

## OBTENÇÃO DE BIOINSETICIDA À BASE DE Bacillus thuringiensis EM NOVOS MEIOS DE CULTURA\*

DEISE M.F. CAPALBO\*\*  
IRACEMA O. MORAES\*\*\*  
MERENICE R. SOBRINHO\*\*\*  
HELOISA H. CONTI\*\*\*\*

Quatro resíduos da agroindústria, foram testados em seis combinações diferentes, como meios de cultura líquidos, na obtenção de esporos de Bacillus thuringiensis. Os resultados obtidos indicaram a viabilidade de utilização dos resíduos testados, sendo concluído que a combinação equilibrada de fontes de nitrogênio e sais minerais, associada à presença de pequenas quantidades de carboidratos é essencial na obtenção de elevados rendimentos em esporos bacterianos. O acompanhamento da fermentação através de análises de pH e absorbância do meio, mostrou correlação com o desenvolvimento bacteriano, indicando esses parâmetros como eficientes na detecção das etapas fermentativas.

### INTRODUÇÃO

Na busca de alternativas para o combate às pragas da agricultura, o uso de B. thuringiensis (bactéria entomopatogê-

\*Trabalho apresentado no I Seminário Brasileiro de Agrotóxicos. Curitiba, 27 a 29 de novembro de 1990.

\*\*Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura - EMBRAPA/CNPDA.

\*\*\* DETA/IBILCE/UNESP

\*\*\*\*Bolsista CNPq

nica), tem-se mostrado bastante eficiente, apresentando vantagens de inocuidade a vertebrados, peixes e insetos benéficos, além de comprovada especificidade e potência. A toxicidade desta bactéria está associada principalmente a uma inclusão cristalina no esporo. Os formulados entomopatogênicos produzidos comercialmente, são baseados na mistura desses cristais como os esporos, obtidos por fermentação em meios de cultura líquidos (5).

Atualmente o Brasil se apresenta apenas como importador destes produtos, provavelmente pelo alto custo envolvido em seu processo de produção, aliado à dificuldade na aquisição de fermentadores apropriados. O custo do meio de cultura também contribui para a elevação do preço do produto final, sendo importante pesquisar componentes de baixo custo para a composição do meio.

No presente trabalho, procurou-se compor o meio de cultura com subprodutos ou resíduos de indústrias regionais, todos de baixo custo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado B. thuringiensis Berliner, isolado de produto comercial DIPEL (produzido pela ABBOT LAB.) que consta da mistura de esporos e cristais desta bactéria. Após isolamento, a cultura pura foi mantida em agar nutritivo, à baixa temperatura, sendo repicado para meio novo a cada 40 dias.

Os resíduos utilizados na composição dos meios de cultura, bem como suas principais características de composição química, são:

- resíduo líquido de indústria de glutamato monossódico (RGM), contendo aminoácidos (entre os quais se destaca o ácido glutâmico), nitrogênio (5%) e potássio (1%);
- água de côco filtrada, obtida do descarte de indústria de leite de côco e derivados (ACF), contendo

- 1,5% em açúcares totais, e alguns sais minerais;
- melaço de cana-de-açúcar, obtido em usina de açúcar e álcool (MCA), contendo aproximadamente 67% de açúcares totais;
- suplemento mineral de algas, comercializado para suplemento de ração animal (SMA), rico em sais minerais e algumas vitaminas.

Para obtenção de inóculo para as fermentações, foi efetuada pré-fermentação em frasco erlenmeyer, com meio de cultura definido, conforme descrito por CAPALBO (2) e MORAES (6).

A composição dos meios de cultura testados é apresentada na Tabela 1. Todos os meios tiveram seus volumes complementados com água de torneira, e o pH corrigido para o valor 7,3. Os MEIOs 1 e 2 foram utilizados para fermentações em mini-fermentadores (capacidade total do frasco: 1 litro; volume útil: 700 ml). Os demais MEIOs foram utilizados para ensaios em fermentadores com capacidade total de 5 litros, e volume útil de 3,5 litros.

TABELA 1 - SUBPRODUTOS OU RESÍDUOS UTILIZADOS COMO MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO DE Bacillus thuringiensis

COMPONENTE	Meio de Cultura					
	1	2	3	4	5	6
ACF (553 ml)	x					
ACF (480 ml)				x		
MCA (12,4 g)		x			x	x
RGM (40 g)			x	x	x	x
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5g)		x	x	x	x	x
SMA (8,6 g)					x	

volume total do meio, correspondendo a um total de  $3 - 5,0 \times 10^{10}$  células bacterianas, e a temperatura foi mantida em  $30^{\circ}\text{C}$ . As condições de fermentação foram as mesma de CAPALBO (2).

O acompanhamento das fermentações foi efetuado através de análises de pH, absorbância a 600 nm (DO), e contagem de esporos viáveis (UFC) (1) após tratamento térmico ( $80^{\circ}\text{C}/10$  minutos). Denomina-se esporo viável aquele capaz de crescer em meio artificial, desenvolvendo uma colônia, que pode ser observada quando plaqueado; cada colônia contada corresponde a uma Unidade Formadora de Colônia (UFC).

### 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM Bacillus thuringiensis EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Tempo (h)	pH	Absorb. (DO)	Esporos (UFC/ml)	Tempo (h)	pH	Absorb. (DO)	Esporos (UFC/ml)
<b>Meio 1</b>							
0	6,5	0,7	*	0	6,1	4,7	*
3	6,7	1,5	*	18	5,4	15,1	*
7	5,5	2,7	*	24	5,4	16,2	$1,6 \times 10^5$
10	5,7	4,6	*	42	6,1	20,5	$2,9 \times 10^6$
18	6,8	7,0	*	49	7,1	18,6	$2,2 \times 10^8$
24	5,8	3,7	*	66	7,2	16,2	$9,5 \times 10^6$
53	4,8	1,6	*	72	7,4	12,1	$7,9 \times 10^6$
<b>Meio 2</b>							
0	7,1	0,2	*	0	6,5	5,0	*
3	6,8	0,4	*	5	5,8	6,3	*
5	6,7	0,7	*	24	5,5	14,0	$5,0 \times 10^5$
7	6,9	1,1	*	29	6,1	16,6	$1,8 \times 10^6$
24	7,0	2,1	*	45	6,8	15,6	$7,7 \times 10^6$
				53	7,3	13,4	$2,8 \times 10^7$
<b>Meio 3</b>							
0	6,5	4,4	*	0	7,4	7,2	*
2	6,4	4,8	*	4	6,5	8,3	*
17	7,7	6,5	$1,8 \times 10^6$	21	7,5	22,5	$1,7 \times 10^{10}$
19	8,1	8,6	$5,5 \times 10^9$	24	8,0	22,5	**
23	8,1	9,2	$2,9 \times 10^{12}$	28	8,1	20,7	**
25	8,4	7,9	**	48	8,1	12,6	$1,7 \times 10^{12}$

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

\* = Contagens inferiores a  $10^4$  UFC/ml

\*\* = Contagens superiores a  $10^{12}$  UFC/ml

### 4 DISCUSSÃO

Pela Tabela 2 pode-se observar que para os MEIOS 1 e 2, onde a concentração de açúcares é elevada e não há adição de nitrogênio, o crescimento celular é pequeno. O mesmo não ocorre num meio rico em compostos nitrogenados e sais como o MEIO 3. Tais resultados estão de acordo com os apresentados por DHARMSTHITI que salienta a importância de ácido glutâmico (presente no RGM) no desenvolvimento e esporulação do B. thuringiensis (4).

Nos meios onde houve a combinação de fontes de nitrogênio, carboidratos e alguns sais (MEIO 4 e 5), o crescimento celular, representado pela DO, foi superior, e a esporulação atingiu índices considerados satisfatórios para fermentação de B. thuringiensis em meios líquidos (6,7). O MEIO 5 quando suplementado com elementos ricos em sais minerais (MEIO 6), mostrou ótimo desempenho, apresentando após 24 horas de fermentação, contagem superior a  $10^{12}$  UFC/ml.

Observa-se principalmente nos MEIOS 3 e 5, um máximo nos valores de DO seguido de uma fase de decréscimo. Tal fato pode ser explicado lembrando-se que na fase de esporulação a refringência das células bacterianas se altera, diminuindo a DO.

Nos MEIOS 4 e 6 observa-se o mesmo comportamento com relação à contagem de esporos viáveis. Acredita-se que nestes meios, após ser atingido o máximo crescimento celular e máxima esporulação, tenha ocorrido lise das células. Como o que se deseja como produto final são os esporos e principalmente os cristais, a lise celular não altera o produto desejado.

Em todos os experimentos, o comportamento do pH foi característico, tendo seus valores diminuído numa primeira fase (fase de crescimento logarítmico) e posteriormente retornando ou ultrapassado os valores iniciais (fase de esporulação) (2, 6).

Pelos resultados apresentados, conclui-se que o crescimento e esporulação do B. thuringiensis está intrinsicamente relacionado com a presença de nitrogênio e sais no meio, e em menor escala com a presença de altas concentrações de carboidratos. A combinação equilibrada desses componentes, presentes nos resíduos agroindustriais utilizados, resultará em meio propício para a produção de bioinseticidas à base de B. thuringiensis.

Além da importância da composição do meio de cultura, pode-se concluir que o acompanhamento da fermentação pode ser realizado através de análises simples e rápidas como de pH e DO.

#### ABSTRACT

Four agroindustrial by products were used in six different combinations as liquid culture media for obtaining Bacillus thuringiensis spores. The results indicated the feasibility of these by products for fermentation purposes. The correct nitrogen and mineral salts combination, and the presence of small parts of carbohydrates, were fundamental for obtaining high yields of bacterial spores. The evaluation of the fermentation parameters: pH and optical density, indicated correlation to the bacteria development, which indicates that these parameters are efficient for detection of fermentation steps.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 APHA - Intersociety/Agency Committee on Methodology for Foods. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. S.L., 1976.
- 02 CAPALBO, D.M.F., MORAES, I.O. Agroindustrial residues as a medium for growth and sporulation of Bacillus thuringiensis. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÉNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11. 1986: Anais... São Paulo, 1986. p.195-202.
- 03 CROSBY, W.H., GREENA, R.A., SLEPECKY, R.A. The relationship of metal content to dormancy, germination and sporulation in Bacillus megaterium. In: SPORE RESEARCH. London: Academic Press, 1971. p.143-160.
- 04 DHARMSTHITI, S.C., PANTUWATANA, S., BHUMIRATANA, A. Production of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis and Bacillus sphaericus strain 1593 on media using a by product from a monosodium glutamate factory. J.Invertebr. Pathol., v.46, p.231-238, 1985.
- 05 LUTHY, P., EBERSOLD, H.R. Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action. In: DAVIDSON, E.V. (ed.) Pathogenesés of invertebrate microbial disease. USA: Allanheld Osmun, 1981. p. 235-268.
- 06 MORAES, I.O. Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em minifermentador. pinas, 1976. 69 p. Tese. Universidade Estadual de Campinas.
- 07 SALAMA, H.S. et al. Novel fermentation media for production of delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. v.41, p.8-19, 1983.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos financiadores CNPq e OEA pelo auxílio financeiro.