glicose, inoculado a partir dos métodos de manutenção em (A) disco de papel, (B) sob óleo mineral e (C) em pellet congelado.

Na Figura 3.A, na primeira hora do cultivo de *B. thuringiensis*, observa-se que o percentual de oxigênio dissolvido era de 94,17%, e houve redução, nas 2 horas seguintes, para 9,25%. Isto ocorreu, possivelmente, pela atividade metabólica do *Bt* em crescimento no meio de cultivo. Em 29 horas, ocorre um pico na D.O₂, que chegou a 33,02%, logo após, em 31 horas a taxa de DO₂ aumenta gradualmente, chegando ao percentual de 89,68% no final do processo. O aumento na taxa de oxigênio disponível coincidiu com fase estacionária e de esporulação de *Bt*.

A curva de crescimento exponencial obtida para o cultivo de *Bt* mantido em discos de papel demonstra ausência de fase *lag*, devido a multiplicação celular prévia ocorrida no inoculo. A fase *log* do crescimento ocorreu durante 31 horas de cultivo, apresentando densidade óptica máxima de 2,46. Às 33 horas de cultivo, iniciou-se a fase estacionária do crescimento celular, e a concentração celular obteve o valor máximo de absorvância de 2,59 em 51 horas de cultivo.

Durante o cultivo submerso de *Bacillus* é natural eu haja formação de espuma, devido a presença de proteínas provenientes da composição do meio de cultura, do metabolismo microbiano ou da lise celular durante o cultivo. A espuma pode ainda ser originada da produção de substâncias tenso ativas durante o cultivo (LUNA-FINKLER, 2012). Assim sendo, é necessário utilizar substâncias antiespumantes, a fim de evitar a formação de espuma. O controle de espuma deste estudo foi realizado automaticamente por meio de eletrodos acoplados ao biorreator, no entanto em 47 horas, houve uma falha neste sensor de espuma do equipamento, acarretando em um extravasamento de espuma. De acordo com RIOS (1998), as células de *Bt* são hidrofóbicas e, naturalmente, ligam-se a bolhas de ar formadas na interface ar-líquido, o que resulta na perda de biomassa em casos de extravasamento. Este comportamento das células de *Bacillus thuringiensis* durante o cultivo submerso pode justificar a redução da absorvância da amostra retirada em 47 horas de cultivo. Após o ocorrido houve recuperação do crescimento e retorno à fase estacionária.

A Figura 3.B elucidada o consumo de oxigênio e a densidade ótica (expressa em absorvância) das células viáveis e esporos de *Bacillus thuringiensis* durante o cultivo em biorreator realizado a partir da cultura mantida submersa em óleo mineral. Nas duas primeiras horas do cultivo, a taxa de oxigênio dissolvido disponível no meio de cultura contendo o *Bacillus thuringiensis* proveniente da manutenção em óleo mineral era de 96,66%. Em 4 horas de cultivo, houve uma redução da disponibilidade de oxigênio à 29,59%, a qual foi mantida durante as 6 horas seguintes. Após 21 horas de

cultivo observa-se uma redução no percentual de D.O₂ para 4,52%, taxa na qual se manteve até o final do processo. A curva gráfica obtida para D.O₂ apresentou este comportamento possivelmente devido a falhas de leitura causada pelo mau funcionamento do sensor do equipamento durante o cultivo em óleo mineral.

Observa-se a presença de células viáveis e de esporos desde o início do cultivo, provavelmente originadas do inóculo, o que explica a ausência da fase *lag* do crescimento exponencial. A fase *log* teve duração de 10 horas, apresentando a absorvância máxima de 2,35. A fase estacionária se inicia após 10 horas de cultivo, mantendo-se com densidades óticas em torno de 2,65 em 49 horas de cultivo.

A Figura 3.C ilustra a densidade ótica (D.O) expressa em absorvância de células totais e esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis*, e o percentual do consumo de oxigênio dissolvido (D.O₂) durante o cultivo em meio UG inoculado a partir da cultura mantida em pellet congelado. Nas primeiras horas de cultivo houve redução dos níveis de oxigênio dissolvido de 97% na primeira hora, para 1,36% após 6 horas. A taxa de D.O₂ manteve-se com baixos percentuais durante 19 horas, aumentando a partir das 27 horas de cultivo. Em 57 horas de cultivo, a taxa de D.O₂ encontra-se em torno de 90% e diminui nas próximas 13 horas, apresentando ao final do cultivo, 81,16% de oxigênio dissolvido.

A fase *log* iniciou-se imediatamente após a inoculação de *B. thuringiensis* proveniente da cultura mantida em pellet congelado, e durou cerca de 21 horas. A amostra retirada na primeira hora de cultivo apresentou absorvância de 0,5, ao passo que a última amostra da fase de multiplicação bacteriana resultou em 2,38 de absorvância. Após 21 horas de cultivo, teve início a fase estacionária do crescimento exponencial de *Bt*. Em 27 horas de cultivo, o crescimento bacteriano atingiu a absorvância máxima de 2,65 e permaneceu com valores de absorvância entre 2,4 e 2,6 até o final do cultivo.

Os três métodos avaliados apresentaram concentrações celulares com valores máximos de absorvância aproximados (2,6), no entanto, diferiram no tempo necessário para atingir esta máxima concentração. Os métodos de manutenção obtiveram resultados diferentes para a manutenção da velocidade de crescimento do micro-organismo. No método de manutenção de *Bacillus thuringiensis* em discos de papel, foram necessárias 51 horas de cultivo para que a concentração celular chegasse a valores de 2,6 em absorvância. Nos cultivos originados a partir dos métodos de manutenção em pellet congelado e com a cultura submersa em óleo

mineral, o tempo decorrido para que a absorvância resultasse 2,6 foi de, respectivamente, 49 e 27 horas. Assim, levando-se em consideração o tempo para que a concentração celular seja máxima, o método de manutenção de *B. thuringiensis* em óleo mineral demonstrou melhor preservação da velocidade de crescimento.

Capalbo (2007), ao descrever a produção de bactérias utilizadas no biocontrole, afirmou que as etapas de crescimento celular alteram a refração luminosa, sendo a leitura em espectrofotômetro da absorvância um parâmetro importante para determinar a curva de crescimento bacteriano. A autora também afirma que alguns estudos, obtiveram valores máximos de absorvância entre 0,9 e 1,5 ao final dos processos fermentativos (cerca de 50 horas de cultivo). Os valores de densidade ótica máxima (expressas em absorvância) obtidos no presente estudo (2,6) foram superiores aos relatados por Capalbo (2007), porém com o intervalo de tempo semelhante.

Lorenzini (2012) estudou a transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus* e relatou que em cerca de 12 horas de cultivo, estabeleceu-se a curva logarítmica da concentração celular em termos de biomassa, havendo concomitantemente o decréscimo da concentração de oxigênio nesse mesmo período; isso se deve ao amplo consumo do substrato e a grande demanda de oxigênio devido ao aumento no número de células durante o crescimento exponencial, levando a uma redução na concentração de oxigênio dissolvido. Segundo a autora, estes parâmetros permitem a análise da atividade metabólica celular dos *Bacillus* esporulantes no processo de fermentação. Maldonado-Blanco, Romero e Galán-Wong (2003) avaliaram a influência do fluxo de oxigênio combinado com a frequência de agitação na produtividade e toxicidade de *Bti* e indicaram que há uma melhor produção de endotoxinas quando o oxigênio dissolvido está acima de 26%. Este valor é conseguido com uma agitação de 300 rpm e aeração de 1vvm ou 500 rpm e 0.6vvm, para *B. thuringiensis* var. *israelensis* em um fermentador de 5 litros.

No presente estudo, observa-se uma taxa de D.O₂ muito abaixo do percentual de 26% estabelecido por Maldonado-Blanco, Romero e Galán-Wong (2003), o que pode ter influenciado negativamente o crescimento do bacilo e a produção de suas endotoxinas. Concomitantemente, os baixos níveis de D.O₂ podem ter reduzido o tempo de crescimento logarítmico à metade do tempo de crescimento obtido por Lorenzini (2012).

3.3 AVALIAÇÃO DO pH DURANTE O CULTIVO DE *B. thuringiensis* var. *israelensis* EM BIORREATOR

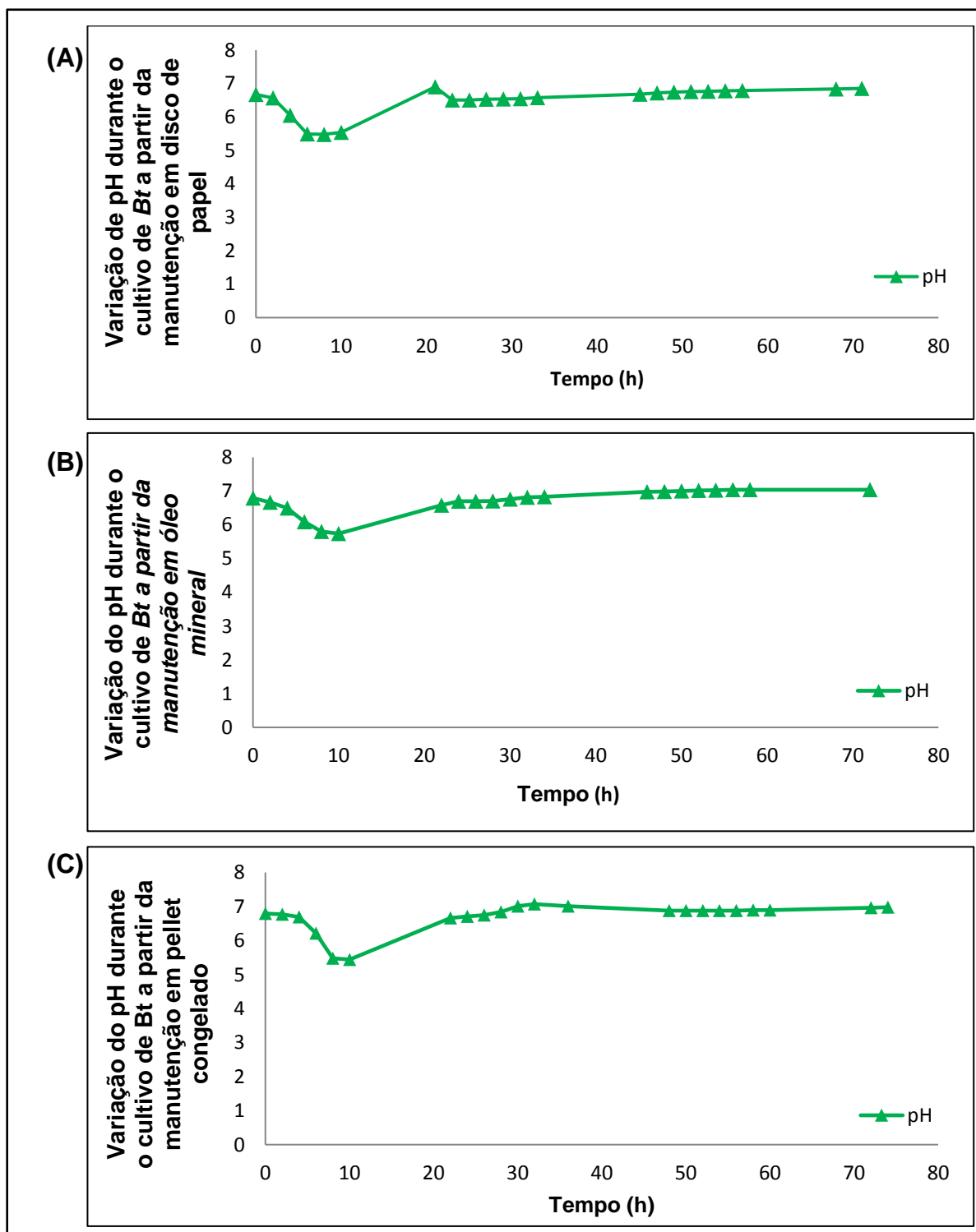


Figura 6. Variação do pH durante os cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio de cultura a base de peptona de carne, sais e glicose, inoculado a partir dos métodos de manutenção (A) disco de papel, (B) sob óleo mineral e (C) em pellet congelado,

Os valores de pH obtidos ao longo dos cultivos realizados para os três métodos de manutenção avaliados estão representados na Figura 4 (A, B e C). O crescimento

otimizado de *Bacillus thuringiensis* ocorre em uma faixa de pH entre 6,5 e 7,5, sendo este um parâmetro acompanhado durante todo o processo fermentativo e que caracteriza as fases de crescimento e esporulação (FINKLER, 2010).

A Figura 4.A demonstra as variações do pH durante o cultivo de *B. thuringiensis* inoculado a partir do disco de papel. Nota-se que nas primeiras 21 horas do processo houve variação entre 5,48 e 6,9. Após 23h o pH manteve-se em torno de 6,6 e, ao final do processo fermentativo o valor obtido para o pH foi de 6,85.

Na Figura 4.B, observa-se a curva de pH para a fermentação com inoculo a partir do óleo mineral. Observa-se que nas primeiras 10 horas do processo o pH reduz gradualmente à acidez, partindo de 6,9 para 5,74. Após as 10 horas o potencial hidrogênio-iônico ascende para 6,66, e mantém-se com valores próximos à neutralidade até o final do cultivo.

Na Figura 4.C, estão contidos os valores do pH ao longo do cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, inoculado a partir do pellet congelado. Nota-se que há uma redução do pH nas primeiras 10h, descendendo de 6,79 para 5,44. Após as 10 horas, há um aumento do pH que se aproxima da neutralidade, e mantém-se com pouco variável nas horas seguintes. Ao final do cultivo de *Bt* partido da manutenção em pellet congelado, com 72 horas de cultivo, o valor obtido para o pH foi de 6,98.

Como descrito por Berbert-Molina (1998), o cultivo de *Bti* pode ser dividido em quatro fases, em que na fase I, (entre 1 e 5 horas de cultivo) há acidificação do meio cultivado devido a redução do pH pela produção de ácidos orgânicos; na fase II (entre 5 e 13 horas de cultivo), que é a fase de transição entre a multiplicação vegetativa e a esporulação, ocorre a elevação do pH; nas fases III e IV, o pH eleva-se até o final do cultivo.

Segundo Ângelo et. al. (2010), é comum que hajam variações do pH nas primeiras horas de fermentação em culturas de *Bacillus thuringiensis* que iniciam o processo fermentativo com pH neutro. Os autores também ressaltam que a redução do pH no início do processo tende a valores ácidos, enquanto que ao final os valores tendem a alcalinidade. Essa característica da curva de pH não foi observada neste estudo, pois de acordo com MURREL (1967), os meios de cultivo para *Bacillus* que contam com a glicose como fonte de Carbono, são marcados por uma redução acentuada no pH devido a conversão do açúcar em ácidos orgânicos. A utilização desses ácidos associados aos compostos amoniacais produzidos, resultam na

elevação do pH à neutralidade, o que explica a não alcalinização do meio de cultura durante o cultivo.

De acordo com Pereira e Martins (2016), há controvérsias quanto a faixa ótima de pH a ser utilizada durante o cultivo. Normalmente emprega-se o pH constante, visto que alguns pesquisadores consideram as variações prejudiciais à produção. No entanto, há estudos que indicam que as variações naturais do pH podem proporcionar melhorias no crescimento celular.

3.4 RENDIMENTO TOTAL DE BIOMASSA

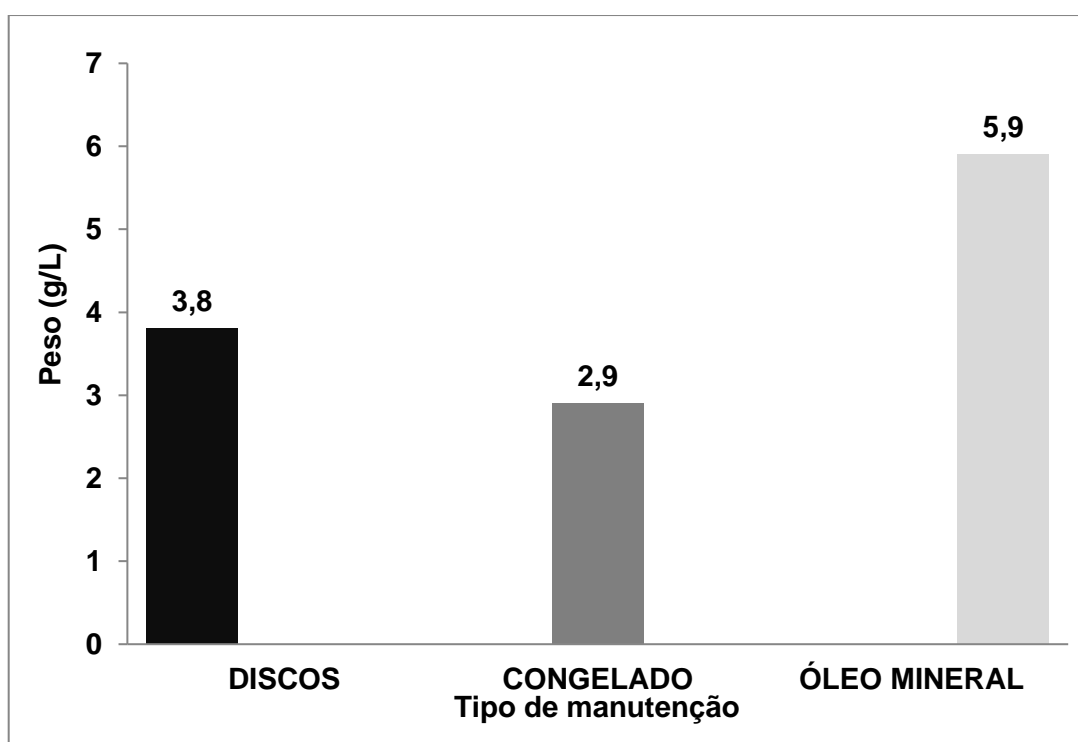


Figura 5. Rendimento da biomassa de *Bacillus thuringiensis* em meio UG inoculado a partir diferentes métodos de manutenção.

A Figura 5 demonstra o rendimento da biomassa de *Bacillus thuringiensis* em meio UG inoculado a partir dos diferentes métodos de manutenção. Em todos os métodos a biomassa resultante foi obtida a partir de 5 litros de caldo fermentado em escala laboratorial, em que se obteve um rendimento de 5,9 g/L para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* em meio UG inoculado a partir da cultura mantida em óleo mineral. Para o cultivo de *B. thuringiensis* em meio UG inoculado a partir da cultura mantida em discos, obteve-se um rendimento de 3,8 g/L; 2,9 g/L foi o rendimento resultante para o cultivo em meio UG inoculado a partir do pellet congelado.

Para separação e recuperação da biomassa optou-se no presente trabalho, utilizar o método da floculação/sedimentação gravitacional seguido por centrifugação,

técnica caracterizada por recuperar os sólidos em suspensão de maneira eficiente pela diminuição do pH, como descrito por Luna (2004). Segundo a autora, a acidificação do meio de cultivo com pH em torno de 3,0 favorece a hidrofobicidade e a agregação das células de *Bacillus*. Isso ocorre devido a presença de um ponto isoelétrico entre as cargas negativas da superfície da parede celular dos microrganismos e a acidez do meio. Desse modo, a superfície bacteriana carregada negativamente promove a interação das células com os prótons do meio de cultivo, ocasionando a agregação das células em suspensão.

O método de manutenção do *B. thuringiensis* submerso em óleo mineral proporcionou um rendimento de biomassa (g/L) cerca de duas vezes maior que o método de manutenção em disco de papel, mesmo apresentando menor valor de absorvância no inoculo. Apesar disso, de acordo com SOLA (2012) e com FINKLER (2010), o método de manutenção em discos de papel é de fácil manipulação, possui um custo econômico menor, apresenta menor de espaço de armazenamento e risco de contaminação.

O método de manutenção em pellet congelado proporcionou o menor rendimento de biomassa (g/L) em comparação com os métodos de manutenção em discos de papel e sob óleo mineral, isso ocorreu possivelmente devido ao processo lento de congelamento (-20° C) que pode ter provocado a ruptura das células bacterianas durante a formação dos cristais de gelo, mesmo com a adição crio protetora do glicerol a 60% (v/v). Apesar de ser um método de manutenção que exige menos manipulação, menor espaço de armazenamento e custo aos laboratórios, este método não é recomendado quando a finalidade do *B. thuringiensis* for a produção de bioinseticidas, devido à baixa recuperação de biomassa apresentada por este estudo.

Medeiros (2005), descreveu a produção e formulação de comprimidos de *Bacillus* entomopatogênicos, destacando que para 5L de caldo fermentado conseguiu-se recuperar em torno de 3 g/L de pó primário. Comparando os valores de rendimento obtidos por Medeiros (2005), e o resultado obtido no presente trabalho, observa-se um resultado superior uma vez que o meio de cultivo utilizado por Medeiros (2005) apresenta elevados teores de componentes insolúveis dispersos, enquanto que o meio de cultura empregado neste trabalho não contém sólidos em suspensão.

3.5 PERFIL PROTEÍCO DE *Bacillus thuringiensis* NOS MÉTODOS DE MANUTENÇÃO AVALIADOS

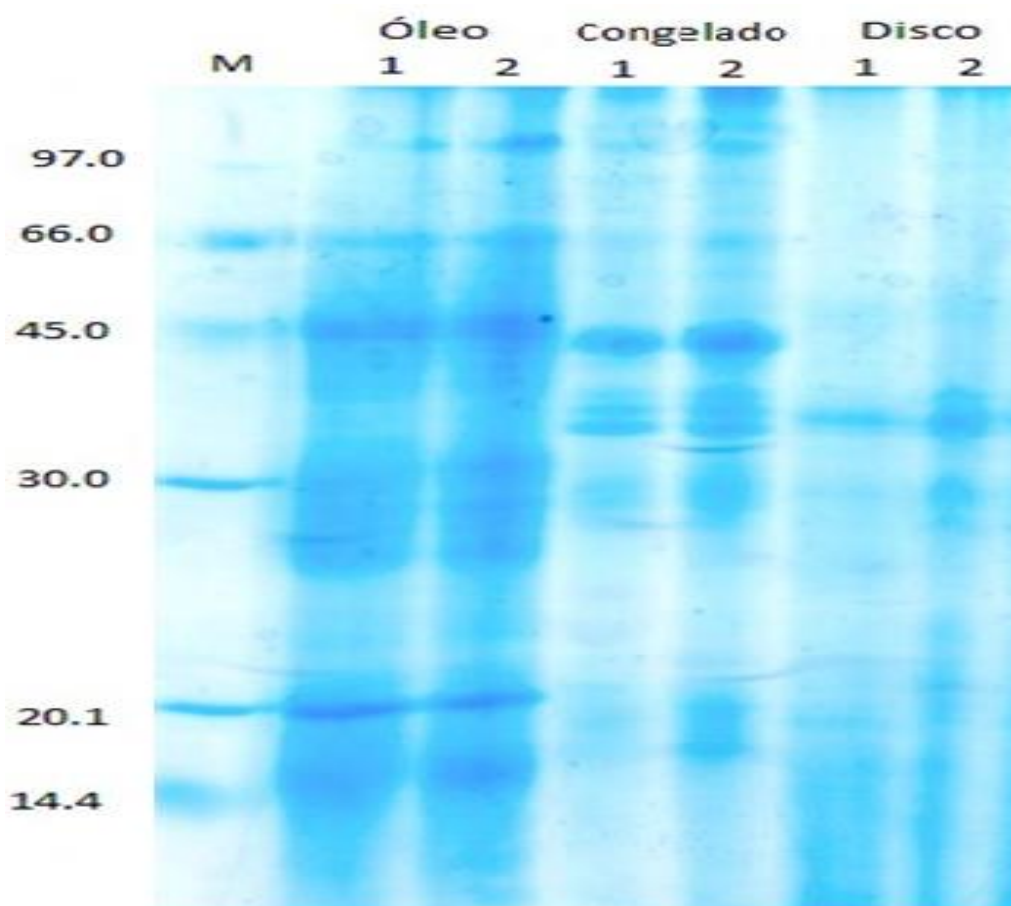


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando o perfil proteico obtido do cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, a partir de cada um dos métodos de manutenção avaliados; M – Marcador de baixo peso molecular; Óleo 1 e 2, congelado 1 e 2 e Disco 1, 2- Proteínas marcadas pelas amostras provenientes dos cultivos com inoculo a partir das manutenções em óleo mineral, em pellet congelado e em discos de papel, respectivamente.

A eletroforese realizada em gel de poliacrilamida, contida na Figura 6, permitiu identificar o perfil das proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cada um dos métodos avaliados. Observam-se que proteínas com diferentes pesos moleculares foram coradas.

Nas amostras do cultivo inoculado com a cultura mantida submersa em óleo mineral (óleo 1 e 2), observa-se que foram coradas diversas proteínas, porém as proteínas cujos pesos moleculares são de 97, 66, 45, 30 e 14.4 kDa apresentaram coloração mais forte no gel.

A amostra da cultura mantida em pellet congelado, representadas por congelado 1 e 2, obtiveram pesos moleculares semelhantes aos observados na amostra proveniente da cultura mantida sob óleo mineral, no entanto percebe-se que

algumas proteínas apresentaram pesos moleculares diferentes, formando perfis de proteínas diferentes das observadas para a manutenção em óleo mineral.

A amostra do cultivo de *Bacillus thuringiensis* cujo inoculo foi proveniente da manutenção em disco de papel, apresentou proteínas coradas na faixa dos 30 kDa de peso molecular.

Lima (2010) descreveu as proteínas bioinseticidas produzidas por *Bt* e afirmou que as proteínas Cyt da classe 2 (Cyt2) apresentam massa molecular de baixo peso, variando entre 27 e 30 kDa. Nesta classe estão contidas 5 proteínas e todas elas são tóxicas para insetos da ordem Diptera. Desse modo, há possibilidade de que as proteínas Cyt2 tenham sido marcadas na eletroforese realizada para os *Bacillus thuringiensis* provenientes dos três métodos de manutenção avaliados.

Medeiros *et al.* (2005) testaram estirpes de *Bacillus thuringiensis* que causam mortalidade em traças-da-crucífera (*Plutella xylostella*) e observaram que algumas das proteínas Cry apresentam perfil proteico com pesos moleculares de entre 30 e 130 kDa, dos quais houveram proteínas de 30 e 45 kDa que eram codificadas por genes das variações de Cry 1 e 2. Isto posto, pode-se considerar a possibilidade de que algumas das proteínas coradas no presente estudo são das classes Cry1 e Cry2.

Sabiá Junior (2015) realizou estudos de detecção e caracterização de proteínas Parasporinas em *B. thuringiensis*, que também são constituintes da toxicidade do bacilo. De acordo com o autor, cada classe de tais proteínas possuem um peso molecular diferente: A parasporina 1, apresenta peso molecular de 81 kDa; a parasporina 2, possui 37 kDa; a parasporina 3 tem 88 kDa de peso molecular; por fim, as parasporinas 4, 5 e 6 possuem 34 kDa cada. Assim sendo, é possível que tais proteínas possam ter sido marcadas nos perfis proteicos obtidos de *Bacillus thuringiensis* provenientes dos métodos de manutenção avaliados neste estudo.

4. CONCLUSÃO

A manutenção do *Bacillus thuringiensis* submerso em óleo mineral mostrou-se mais eficiente, apresentando o maior rendimento de biomassa total, maior viabilidade e velocidade de crescimento.

A manutenção em pellet congelado não obteve o melhor rendimento de biomassa total. A manutenção do *Bt* em discos de papel obteve bom rendimento de biomassa total quando comparado ao rendimento obtido na manutenção sob óleo mineral. Porém, a eletroforese realizada não elucidou se houve preservação do potencial tóxico na manutenção em discos de papel, sendo necessários novos estudos.

Apesar disto, os métodos de manutenção em discos de papel e em pellet congelado são de simples manipulação, apresentando menor custo econômico e espaço de armazenamento, assim como menor risco de contaminação. Desse modo, são necessários estudos para o desenvolvimento de técnicas que visem maximizar o rendimento de biomassa e a preservação das proteínas entomopatogênicas produzidas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mantidos por esses métodos.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1998. 1163 p.
- ANGELO, Elisângela Andrade; VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade; CASTRO-GÓMEZ, Raúl Jorge Hernan. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, abr. 2010
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Reavaliação de agrotóxicos: 10 anos de proteção a população**. Brasília, DF. Publicação em 2 de abril de 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias>
- ARAÚJO, Ana Paula. **Avaliação de um biolarvicida a base de Bacillus thuringiensis sorovar israelensis, desenvolvido no Brasil, para controle de Aedes aegypti (Diptera: culicidae)**. 2006. 95 f. Dissertação (mestrado em biologia animal) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2006.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILASBÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, 2002. p. 269-293.
- BECHTEL, D.B., BULLA, L.A. Jr. Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of bacteriology**. v 127, p. 1472 – 1481, 1976.
- BERBERT-MOLINA, M.A. (1998). Estudo da influência do suprimento de oxigênio e da concentração de glicose sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS 82 em regime descontínuo. **Tese de doutorado**. Área de Tecnologia em Fermentações, Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil.
- BOBROWSKI, Vera Lucia et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 843-850, set. 2003.
- CAPALBO, Deise Maria Fontana et al. *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 8, n. 34, p. 76-83, jun. 2005.
- CAPALBO, Deise Maria Fontana. Produção de bactérias para uso no controle biológico. In: SANHUEZA, Rosa Maria Valdebenito; MELO, Itamar Soares de. **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos** . 1. ed. Bento Gonçalves - RS: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p. 97-102.
- CORDEIRO, Juliana Xavier. **Obtenção de mutantes de Bacillus thuringiensis por inserção do transposon Tn-5 e avaliação da toxicidade frente a larvas de Spodoptera frugiperda** . 2009. 65 f. Dissertação (Pós-graduação em microbiologia veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94948>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

COUCH T. L. **Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria.** In: CHARLES, J. F. (Org.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications.* New York: Kluwer Academic Publishes, 2000. p. 297-316.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology review**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

ERNANDES, Samara; MORAES, Iracema de Oliveira. Utilização de sangue de abatedouros para produção de bacillus thuringiensis por fermentação submersa. **HOLOS environment**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 60-66, nov. 2000.

ESTRUCH, J.J., et al. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, v.15, p.137- 141, 1997.

FORTTINI OP. Família Culicidae: Introdução. In: Forttini OP. **Culicidologia Médica.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2002.

FINKLER, Christine Lamenha Luna et al. Técnicas biotecnológicas aplicadas à agricultura: **Produção de Biolarvicidas à base de Bacillus sphaericus e Bacillus thuringiensis var. israelensis para o controle de insetos.** In: Biotecnologia Aplicada à Agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais / editores técnicos: Marcia do Vale Barreto Figueiredo, Hélio Almeida Burity, José de Paula Oliveira, Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Newton Pereira Stamford.. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010. cap. 1, p. 608-624. v. 1.

FRANCO, R.; CORRÊA, T. Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp . israelensis para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero Avaliação da Toxicidade de Proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp . israelensis para dif. 2012.
GALZER, E. C. W.; AZEVEDO-FILHO, S. W. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **RICA - Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 01, n. August, 2016.

GILL, Sarjeet S.; COWLES, Elizabeth A.; PIETRANTONIO, Patricia V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Reviews Entomology**, [S.l.], v. 37, p. 615-634, 1992.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 350 p.

KIM, L. *Advanced Engineered Pesticides: Technology and Engineering.* New York: Marcel Dekker Inc., 448 p., 1993.

LIMA, Gláucia Manoella de Souza. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife - PE, v. 7, p. 119-137, jan. 2010.

LORENZINI, Giulia Carli. **Estudo da transferência de oxigênio em cultivo de Bacillus megaterium**. 2012. 55 f. Monografia (diplomação em engenharia química)-Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

LUNA, Christine Lamenha. (2004). Avaliação de técnicas de separação sólido-fluido na produção de bioinseticidas a partir de Bacillus sphaericus e Bacillus thuringiensis var. israelensis. **Tese de doutorado**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LUNA-FINKLER, Christine Lamenha; FINKLER, Leandro. Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters. In: PERVEEN, Dr Farzana (Org.). **Insecticides - Advances in Integrated Pest Management**. [S.l.]: InTech, 2012. cap. 27, p. 613-626. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/insecticides-advances-in-integrated-pestmanagement/bacillus-sphaericus-and-bacillus-thuringiensis-to-insect-control-process-development-of-smallscale>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

MALDONADO-BLANCO, María Guadalupe; ROMERO, Gustavo Solís; GALÁN-WONG, Luis Jesús. 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**, [S.l.], 02 abr. 2003. 19, p. 671. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025198502452>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

MEDEIROS, Patrícia Teles et al. Seleção e caracterização de estirpes de Bacillus thuringiensis efetivas no controle da traça-das-crucíferas Plutella xylostella. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília - DF, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, nov. 2008.

MONTIEL, M. I. T.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Water Research**, New York, v. 35, p. 3807-3816, 2001.

MURREL, W. G. The biochemistry of the bacterial endospore. In: *Advances in Microbial Physiology*. p. 133. Acad. Press. 1967.

NETO, Aduino Gomes Barbosa, et al. Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant Dekkera bruxellensis. **Journal of Proteomics**, [S.l.], v. 104, p. 104-111, jun. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914001365>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

PANAROTTO, Cintia. **Influência de parâmetros operacionais, fontes proteicas e substratos energéticos sobre o cultivo de Bacillus thuringiensis var. israelensis**. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - pós-graduação em biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS, 2006. 1. Disponível em: <<https://repositorio.ucs.br/handle/11338/169>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.15, p.173-177, 1997.

POLANCZYK, R. & ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**. v. 2, n. 2, p. 1-10, 2003.

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

REGIS L, SILVA-FILHA MH, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES JF. **Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors**. Trends Parasitol. 2001.

RIOS, E. M. **Recuperação de esporos de *Bacillus sphaericus* em meio fermentado**. 1998. 106 p. Tese de Doutorado. Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SABIÁ JUNIOR, Elias Ferreira. **Deteção e Caracterização de Proteínas Parasporinas em *Bacillus thuringiensis***. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2015. 1.

SCHNEPF, H.E, CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review** 62:775–806. 1998.

SINDIVEG –SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. Disponível em:<<http://sindiveg.org.br/>>. Acesso em: julho de 2016.

SOLA, Marília Cristina et al. **Manutenção de Microrganismos: conservação e viabilidade**. Goiania: [s.n.], 2012. 1398 p. v. 8.

TOMA, L.; SEVERINI, F.; BELLA, A.; ROMI, R. (2003). A Semifield evaluation of VECTOBAC-DT (ABG-6499), a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of *Aedes albopictus*. **J. Am. Mosquito Contr.**, 19:424-429.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 964, 2011.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.

WEISIER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in Eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M. Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft. Berlin: Paul Parey: 233, p. 37-50, 1986.

