

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS OPERACIONAIS, FONTES
PROTÉICAS E SUBSTRATOS ENERGÉTICOS SOBRE O CULTIVO DE
*Bacillus thuringiensis var. israelensis***

Cíntia Panarotto

Caxias do Sul, 2006.

Cíntia Panarotto

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS OPERACIONAIS, FONTES
PROTÉICAS E SUBSTRATOS ENERGÉTICOS SOBRE O CULTIVO DE
*Bacillus thuringiensis var. israelensis***

“Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.”

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

Caxias do Sul, 2006.

CÍNTIA PANAROTTO

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS OPERACIONAIS, FONTES
PROTÉICAS E SUBSTRATOS ENERGÉTICOS SOBRE O CULTIVO DE**
Bacillus thuringiensis var. israelensis

**“Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.”**

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 DE OUTUBRO DE 2006.

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

Prof^a. Dr^a. Marília Amorim Berbert de Molina

Prof. Dr. Alexandre Specht

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira, pessoa a qual levarei como exemplo, pela orientação, incentivo e imprescindível contribuição para minha vida profissional.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare, pela co-orientação e contribuições importantíssimas dadas a este trabalho com relação às análises eletroforéticas.

À Prof^a. Msc. Eloane Malvessi por toda ajuda e atenção dispensada e à toda à equipe do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela amizade, convivência e companheirismo em todos os momentos.

Às estagiárias Clécia Pierozan, Rafaela Vedovelli, Juliana Oliveira de Matos, Denise Bizarro Kern e o estagiário Tomás Augusto Polidoro, por toda ajuda, disponibilidade, colaboração e atenção concedida.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pelo livre acesso e utilização dos equipamentos utilizados.

À equipe do Laboratório de Controle Biológico de Pragas, em especial a Prof^a Neiva Monteiro de Barros, a Mestranda Vaneisa Gobatto e a estagiária Stefani Giani pela realização dos bioensaios e colaboração no projeto de pesquisa.

À equipe do Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos, pela determinação do teor protéico de componentes utilizados em alguns meios de cultivo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por todos os conhecimentos compartilhados.

Às funcionárias Marielsa Daré Neumman Secco e Rosângela Terezinha Festugatto.

Ao Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray pela revisão dessa dissertação.

Aos Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, Alexandre Specht, Sérgio Echeverrigaray, Marília Amorin Berbert de Molina pela avaliação e por todas as contribuições significativas e essenciais dadas a este trabalho.

À minha mãe, Ivanir Panarotto, minha cunhada Claudia Teixeira Panarotto, meu pai Dario Panarotto, meu namorado James Edward Slusser e toda a minha família, por todo o incentivo, paciência, preocupação, carinho e compreensão.

À CAPES pela bolsa e a FAPERGS e CNPq pelo apoio e financiamento do projeto.

A Deus por tudo, mas principalmente, pela fé e perseverança para nunca desistir dos meus objetivos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
NOMENCLATURA	iiiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Controle Biológico com Endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2 Características Morfológicas e Bioquímicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.3 Endotoxinas Encontradas em Variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.4 Condições de Crescimento, Esporulação e Produção de Endotoxinas por	12
<i>Bacillus thuringiensis</i>	
2.4.1 Componentes para meios de cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.4.2 Suprimento de oxigênio, pH e temperatura	16
2.5 Quantificação Indireta da Concentração Celular de <i>Bacillus thuringiensis</i> var.	17
<i>israelensis</i>	
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Microrganismo	19
3.2 Meios de Cultivo Básicos	19
3.3 Condições Operacionais Básicas	19
3.4 Ensaio Realizados com Diferentes Formulações de Meio de Cultivo	21
3.5 Métodos Analíticos Utilizados nos Ensaio	22
3.5.1 Coleta e preparo das amostras	22
3.5.2 Medida da concentração celular	22
3.5.3 Determinação do número de esporos	22
3.5.4 Observação microscópica	23
3.5.5 Medida da concentração de açúcares redutores	23
3.5.6 Medida da concentração de açúcares redutores totais	24
3.5.7 Determinação do teor protéico dos meios de cultivo	24
3.5.8 Avaliação da expressão de endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var.	24
<i>israelensis</i>	
3.5.9 Atividade larvicida dos cultivos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var.	25
<i>israelensis</i>	
3.5.10 Medida da fração molar de oxigênio	26
3.6 Cálculos de Parâmetros Fermentativos e Respiratórios para o Cultivo de <i>B.</i>	26
<i>thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em biorreator de bancada	
3.6.1 Velocidade específica de crescimento	26
3.6.2 Fator de conversão de substrato em células	27
3.6.3 Demanda de oxigênio pelo cultivo de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> e	27
velocidade específica de respiração	
3.6.4 Cálculo do fator real de conversão de oxigênio em células e coeficiente	29
de manutenção.	
3.6.5 Estimativa da Concentração Celular a Partir de Parâmetros Respiratórios	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1 Comparação entre Métodos de Quantificação de Concentração Celular	31
4.2 Artigo 1: Utilização de Diferentes Fontes Protéicas na Formulação de Meios de Crescimento, Esporulação e Formação de Endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	35
4.3 Artigo 2: Influência do Substrato Energético sobre o Crescimento e a Formação de Endotoxinas por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	55
4.4 Artigo 3: Influência da Temperatura e do pH sobre o Crescimento Celular, Produção de Endotoxinas e esporulação de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> Cultivado em Biorreator de Bancada	69
5 CONCLUSÕES	88
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Microfotografia eletrônica de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mostrando o esporo (A), o cristal protéico (B) dentro da célula bacteriana e as endotoxinas de 26, 70 e 130 kDa (C). 5
Fontes: www.mddep.gov.qc.ca/pesticides
- Figura 2:** Representação dos cristais esféricos (A) e bipiramidais (B) de *Bacillus thuringiensis* através de microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Souza-Dias *et al.* 2002. 9
- Figura 3** – Representação da inclusão cristalina (δ -endotoxina) produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Fonte: www.ogm-info.com. 10
- Figura 4:** Sistema de fermentação utilizado no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em fermentador de bancada BIOSTAT B (B. BRAUN). 20
- Figura 5** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 12 g/L de extrato de levedura bruto: variação da demanda de oxigênio pelo cultivo - OUR - em função do tempo. 32
- Figura 6** – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em três diferentes ensaios em meio contendo extrato de levedura bruto (ELB) (6 e 12 g/L) - Ensaio 1 ELB 12 g/L, Ensaio 2 ELB 12 g/L e Ensaio 3 ELB 6 g/L: velocidade específica de respiração - QO_2 - em função da velocidade específica de crescimento - μ_{xm} . 33
- Figura 7** – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada contendo 12 g/L de extrato de levedura bruto: concentração celular – X - medida por gravimetria, concentração celular medida por absorvância e concentração celular medida a partir do balanço respiratório. 33
- Figura 8** - Fases do crescimento celular indicando as mudanças morfológicas e fisiológicas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivo contendo extrato de levedura bruto 12 g/L em fermentador de bancada e observadas em microscópio de contraste de fase: [A] 4 horas de cultivo – células vegetativas livres; [B] 6 horas de cultivo – formação de grumos; [C] 24 horas de cultivo – esporos livres. 34

Artigo 1: Utilização de Diferentes Fontes Protéicas na Formulação de Meios de Crescimento, Esporulação e Formação de Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Figura 1 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 12 g/L de extrato de levedura bruto: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X e substrato - S - em função do tempo. 42

Figura 2 - Fases do crescimento celular indicando as mudanças morfológicas e fisiológicas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivo contendo extrato de levedura bruto 12 g/L em fermentador de bancada e observadas em microscópio de contraste de fase: [A] 4 horas de cultivo – células vegetativas livres; [B] 6 horas de cultivo – formação de grumos; [C] 12 horas de cultivo - células esporuladas; [D] 24 horas de cultivo – esporos livres. 43

Figura 3 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 10 g/L de farelo de soja: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X e substrato – S - em função do tempo. 44

Figura 4 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 8,4 g/L de extrato de soja em pó desengordurado: [A] demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X e substrato – S - em função do tempo. 45

Figura 5 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 6 g/L de extrato de levedura: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo ; [B] variação da concentração celular – X e substrato – S - em função do tempo. 51

Figura 6 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 15 g/L de farelo de soja: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular –X e substrato – S - em função do tempo. 52

Figura 7 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 20 g/L de farelo de soja: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo - OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X e substrato – S - em função do tempo. 53

Figura 8 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 12 g/L de extrato de soja em pó desengordurado: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular –X e substrato – S - em função do tempo. 54

Artigo 2: Influência do Substrato Energético sobre o Crescimento e a Formação de Endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Figura 1 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio formulado na ausência de fonte de carbono: [A] demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X - em função do tempo. 62

Figura 2 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 10 g/L de glicose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X e substrato - S - em função do tempo. 63

Figura 3 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 20 g/L de glicose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X e substrato - S - em função do tempo. 63

Figura 4 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 10 g/L de sacarose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X e substrato – S - em função do tempo. 64

Figura 5 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 10 g/L de lactose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo - OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X e substrato – S - em função do tempo. 64

Figura 6 – Perfil eletroforético da produção de endotoxinas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios formulados com glicose 10 g/L (G), nos tempos de 24, 26, 28, 30 e 32 horas, sacarose 10 g/L (S), nos tempos de 24, 26, 28, 30, 32 e 48 horas e lactose 10 g/L (L), nos tempos de 24, 26, 28, 30, 32 e 48 horas. 65

Artigo 3: Influência da Temperatura e do pH sobre o Crescimento Celular, Produção de Endotoxinas e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cultivado em Biorreator de Bancada.

- Figura 1** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada às temperaturas de [A] 23° C; [B] 25°C; [C] 27°C e [D] 30°C: tempo em foi atingida a máxima velocidade específica de crescimento - μ_{Xm} ; variação da concentração celular - X e substrato - S - em função do tempo. 76
- Figura 2** - Perfil eletroforético da produção de endotoxinas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivos mantidos a 23, 25, 27 e 30°C em 24 horas de cultivo em que: M – marcador molecular. 77
- Figura 3** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada com [A] pH não controlado e [B] pH controlado em 7,0 e 5,5: variação da demanda de oxigênio pelo cultivo em função do tempo – OUR - em função do tempo, tempo em foi atingida a máxima velocidade específica de crescimento - μ_{Xm} , variação do pH, da concentração celular - X e substrato - S - em função do tempo. 78
- Figura 4** – Perfil eletroforético da produção de endotoxinas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivos em que o pH não foi controlado e pH foi controlado em 5,5, 6,2 ou 7,0. 80
- Figura 5** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada às temperaturas de 23°C [A], 25°C [B], 27°C [C] e 30°C [D]: variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo. 84
- Figura 6** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em que o pH foi controlado em 5,5: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X e substrato - S - em função do tempo. 85
- Figura 7** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em que o pH foi controlado em 6,2: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X e substrato - S - em função do tempo. 86
- Figura 8** - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em que o pH foi controlado em 6,2: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X e substrato - S - em função do tempo. 87

LISTA DE TABELAS

Artigo 1: Utilização de Diferentes Fontes Protéicas na Formulação de Meios de Crescimento, Esporulação e Formação de Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Tabela 1 - Influência de diferentes fontes protéicas sobre a esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) em cultivos em frascos sob agitação recíproca por 36 horas. EL (extrato de levedura); ELB (extrato de levedura bruto); S (proteína isolada de soja); PS (extrato de soja em pó desengordurado); FS (farelo de soja). 41

Tabela 2 - Resultados gerais de cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada, utilizando diferentes fontes protéicas orgânico. X_f - concentração celular máxima; ΔS - substrato consumido; μ_{xm} - máxima velocidade específica de crescimento; $Y_{x/s}$ - fator de conversão de substrato em células e CL_{50} - concentração letal para atingir 50% de mortalidade. 47

Artigo 2: Influência do Substrato Energético sobre o Crescimento e a Formação de Endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Tabela 1: Resultados gerais dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados em frascos sob agitação recíproca utilizando diferentes substratos energéticos. X_o - concentração celular inicial; X_{24} - concentração celular medida após 24 horas de cultivo; ΔS - variação do consumo de substrato ao final de 12 horas; $\mu_{x\max}$ - máxima velocidade específica de crescimento; Esp/CV - relação entre esporos e células viáveis totais. 61

Artigo 3: Influência da Temperatura e do pH sobre o Crescimento Celular, Produção de Endotoxinas e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cultivado em Biorreator de Bancada.

Tabela 1: Resultados gerais dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados em biorreator de bancada, controlados em diferentes temperaturas. ΔS - variação do consumo de substrato ao final de 12 horas; $Y_{x/s}$ - fator de conversão de substrato em células; Esp/CV - relação entre esporos e células viáveis totais. 76

Tabela 2: Resultados gerais dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados em biorreator de bancada, controlados em diferentes valores de pH. X_i - 79

concentração celular ao início do cultivo; X_f – concentração celular ao final do cultivo; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento; ΔS – variação do consumo de substrato ao final de 12 horas; $Y_{x/s}$ – fator de conversão de substrato em células; Esp/CV – relação entre esporos e células viáveis totais

NOMENCLATURA

CL₅₀ – concentração letal mediana

DNS – ácido 3,5 di-nitrosalicílico

dX/dt - velocidade instantânea de crescimento

ΔS – consumo de substrato

Δt = t_n – t_{n-1} - intervalo de tempo no processo

Esp/CV – relação entre esporos e células viáveis

EL – extrato de levedura

ELB – extrato de levedura bruto

F_n - vazão em base molar de ar

F_{O₂,e} - vazão em base molar de oxigênio na entrada do fermentador

F_{O₂,s} - vazão em base molar de oxigênio na saída do fermentador

FS – farelo de soja

F_v - vazão volumétrica de ar

G - glicose

GYS – meio a base de glicose e sais

L - lactose

LB – meio Luria Bertani

m_o - coeficiente de manutenção celular para o oxigênio

μ_x – velocidade específica de crescimento

μ_{x,m} – máxima velocidade específica de crescimento

OUR - demanda de oxigênio pelo cultivo

OUR_n - demanda de oxigênio pelo cultivo em t_n

OUR_{n-1} - demanda de oxigênio pelo cultivo em t_{n-1}

P – pressão

pO₂ - percentual de oxigênio dissolvido em relação à saturação

PS – extrato de soja em pó desengordurado

Q_{O₂} – velocidade específica de respiração

Q_{O₂}.X - demanda de oxigênio pelo cultivo

R - constante dos gases

S (fontes protéicas) – proteína isolada de soja

S (fontes de carbono) – sacarose

SC – meio formulado na ausência de substrato energético

S_f – concentração de substrato no final do cultivo

S_i – concentração de substrato no início do cultivo

T – temperatura

V - volume do meio de cultura

X – concentração celular

X_f – concentração celular ao final do cultivo

X_i – concentração celular no início do cultivo

X_n - concentração celular em t_n

X_{n-1} - concentração celular em t_{n-1}

Y_{GO} - fator de conversão real de oxigênio em células

y_{O₂,e} - fração molar de oxigênio no ar

Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células

RESUMO

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* é uma bactéria entomopatogênica capaz de sintetizar um cristal protéico composto por endotoxinas. Estas endotoxinas são utilizadas em formulações de biolarvicidas, sendo efetivas contra dípteros que representam um problema para a saúde humana. Neste trabalho, estudou-se a influência de fontes protéicas, de substratos energéticos, da temperatura e do pH sobre o crescimento celular, a esporulação e a expressão de endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, em frascos agitados e em fermentador de bancada.

Foram estudadas fontes protéicas de menor custo em substituição ao extrato de levedura de laboratório. Melhores resultados, com relação ao crescimento celular, à esporulação e à mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus*, foram obtidos com 12 g/L de extrato de levedura bruto Prodex (ELB) ou 20 g/L de farelo de soja (FS) em biorreator de bancada, com valores máximos de demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) de 58,1 e 53,3 mmolO₂/L/h, máxima concentração celular (X) de 12 g/L, esporulação de 3.10¹² e 6.10¹² esporos/mL e concentração letal mediana (CL₅₀) de 0,21 e 0,45 ppm, respectivamente. Entre estas alternativas, o ELB, com um custo muito inferior ao do extrato de levedura de laboratório, foi considerado como uma fonte de proteína mais adequada que o farelo de soja por ser completamente solúvel o que representaria uma vantagem em processos em larga escala.

Com relação aos substratos energéticos estudados (glicose, sacarose e lactose), a glicose, nas concentrações de 10 e 20 g/L, apresentou os resultados mais expressivos em termos de respiração (OUR máximo ≈ 60 mmolO₂/L/h, em ambos os cultivos), de crescimento (X máxima = 8,2 e 12 g/L, respectivamente) e esporulação (10¹² esporos/mL em 26 e 28 horas, respectivamente). A expressão de endotoxinas foi maior em meios com glicose ou sacarose, observando-se em eletroforese as bandas de 26, 70 e 128 kDa. Apesar do crescimento celular

inferior, a sacarose (10 g/L), um carboidrato de custo relativamente baixo no Brasil, pode ser utilizada como substrato para Bti uma vez que permite a expressão das endotoxinas em estudo.

A temperatura mostrou grande influência sobre o cultivo de Bti, sendo 27 e 30°C as que proporcionaram as mais altas OUR (88,1 e 66,1 mmolO₂/L/h), X (13 g/L, em ambos os cultivos) e esporulação (8 e 7.10¹⁰ esporos/mL), assim como maior expressão das endotoxinas de 70 e 26 kDa em meios com ELB (12 g/L) e glicose (20 g/L). Entre as duas, a temperatura de 27°C, porém, foi considerada mais adequada por facilitar a transferência de oxigênio em cultivo de Bti.

Os baixos valores de pH, observados quando o cultivo foi realizado sem controle e quando foi controlado em 5,5, influenciaram negativamente a produção de biomassa que atingiu 9,5 g/L. Com o pH controlado em 6,2 e 7,0 ou quando variou entre 7,0 e 5,5, o maior valor de X foi de cerca de 12 g/L. Apesar disso, a contagem de esporos foi semelhante em todos os ensaios: aproximadamente 10¹² esporos/mL, em cerca de 30 horas de cultivo. Uma melhor expressão das endotoxinas de 26, 70 e 128 kDa foi evidenciada quando o pH foi mantido próximo da neutralidade.

ABSTRACT

The entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* produces a crystal protein formed by endotoxins. These endotoxins are used in the formulation of biolarvicides effective for the control of diptera, which represent a problem for human health. In this work, the influence of nitrogen sources, energetic substrates, temperature, and pH on the cell growth, spore formation, and the expression of endotoxins by *B. thuringiensis* var. *israelensis* was studied in shake-flask and bioreactor experiments.

Low-cost nitrogen sources were studied for the substitution of laboratory yeast extract. The best results for cell growth, spore formation and lethality of *Culex quinquefasciatus* larvae were obtained in bench bioreactor with medium containing 12 g/L of the bulk yeast extract Prodex (BYE) or 20 g/L of soy bran (SB), with maximum oxygen uptake rate values (OUR) of 58.1 and 53.3 mmolO₂/L/h, maximum cell concentration of 12 g/L, spore counting of 3.10¹² and 6.10¹² spores/mL, and medium lethal concentration (LC₅₀) of 0.21 and 0.45 ppm, respectively. In this comparison, BYE, which is much cheaper than laboratory yeast extract, was preferred as a protein source than soy bran because it is completely soluble, which could be an advantage in large-scale processing.

With respect to the energetic substrates evaluated (glucose, sucrose and lactose), glucose, in concentrations of 10 and 20 g/L, led to the most significant results for respiration (maximum OUR ≈ 60 mmolO₂/L/h for both conditions), cell growth (maximum X = 8.2 and 12 g/L, respectively), and spore counting (10¹² spores/mL in 26 and 28 hours, approximately). In media containing glucose or sucrose, the presence of toxins of 26, 70, and 128 kDa was observed. Despite the inferior cell growth observed, sucrose (10 g/L), a relatively low-cost carbohydrate in Brazil, could be used as a substrate for Bti cultivation since the endotoxins studied were expressed. With lactose, no significant result was found.

The temperature of the medium exerts a major influence on the cultivation of Bti. At 27 and 30°C, the higher values for the maximum OUR (88.1 and 66.1 mmolO₂/L/h), X (13 g/L for both conditions) and spore counting (8 and 7.10¹⁰ spores/mL) were measured. The more intense expression for proteins of 70 and 26 kDa, in medium containing BYE (12 g/L) and glucose (20 g/L), were also observed at these temperatures. The temperature of 27°C can be considered as a better temperature for this process since oxygen supply would be facilitated at this condition.

The low pH observed when the cultivation was performed without pH control or with pH kept constant at 5.5 led to decreasing values of biomass concentration which reached 9.5 g/L. When the pH was controlled in 6.2 and 7.0 or varied from 7.0 to 5.5, the maximum X was measured as 12 g/L. Despite such a difference, spore counting was similar in all experiments: 10¹² spores/mL in approximately 30 hours of cultivation. A better expression of endotoxins of 26, 70, and 128 kDa was detected when the pH was kept close to neutral values.

1. INTRODUÇÃO

Formulações de larvicidas baseadas em δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) têm sido amplamente difundidas e utilizadas, com sucesso, para o controle de dípteros – culicídeos e simulídeos – de importância para a saúde pública. Isto se dá em razão da alta especificidade destes produtos em relação ao inseto alvo.

Entre os insetos que podem ser incluídos em programas de controle, destaca-se *Aedes aegypti*, uma das maiores preocupações no Brasil em termos de saúde pública por ser o transmissor do vírus da dengue. Além deste inseto, há um interesse especial no controle do mosquito *Simulium pertinax*, conhecido como borrachudo. A infestação pela espécie de borrachudo *S. pertinax*, que ocorre nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, torna a vida das populações extremamente desconfortável e, em casos mais sérios, seus ataques podem, inclusive, causar hemorragias localizadas, edemas e estado febril.

Bti se diferencia das demais espécies de *Bacillus* por sua capacidade de sintetizar um cristal protéico, durante o processo de esporulação, que de fato a torna entomopatogênica contra larvas de dípteros de importância sanitária. Deste modo, um grande volume de larvicidas, baseados em metabólitos produzidos por esta bactéria, tem sido usado na prevenção de doenças causadas por dípteros.

Um problema para a maior aplicação destes larvicidas no Brasil é o fato de estas formulações serem, na maioria, importadas, o que limita a sua utilização em razão do seu alto preço, indicando a necessidade de desenvolvimento de produtos biológicos com um menor custo de produção, especialmente para o uso pelo poder público.

Uma outra questão é que o meio de cultivo de Bti é geralmente formulado com resíduos agroindustriais, que normalmente possuem alto teor de sólidos em suspensão, o que pode criar alguma dificuldade para o processo com respeito à transferência de oxigênio para o cultivo,

aos tratamentos finais para recuperação das toxinas produzidas e à própria formulação do larvicida. Adicionalmente, em escala de laboratório, a cinética do processo é pouco estudada, uma vez que a insolubilidade de componentes do meio impossibilita a medição da concentração celular por métodos convencionais

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo geral estudar o crescimento e a formação de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), avaliando alguns componentes do meio de cultivo e parâmetros operacionais do processo fermentativo.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- avaliar, qualitativa e quantitativamente, o uso de fontes protéicas orgânico de baixo custo para a substituição do extrato de levedura geralmente utilizado em laboratório para a formulação de meios de cultivo de Bti;
- testar, qualitativa e quantitativamente, o efeito da presença de diferentes substratos energéticos no meio de cultivo sobre o crescimento e a formação de δ -endotoxinas de Bti.
- avaliar a influência do pH e da temperatura sobre o crescimento celular e a formação de δ -endotoxinas de Bti.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle Biológico com Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Diversas doenças humanas têm em algumas espécies de insetos das famílias Culicidae e Simuliidae seus principais vetores. Entre os culicídeos, atenção especial é dada à espécie *Aedes aegypti*, uma das maiores preocupações no Brasil atualmente, por ser o transmissor do vírus da dengue. Entre as doenças causadas por simulídeos, conhecidos como borrachudos, destaca-se a oncocercose ou “cegueira dos rios”, causada pelo nematódeo *Onchocerca volvulus* que tem como vetor *Simulium damnosum* (Beckert & Margalit, 1993). Além de doenças, os borrachudos são considerados um grande problema pelo fato de causarem grande desconforto às populações de regiões próximas ao seu habitat (Vilarinhos *et al.*, 1998). Nos estados da Região Sul e Sudeste do Brasil, ressalta-se a importância social do *S. pertinax* que, em maior intensidade, pode causar hemorragias localizadas, edemas e estado febril, além de prejudicar o desenvolvimento sócio-econômico de regiões com potencial para exploração do turismo (Lozovei *et al.*, 1987).

Inicialmente, para o combate destes insetos, os inseticidas químicos foram considerados a melhor alternativa devido ao seu baixo custo. Porém, estes inseticidas são tóxicos e não específicos; ou seja, prejudicam não só a espécie alvo como também espécies benéficas, animais e o Homem, interferindo negativamente no meio ambiente. Além disso, podem favorecer o aparecimento de insetos resistentes. Com isso, surgiram como alternativa, os biolarvicidas à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e outras variedades desta bactéria, que possuem como principal vantagem, a alta especificidade com relação ao inseto (Becker & Margalit, 1993; Vilarinhos *et al.*, 1998; Praça *et al.*, 2004).

No trabalho realizado por Becker & Margalit (1993), é relatado que inseticidas químicos podem ser substituídos com eficiência pelos biológicos, destacando-se uma

formulação á base de δ -endotoxinas de Bti denominada TEKNAR[®] (VALENT BIOSCIENCE Co., EUA). Vilarinhos *et al.* (2003) compararam a eficácia de três diferentes formulações comerciais de Bti e uma de um inseticida químico (TEMEPHOS[®], AMERICAN CYNAMID Co., EUA) em condições de campo simuladas, realizadas em caixas d'água com e sem a exposição direta à luz solar. O inseticida químico controlou 100% das larvas nas caixas expostas e não expostas à luz solar durante todo o experimento. Os biolarvicidas, da mesma forma, apresentaram alta eficiência, mas o tipo de formulação e a exposição à luz solar parecem ter influenciado a atividade dos larvicidas.

Um dos produtos biológicos mais utilizados atualmente é o VECTOBAC[®] DT (ABBOTT LABORATORIES, EUA) que é uma formulação de Bti (ABG-6499) em forma de tablete contendo 3,4% dos ingredientes ativos. A dosagem recomendada é de um tablete (0,384 g) para cada 50 L de água (Toma *et al.*, 2003). Este produto apresentou alta eficiência contra larvas de *Aedes albopictus*, *A. aegypti* e *Culex pipiens*, levando a 100% de mortalidade em cerca de 24 horas de tratamento (Toma *et al.*, 2003).

Praça *et al.* (2004) selecionaram as linhagens de *B. thuringiensis* (Bt) S234 e S997 que apresentaram toxicidade para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, entre outros insetos, concluindo que poderiam ser utilizadas no controle biológico destes dípteros. Os valores de concentração letal mediana (CL₅₀) obtidos para estas linhagens foram semelhantes entre si. Apesar de estas linhagens apresentarem alta toxicidade nos bioensaios, foram menos efetivas que o padrão Bti IPS 82 do Instituto Pasteur (França).

Além de sua atividade entomopatogênica, Bt é, ainda, a maior fonte de genes que concedem resistência a insetos em plantas transgênicas (Kumar & Udayasiriyam, 2004). De acordo com estes mesmos autores, a clonagem dos genes responsáveis pela toxicidade de Bt possibilita expressá-los em linhagens acristalíferas de Bt ou *Escherichia coli*. Com a

reintrodução de genes clonados em Bt, é possível estudar os fatores de regulação e expressão dos genes das endotoxinas.

2.2 Características Morfológicas e Bioquímicas de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva, em forma de bastonetes com tamanho variável entre 1,0 e 5,0 μm (Rogoff & Yousten, 1969). Ao início do cultivo, as células possuem alta motilidade celular, movimentando-se por meio de flagelos peritríqueos e, como as demais espécies de *Bacillus*, são esporulantes. A principal característica que difere Bt das outras espécies do gênero é a capacidade de formar um cristal paraesporal concomitantemente à fase de esporulação (Figura 1). Esse cristal é o que lhe confere a atividade tóxica contra insetos de diferentes ordens (Madigan *et al.*, 1997; Praça *et al.* 2004).

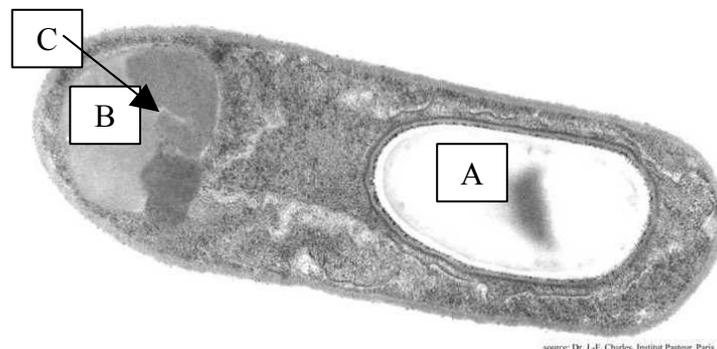


Figura 1 - Microfotografia eletrônica de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mostrando o esporo (A), o cristal protéico (B) dentro da célula bacteriana e as δ -endotoxinas de 26, 70 e 130 kDa (C).

Fontes: www.mddep.gov.qc.ca/pesticides

Existem diversas variedades de Bt utilizadas no controle de insetos, destacando-se *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) e *B. thuringiensis* var. *galleriae* (Btg), entre outras. Essas variedades diferenciam-se quanto às endotoxinas apresentadas, o que determina a especificidade de cada uma para cada ordem de inseto (Glare & O'Callaghan, 1998; Joung & Coté, 2000; Praça *et*

al., 2004). Praça *et al.* (2004) constataram a presença de cristais cuboidais, esféricos e bipiramidais em diversas subespécies de Bt. Essas formas podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida dos cristais.

As variedades de Bt encontram-se em uma série de ambientes, sendo isoladas, geralmente, de insetos infectados; porém, o solo pode funcionar como um reservatório de esporos provenientes de insetos mortos ou carregados pelo vento (Sthaly *et al.*, 1990; Meadows, 1993). Os esporos de Bt podem sobreviver por anos, dependendo do ambiente em que se encontram (Bobrowisky *et al.*, 2001). Furlaneto *et al.* (2000) constataram que os esporos de diversas subespécies de Bt podem durar até 10 dias na água.

O comportamento de células vegetativas de Bt foi estudado por Ferreira *et al.* (2003) em solo não esterilizado. Segundo o autor, após a inoculação, grande parte das células morreram e o restante esporulou em 24 horas.

Berbert-Molina (1998) descreveu o cultivo de Bti, com suprimento de oxigênio não limitado, propondo a sua divisão em quatro fases: na fase I ou vegetativa (1-5 horas), ocorre o crescimento de células vegetativas com a presença de bacilos longos e de tamanho uniforme, células isoladas, aos pares ou em cadeias, alta motilidade celular, demanda de oxigênio elevada e queda rápida do pH; na fase II, chamada de transição para esporulação (5–13 horas), observam-se bacilos mais curtos, células isoladas e imóveis, elevação do pH, início da floculação, formação de grânulos de polihidroxitirato, diminuição da velocidade de crescimento e queda acentuada na demanda de oxigênio; na fase III ou fase de esporulação (13-18 horas), ocorre intensa floculação, curva de crescimento com perfil decrescente, aumento da concentração de oxigênio dissolvido e demanda de oxigênio decrescente; na fase IV ou de lise celular (18-24 horas), dá-se a maturação completa dos esporos, lise celular, curva de crescimento decrescente e valores mínimos de demanda de oxigênio.

Com relação às exigências nutricionais, Bt necessita de uma fonte de proteínas para crescimento celular, um substrato energético para a produção de energia e alguns sais inorgânicos. Apesar de os nutrientes que compõem o meio de cultivo ideal para Bt serem relativamente simples, este microrganismo não cresce em meio mínimo contendo apenas sais e glicose, necessitando também de aspartato, citrato e glutamato (Arcas *et al.*, 1987, Bulla Jr. *et al.*, 1977; Mignone & Avignone-Rossa, 1996). Conforme o estudo de Vimala Devi *et al.* (2005), a adição de fontes protéicas e sais pode variar significativamente a contagem de esporos. Segundo estes mesmos autores, os meios formulados com extrato de levedura dobraram a produção de endotoxinas. No estudo realizado por Mignone e Avignone-Rossa (1996), foi constatado que o extrato de levedura é eficiente para o crescimento celular de Bt, uma vez que contém todas as vitaminas e aminoácidos necessários para o desenvolvimento da bactéria.

A glicose é um dos principais substratos energéticos utilizados no cultivo de Bt, sendo, na maior parte, inicialmente metabolizada na via glicolítica tendo como principais produtos piruvato, acetato e acetoína. Pequena parte da glicose pode ser degradada na via das pentoses-fosfatos para a biossíntese de energia e formação de NADPH (Nickerson *et al.*, 1974; Madigan *et al.*, 1997). O acetato produzido é proveniente da oxidação do piruvato pela enzima piruvato desidrogenase que é degradado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (Hanson *et al.*, 1963).

Passos & Silveira (2004), trabalhando com Bti IPS82, observaram concentrações ideais de glicose para produção de biomassa e esporulação em torno de 20 g/L e que o aumento da concentração desta fonte de carbono não influenciou diretamente a produtividade em células.

Na maioria das variedades de Bt estudadas, inclusive Bti, ocorre a produção de ácidos no início da fase exponencial levando a queda nos valores de pH caso este parâmetro não seja

controlado (Hanson *et al.*, 1963). Ao final da fase exponencial de crescimento e ao início da fase estacionária, ocorre a formação de grânulos de polihidroxibutirato (PHB) resultando no aumento do pH do meio (Becker & Margalit, 1993).

Segundo Kramer-Shafhalter & Moser (1996), Bti possui a capacidade de formar ácido succínico ao início da fase exponencial e da fase estacionária. Além do ácido succínico, também produz lactato durante a fase exponencial. Estes autores relatam, ainda, um perfil de produção de acetato linearmente relacionado ao crescimento celular da bactéria.

Além da glicose, as variedades de Bt são também capazes de metabolizar açúcares como a sacarose, lactose, maltose e, até mesmo, carboidratos mais complexos uma vez que produzem amilases e proteases. O açúcar utilizado no meio de cultivo pode influenciar a produção de endotoxinas (Rogoff & Yousten, 1969; Özkan *et al.*, 2003).

Reddy *et al.* (1998) relatam que a produção de proteases ocorre na fase inicial da esporulação (6-14 horas). Quatro proteases de massas moleculares de 90 kDa, 75 kDa, 60 kDa e 30 kDa, foram produzidas por Bti. Segundo este estudo, a presença de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) reduz a atividade de proteases em diversas linhagens de Bt. De acordo com Reddy *et al.* (2002), em linhagens de Btk, algumas proteases (78 kDa) começam a ser produzidas em 6 horas de cultivo e começam a desaparecer em cerca de 12 horas de esporulação. Outras, podem persistir até 48 horas de crescimento.

Em seu trabalho, Xiaoyan *et al.* (2005) utilizaram linhagens recombinantes de Bt (BMB304GFP e BMB315GFP) com diferentes números de plasmídeos contendo genes que codificam as endotoxinas, para a determinação do crescimento desta bactéria pelo método de microcalorimetria. Estes autores reportaram que o número de plasmídeos por célula tem um efeito significativo nas fases *lag* e exponencial de crescimento. Um menor número de plasmídeos proporcionou um crescimento mais rápido, indicando que a síntese de toxinas requer um maior consumo de nutrientes.

2.3 Endotoxinas Encontradas em Variedades de *Bacillus thuringiensis*

Como já citado nesta revisão, Bt é capaz de sintetizar um cristal protéico efetivo contra diferentes insetos. Esses cristais são codificados por genes denominados *cry* (Borror & De Long, 1998).

As proteínas Cry possuem atividade inseticida altamente específica para determinados insetos e não apresentam toxicidade para insetos benéficos, plantas e vertebrados (Bobrowski *et al.*, 2001). A especificidade das proteínas Cry contra diferentes insetos é atribuída aos diferentes polipetídeos que a compõem (Höfte & Whiteley, 1989). Os genes responsáveis pela produção destas toxinas estão localizados em plasmídeos (Aronson *et al.*, 1982; Lereclus *et al.*, 1993).

No trabalho de Praça *et al.* (2004), foram evidenciados os polipetídeos de 130 e 65 kDa para linhagens de Bt efetivas para diversos insetos. Conforme estes autores, foram identificados cristais bipiramidais associados ao gene *cry* 1, eficientes contra lepidópteros e coleópteros, cuboidais associados ao gene *cry* 2, efetivos contra lepidópteros e dípteros, e esféricos associados ao gene *cry* 4, também com alta eficiência contra lepidópteros e dípteros (Figura 2).

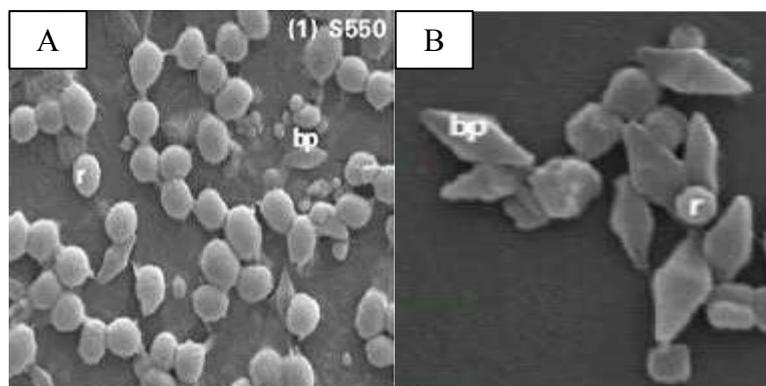


Figura 2 – Microfotografias de cristais esféricos (A) e bipiramidais (B) de *Bacillus thuringiensis* obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Souza-Dias *et al.* (2002).

Segundo Kumar & Udayasuriyan (2004), as proteínas Cry 2 possuem em torno de 633 aminoácidos, massa de 63 kDa , formando pequenos cristais de formas cúbicas.

Conforme o trabalho realizado por Souza Dias *et al.* (2003), onze linhagens de Bt, isoladas de diversas regiões do Brasil e armazenadas na coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, mostraram distintos perfis de proteína; entretanto, todas apresentaram uma proteína de massa molecular em torno de 130 kDa. A massa molecular desta proteína é compatível com o da proteína Cry 4, uma das tóxicas para dípteros, presentes na linhagem de Bti IPS – H14. Tokcaer *et al.* (2006) constataram a presença de quatro principais δ -endotoxinas em uma linhagem de Bti HD-500 designadas Cry 4A (125 kDa), Cry 4B (134 kDa), Cry 11A (67 kDa) e Cyt 1A (27 kDa).

Com relação à linhagem de Bti IPS 82, utilizada em muitos estudos, inclusive no presente trabalho, as principais δ -endotoxinas são as de massa molecular equivalente a 26, 67, 128 e 134 kDa codificadas pelos genes *cyt 1Aa*, *cry 11Aa*, *cry 4Aa* e *cry 4Ba*, respectivamente (Park *et al.* 2001). Estes autores afirmam, também, a existência de uma endotoxina denominada de Cry 11B com massa molecular de 80 kDa, em linhagens mutantes de Bti IPS-82.

Conforme o trabalho realizado por Lee *et al.* (1985), posteriormente confirmado por Praça *et al.* (2004), as estirpes efetivas contra dípteros contêm, caracteristicamente, a proteína de 70 kDa, codificada pelo gene *cry 2*. Wu & Chang (1985) evidenciaram que a atividade larvicida é atribuída à interação dos polipetídeos de 26 e 70 kDa.

O primeiro efeito das δ -endotoxina é a formação de poros na porção apical das microvilosidades e posterior lise das células epiteliais do intestino médio do inseto-alvo. A inclusão cristalina ingerida por uma larva suscetível dissolve-se no ambiente intestinal e é clivada por proteases, formando fragmentos de cerca de 65-70 kDa (De Maagd, *et al.*, 2003). Esse modelo está de acordo com o descrito por Revina *et al.* (2004), que relatam que as

endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis* agem no intestino médio da larva do inseto, sendo expostas a uma severa atividade proteolítica devido a enzimas como tripsina e quimiotripsina. A proteólise dessas endotoxinas de alta massa molecular (130-145 kDa) resulta na formação das “toxinas verdadeiras” com uma massa molecular menor, em torno de 65-70 kDa, que são resistentes a uma subsequente proteólise (Revina *et al.*, 2004).

A toxina correspondente ao polipetídeo de 26 kDa, chamado de Cyt A, é responsável pela atividade citolítica e hemolítica sobre as células do intestino larval (De Maagd *et al.* 2003). Becker & Margalit (1993) reportaram que esta toxina representa 50% do total da inclusão cristalina.

Após serem clivadas no intestino médio das larvas, as toxinas Cry apresentam três domínios: o domínio N-terminal, que contém α -hélices, e dois domínios que contêm estrutura β . Esses domínios são funcionalmente autônomos e cada um deles tem o seu próprio efeito tóxico (De Maagd *et al.*, 2003). Na Figura 3, esses domínios são ilustrados.

Quando a toxina ativada interage com as células do epitélio do intestino, gerando poros na membrana celular, o equilíbrio osmótico é perturbado e, como consequência, as células incham e se rompem. Uma paralisia das atividades do intestino, seguida da queda do pH do suco digestivo e elevação do pH da hemolinfa, são reações observadas nos primeiros minutos (Sthaly *et al.*, 1990).

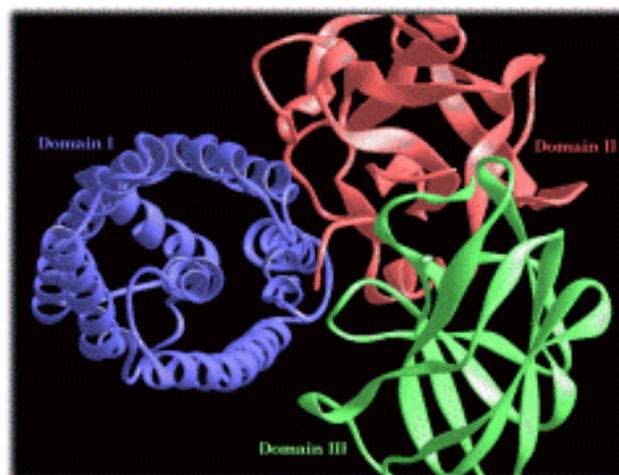


Figura 3 – Representação da inclusão cristalina (δ -endotoxina) produzida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Fonte: www.ogm-info.com

2.4 Condições de Crescimento, Esporulação e Produção de Endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*

Condições operacionais como pH, temperatura e teor de oxigênio dissolvido, além da formulação dos meios de cultivo, têm um efeito relevante no crescimento, esporulação e expressão de endotoxinas de *B. thuringiensis*. Essas condições diferenciam-se de acordo com a variedade e a linhagem em estudo e, por isso, devem ser adequadas a cada uma delas (Roggof & Yousten, 1969; Bernhard & Utz, 1993; Berbert-Molina, 1998).

O cultivo de Bt é normalmente realizado em processo submerso descontínuo (Rowe & Margaritis, 1987), embora Avignone-Rossa & Mignone (1993) tenham estudado o cultivo de Bti em regime descontínuo alimentado em que obtiveram uma menor atividade larvicida. Já em cultivo em estado sólido, bons resultados foram obtidos quanto ao crescimento e a esporulação de Bti utilizando-se farelo de trigo ou farelo de soja como suporte e fonte de carbono e nutrientes (Sousa *et al.*, 2005; Vimala-Devi *et al.*, 2005).

Na seqüência, as necessidades nutricionais e parâmetros operacionais para a condução do cultivo de Bti são descritos detalhadamente.

2.4.1 Componentes para meios de cultivo de *Bacillus thuringiensis*

Os meios de cultivo empregados para a produção de endotoxinas de Bt são geralmente compostos por uma fonte de carbono, uma fonte protéica e sais (Arcas *et al.*, 1987). Como já relatado anteriormente, Bti possui a capacidade de metabolizar diferentes substratos energéticos fazendo com que diversas matérias-primas naturais e resíduos agrícolas de baixo custo possam ser usados como fontes de nutrientes para a formulação de meios de fermentação para o processo (Rogoff & Yousten, 1969; Abdell-Hameed *et al.*, 1990). Entretanto, diferentes autores ressaltam a importância de uma adequada relação entre

carbono e nitrogênio no meio de cultivo para a obtenção de bons resultados (Farrera *et al.*, 1998; Tokcaer *et al.*, 2006).

Avignone-Rossa *et al.* (1993) realizaram um trabalho comparando diferentes concentrações de extrato de levedura de laboratório, em meio contendo glicose, e constataram que concentrações crescentes levaram a um aumento da produção de biomassa e de δ -endotoxinas por Bti. Ainda neste estudo, foi realizada a substituição parcial do extrato de levedura por sulfato de amônio, resultando em incremento do crescimento celular. Já a substituição total de extrato de levedura por sulfato de amônio reduziu a produção de células deste microrganismo.

No trabalho de Abdell-Hameed *et al.* (1991), foi constatado que o uso 20-30 g/L de melaço de cana-de-açúcar, como principal fonte de carbono, e 30 g/L de farelo de soja, especialmente como fonte protéica, foi suficiente para a obtenção de preparações com letalidade sobre larvas de dípteros.

Para Bti IPS82, foram identificadas como melhores fontes protéicas a farinha de peixe, o farelo de soja e o extrato de levedura em estudo em que 54 fontes protéicas foram comparadas (Saar *et al.*, 1996).

Posteriormente, outros autores estudaram fontes alternativas de carbono e nitrogênio para a produção de variedades de Bt. Segundo Khuzhamshukurov *et al.* (2001), a utilização do melaço em vez de glicose não apresenta relevância no nível de entomopatogenicidade de Bti. O uso de um meio formulado com extrato de levedura, batata e melaço de cana-de-açúcar acarreta em decréscimo no custo do meio, não ocorrendo influência na atividade entomopatogênica.

Saksinchai *et al.* (2001) constataram que um meio formulado com levedo de cerveja, resíduo proveniente da indústria cervejeira, 25 g/L de glicose e 3 mg/L de sulfato de ferro,

apresentou formação de biomassa (12 g/L) e esporulação ($3 \cdot 10^9$ esporos/mL) comparáveis ao obtido com extrato de levedura comercial.

Poopathi *et al.* (2003) desenvolveram um meio de cultura com batata como fonte de carbono para o cultivo de Bti e *B. sphaericus*, avaliando suas respectivas toxicidades contra *C. quinquefasciatus*. O meio formulado gerou altas taxas de mortalidade em comparação com o meio padrão (Luria Bertani – LB).

No estudo de Ernandes *et al.* (2003), foi testado o uso de manipueira, um resíduo obtido do processamento de mandioca, como fonte protéica, tendo sido observado um crescimento lento, mas contínuo, resultando em esporulação relevante.

Em um trabalho realizado por Luna *et al.* (2004), foi avaliado o cultivo de Bti utilizando o sobrenadante da floculação e sedimentação da biomassa da própria bactéria, com a finalidade de minimizar os custos do produto formulado em larga escala. Segundo estes autores, o pH decresceu após 6 horas de cultivo e em cerca de 24 horas a glicose foi totalmente consumida. A contagem de esporos alcançou valor em torno de 10^{10} esporos/mL.

Vimala Devi *et al.* (2005) reportam que, atualmente, tem-se procurado utilizar resíduos, como melaço de cana-de-açúcar, diversas sementes de leguminosas e bioprodutos agroindustriais, para a formulação do meio de produção de Bt, uma vez que o custo do processo ainda é alto. Estes autores reportam que meios formulados com cevada podem ser utilizados com sucesso como fonte de carbono e nutrientes para crescimento e esporulação de Bt. Esse resíduo contém baixo conteúdo de proteína e precisa ser suplementado com uma fonte protéica externa.

Em um estudo realizado por Souza *et al.* (2005), foi utilizado, em cultivo em estado sólido, quirera de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e cascas de banana. Segundo estes autores, a quirera de arroz proporcionou maiores valores de esporulação em comparação com os outros substratos, chegando a $2 \cdot 10^{11}$ esporos/Kg, após 12 dias de cultivo. No entanto, o

bagaço de cana-de-açúcar e as cascas de banana apresentaram características químicas e físicas mais interessantes do que a quirera de arroz com relação a uma futura aplicação do produto final no campo.

Cultivos em escala industrial foram realizados por Prabakaran & Balaraman (2006), testando o extrato do farelo de soja e o farelo de trigo em comparação com o meio NYSM que tem como base água de maceração de milho (milhocina). Com o extrato de farelo de soja, determinou-se concentração letal mediana (CL_{50}) de 8,89 ng/mL e esporulação da ordem 10^{11} esporos/mL, enquanto que com o meio NYSM foram atingidos valores muito semelhantes de CL_{50} (9,31 ng/mL) e idêntica esporulação. De acordo com estes autores, o meio formulado com farelo de soja é 42 vezes mais barato que o meio NYSM, sendo este componente o mais econômico e eficiente para uso em grande escala.

A produção de endotoxinas também pode ser afetada pela fonte de carbono e nitrogênio. Conforme İçgen *et al.* (2002), foram observadas altas densidades celulares de Bt com a adição de glicose e maltose ao meio de cultivo; porém, a produção de toxinas Cry 4 foi maior em meios contendo sacarose, lactose e inulina. Estes mesmos autores constataram que peptona foi a fonte protéica mais eficiente para a produção desta toxina.

Özkan *et al.* (2003) reportam que Bti HD-500 produz quantidades apreciáveis de δ -endotoxinas em presença de inulina, dextrina, lactose e sacarose utilizadas como fontes de carbono. Estes mesmos autores afirmam que altas concentrações de fosfatos inorgânicos, como $(NH_4)_2HPO_4$, são requeridas para uma efetiva produção de Cry 4Ba.

Com relação aos sais minerais utilizados no meio de cultivo de Bt, Benoit *et al.* (1990) relatam a importância dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , que influenciam na esporulação, enquanto Obeta & Okafor (1984) constataram que o íon K^+ é essencial à formação do cristal, estando relacionado à produção e a assimilação de polihidroxibutiratos (PHB). Wakisaka *et*

al. (1982) afirmaram, porém, que este último íon desempenha papel fundamental também na esporulação.

Como já verificado por Sikdar *et al.* (1991), os íons Fe^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} são necessários nas concentrações de 2, 5 e 0,25g/mL, respectivamente. Os autores constataram, ainda, que molibdênio exerce efeito inibidor sobre a síntese de toxinas.

Além disso, Içgen *et al.* (2002) afirmam que sais de cálcio, manganês e magnésio incrementam a produção de toxinas, enquanto os de Zn^{2+} e Cu^{2+} influenciam negativamente no crescimento e esporulação de Bti.

2.4.2 Suprimento de oxigênio, pH e temperatura

Segundo Maldonado-Blanco *et al.* (2003), parâmetros como o teor de oxigênio dissolvido no meio, pH e temperatura são de fundamental importância para o cultivo e a produção de endotoxinas de Bti.

O suprimento de oxigênio no cultivo de Bti é de extrema importância para o crescimento, a esporulação e a produção de δ -endotoxinas (Dulmage, 1989). Avignone-Rossa *et al.* (1992) obtiveram crescimento celular, formação de esporos e produção de toxina similares, quando houve alta disponibilidade de oxigênio. Kraemer-Shafhalter & Moser (1996) afirmam que a concentração de oxigênio dissolvido ideal para crescimento e esporulação de Bti ficam em torno de 26% em relação à saturação. Já Berbert-Molina (1998) relata que no cultivo de Bti a concentração deste componente no meio de cultivo deve ficar acima da concentração crítica para o microrganismo para que o crescimento e a esporulação do microrganismo não sejam prejudicados.

As variações ocorridas no pH em cultivos de Bti devem-se à produção de ácidos e formação de grânulos de PHB (Hanson, *et al.* 1963). Conforme Bernhard & Utz (1993), Bti não é particularmente sensível a este parâmetro podendo crescer sob valores de pH entre 5,5

a 8,5; porém, a faixa ideal é de 5,0 a 7,0. Por sua vez, İçgen *et al.* (2002) relatam que a síntese de toxinas por Bti é incrementada quando cultivado em pH próximo a neutralidade.

Conforme Bernhard & Utz (1993), a faixa de temperatura em que ocorre o crescimento de Bt fica em torno de 15° e 45°C, sendo que os valores ótimos se encontram entre 25° e 35°C. Já İçgen *et al.* (2002) afirmam que a faixa ideal fica entre 25 e 37°C, sendo que a maior produção de Cry 4Ba foi observada quando o cultivo foi conduzido a 25°C, apesar de esta temperatura ser considerada baixa para o crescimento de Bti.

2.5 Quantificação Indireta da Concentração Celular de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

A demanda de oxigênio pelo cultivo e a velocidade específica de respiração são ferramentas muito úteis para a caracterização do crescimento e observação das diferentes fases do ciclo celular de Bt (Rowe *et al.*, 2003).

Segundo Silveira & Berbert-Molina. (2005), existem dificuldades na determinação de concentrações celulares ao longo do processo de produção de bioinseticidas à base de Bti, 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.

Berbert-Molina *et al.* (2001) definiram algumas equações para a descrição matemática do crescimento de Bti, utilizando variáveis de fácil quantificação como a concentração de fonte de carbono e a demanda de oxigênio pelo cultivo, levando em conta a relação carbono/nitrogênio presente no meio. Os mesmos autores, entretanto, relatam que a aplicação deste método é limitada a meios específicos.

Silveira & Berbert-Molina (2005) avaliaram o método indireto de quantificação de biomassa microbiana de Bti, originalmente proposto por Zabriskie & Humphrey (1978) para leveduras. No caso, a estimativa da concentração é feita com base em dados obtidos no

balanço respiratório: demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR), fator de conversão real de oxigênio em células (Y_{GO}) e coeficiente de manutenção (m_o). Neste trabalho, os valores de fator de conversão real de oxigênio em células (Y_{GO}) e o coeficiente de manutenção (m_o) foram determinados graficamente como $0,091 \text{ g células / mmol O}_2$ e $2,1 \text{ mmol/g/h}$, respectivamente. De acordo com os autores, observou-se uma boa correlação entre os resultados experimentais dos cultivos de Bti e os estimados pelo modelo, com desvios mais acentuados nos períodos que antecedem as fases estacionárias de cada cultivo, devido, provavelmente, às drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem no cultivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

Em todos os ensaios descritos neste trabalho, foi utilizada a linhagem IPS82 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sorotipo H-14, originária da coleção de culturas do Instituto Pasteur (França). As culturas foram mantidas em tubos com agar nutriente inclinado, estocados a 4°C.

3.2 Meios de Cultivo Básicos

Para a manutenção de culturas e contagem do número de esporos, foi utilizado o meio ágar nutriente, que contém (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona de carne, 5,0; agar-agar, 18,0.

Para a reativação de culturas (pré-inóculo) foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB) (g/L): peptona, 10,0; extrato de levedura, 5,0; NaCl, 5,0.

O Meio GYS (Rogoff & Yousten, 1969), usado no preparo dos inóculos para os ensaios em biorreator e como base nos diferentes ensaios fermentativos realizados, apresenta os componentes descritos a seguir (g/L): glicose, 20 g/L; extrato de levedura, 12,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,09; K_2HPO_4 , 1,5; KH_2PO_4 , 1,5.

A esterilização dos meios foi realizada em autoclave à pressão de 1 atm, por 20 minutos.

3.3 Condições Operacionais Básicas

A ativação de culturas, para a realização dos ensaios, foi feita em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio LB, vedados com fina camada de gaze e algodão hidrófobo, sendo estes frascos inoculados por transferência direta de culturas estoque em ágar nutriente

inclinado. Os frascos foram mantidos a 30°C, em agitador recíproco (CERTOMAT U, B. BRAUN BIOTECH, RFA), a 130 rpm, por 15 h.

Nos ensaios em frascos sob agitação, a inoculação foi feita diretamente a partir das culturas em meio LB, em volume correspondente a 5% (v/v) do volume inicial de meio no frasco.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio GYS, mantidos sob agitação recíproca de 130 rpm, por até 36 h, a 30°C.

Nos cultivos realizados em biorreator de bancada, os inóculos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do mesmo meio utilizado no biorreator (GYS), nas mesmas condições descritas para os ensaios em frascos sob agitação. Os frascos de inóculo foram mantidos em agitador recíproco, a 130 rpm e a 30°C, por 5 horas. Após este período, um volume desta cultura, correspondente a 5% do volume inicial de meio no reator (3,5 L), foi usado como inóculo nos diferentes ensaios.

Os ensaios em biorreator foram realizados em regime descontínuo, utilizando um fermentador de bancada BIOSTAT B (B. BRAUN BIOTECH, RFA) (Figura 4).



Figura 4 - Sistema de fermentação utilizado no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em fermentador de bancada BIOSTAT B (B. BRAUN).

A cuba de fermentação em vidro refratário tem volume útil de 5 litros, com a temperatura do meio controlada através de uma camisa externa. O biorreator é equipado com quatro chicanas, três turbinas com seis pás planas, dispersor de ar em forma de ferradura

perfurada, eletrodos de pH e oxigênio dissolvido e sensores de temperatura e espuma. O equipamento é equipado com um módulo com três bombas peristálticas para adição de base, ácido e anti-espumante.

Os meios de cultivo foram preparados dentro da própria cuba e esterilizados em autoclave. Os eletrodos de pH e de oxigênio dissolvido foram higienizados com etanol (70% v/v) antes do acoplamento à cuba de fermentação. O nível de espuma foi controlado automaticamente com anti-espumante Fluent Cane 114 (FENIL QUÍMICA, Brasil).

As condições básicas de operação nos ensaios em biorreator foram as seguintes: temperatura, 30° C; frequência inicial do agitador, 550 rpm; pH, entre 5,5 e 7,0, pela adição de KOH (5M) e HCl (2M). Sempre que possível, a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida no nível mínimo de 30% da saturação através do aumento da frequência do agitador, do fluxo de ar e da pressão interna do reator. Para controle da pressão, ao biorreator foi acoplado um manômetro de mercúrio com tubo em forma de “U”.

3.4 Ensaios Realizados com Diferentes Formulações de Meio de Cultivo

A partir do meio de Rogoff & Yousten (1969), foram estudadas variações de fontes de substrato energético – lactose, sacarose e glicose, nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L. Como alternativas ao extrato de levedura purificado, como fonte protéica e vitaminas, foram testados: extrato de levedura bruto PRODEX (PRODESA, Brasil), extrato de soja em pó desengordurado PS (OLVEBRA, Brasil), proteína isolada de soja SAMPROSOY 90 NB (BUNGE ALIMENTOS, Brasil) e farelo de soja.

A influência da temperatura sobre o processo foi avaliada em valores de 23, 25, 27 e 30°C, utilizando-se o meio GYS e as demais condições de cultivo básicas.

Com relação aos ensaios de variação de pH, compararam-se cultivos sem controle deste parâmetro, com pH na condição básica, entre 5,5 e 7,0, e, ainda, valores fixos em 5,5, 6,2 e 7,0. Nestes experimentos, utilizou-se o meio GYS à temperatura de 30°C.

3.5 Métodos Analíticos Utilizados nos Ensaios

3.5.1 Coleta e preparo das amostras

Nos ensaios em frascos sob agitação, amostras foram coletadas periodicamente para a determinação de pH, açúcares redutores e/ou redutores totais, concentração celular, formação de esporos e avaliação qualitativa de endotoxinas de Bti. Nos ensaios em fermentador de bancada, o procedimento utilizado com relação às amostras foi o mesmo, e, adicionalmente, parâmetros como pH, percentual de oxigênio dissolvido em relação à saturação (pO_2) foram obtidos diretamente na unidade de controle do fermentador. Em amostras tomadas ao final de alguns ensaios, a atividade larvicida dos meios fermentados foi avaliada em bioensaios.

3.5.2 Medida da concentração celular

Em fermentações realizadas com meios solúveis, tanto em agitador de bancada como em fermentador, a quantificação da biomassa foi realizada diretamente por gravimetria, após filtração da amostra em membrana de celulose-acetato, com porosidade de 0,2 μm , e seca em estufa a 90°C. Alternativamente, em experimentos com esse tipo de meio, foram determinadas as absorbâncias de suspensões celulares em espectrofotômetro AURORA INSTRUMENTS (EUA), a 560 nm e através de parâmetros respiratórios.

No caso de meios contendo sólidos em suspensão, foi realizada a determinação indireta de concentração de biomassa por parâmetros respiratórios de acordo com o método descrito por Silveira & Berbert-Molina (2005), que é detalhado adiante neste capítulo.

3.5.3 Determinação do número de esporos

Nos ensaios em frascos sob agitação, foram feitas contagens de esporos nas amostras de 36 e 52 horas, e em fermentador avaliaram-se as amostras no período de 12 a 48 horas de processo. Alíquotas das amostras foram submetidas a choque térmico em banho a 80°C por 10 minutos, para eliminação de formas vegetativas, seguido de resfriamento em banho de gelo. Posteriormente, foram feitas pré-diluições destas amostras em solução de Tween 80 (0,1%) e diluições seriadas em solução com 9 g/L de NaCl previamente esterilizadas, em tubos com tampa rosqueada. Alíquotas de 1,0 mL das amostras diluídas foram transferidas para placas de Petri, sobre as quais verteram-se 9,0 mL de meio ágar-nutriente a 55°C. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa a 30°C, por 24 horas. Uma contagem foi feita após 15 horas de incubação, repetindo-se a operação com 24 h.

O resultado foi expresso em número de esporos por volume (esporos/mL), calculado pela multiplicação do número de colônias pela diluição correspondente. O número de colônias considerado nos cálculos representou a média aritmética das contagens observadas nas três placas de cada amostra.

3.5.4 Observação microscópica

As variações morfológicas do microrganismo ao longo dos cultivos foram observadas em microscópio de contraste de fase, em preparações à fresco, que permite a visualização dos esporos e do cristal protéico no citoplasma bacteriano (Berbert-Molina, 1998).

3.5.5 Medida da concentração de açúcares redutores

Para determinação do teor de carboidratos redutores, foi utilizado o sobrenadante de amostras previamente centrifugadas (CENTRÍFUGA SIGMA 1-13, B. BRAUN BIOTECH, RFA) e apropriadamente diluídas, em espectrofotômetro (AURORA INSTRUMENTS UV-210, EUA), a 545 nm, pelo método de DNS (ácido 3,5 di-nitrosalicílico) (Miller, 1959). Na realização do método, às amostras diluídas adicionou-se 1,5 mL da solução de DNS, sendo feito um “branco” da reação, substituindo-se o mesmo volume da amostra diluída por água destilada. Os tubos foram colocados em banho a 100°C, por 5 minutos, e, em seguida, resfriados em banho de gelo. Após esse procedimento, foram acrescentados às preparações, 8 mL de água destilada e medida a absorbância em espectrofotômetro. As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras foram determinadas com uma curva de calibração construída com soluções de glicose entre 100 e 1000 mg/L.

3.5.6 Medida da concentração de açúcares redutores totais

Para os meios formulados com sacarose, determinou-se a concentração de açúcares redutores totais. Foi realizada uma prévia centrifugação de 5 mL de amostras retiradas em diversos tempos de cultivo. Do sobrenadante, foi retirada uma alíquota de 1 mL à qual foi adicionado 1 mL de HCl (2M) para hidrólise da sacarose. Após 10 minutos em banho termostaticado a 65°C, as amostras foram alcalinizadas com 1,5 mL de NaOH (4M) e diluídas apropriadamente. Após este procedimento, os carboidratos redutores formados na reação de hidrólise foram submetidos ao método do DNS (Miller, 1959) descrito anteriormente.

3.5.7 Determinação do teor protéico dos meios de cultivo

O teor protéico dos meios foi determinado no Laboratório de Tecnologia em Alimentos do INBI/UCS, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1993).

3.5.8 Avaliação da expressão de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

A avaliação de proteínas totais, em sistema eletroforético desnaturante, foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), utilizando-se amostras provenientes dos cultivos realizados. A biomassa contida em 500 µL da cultura foi centrifugada e posteriormente ressuspensa em 500 µL de água. Desta suspensão, foram retirados 100 µL aos quais foram adicionados 100 µL de tampão desnaturante contendo SDS e 2-mercaptoetanol. As amostras foram submetidas a fervura, durante 10 minutos, e utilizadas diretamente na eletroforese. A eletroforese foi desenvolvida em gel descontínuo, formado por um gel concentrador contendo 4,5% de acrilamida (2,5 mL de 4x upper buffer, 0,1 mL de SDS 10%, 1,5 mL de acril-bis, 5,4 mL de água, 0,1 mL de persulfato de amônio 10%, 7 µL de TEMED) e um gel separador contendo 12% de acrilamida (7,5 mL de 4x lower buffer; 0,3 mL de SDS 10%, 12 mL de acril-bis, 9,4 mL de água; 0,5 mL de persulfato de amônio 10%, 7 µL de TEMED)

A corrida eletroforética foi realizada com uma corrente constante de 80 volts no gel concentrador e 150 volts no gel separador. Quando o marcador (azul de bromofenol) atingiu a parte inferior do gel, foi retirado e fixado em solução contendo metanol/ ácido acético/ água (30/ 7/ 63) por 30 minutos. O gel foi corado por 18 horas com Coomassie Brilliant Blue R-250 (50 mg/100 mL) e dissolvido na solução anterior. Após a coloração, foram realizadas várias lavagens com solução fixadora até obter-se boa definição das bandas.

A massa molecular dos polipeptídeos foi determinado por comparação com um marcador molecular padrão de massa molecular (GIBCO –10747-012) contendo os

polipeptídeos de 10, 25, 30, 50, 70, 90, 100, 120, 160 e 220 kDa.

3.5.9 Atividade larvicida em meios de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico do IB/UCS, com 25 larvas de *Culex quinquesfasciatus*, no terceiro estágio de desenvolvimento, colocadas em copos contendo 200 mL de água com 0,1 g de levedo de cerveja e 100 µL das amostras, previamente diluídas, provenientes dos ensaios realizados. Os copos contendo os bioensaios foram mantidos em ambiente a 25°C e 70% de umidade. Após 48 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas. A concentração letal mediana (CL₅₀), que leva à morte de 50% das larvas, foi calculada pelo teste de Probit (Finney, 1971).

3.5.10 Medida da Fração Molar de Oxigênio em Cultivos em Biorreator

A medida da fração molar de oxigênio foi realizada em oxímetro DIGIMED-DM4 acoplado ao fermentador através uma coluna de vidro ligada ao fermentador por mangueiras de silicone.

3.6 Cálculos de Parâmetros Fermentativos e Respiratórios

3.6.1 Velocidade específica de crescimento

A partir de pontos experimentais relacionando concentrações celulares ou absorbâncias de cultivos com o tempo de processo, foi realizado um ajuste sigmoidal, com o programa Microcal Origin 6.0. A curva ajustada foi convertida em tabela e, com estes dados, calculados os logaritmos naturais de cada valor de concentração ou absorbância. Uma nova curva, relacionando estes valores logarítmicos com o tempo, foi construída e novamente

ajustada. As velocidades específicas de crescimento (μ_x) foram obtidas derivando-se a função estabelecida nesta última curva.

As máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$) foram determinadas por regressão linear do trecho linear da curva semi-logarítmica, correspondendo à fase exponencial de crescimento, sendo o coeficiente angular da equação de reta o próprio $\mu_{x,m}$.

3.6.2 Fator de conversão de substrato em células

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) foi calculado levando em consideração os valores inicial e final de concentração celular e substrato consumido, através da seguinte equação:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

Onde:

$Y_{x/s}$ – fator de conversão de substrato em células (g/g),

X_f – concentração celular ao final do cultivo (g/L),

X_i – concentração celular no início do cultivo (g/L),

S_i – concentração de substrato no início do cultivo (g/L),

S_f – concentração de substrato no final do cultivo (g/L).

3.6.3 Demanda de oxigênio pelo cultivo e velocidade específica de respiração

O cálculo da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) foi realizado com base no método descrito por Schmidell (2001). O fluxo de gás (ar) que entrou no fermentador durante os cultivos foi medido em "L/h", convertendo-se a unidades para mol ar / h através da equação:

$$F_n = \frac{P \cdot F_v}{R \cdot T}$$

Onde:

P – pressão (mmHg),

F_V - vazão volumétrica de ar (L/h),

F_n - vazão em base molar de ar (mol/h),

R - constante dos gases ($6,23 \cdot 10^4$ mm Hg . ml / mol /K),

T - temperatura (K).

A partir da fração molar de oxigênio (y_{O_2} no ar = 0,21), foi calculada a vazão molar de O_2 na entrada do sistema como:

$$F_{O_{2,e}} = F_n \cdot y_{O_{2,e}}$$

Onde:

$F_{O_{2,e}}$ - vazão em base molar de oxigênio na entrada do fermentador (mol/h),

F_n - vazão em base molar de ar (mol/h),

$y_{O_{2,e}}$ - fração molar de oxigênio no ar.

Foi considerado que a vazão de gás que entrou no fermentador foi igual à vazão de gás que saiu do fermentador, uma vez que o teor de oxigênio dissolvido no meio não foi limitado, sendo possível admitir-se que o microrganismo estivesse utilizando, apenas, a via respiratória. Neste caso, tem-se que o quociente respiratório foi igual a 1, ou seja, para cada mol de O_2 consumido, 1 mol de CO_2 foi produzido. Assim, para calcular a vazão de gás na saída do fermentador, utilizou-se a seguinte equação:

$$F_{O_{2,s}} = F_n \cdot y_{O_{2,s}}$$

Onde:

$F_{O_{2,s}}$ - vazão em base molar de oxigênio na saída do fermentador (mol/h),

$y_{O_{2,s}}$ - fração molar de oxigênio no gás que sai do fermentador.

A partir dos dados obtidos, calculou-se a demanda de oxigênio ao longo dos diversos ensaios de fermentação que foram realizados, através da seguinte equação:

$$OUR = \frac{F_{O_{2,e}} - F_{O_{2,s}}}{V} \cdot 1000 \quad (1)$$

Onde:

OUR - demanda de oxigênio pelo cultivo (mmol/L/h),

V - volume do meio de cultura (L).

Nos meios formulados com extrato de levedura bruto foi possível obter a velocidade específica de respiração Q_{O_2} de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{O_2} = OUR / X \quad (2)$$

Onde:

OUR – demanda de oxigênio pelo cultivo (mmolO₂/L/h),

X – concentração celular (g/L),

Q_{O₂} – velocidade específica de respiração (mmolO₂/g/h).

Para o cálculo do volume de meio em fermentação considerou-se o volume inicial, o volume retirado de amostra e o volume de base adicionado no meio para o controle do pH.

A medida da pressão no interior do fermentador foi feita com um manômetro de coluna de mercúrio, enquanto a temperatura do fluxo gasoso foi medida no próprio oxímetro.

3.6.4 Cálculo do fator real de conversão de oxigênio em células e coeficiente de manutenção

A correlação entre as velocidades específicas de crescimento (μ_x) e de respiração (Q_{O_2}), de acordo com Nagai (1979), tem a seguinte forma:

$$Q_{O_2} = \frac{1}{Y_{GO}} \mu_x + m_o \quad (3)$$

Onde:

Y_{GO} - fator de conversão real de oxigênio em células (g/mmolO₂),

m_o - coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmolO₂/g/h).

Utilizando-se dados de concentração celular obtidos por gravimetria, foram determinadas as velocidades específica de crescimento (μ_x) em função do tempo. Para estes

mesmos tempos, calcularam-se as velocidades específicas de respiração (Q_{O_2}). A partir da Equação 3, os valores de Y_{GO} (fator real de conversão de oxigênio em células) e m_o (coeficiente de manutenção) foram determinados graficamente em uma curva $Q_{O_2} = f(\mu_X)$.

3.6.5 Estimativa de concentração celular a partir de parâmetros respiratórios

O procedimento descrito a seguir foi originalmente proposto por Zabriskie & Humphrey (1978) para microrganismos aeróbios e posteriormente adaptado por Silveira & Berbert-Molina (2005) para *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Multiplicando-se os dois lados da Equação 3 pela concentração celular (X), tem-se:

$$Q_{O_2} X = \frac{1}{Y_{GO}} \frac{dX}{dt} + m_o \cdot X \quad (4)$$

Onde:

$Q_{O_2} \cdot X$ = OUR - demanda de oxigênio pelo cultivo (mmolO₂/L/h),

X - concentração celular (g/L)

dX/dt - velocidade instantânea de crescimento (h⁻¹).

A Equação 4 pode ser integrada, usando o método dos trapézios, como sugerido por Zabriskie & Humphrey (1978),

$$\int_{t_{n-1}}^{t_n} OUR \, dt = \int_{X_{n-1}}^{X_n} \frac{1}{Y_{GO}} \, dX + \int_{t_{n-1}}^{t_n} m_o \, X \, dt \quad (5)$$

tendo como resultado

$$X_n = \frac{Y_{GO} \cdot (\Delta t/2) \cdot [(OUR)_n + (OUR)_{n-1}] + [1 - m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)] \cdot X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)} \quad (6)$$

Onde:

$\Delta t = t_n - t_{n-1}$ - intervalo de tempo no processo (h),

X_{n-1} - concentração celular em t_{n-1} (g/L),

X_n - concentração celular em t_n (g/L),

$(OUR)_{n-1}$ - demanda de oxigênio em t_{n-1} (mmolO₂/L/h),

$(OUR)_n$ - demanda de oxigênio em t_n (mmolO₂/L/h).

A aplicação da Equação 6 é feita ponto a ponto, sendo o primeiro valor de concentração celular determinado a partir do inóculo de cada batelada. Com as constantes Y_{GO} e m_o e com os valores de OUR calculados por balanço de oxigênio, estimaram-se as concentrações celulares nos cultivos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* realizados em biorreator.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos nos ensaios fermentativos realizados. Inicialmente, são discutidos alguns métodos de quantificação celular utilizados no trabalho e, na seqüência, é relatado um conjunto de resultados – estruturados na forma de artigos científicos – em que avaliam-se os efeitos de diferentes fontes protéicas, substratos energéticos, temperatura e pH sobre o crescimento e a formação de endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82.

4.1 Comparação entre Métodos de Quantificação de Concentração Celular

Em cultivos de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, a quantificação da concentração celular é, muitas vezes, dificultada devido à presença de sólidos suspensos provenientes de resíduos agroindustriais e matérias-primas naturais utilizadas na formulação dos meios. Neste caso, a aplicação de técnicas convencionais como a determinação da massa seca de microrganismos e a medida de absorvância tornam-se inviáveis.

Entretanto, a realização da análise cinética do processo depende fundamentalmente da concentração de biomassa obtida nos cultivos. Como alternativa aos métodos de gravimetria e absorvância, pode ser utilizada a estimativa da concentração celular de Bti a partir da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR), descrito por Silveira e Berbert-Molina (2005). Os ensaios foram conduzidos em fermentador de bancada com o meio de cultivo com extrato de levedura bruto que, por ser totalmente solúvel, possibilitou a comparação dos três métodos.

Na Figura 4, que representa o perfil da OUR em função do tempo de cultivo, observou-se maior valor foi alcançado em 6 horas de cultivo chegando a 58,1 mmolO₂/L/h.

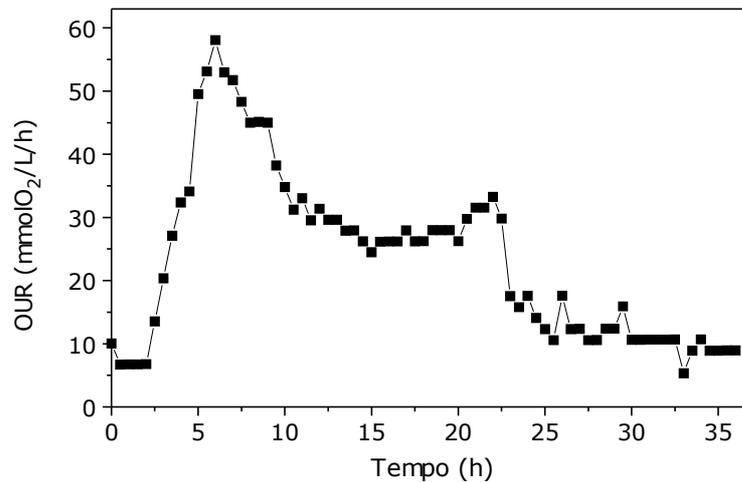


Figura 5 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 12 g/L de extrato de levedura bruto: variação da demanda de oxigênio pelo cultivo - OUR - em função do tempo

A partir da estimativa de OUR, pela Equação 1 (p. 28), foram calculados graficamente, como mostra a Figura 5, que relaciona as velocidades específicas de respiração (Q_{O_2}) e de crescimento (μ_x), os valores do fator de conversão de oxigênio em células ($Y_{GO} = 0,035 \text{ g/mmO}_2$) e do coeficiente de manutenção para o oxigênio ($m_o = 1,72 \text{ mmol/g/L}$). A dispersão de pontos observada na Figura 6 é aceitável em ajustes deste tipo. No trabalho de Silveira & Berbert-Molina (2005) foram encontrados valores de $0,091 \text{ g/mmO}_2$ e $2,13 \text{ mmol/g/L}$ para Y_{GO} e m_o , respectivamente.

No sistema utilizado por Silveira & Berbert-Molina (2005), foi medida a fração molar de oxigênio em um sistema que utiliza também uma medida de dióxido de carbono. Estes autores obtiveram um bom ajuste entre os dados medidos através de parâmetros respiratórios e os obtidos por gravimetria. Neste trabalho apenas a fração molar de oxigênio foi estimada com um oxímetro portátil relativamente simples. Neste sistema é necessário manter o teor de oxigênio dissolvido sempre acima dos valores críticos.

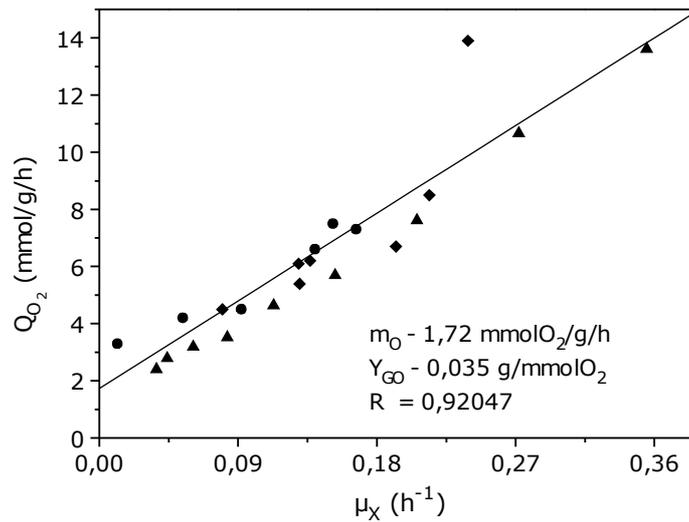


Figura 6 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em três diferentes ensaios em meio contendo extrato de levedura bruto (ELB) (6 e 12 g/L): (▲) Ensaio 1 - ELB 12 g/L, (◆) Ensaio 2 - ELB 12 g/L e (●) Ensaio 3 - ELB 6 g/L: velocidade específica de respiração - Q_{O_2} - em função da velocidade específica de crescimento - μ_x

Com base em valores de OUR, Y_{GO} e m_0 , foi possível obter um excelente ajuste ($R = 0,9947$) de curva de crescimento em comparação com os dados obtidos por gravimetria (Figura 7), com as concentrações celulares podendo ser estimadas a partir do balanço gasoso até a fase estacionária. A biomassa determinada a partir da massa seca foi de 10,7 g/L em 11 horas de cultivo. Valor semelhante foi alcançado, neste mesmo tempo, através da medida de balanço gasoso: cerca de 11,4 g/L.

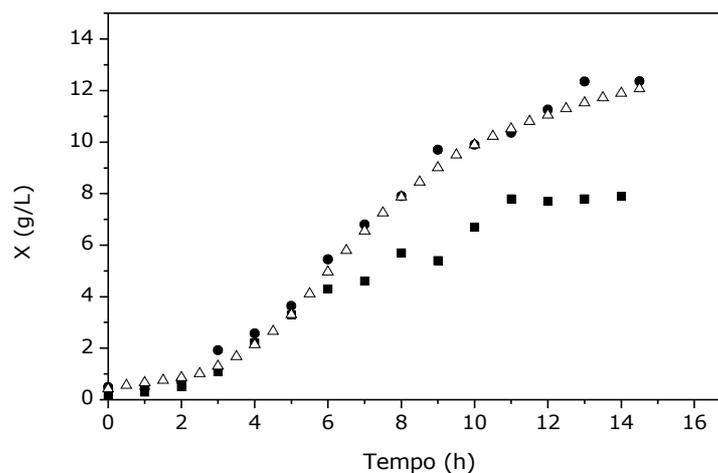


Figura 7 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada contendo 12 g/L de extrato de levedura bruto: concentração celular - X - medida por gravimetria (●), concentração celular medida por absorvância (■) concentração celular medida a partir do balanço respiratório (Δ).

Apesar de Y_{GO} e m_0 terem sido obtidos em um meio formulado com extrato de levedura bruto, na seqüência do trabalho, estes parâmetros foram utilizados para estimativa indireta de concentração celular em meios contendo sólidos em suspensão, admitindo-se a sua validade também nestes casos.

Na Figura 7 observa-se ainda, que as medidas obtidas por absorvância somente tiveram um bom ajuste até 5-6 horas de cultivo. Neste tempo de processo, normalmente, o microrganismo passa a se agrupar em grumos, como mostra a Figura 8, o que interfere na leitura espectrofotométrica, impedindo medidas confiáveis após este tempo de cultivo. Estas fases ocorridas com o microrganismo foram descritas por Berbert-Molina (1998) que relata a ocorrência de bruscas mudanças morfológicas a partir da quinta hora de cultivo de Bti IPS82: as células perdem a motilidade, diminuem de tamanho e agrupam-se em flocos.

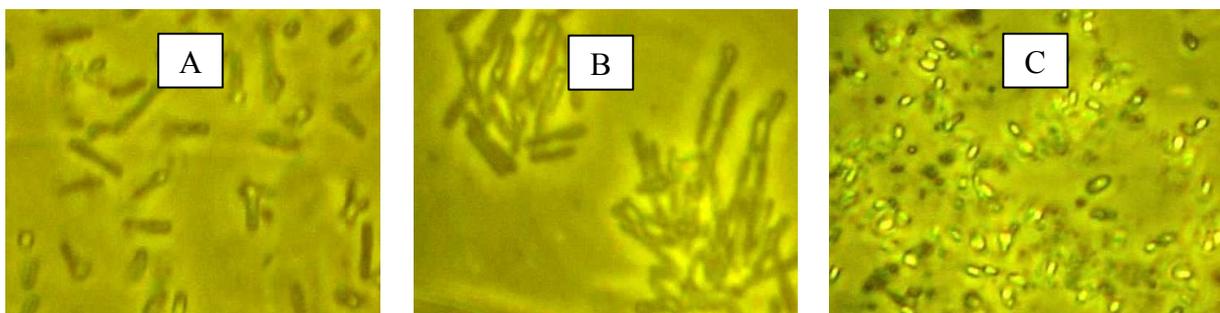


Figura 8 - Fases do crescimento celular indicando as mudanças morfológicas e fisiológicas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivo contendo extrato de levedura bruto 12 g/L em fermentador de bancada e observadas em microscópio de contraste de fase: [A] 4 horas de cultivo – células vegetativas livres; [B] 6 horas de cultivo – formação de grumos; [C] 24 horas de cultivo – esporos livres

Apesar disto, em meios com compostos solúveis, principalmente em ensaios realizados em agitador de bancada, a medida de absorvância pôde ser considerada como a melhor alternativa para o acompanhamento do crescimento nas primeiras horas dos ensaios, possibilitando calcular a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{Xm}), parâmetro fundamental para comparação de condições iniciais

4.2 Artigo 1: Utilização de Diferentes Fontes Protéicas na Formulação de Meios de Crescimento, Esporulação e Formação de Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Utilização de Diferentes Fontes Protéicas na Formulação de Meios de Crescimento, Esporulação e Formação de Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Resumo

No presente trabalho, foi comparada a influência de diferentes fontes protéicas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, com o objetivo de definir uma formulação com menor custo e, ao mesmo tempo, que favorecesse a operação do processo. Melhores resultados foram obtidos com extrato de levedura bruto (ELB; 12 g/L), que propiciou concentração celular de 11,5 g/L, esporulação de 3.10^{12} esporos/mL, além de alcançar mortalidade comparável ao produto comercial com larvas de *Culex quinquefasciatus*, atingindo uma CL_{50} de 0,21 ppm. Também foram obtidos resultados relevantes quando a fonte protéica utilizada foi o farelo de soja (20 g/L); concentração celular de 11,0 g/L, 6.10^{12} esporos/mL e CL_{50} de 0,45 ppm. Entre os componentes testados, ELB mostrou-se como uma fonte protéica mais adequada por ter um preço significativamente mais baixo que o extrato de levedura geralmente utilizado em laboratório e por não conter sólidos em suspensão, o que facilitaria a condução do processo em maiores escalas.

Introdução

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) é uma bactéria Gram-positiva que possui a particularidade de sintetizar, concomitantemente à fase de esporulação, um cristal protéico composto por proteínas altamente tóxicas contra dípteros (Becker & Margalit, 1993; Madigan *et al.*, 1997).

Biolarvicidas baseados nas endotoxinas de Bti são específicos e seguros, não prejudicando outras espécies e o meio ambiente (Becker & Margalit, 1993), possuindo, porém, um preço relativamente alto.

A fonte protéica é um nutriente imprescindível para o crescimento, esporulação e a formação de endotoxinas de Bti (Kraemer-Shafhalter & Moser, 1996). Meios contendo extrato de levedura favorecem o crescimento desta bactéria, pois possuem todos os precursores necessários para o seu desenvolvimento (Mignone & Avignone-Rossa, 1996). É também relatado na literatura, a necessidade do balanceamento entre o carbono e o nitrogênio presente no meio (Farrera *et al.*, 1998; Tockaer *et al.*, 2006)

A fonte protéica influencia tanto o crescimento celular e a esporulação quanto a produção de toxinas, sendo empregados, em laboratório, meios contendo extrato de levedura ou peptona (Vimala-Devi *et al.*, 2005; İçgen *et al.*, 2002). Com o intuito de baixar o custo do cultivo de Bti, podem ser utilizados diversos resíduos agroindustriais e matérias-primas naturais como cevada, melão, sementes de leguminosas, farelo de soja (Abdel-Hameed, 1990; Ernandes *et al.*, 2003; Vimala-Devi *et al.*, 2005) e, até mesmo, o sobrenadante de outras fermentações de Bti (Luna *et al.*, 2004).

Um ponto pouco considerado com relação aos meios de cultivo para Bti, é que as matérias-primas naturais ou agroindustriais de baixo custo freqüentemente contêm altos teores de sólidos em suspensão, o que resulta em alguma dificuldade para o processo em aspectos como a transferência de oxigênio para o cultivo, os tratamentos finais para recuperação das toxinas produzidas e a própria formulação do larvicida. Além disso, a cinética do processo é pouco estudada, uma vez que a insolubilidade do meio impossibilita a medição da concentração celular por métodos convencionais (Silveira e Berbert-Molina, 2005). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes fontes protéicas adicionadas ao meio

de cultivo para Bti em substituição ao extrato de levedura comumente utilizado em laboratório, com o intuito de baixar o custo do processo.

Material e Métodos

Microorganismo

O microrganismo utilizado foi *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 sorotipo H14 (Instituto Pasteur, França) foi utilizado em todos os experimentos. A linhagem foi conservada em tubos inclinados a 4°C.

Meios de cultivo

Para a manutenção de culturas e plaqueamento para contagem de esporos foi utilizado o meio ágar nutriente, que contém (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona de carne, 5,0; agar-agar, 18,0.

Para a reativação de culturas de estoque, foi utilizado o meio LB com a seguinte composição (g/L): peptona, 10,0; extrato de levedura, 5,0; NaCl, 5,0.

O meio GYS (Rogoff e Yousten, 1969), usado no preparo dos inóculos para os ensaios em biorreator e como base nos cultivos de Bti, tem a seguinte composição (g/L): glicose, 20; extrato de levedura, 12,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,09; K_2HPO_4 , 1,5; KH_2PO_4 , 1,5.

Foram realizados ensaios preliminares em frascos sob agitação utilizando, como fontes protéicas, extrato de levedura de laboratório OXOID (EL; 12 g/L), extrato de levedura bruto (ELB; 6, 12, 15, 18, 21 e 24 g/L), proteína isolada de soja (S; 6 e 12 g/L), extrato de soja em pó desengordurado (PS; 4, 8 e 12 g/L) e farelo de soja (FS; 10, 20 e 40 g/L). Posteriormente estas fontes protéicas foram testadas em biorreator de bancada, sendo que a concentração de cada componente protéico foi baseada nos ensaios preliminares em frascos sob agitação.

Condições operacionais

Nos ensaios em frascos sob agitação, o pré-inóculo foi preparado introduzindo-se duas alçadas de cultura estoque do microrganismo em 25 mL de meio LB em frasco Erlenmeyer de 125 mL, deixado em agitador recíproco (CERTOMAT - U, B. BRAUN BIOTECH, RFA) a 130 rpm e 30°C por 15 horas. Um volume correspondente a 5% (v/v) desta cultura foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio GYS com extrato de levedura comum ou com a fonte protéica em estudo. Posteriormente, alguns meios foram novamente testados em biorreator de bancada (BIOSTAT B, B. BRAUN BIOTECH, RFA) para confirmação dos resultados em condições controladas. Estes ensaios foram iniciados com a adição de um volume de inóculo – preparado em Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio GYS básico, nas condições citadas acima – que correspondesse a 5% do volume de meio no biorreator. O pH foi ajustado em 7,0 logo após a inoculação e, posteriormente, controlado entre 5,5 e 7,0 com a adição de KOH (5M) e HCl (2M), e a temperatura foi mantida entre 28 e 30°C. O fluxo de ar e a frequência do agitador foram, inicialmente, 2,6 L/min e 550 min⁻¹, com estes valores sendo variados ao longo dos ensaios a fim de manter o teor de oxigênio dissolvido no meio de cultivo em torno de 30% da saturação.

Métodos analíticos

A fração molar de oxigênio foi medida em oxímetro (DIGIMED DM-4) e convertida em demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) pela expressão:

$$\text{OUR} = F_n \frac{y_{\text{O}_2\text{e}} - y_{\text{O}_2\text{s}}}{V}$$

Onde: F_n , vazão molar de ar (mmol/h); $y_{\text{O}_2\text{e}}$, fração molar de oxigênio na entrada do reator; $y_{\text{O}_2\text{s}}$, fração molar de oxigênio na saída do reator; V , volume de meio no reator (L).

A partir deste dado foi possível estimar concentrações celulares utilizando os valores do fator real de conversão de oxigênio em células ($Y_{\text{GO}} = 0,035$ g células/mmol O₂) e do

coeficiente de manutenção ($m_o = 1,72 \text{ mmol O}_2/\text{g/h}$), calculados graficamente conforme o modelo proposto por Silveira e Berbert Molina (2005). A equação utilizada na estimativa foi a seguinte:

$$X_n = \frac{Y_{GO} \cdot (\Delta t/2) \cdot [(OUR)_n + (OUR)_{n-1}] + [1 - m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)] \cdot X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)}$$

Onde: $\Delta t = t_n - t_{n-1}$, intervalo de tempo no processo; X_{n-1} , concentração celular em t_{n-1} ; X_n , concentração celular em t_n ; $(OUR)_{n-1}$, demanda de oxigênio em t_{n-1} ; $(OUR)_n$, demanda de oxigênio em t_n .

A determinação do número de esporos foi realizada após a aplicação, às amostras, de um choque térmico a 80°C por 10 minutos para a eliminação de formas vegetativas. Em seguida, os esporos foram suspensos em solução de Tween 80 (0,1% v/v) e, posteriormente, sofreram diluições seriadas em solução 0,9% (p/v) de NaCl. O plaqueamento foi feito em meio ágar nutriente, sendo as placas incubadas a 30°C por 24 horas quando foi realizada a contagem das colônias. Nos ensaios em frascos sob agitação, as amostras para plaqueamento foram retiradas após 36 horas de cultivo, enquanto que nos ensaios em biorreator as amostras foram tomadas periodicamente a partir de 18 horas de processo.

Os ensaios biológicos foram realizados com 25 larvas de *Culex quinquesfasciatus*, no terceiro estágio de desenvolvimento, colocadas em copos contendo 200 mL de água com 0,1g de levedo de cerveja e 100 μL das amostras, previamente diluídas, provenientes dos ensaios realizados. Os copos contendo os bioensaios foram mantidos a 25° C e 70% de umidade. Após 48 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas. A concentração letal mediana (CL_{50}), que leva à morte de 50% das larvas, foi calculada pelo teste de Probit (Finney, 1971).

Os açúcares redutores foram medidos pelo método do DNS (Miller, 1959) e o teor protéico dos meios foi determinado de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1993).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1, são apresentados os resultados dos ensaios em frascos sob agitação. Verificou-se que melhores esporulações foram obtidas utilizando-se o ELB nas concentrações de 12, 15 e 18 g/L, o extrato de soja em pó desengordurado 8 e 12 g/L e o farelo de soja 20 g/L. Observou-se que concentrações acima de 18 g/L para o ELB, assim como para o FS contendo 40 g/L, levou a decréscimo do número de esporos, possivelmente devido ao elevado teor de nitrogênio presente nestes meios de cultivo. Dados semelhantes foram encontrados por Farrera *et al.* (1998) para *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e Tockaer *et al.* (2006) para Bti, que afirmam que altas concentrações de nitrogênio são importantes, porém podem ser prejudiciais caso não haja um balanço entre carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo. Estes dados, portanto, evidenciam a eficiência das fontes alternativas de proteínas estudadas, em concentrações intermediárias, em substituição ao extrato de levedura comercial.

Tabela 1 - Influência de diferentes fontes protéicas sobre a esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) em cultivos em frascos sob agitação recíproca por 36 horas. EL (extrato de levedura); ELB (extrato de levedura bruto); S (proteína isolada de soja); PS (extrato de soja em pó desengordurado); FS (farelo de soja).

Componente / concentração	Contagem de esporos (esporos/mL)
EL (12 g/L)	2.10^8
ELB (12 g/L)	4.10^9
ELB (15 g/L)	8.10^9
ELB (18 g/L)	3.10^9
ELB (21 g/L)	3.10^8
ELB (24 g/L)	5.10^8
S (6 g/L)	8.10^7
S (12 g/L)	7.10^7
PS (4 g/L)	4.10^8
PS (8 g/L)	8.10^8
PS (12 g/L)	7.10^8
FS (10 g/L)	7.10^8
FS (20 g/L)	4.10^9
FS (40 g/L)	4.10^8

Com base nestes resultados foram feitos testes em biorreator de bancada utilizando-se ELB (12 g/L), FS (10 g/L) e PS (8,4 g/L). Estas concentrações foram escolhidas, inicialmente, por possuírem o mesmo teor protéico que o EL na concentração básica do meio GYS (dados de análise não apresentados).

No cultivo com ELB 12 g/L, foi obtida concentração celular máxima de 11,5 g/L. O consumo de substrato foi total, em aproximadamente 12 horas de cultivo. Maiores valores de OUR foram medidos com 6 horas, atingindo 58,1 mmolO₂/L/h. Este tempo coincide com o final da fase exponencial do crescimento e o período de formação de flocos de microrganismo. Estes resultados estão representados na Figura 1. Maior número de esporos foi alcançado com 28 horas de cultivo, chegando a um valor de 3.10¹² esporos/mL. Em comparação com os ensaios em frascos agitados, os mais altos valores de esporulação obtidos neste cultivo deveram-se, provavelmente, a um melhor controle da concentração de oxigênio dissolvido, que, como relatado por Kraemer-Schafhalter & Moser (1996), é um parâmetro indispensável para que ocorra esporulação.

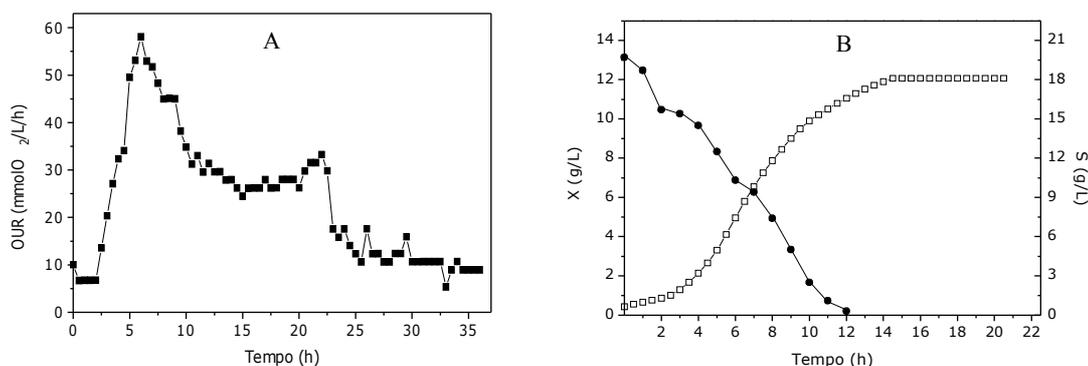


Figura 1 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 12 g/L de extrato de levedura bruto: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

Neste mesmo cultivo, foi feito um acompanhamento das mudanças morfológicas que ocorrem durante o cultivo de Bti (Figura 2), conforme as fases anteriormente descritas por Berbert-Molina (1998). Até 5 horas de cultivo, observaram-se células vegetativas isoladas,

longas e com alta motilidade. A partir de 6 horas, os microrganismos passaram a agrupar-se em grumos. Em 8 horas, os grumos já estavam se desfazendo e as células passaram à fase de transição para a esporulação. Entre 12 e 16 horas de processo, observaram-se células esporuladas e também alguns esporos livres. Em 24 horas, a inexistência de células vegetativas e muitos esporos livres foi indicada.

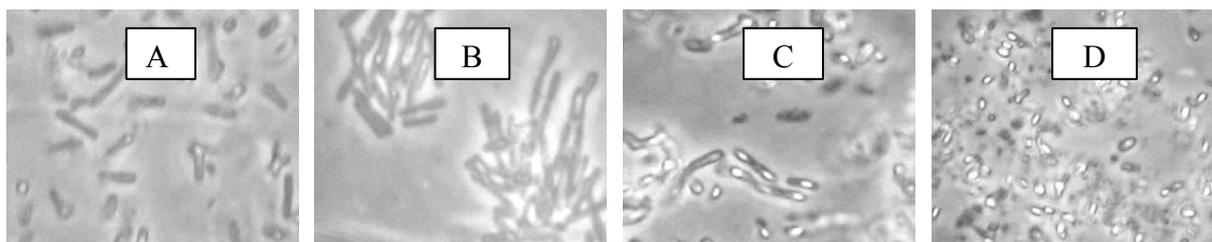


Figura 2 - Fases do crescimento celular indicando as mudanças morfológicas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivo contendo extrato de levedura bruto 12 g/L em fermentador de bancada e observadas em microscópio de contraste de fase: [A] 4 horas de cultivo – células vegetativas livres; [B] 6 horas de cultivo – formação de grumos; [C] 12 horas- células esporuladas; [D] 24 horas de cultivo – esporos livres.

Nos ensaios em que FS 10 g/L foi utilizado como fonte protéica, observou-se um perfil diferente, havendo duas fases de crescimento e duas estacionárias (Figura 3). Ao início da primeira fase estacionária, em torno de 9 horas de cultivo, atingiu-se concentração celular equivalente a 5 g/L e concentração residual de glicose de 11,7 g/L. O pico de OUR, 33,6 mmolO₂/L/h, ocorreu com 6,5 horas de processo. Com 10 horas de cultivo, durante a primeira fase estacionária, a contagem de esporos/mL foi de cerca de 7.10¹⁰. O crescimento foi retomado com aproximadamente 12 horas, observando-se, nesta fase, OUR máximo de 43,3 mmolO₂/L/h (13 horas) e uma concentração celular máxima de 8,3 g/L, em 16 horas de cultivo, quando um segundo período de fase estacionária foi iniciado devido ao esgotamento da glicose. Durante a segunda fase de crescimento, ocorreu um forte decréscimo do número de esporos, indicando o crescimento da biomassa e uma possível ocorrência de ocorrência de regeneração dos esporos. Com 20 horas de cultivo, a esporulação atingiu 2.10¹⁰ com o valor máximo de 6.10¹² esporos/mL sendo alcançado em 28 horas.

O comportamento diáuxico e demais características observadas neste cultivo ocorreram, possivelmente, em virtude da limitação da fonte protéica disponível inicialmente no meio, que levou à formação da primeira fase estacionária. Na seqüência, com a presença de glicose residual, teve início uma segunda fase de crescimento, durante a qual o microrganismo pode ter feito uso de compostos nitrogenados liberados na lise celular e/ou oriundos da ação de proteases, sintetizadas por Bti, hidrolisando o farelo de soja. Apesar de o teor protéico do meio com FS ter sido o mesmo do meio formulado com ELB, estes resultados mostram ser necessário que se leve em consideração não só a concentração da fonte protéica mas, também, a acessibilidade do microrganismo às proteínas contidas no meio.

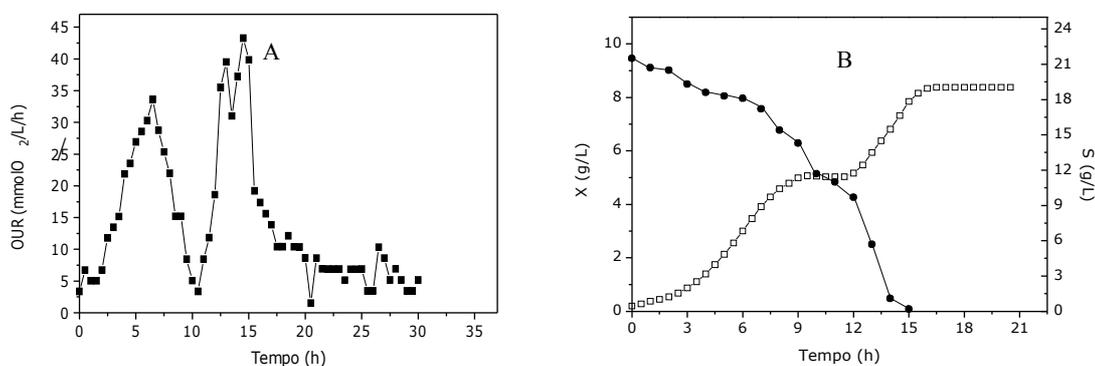


Figura 3 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 10 g/L de farelo de soja: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato – S (●) em função do tempo.

Estes resultados foram confirmados em cultivo em meio com teor reduzido de ELB (6 g/L). Neste cultivo ocorreu um curta fase estacionária, entre 7,5 e 10 horas, atingindo 3,7 g/L de células. Após esse tempo, houve a retomada do crescimento celular chegando a 5,1 g/L, em 12 horas, com concentração residual de glicose de 7,5 g/L. A máxima esporulação atingida foi de $9 \cdot 10^{11}$ esporos/mL em 28 horas de processo. Menores valores de esporulação e crescimento celular foram atingidos devido à redução da fonte protéica que é um componente precursor da síntese de aminoácidos essenciais para o crescimento celular, afetando também a esporulação, como já relatado por Kraemer- Shafhalter & Moser (1996) e Vimala-Devi *et al.* (2005).

Nos meios contendo PS 8,4 g/L como fonte protéica, a situação observada foi semelhante, havendo uma tendência à ocorrência de um comportamento diáuxico, com cerca de 14 horas de cultivo, conforme é ilustrado na Figura 4. Nesta situação, em 14 horas de cultivo, a concentração de açúcar residual foi 1,2 g/L e a concentração celular foi de 10,3 g/L. Após este período, houve um leve incremento na biomassa celular, chegando a 11,8 g/L ao final do processo. Com relação à OUR, foram observados picos em 10 e 20 horas de processo chegando a 38,5 e 41,7 mmolO₂/L/h, respectivamente. Neste período intermediário (10 a 20 horas), a queda na demanda de oxigênio não foi tão brusca quanto no ensaio com FS 10 g/L ficando em torno de 21 mmolO₂/L/h. Maior esporulação foi obtida em 22 horas de cultivo, chegando a 1.10¹² esporos/mL.

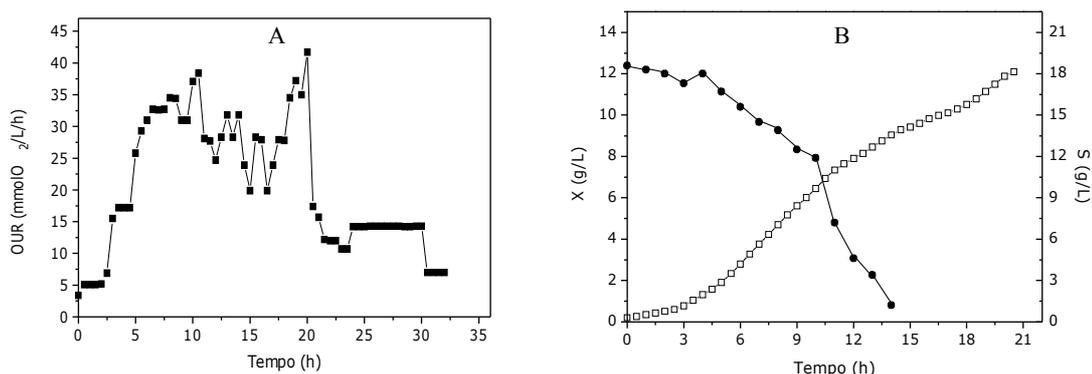


Figura 4 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 8,4 g/L de extrato de soja em pó desengordurado: [A] demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

Estes resultados indicaram a necessidade do aumento do teor protéico nos meios formulados com FS e PS, o que foi testado aumentando-se as concentrações para 15 e 20 g/L de FS e 12 g/L de PS. A escolha destas concentrações foi feita em razão de terem levado a bons resultados, com relação à esporulação, em agitador de bancada.

No cultivo em meio com FS 15 g/L, observou-se novamente crescimento diáuxico. A primeira fase estacionária foi alcançada com 10 horas de processo atingindo 5,5 g/L de concentração celular. Valor máximo de OUR foi encontrado em 8 horas, chegando a 26,6

mmolO₂/L/h. Na segunda etapa de crescimento, os valores obtidos foram de 12 g/L para concentração celular e 40,2 mmolO₂/L/h para OUR em 24 e 22 horas de cultivo, respectivamente. O consumo de substrato foi semelhante ao do meio formulado com FS 10 g/L e a esporulação atingiu os valores de 2.10¹² e 6.10¹² após cada uma das fases de crescimento (18 e 30 horas, respectivamente).

Com PS 12 g/L e FS 20 g/L, o perfil cinético obtido foi semelhante ao ELB 12 g/L em que não foi observada a ocorrência de diauxia. Os valores obtidos para concentração celular foram 14 e 11,6 g/L. Para OUR, os valores encontrados foram 43,3 e 40 mmolO₂/L/h em 8 e 10 horas de cultivo. Com relação à esporulação, foram encontrados valores de 1.10¹¹ e 5.10¹² esporos/mL, ambos, em 30 horas de cultivo.

Como já descrito na literatura, a presença da fonte protéica mostrou-se essencial para o crescimento e a esporulação de Bti (Vimala-Devi *et al.* 2005; İçgen, *et al.* 2002). Os dados obtidos evidenciam que as fontes protéicas avaliadas podem ser utilizadas em substituição ao extrato de levedura comercial por proporcionarem bom crescimento e esporulação nas condições testadas. O meio formulado com PS 12 g/L teve esporulação mais baixa em comparação às demais formulações, sugerindo que concentrações muito altas deste componente do meio favorecem o crescimento, mas não a formação de esporos. A formulação do meio com ELB mostra-se ainda vantajosa por não possuir sólidos em suspensão, evitando problemas com os equipamentos, a transferência de oxigênio e recuperação de toxinas, facilitando o processo em escala industrial. Ressalte-se que este componente tem custo significativamente inferior ao extrato de levedura purificado.

Em praticamente todas as condições testadas, foram encontradas máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,m}$) e fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) semelhantes. Os valores de $\mu_{x,m}$ ficaram em torno de 0,50 h⁻¹, exceto no meios com ELB na concentração de 6 g/L chengando a 0,25 h⁻¹. Já para o $Y_{x/s}$ os valores variaram entre 0,40 e

0,60 g/g. Estes dados são resumidos na Tabela 2. Com relação a $\mu_{x,m}$, em meios formulados com extrato de levedura, Rowe *et al.* (2003) relataram valores semelhantes, entre 0,42 a 0,67 h^{-1} , enquanto Berbert-Molina *et al.* (2001) obtiveram valores em torno de 1,0 h^{-1} .

Na Tabela 2, são mostrados, também, os resultados de bioensaios realizados com os cultivos em meios contendo ELB 12 g/L, FS 10, 15 e 20 g/L e PS 12 g/L.

Tabela 2 - Resultados gerais de cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada, utilizando diferentes fontes protéicas orgânico. X_f - concentração celular máxima; ΔS - substrato consumido; μ_{xm} - máxima velocidade específica de crescimento; $Y_{x/s}$ - fator de conversão de substrato em células e CL_{50} - concentração letal para atingir 50% de mortalidade.

Componente	Concentração (g/L)	Proteína equivalente (g/L)	X_f (g/L)	ΔS (g/L)	μ_{xm} (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g/g)
ELB	6	2,4	5,1	14,3	0,25	0,40
ELB	12	4,8	12,9	18,5	0,46	0,51
PS	8,4	4,7	10,3	17,7	0,43	0,55
FS	10	4,7	5,1*	9,8*	0,47	0,49
FS	15	7,0	5,5*	14,2*	0,53	0,44
FS	20	9,2	12,1	20,6	0,43	0,60
PS	12	6,7	14	20,0	0,52	0,60

*valores referêntes à primeira fase estacionária

Com relação aos bioensaios, observou-se que, em todas as condições, ocorreu mortalidade de larvas, com as mais baixas concentrações letais medianas (CL_{50}) sendo alcançadas com os meios formulados com ELB 12 g/L e FS 20 g/L: 0,21 e 0,45 ppm, respectivamente. Como referência, utilizou-se o larvicida biológico comercial Vectobac® com o qual uma CL_{50} mais baixa (0,06 ppm) foi determinada. Ressalte-se, porém, que as amostras utilizadas nas determinações consistiram de meios de cultivo retirados diretamente do biorreator e sem qualquer espécie de tratamento posterior.

Conclusões

Todas as condições testadas apresentaram altos valores de esporulação. Entretanto, o extrato de levedura bruto, de custo relativamente baixo, foi considerado como uma fonte protéica mais adequada pelo fato de não conter sólidos em suspensão, como o farelo de soja, ou não interferir sobre a reologia do meio pelo aumento da viscosidade, como o extrato de soja em pó desengordurado, o que facilitaria a condução do processo em maiores escalas. Com relação aos bioensaios, menores CL_{50} foram encontradas em meios com extrato de levedura bruto 12 g/L e farelo de soja 20 g/L, indicando a eficiência destas fontes protéicas na utilização de formulações posteriores do produto.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Hameed, A.; Carlberg, G.; El-Tayeb, O.M. (1990). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 Strains Isolated in Egypt – III. Selection of Media for δ -Endotoxin Production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 6:313-317.
- American Methods of Analysis for Nutrition Labeling (1993). A.O.A.C. EUA. nº920, p. 152.
- Beckert, N.; Margalit, J. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. IN: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice***. 2 nd ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p.146-170.
- 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* IPS82 em regime descontínuo. **Tese de doutorado**. Área de Tecnologia e Fermentações, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

- Berbert-Molina, M.A.; Silveira, M.M.; Sato, S. (2001). Estudo cinético de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio semi-sintético com diferentes concentrações iniciais de glicose. In: XII Sinaferm – Simpósio Nacional de Bioprocessos. **CD-ROM**.
- Ernandes, S.; Oshiro, A.; Yamaoka, K.; Del-Bianchi, V.L. (2003). Estudo comparativo do crescimento celular e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em fontes comerciais e alternativas utilizadas em fermentação submersa. In: XIV Sinaferm -Simpósio Nacional de Bioprocessos. **CD-ROM**. Florianópolis, 2003.
- Farrera, R.R.; Pérez-Guevara, F.; Torre, M. (1998). Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49:758-765.
- Finney, D.J. (1971). **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 333 p.
- Içgen, Y.; Içgen, B.; Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Res. Microbiol.**, 153:605-609.
- Kramer-Schafhalter, A.; Moser, A. (1996). Kinetic Study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Lab-Scale Batch Process. **Bioprocess Eng.**, 14:139-144.
- Luna, C.L.; Silva, G.R.; Rios, E.M.M.M. (2004). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant. **Biotechnol. Lett.**, 26:143-145.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. Parker, J. (1997). **Brock Biology of Microorganisms**, 8 th ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., USA, 986 p.
- Mignone, C.F.; Avignone-Rossa, C. (1996). Analysis of Glucose Fluxes in Continuous Cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 46:78-84.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426.

- Rogoff, M.; Yousten, A.A. (1969). *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations. **Ann. Rev. Microbiol.** 23: 257-386.
- Rowe, G. E.; Margaritis, A. Wei, N. (2003). Specific oxigen uptake rate variation during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* HD-1. **Biotechnol. Progr.**, 19:1439-1443.
- Silveira, M. M.; Berbert-Molina, M. (2005). Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Braz. J. Chem. Eng.**, 22:495-500.
- Tokcaer, Z.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U.; Özcengiz, G.; Alaeddinoglu, N.G. (2006). Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-500. **Proc. Biochem.**, 41:350-355.
- Vimala Devi, P.S.; Ravinder,; T. Jaidev, C. (2005). Barley-based medium for the cost-effective production of *Bacillus thuringiensis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 21:173-178.

ANEXO

Figuras não incluídas na discussão

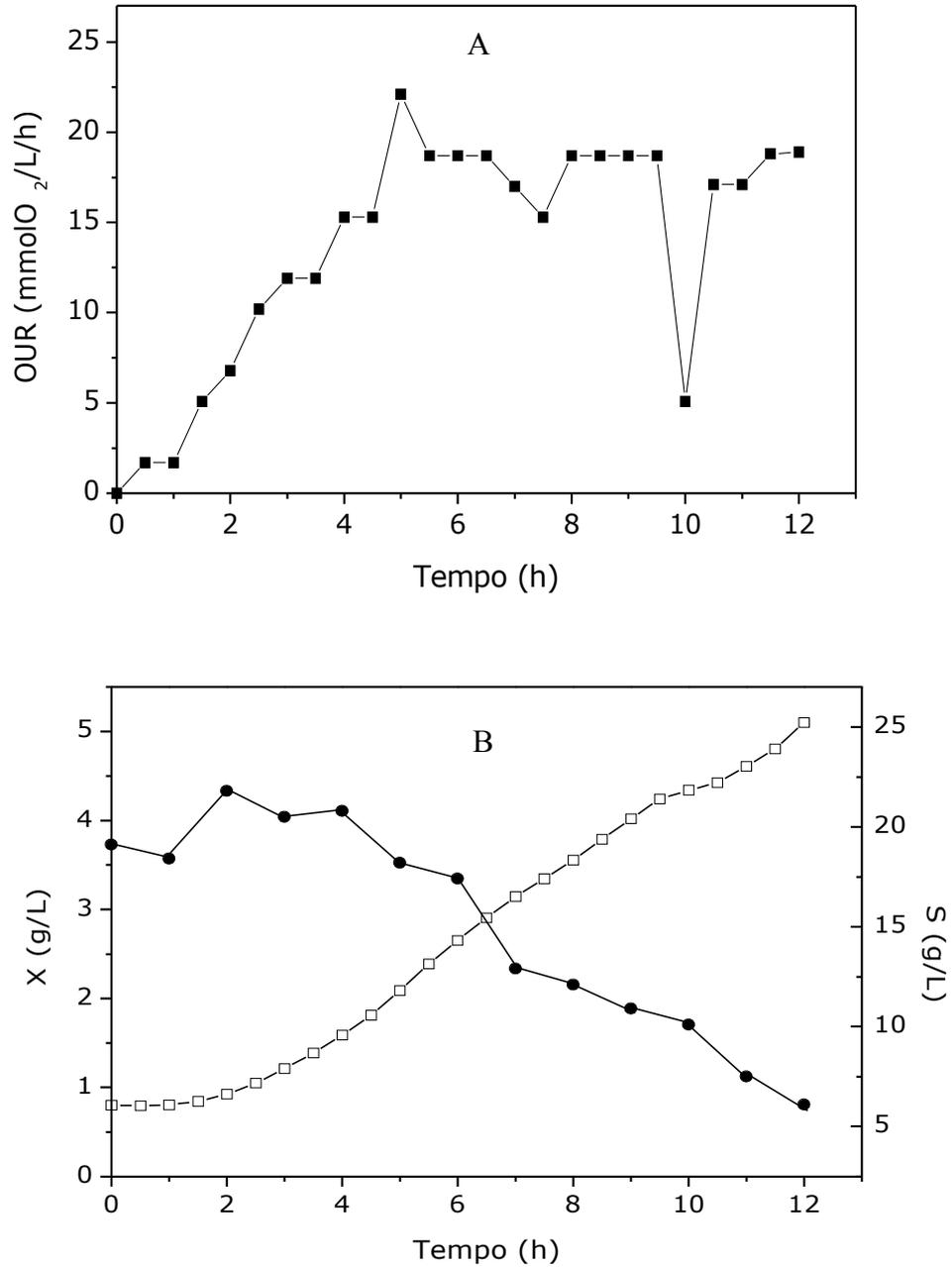


Figura 5 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 6 g/L de extrato de levedura: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo ; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato – S (●) em função do tempo.

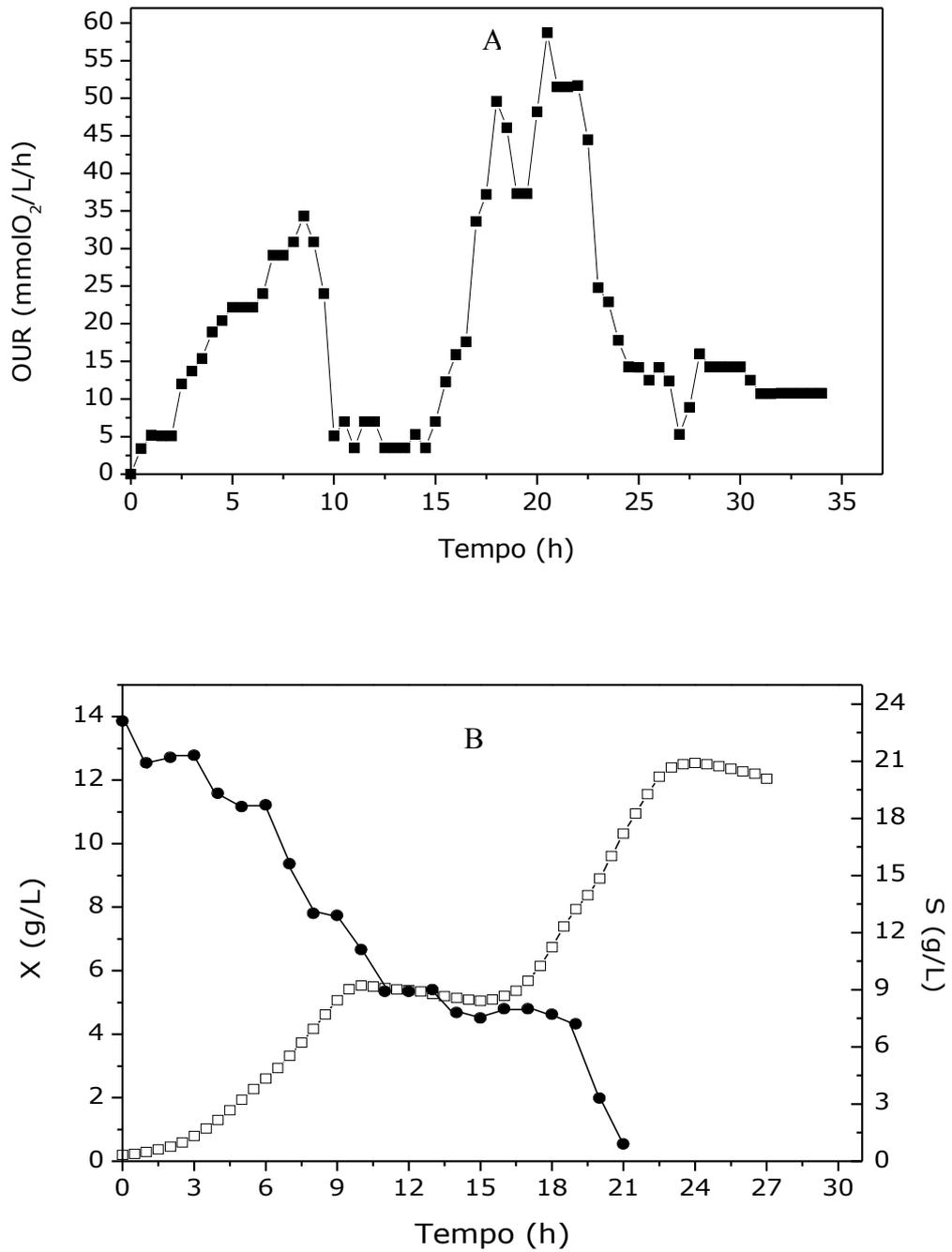


Figura 6 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 15 g/L de farelo de soja: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular –X (□) e substrato – S – (●) em função do tempo.

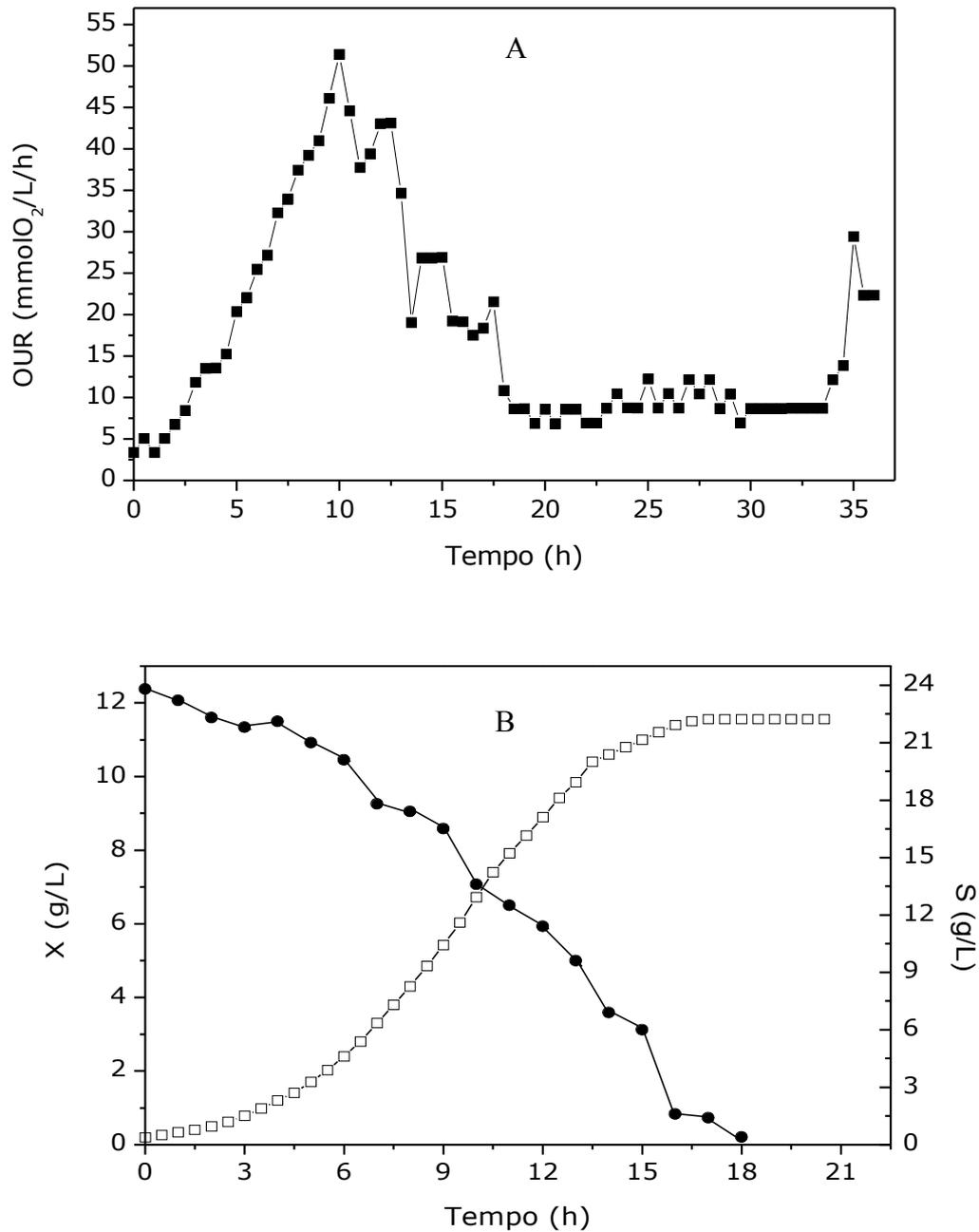


Figura 7 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 20 g/L de farelo de soja: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo - OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

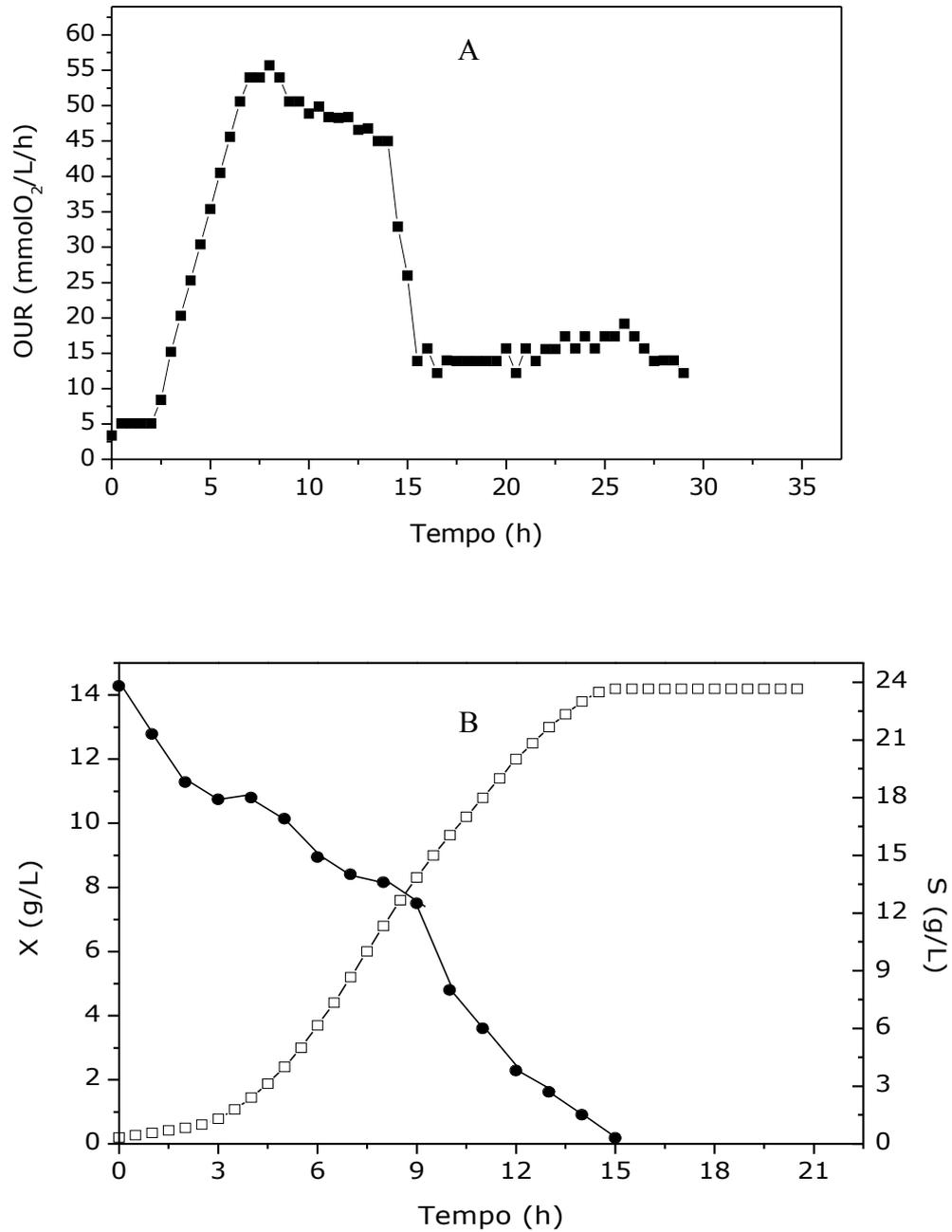


Figura 8 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio contendo 12 g/L de extrato de soja em pó desengordurado: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular –X (□) e substrato – S (●) em função do tempo.

4.3 Artigo 2: Influência do Substrato Energético sobre o Crescimento e a Formação de Endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Influência do Substrato Energético sobre o Crescimento e a Formação de Endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência de glicose, sacarose e lactose, em concentrações de 5, 10 e 20 g/L, sobre o crescimento celular, a esporulação e a formação de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Maiores valores de concentração celular foram obtidos com glicose nas concentrações de 10 e 20 g/L, chegando a 7,5 e 10,8 g/L em frascos sob agitação e 8,3 e 12,0 g/L em biorreator. Com relação à esporulação, valores semelhantes foram encontrados para todas as condições, tanto em frascos quanto em biorreator, atingindo cerca de 10^{10} e 10^{12} esporos/mL, respectivamente. Os meios formulados com glicose e sacarose apresentaram as endotoxinas de 26, 70,128 kDa, já com lactose, não houve uma expressão favorável das endotoxinas. A glicose mostrou-se o substrato energético mais acessível ao metabolismo de Bti. A sacarose apresentou menor crescimento celular com relação à glicose, entretanto pode ser utilizada como fonte de carbono por apresentar as endotoxinas em estudo.

Introdução

Bacillus thuringiensis var. *israelensis*, bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa, difere-se das demais espécies do gênero por produzir um cristal protéico paraesporal com atividade tóxica contra dípteros de importância para a saúde humana, sendo utilizados em formulações de biolarvicidas (Becker & Margalit, 1993).

A atividade larvicida destes cristais é atribuída a polipetídeos de diferentes massas moleculares (Angus, 1956). Inicialmente, Tyrell *et al.* (1981) identificaram dois polipetídeos

de 130 kDa e 26 kDa. Hurley *et al.* (1985) observaram a presença de uma proteína de 65 kDa. Já Höfte & Whiteley (1989) caracterizaram os genes que codificam estas proteínas como genes *cry*. Posteriormente, Praça *et al.* (2004) afirmaram que o perfil de 65 kDa é característico de variedades utilizadas no controle de dípteros e lepidópteros. Özkan *et al.* (2003) evidenciam a importância da proteína Cry 4, com massa molecular de 130 kDa. Park *et al.* (2001) destacam a presença de quatro principais endotoxinas designadas como Cry 4A (125 kDa), Cry 4B (134 kDa), Cry 11A (67 kDa) e Cyt 1A (27 kDa) para Bti HD-500. Tokcaer *et al.* (2006) descrevem os mesmos polipeptídeos para a linhagem HD-500.

A bactéria *B. thuringiensis* necessita de um substrato energético para a produção de energia que influencia indiretamente o crescimento celular, a esporulação e a produção de endotoxinas. sendo a glicose é uma das principais fontes de energia utilizadas no cultivo de Bti (Mignone & Avignone-Rossa, 1996; Madigan *et al.*, 1997).

Concentrações ideais de glicose para produção de biomassa e esporulação ficam em torno de 20 g/L, uma vez que o aumento da concentração desta fonte de carbono não influenciou diretamente a produtividade em células (Passos & Silveira, 2004).

Altas densidades celulares de *B. thuringiensis* são obtidas com a presença no meio de cultivo de glicose e maltose (Içgen *et al.*, 2002). Entretanto, a produção de toxinas Cry 4, efetivas contra dípteros, foi maior em meios contendo sacarose, lactose e inulina. Özkan *et al.* (2003) obtiveram resultados semelhantes para *B. thuringiensis* var. *israelensis*, com maior produção de Cry 4Ba e Cry 11Aa com sacarose, dextrina, lactose, glicerol e inulina.

Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de avaliar a influência qualitativa e quantitativa de glicose, sacarose e maltose, em diferentes concentrações, utilizados em meios de cultivo de Bti, sobre o crescimento celular, a esporulação e a formação de endotoxinas por esta bactéria.

Material e Métodos

Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS82 sorotipo H14 (Instituto Pasteur, França) foi utilizado em todos os ensaios. A linhagem foi conservada em tubos inclinados a 4° C.

Meios de cultivo

Para a manutenção de culturas e contagem do número de esporos, foi utilizado o meio ágar nutriente, que contém (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona de carne, 5,0; agar-agar, 18,0. Para a reativação de culturas de estoque, foi utilizado o meio LB com a seguinte composição (g/L): peptona, 10,0; extrato de levedura, 5,0; NaCl, 5,0.

O meio de Rogoff e Yousten (1969), usado como base para o preparo dos inóculos e cultivos de Bti, sem a fonte de carbono, tem a seguinte composição (g/L): extrato de levedura, 12,0; (NH₄)₂SO₄, 3,0; CaCl₂.2H₂O, 0,12; MgSO₄.7H₂O, 1,5; MnSO₄.H₂O, 0,09; K₂HPO₄, 1,5; KH₂PO₄, 1,5. Nos testes realizados, foram formulados meios com glicose, sacarose ou lactose, nas concentrações de 5, 10 e 20 g/L, e sem a adição de carboidratos, mantendo-se faixas as concentrações dos demais componentes.

Condições operacionais

Os ensaios iniciais foram feitos em frascos sob agitação, sendo testados os seguintes substratos energéticos: glicose, lactose e sacarose (5, 10 e 20 g/L), designados como G5, G10, G20, L5, L10, L20, S5, S10 e S20, respectivamente, além de um meio sem a adição de fonte de carbono (SC).

Em ensaios em frascos sob agitação recíproca (CERTOMAT U, B. BRAUN BIOTECH, RFA), o inóculo foi preparado introduzindo-se duas alçadas de cultura estoque do microrganismo em 25 mL de meio LB em frasco Erlenmeyer de 125 mL, posto sob agitação

de 130 rpm, a 30°C, por 15 horas. Volumes correspondentes a 5% (v/v) deste cultivo foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL dos diferentes meios em estudo.

Para os ensaios em biorreator de bancada (BIOSTAT B, B. BRAUN BIOTECH, RFA), utilizou-se 3,5 L de meio contendo os substratos energéticos que apresentaram os melhores resultados, em condições controladas. Os inóculos para estes ensaios foram preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio básico, com a fonte de carbono em teste, incubados a 30°C, em agitador recíproco a 130 rpm, por 6 horas. Volume destas culturas, correspondentes a 5% do meio no biorreator, foram utilizados. O pH inicial no biorreator foi de 7,0, sendo controlado, posteriormente, entre 5,5 e 7,0, com a adição de KOH (5M) e HCl (2M). A temperatura foi mantida entre 28 e 30°C, procurando-se, ainda, manter o teor de oxigênio dissolvido em torno de 30% de saturação no meio de cultivo.

Métodos analíticos

Em ensaios em frascos sob agitação, a concentração celular foi medida indiretamente por absorvância durante as 5 primeiras horas de cultivo. Ao final do processo foi realizada uma medida de gravimetria em que as amostras foram retiradas e colocadas em estufa a 90°C até atingirem massa constante.

Em cultivos em biorreator, a fração molar de oxigênio no gás efluente foi medida em oxímetro (DIGIMED DM-4, Brasil) e convertida em demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) pela seguinte expressão:

$$\text{OUR} = F_n \frac{y_{\text{O}_2\text{e}} - y_{\text{O}_2\text{s}}}{V}$$

Onde: F_n , vazão molar de ar (mmol/h); $y_{\text{O}_2\text{e}}$, fração molar de oxigênio na entrada do reator; $y_{\text{O}_2\text{s}}$, fração molar de oxigênio na saída do reator; V , volume de meio no reator (L).

A partir deste dado e com os valores do fator real de conversão de oxigênio em células ($Y_{GO} = 0,035 \text{ g células/mmolO}_2$) e do coeficiente de manutenção ($m_o = 1,7 \text{ mmolO}_2/\text{g/h}$), calculados graficamente conforme descrito por Silveira e Berbert Molina (2005), foi possível estimar concentrações celulares em biorreatores, através da seguinte equação:

$$X_n = \frac{Y_{GO} \cdot (\Delta t/2) \cdot [(OUR)_n + (OUR)_{n-1}] + [1 - m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)] \cdot X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)}$$

Onde: $\Delta t = t_n - t_{n-1}$, intervalo de tempo no processo; X_{n-1} , concentração celular em t_{n-1} ; X_n , concentração celular em t_n ; $(OUR)_{n-1}$, demanda de oxigênio em t_{n-1} ; $(OUR)_n$, demanda de oxigênio em t_n .

As células viáveis (CV) foram suspensas em solução de Tween 80 (0,1% v/v) e, posteriormente, sofreram diluições seriadas em solução de NaCl (0,9% p/v). O plaqueamento foi feito em meio ágar-nutriente, sendo as placas incubadas a 30°C por 24 horas quando foi realizada a contagem das colônias. A contagem de esporos foi realizada do mesmo modo após a aplicação às amostras de choque térmico a 80°C por 10 minutos para eliminação de formas vegetativas.

A avaliação da formação de endotoxinas foi realizada em sistema eletroforético desnaturante, de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), utilizando as amostras provenientes dos cultivos realizados. As amostras foram tratadas com SDS e 2-mercaptoetanol e utilizadas diretamente na eletroforese em gel descontínuo, formado por um gel concentrador (4,5% de acrilamida) e um gel separador (12% de acrilamida), a 80 e 150 V, respectivamente. Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (50 mg/100 ml).

Os açúcares redutores foram medidos pelo método do DNS (Miller, 1959). Nos meios com sacarose foi realizada uma hidrólise prévia com HCl (2 M).

Resultados e Discussão

Nos meios formulados sem a presença de um substrato energético, obteve-se concentração celular de 2,9 g/L. Já nos meios formulados com glicose foram encontrados os valores de 4,6, 7,5 e 10,8 g/L para G5, G10 e G20, evidenciando que quando a concentração de glicose foi aumentada o crescimento celular também foi incrementado. Um comportamento semelhante foi observado nas condições S5, S10 e S20, porém atingindo valores mais baixos, chegando a 4,4, 4,6 e 6,7 g/L, respectivamente. Com relação aos meios formulados com lactose, constatou-se uma influência pouco relevante deste carboidrato sobre o crescimento celular, observando-se concentrações celulares inferiores às medidas com as demais fontes de carbono testadas. Na Tabela 1, são resumidos os resultados gerais obtidos.

Tabela 1 - Resultados gerais dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados em frascos sob agitação recíproca utilizando diferentes substratos energéticos. X_0 – concentração celular inicial; X_{24} – concentração celular medida após 24 horas de cultivo; ΔS – variação do consumo de substrato ao final de 12 horas; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento; Esp/CV – relação entre esporos e células viáveis totais

Fonte de carbono / concentração	X_0 (g/L)	X_{24} (g/L)	μ_{xm} (h ⁻¹)	ΔS (g/L)	Esporos/mL	Esp/CV
Sem carboidrato	0,27	2,9	0,39	-	9 .10 ⁹ (24h)	5.10 ⁻⁴
Glicose 5 g/L	0,27	4,6	0,60	4,6	2.10 ¹⁰ (24h)	2.10 ⁻⁴
Glicose 10 g/L	0,35	7,5	0,46	10,5	3.10 ¹⁰ (36h)	2.10 ⁻⁴
Glicose 20 g/L	0,40	10,8	0,46	18,7	2.10 ¹⁰ (52h)	2.10 ⁻⁵
Sacarose 5 g/L	0,27	4,4	0,39	2,8	8.10 ⁹ (24h)	1.10 ⁻³
Sacarose10 g/L	0,35	4,6	0,42	4,1	1.10 ¹⁰ (36h)	1.10 ⁻¹
Sacarose20 g/L	0,40	6,7	0,45	6,4	9.10 ⁹ (52h)	1.10 ⁻²
Lactose 5 g/L	0,30	1,7	0,35	0,5	1.10 ¹⁰ (24h)	8.10 ⁻¹
Lactose 10 g/L	0,35	3,3	0,35	2,8	2.10 ¹⁰ (36h)	1.10 ⁻²
Lactose 20 g/L	0,30	4,6	0,39	2,0	1.10 ¹⁰ (52h)	6.10 ⁻²

Os valores de μ_{xm} , em geral, variaram entre 0,35 e 0,46 h⁻¹ com exceção da condição G5, que atingiu um μ_{xm} de 0,60 h⁻¹.

Com relação ao consumo de substrato, observou-se um consumo total nos meios G5, G10 e G20. Nos meios contendo sacarose, houve um baixo consumo de carboidrato, com

altos valores residuais de açúcares redutores totais ao final da fase de crescimento (12 horas). Um perfil semelhante foi observado para lactose, porém com valores residuais ainda maiores. Os resultados observados mostraram que *Bti* tem maior facilidade de metabolizar glicose, sendo esta fonte de energia mais adequada para o crescimento deste microrganismo, confirmando os dados de Madigan *et al.* (1997).

O número de esporos foi semelhante em todas as condições, variando de 8.10^9 a 3.10^{10} esporos/mL; porém, a relação entre esporos e células viáveis totais foi mais alta nos meios com sacarose e lactose. Com glicose, essa relação foi baixa, atingindo um valor comparável ao meio formulado sem fonte de carbono, como mostrado na Tabela 1. Dados semelhantes com relação a esta medida foram obtidos por İçgen *et al.* (2002) com *B. thuringiensis* 81 e por Özkan *et al.* (2003) com *B. thuringiensis* var. *israelensis* HD-500, com uma maior esporulação com sacarose, lactose, dextrina, glicerol e inulina.

Em biorreator de bancada, foram testados os meios G10, G20, L10 e S10 em comparação com meio formulado com a ausência de substrato energético (SC) adicionados de extrato de levedura bruto (12 g/L) e sais minerais.

Com relação à concentração celular, um perfil semelhante ao observado em agitador de bancada foi verificado. No cultivo em meio sem fonte de carbono, alcançaram-se valores de biomassa em torno de 2,5 g/L, em 12 horas de cultivo, e μ_{Xm} de $0,31 \text{ h}^{-1}$ (Figura 1). A OUR atingiu valor máximo em 12,5 horas de cultivo, chegando a $18,9 \text{ mmolO}_2/\text{L/h}$. Observou-se uma fase exponencial tardia (8 horas) devido à ausência de substrato energético.

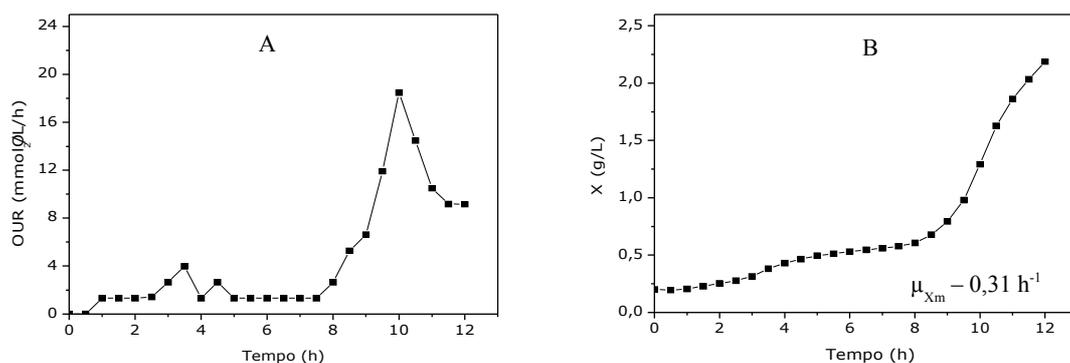


Figura 1 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio formulado na ausência de fonte de carbono: [A] demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular -X (□) em função do tempo.

Maiores concentrações celulares foram alcançadas com G10 (8,3 g/L) e com G20 (12 g/L), com μ_{Xm} de 0,42 e 0,46 h⁻¹, respectivamente. Nestas condições, o consumo de substrato foi total. Com relação a OUR, os valores atingidos foram de 60,1 e 56,6 mmolO₂/L/h, no tempo de 5,5 horas de processo (Figuras 2 e 3, respectivamente).

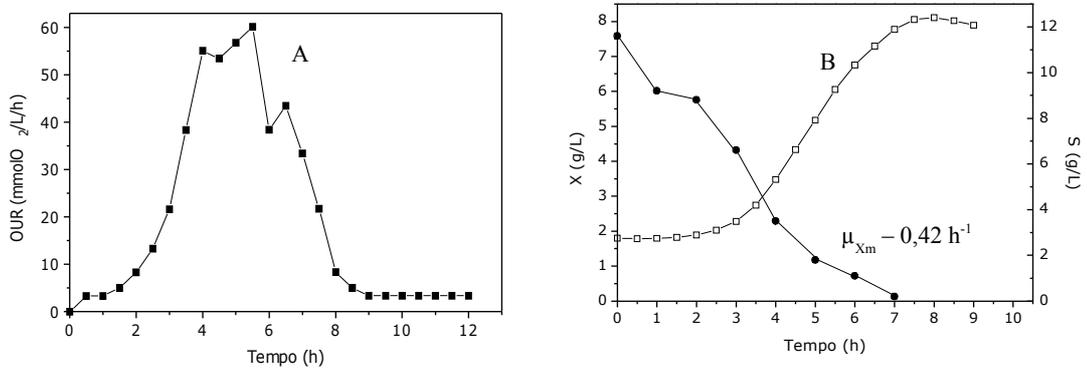


Figura 2 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 10 g/L de glicose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

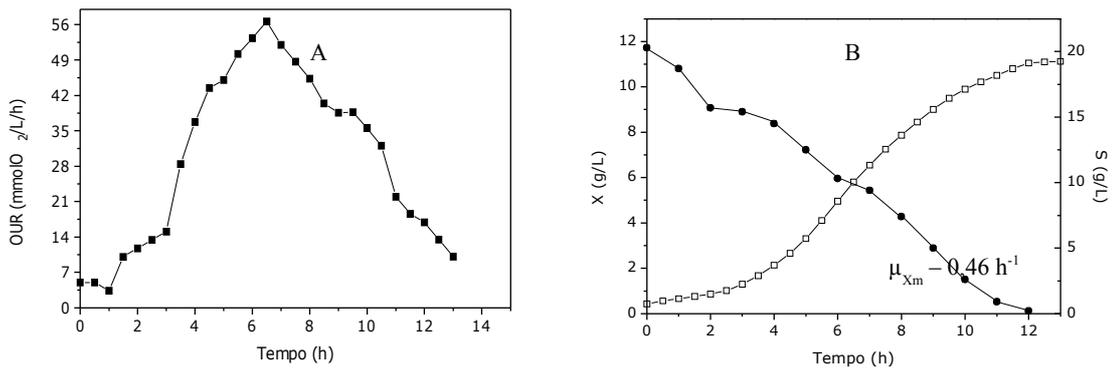


Figura 3 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 20 g/L de glicose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

Assim como em frascos sob agitação, os meios S10 e L10 levaram a menores concentrações celulares que G10 e G20, maiores, porém, que a do meio formulado sem carboidrato, atingindo 4,4 e 4,6 g/L e μ_{Xm} de 0,37 e 0,46 h⁻¹, respectivamente. Com S10 e L10, OUR atingiu valores de 33,6 e 31,7 mmolO₂/L/h em 3,5 horas de cultivo. Igçen *et al.* (2002), comparando estes mesmos carboidratos, observaram em seu trabalho densidades celulares inferiores com glicose, porém com outra variedade de *B. thuringiensis*.

Ao final da fase de crescimento com S10 e L10, confirmaram-se os altos valores residuais de carboidratos obtidos em frascos agitados, mesmo em condições de cultivo melhor controladas (Figuras 4 e 5).

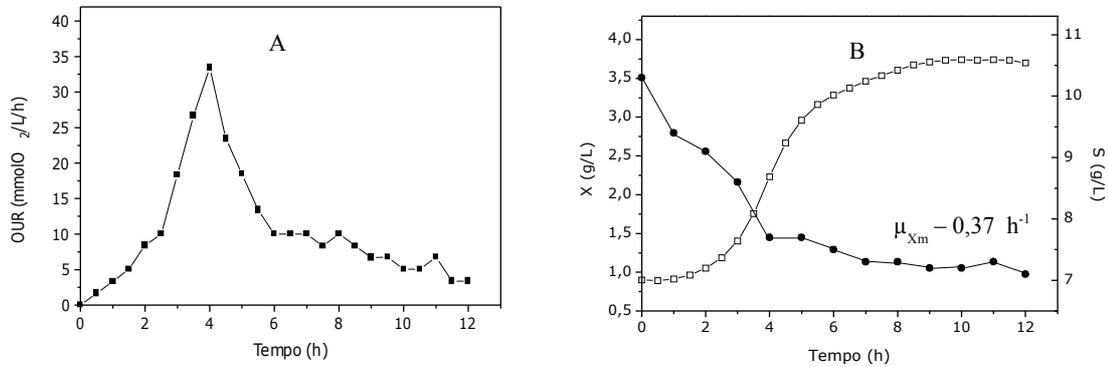


Figura 4 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 10 g/L de sacarose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X (□) e substrato – S (●) em função do tempo.

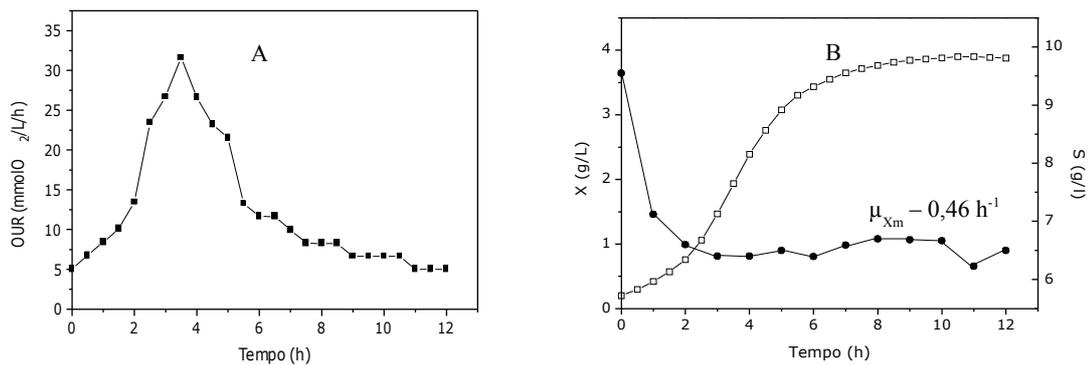


Figura 5 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em meio com 10 g/L de lactose: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo - OUR - em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato (●) em função do tempo.

A esporulação, nas condições testadas em biorreator, apresentou valores da ordem de 10^{12} esporos/mL, com exceção da condição em que não havia substrato energético (5.10^{11} esporos/mL). Assim como em frascos sob agitação, a relação entre esporos e células viáveis foi superior nas condições S10 e L10, chegando a 10^{-1} e 2.10^{-1} , em comparação com os meios formulados com glicose com valores em torno de 10^{-5} .

Quanto à expressão de endotoxinas em frascos agitados, constatou-se a formação da proteína de 70 kDa em todas as condições testadas, exceto nos meios com lactose. Nas condições G10 e G20, a endotoxina de 70 kDa foi revelada de forma mais intensa que nos

meios contendo sacarose. Os meios formulados com lactose também não mostraram resultados relevantes, sendo estes comparáveis àqueles obtidos em meio formulado sem substrato energético (SC). Estes resultados discordam dos relatados por Özkan *et al* (2003) que observaram que a presença de sacarose e lactose no meio de cultura de Bti HD-500 resultava em maior expressão de endotoxinas. As endotoxinas correspondentes às massas moleculares de 26 e 128 kDa não foram identificadas em ensaios em frascos sob agitação, devido, possivelmente, à limitação de oxigênio, normal neste tipo de cultivo. Como mencionado, o perfil de toxinas de 65 a 70 kDa é característico de estirpes tóxicas contra dípteros (Praça *et al.*, 2004).

Na Figura 6, são ilustrados os resultados com relação à produção de endotoxinas em biorreator.

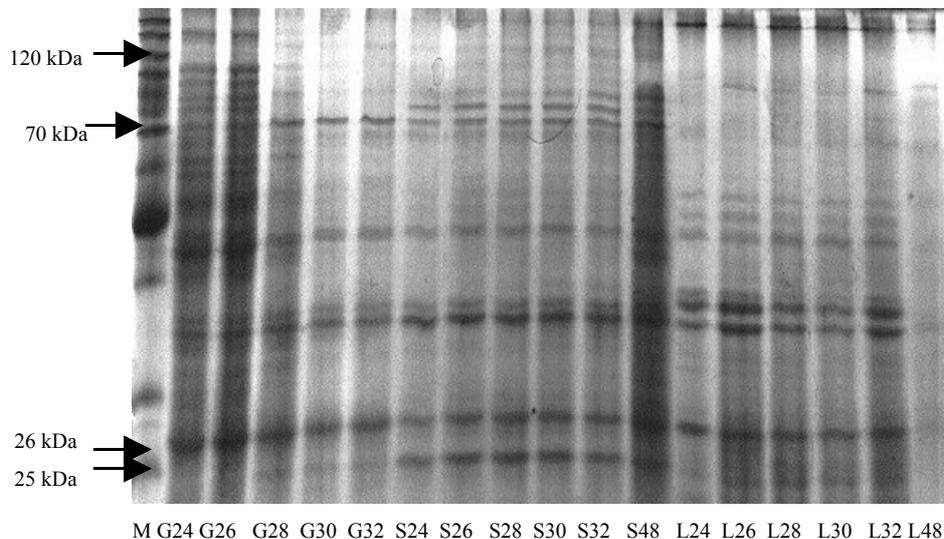


Figura 6 – Perfil eletroforético da produção de endotoxinas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios formulados com glicose 10 g/L (G), nos tempos de 24, 26, 28, 30 e 32 horas, sacarose 10 g/L (S), nos tempos de 24, 26, 28, 30, 32 e 48 horas e lactose 10 g/L (L), nos tempos de 24, 26, 28, 30, 32 e 48 horas.

Em geral, o perfil eletroforético foi semelhante ao observado por Park *et al.* (2001) para a linhagem Bti IPS-82. Nos meios com glicose 10 g/L, em condições controladas, foi constatada a presença das bandas referentes às massas moleculares de 26 (Cyt 1Aa), 70 (Cry

11Aa) e, em menor quantidade, a de 128 kDa (Cry 4Aa), a partir de 28 horas. Em 24 e 26 horas de cultivo, observou-se a expressão de uma banda de massa molecular mais alto (cerca de 140 kDa) podendo ser identificada como a endotoxina Cry 4Ba.

Já quando a sacarose foi utilizada como fonte energética, foram evidenciadas as mesmas endotoxinas encontradas com glicose. Com lactose, não houve uma expressão favorável dessas endotoxinas, porém uma banda de massa molecular de 26 kDa foi revelada.

É descrito na literatura que Bti apresenta um complexo em forma de cristal que determina a atividade tóxica desta bactéria (Park *et. al.*, 2001). Na Figura 6, pode-se observar que a proteína de massa molecular correspondente a 26 kDa é expressa em todas as condições, inclusive nos meios contendo lactose. Isso indica a possibilidade da existência de outra proteína de massa molecular semelhante, uma vez que o gel é feito em sistema desnaturante.

Conclusões

A glicose é o substrato energético mais adequado que a sacarose e a lactose, para Bti, resultando em intenso crescimento celular e expressão de endotoxinas. Apesar da sacarose apresentar um crescimento inferior, evidenciou-se a produção das endotoxinas em estudo, podendo ser utilizada como fonte de carbono. Já a lactose não levou a resultados relevantes.

Foi possível corroborar dados existentes na literatura, indicando a importância dos carboidratos utilizados como fonte de energia na formulação do meio de cultivo de Bti. Por outro lado, os resultados deste estudo sugerem que o processo não pode ser avaliado, apenas, através de critérios como o crescimento celular e/ou a contagem de esporos, visto que, como mostram os dados, estes parâmetros não são necessariamente associados ou proporcionais à formação de endotoxinas.

Referências Bibliográficas

- Beckert, N.; Margalit, J. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. IN: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice***. 2 ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p.146-170.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, 53:242-255.
- Hurley, J.M.; Lee, S.G.; Andrews Jr., R.e.; Klowden, J.M.; Bulla Jr., L.A. (1985). Separation of the Cytolytic and Mosquitocidal Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 126:961-965.
- Içgen, Y.; Içgen, B.; Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Res. Microbiol.**, 153:605-609.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. Parker, J. (1997). **Brock Biology of Microorganisms**, 8 th ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., USA, 986 p.
- Mignone, C.F.; Avignone-Rossa, C. (1996). Analysis of Glucose Fluxes in Continuous Cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.46, n.1, p.78-84.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426.
- Özkan, M.; Dilek, F.B; Yetis, U.; Özcengiz, G. (2003). Nutritional and Cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Res. Microbiol.**, 154:49-53.

- Park, H.W.; Delécluse, A.; Federici, B. (2001). Construction and Characterization of a Recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Strains That Produces Cry 11B. **J. Inverteb. Pathol.** 78:37-44.
- Passos, R.F.; Silveira, M.M. (2004). Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio complexo com diferentes concentrações de glicose em regime descontínuo. In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **CD ROM**. Curitiba, 2004.
- Praça, L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B; Dias, D.G.S; Gomes, A.C.M.M; Falcão, R.; Monnerat, R.G. (2004). Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesq. Agropec. Bras.**, 39:11-16.
- Rogoff, M.; Yousten, A.A. (1969). *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations. **Ann. Rev. Microbiol.** 23: 257-386.
- Silveira, M. M.; Berbert-Molina, M. (2005). Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Braz. J. Chem. Eng.** 22: 495-500.
- Tyrell, D.J.; Bulla Jr., L.A.; Andrews Jr., R.E.; Kramer, K.J.; Davidson, L.I.; Nordin, P. (1981). Comparative Biochemistry of Entomocidal Paraesporal Crystals of Selected *Bacillus thuringiensis* Strains. **J. Bacteriol.**, 145:1052-1062.
- Tokcaer, Z.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U.; Özcengiz, G.; Alaeddinoglu, N.G. (2006). Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-500. **Proc. Biochem.**, 41:350-355.

4.4 Artigo 3: Influência da Temperatura e do pH sobre o Crescimento Celular, Produção de Endotoxinas e Esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cultivado em Biorreator de Bancada.

Influência da Temperatura e do pH sobre o Crescimento Celular, Produção de Endotoxinas e Esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cultivado em Biorreator de Bancada.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo testar a influência dos parâmetros operacionais temperatura e pH sobre o crescimento, a esporulação e a produção de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) IPS-82. Avaliou-se a condução do processo nas temperaturas de 23, 25, 27 e 30°C e valores de pH constantes de 5,5, 6,2 e 7,0 e o pH variável entre 5,5 e 7,0, em comparação com cultivo em que não houve controle de pH. Houve grande influência da temperatura sobre o cultivo de Bti. Maiores valores de concentração celular e esporulação foram alcançados com as temperaturas de 27 e 30°C, chegando a 13,6 e 13,0 g/L e 8.10^{10} esporos/mL em 24 h para ambos os cultivos. As endotoxinas encontradas nestes cultivos foram as de 26 e 70 kDa neste mesmo tempo. Em temperaturas mais baixas, constatou-se um significativo atraso no andamento do processo. Quando o cultivo foi realizado sem controle de pH ou com o pH controlado em 5,5, observou-se menor produção de biomassa, atingindo-se valor máximo de 7,0 e 9,5 g/L, em comparação com as condições em que o pH foi de 6,2, 7,0 e quando variou entre 7,0 e 5,5, em que máxima concentração celular chegou a cerca de 12 g/L. Apesar disso, a contagem de esporos foi semelhante em todos os ensaios: aproximadamente 10^{12} esporos/mL, em cerca de 30 horas de cultivo. As endotoxinas evidenciadas foram as de 26, 70 e 128 kDa, quando os valores de pH foram mantidos próximos da neutralidade.

Introdução

A bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* difere-se das demais espécies do gênero por formar um cristal protéico durante a fase de esporulação. Estes cristais possuem atividade tóxica contra dípteros de importância para a saúde pública (Becker & Margalit, 1993).

A atividade larvicida destes cristais é atribuída a endotoxinas constituídos por polipeptídeos de diferentes massas moleculares (Angus, 1956). Inicialmente, foram identificados três polipeptídeos, de 130, 70 e 26 kDa, denominados como proteínas Cry e Cyt, respectivamente (Tyrell *et al.* 1981; Hurley *et al.* 1985; Höfte & Whiteley, 1989). De acordo com Praça *et al.* (2004), os polipeptídeos de 65-70 kDa são característicos de variedades utilizadas no controle de dípteros e lepidópteros. Tokcaer *et al.* (2006) descrevem a presença de quatro maiores endotoxinas designadas como Cry 4Aa (125 kDa), Cry 4Ba (134 kDa), Cry 11Aa (67 kDa) e Cyt 1Aa (27 kDa) para Bti HD-500. Park *et al.* (2001) destacam a presença das mesmas endotoxinas para a linhagem de Bti IPS-82.

Parâmetros como temperatura e pH são de fundamental importância para o cultivo de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Sendo assim essas condições devem ser controladas de acordo com as necessidades do microrganismo uma vez que favorecem o seu desenvolvimento (Maldonado-Blanco *et al.*, 2003).

A maioria das linhagens de *B. thuringiensis* cresce em temperaturas entre 15 e 45° C, tendo sido constatado que o valor ótimo se encontra na faixa de 26 a 30° C. Com relação ao pH, no mesmo trabalho, são descritos valores entre 6,5 e 7,5 como ideais para o crescimento, embora a bactéria não seja particularmente sensível a este parâmetro e possa desenvolver-se em uma ampla faixa entre 5,5 e 8,5 (Bernhard & Utz, 1993).

o pH é um parâmetro que deve ser controlado, uma vez que durante as primeiras horas do cultivo de Bti ocorre grande produção de ácidos orgânicos, havendo, ao final da fase

exponencial de crescimento e início da fase estacionária, a formação de grânulos de polihidroxibutirato (PHB) que resultam no aumento do pH (Hanson *et al.*, 1963). Valores de pH abaixo de 5,6 afetam a esporulação e o crescimento de Bti. De acordo com a literatura, a variação de pH é menos evidente quando há um adequado balanço carbono / nitrogênio no meio de cultivo (Dulmage *et al.*, 1990)

A síntese de endotoxinas por Bt é incrementada quando o cultivo é feito em pH próximo à neutralidade. Com relação à temperatura, estes autores evidenciam que a faixa ideal fica entre 25 e 37°C, sendo que a maior produção de Cry 4Ba foi observada quando o cultivo foi conduzido a 25°C, apesar de esta temperatura ser considerada baixa para o crescimento de Bti (Içgen *et al.*, 2002).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura e do pH sobre o crescimento celular, a esporulação e a produção de endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo a expressão das proteínas componentes do cristal protéico tóxico avaliadas por eletroforese.

Material e Métodos

Microrganismo

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* IPS82 sorotipo H14 (Instituto Pasteur, França) foi utilizado em todos os experimentos. Culturas da linhagem crescidas em tubos inclinados contendo o meio ágar-nutriente foram conservadas a 4° C.

Meios de cultivo

Para a manutenção de culturas e contagem do número de esporos, foi utilizado o meio ágar nutriente, que contém (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona de carne, 5,0; agar-agar, 18,0.

Para a reativação de culturas de estoque, foi utilizado o meio LB com a seguinte

composição (g/L): peptona, 10,0; extrato de levedura, 5,0; NaCl, 5,0.

O meio GYS (Rogoff e Yousten, 1969), usado no preparo dos inóculos e nos cultivos de Bti, tem a seguinte composição (g/L): glicose, 20; extrato de levedura, 12,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,09; K_2HPO_4 , 1,5; KH_2PO_4 , 1,5.

Condições operacionais

No preparo dos inóculos, introduziram-se duas alçadas de cultura estoque do microrganismo em 25 mL de meio LB em frasco Erlenmeyer de 125 mL, deixado em agitador recíproco (CERTOMAT - U, B. BRAUN BIOTECH, RFA) a 130 rpm e 30°C, por 15 horas. Um volume correspondente a 5% (v/v) desta cultura foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio GYS, que foram incubados nas mesmas condições. Nos ensaios fermentativos, foram inoculados 5% do volume correspondente ao volume de GYS meio (3,5 L) no biorreator bancada (BIOSTAT B, B. BRAUN BIOTECH, RFA).

Foram testadas as temperaturas de 23, 25, 27 e 30°C, com o pH inicial ajustado em 7,0 e posteriormente controlado entre os valores máximo e mínimo de 7,0 e 5,5 com a adição de HCl (2M) ou KOH (5M).

Com relação aos ensaios de pH, foi realizado um ensaio com pH inicial de 6,4 e sem posterior controle, um ensaio iniciado em 7,0 e controlado entre 5,5 e 7,0, e outros três ensaios com o pH fixado em 5,5, 6,2 ou 7,0 com a adição de HCl (2M) e KOH (5M). Nestes ensaios, manteve-se a temperatura constante de 30°C.

O teor de oxigênio dissolvido foi controlado em, no mínimo, 30% em relação à saturação no meio de cultivo em todos os ensaios realizados.

Métodos analíticos

A fração molar de oxigênio foi medida em oxímetro e convertida em demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) pela expressão:

$$\text{OUR} = F_n \frac{y_{O_2e} - y_{O_2s}}{V}$$

Onde: F_n , vazão molar de ar (mmol/h); y_{O_2e} , fração molar de oxigênio na entrada do reator; y_{O_2s} , fração molar de oxigênio na saída do reator; V , volume de meio no reator (L).

A partir dos valores de OUR, do fator real de conversão de oxigênio em células ($Y_{GO} = 0,035$ g de célula/mmolO₂) e do coeficiente de manutenção para o oxigênio ($m_o = 1,7$ mmolO₂/g/h), estes últimos determinados graficamente, estimaram-se as concentrações celulares conforme proposto por Silveira & Berbert Molina (2005), como mostra a equação:

$$X_n = \frac{Y_{GO} \cdot (\Delta t/2) \cdot [(OUR)_n + (OUR)_{n-1}] + [1 - m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)] \cdot X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \cdot (\Delta t/2)}$$

As células viáveis (CV) foram suspensas em solução de Tween 80 (0,1% v/v) e, posteriormente, sofreram diluições seriadas em solução de NaCl (0,9% p/v). O plaqueamento foi feito em meio ágar-nutriente, sendo as placas incubadas a 30°C por 24 horas quando foi realizada a contagem das colônias. A contagem de esporos foi realizada do mesmo modo após a aplicação às amostras de choque térmico a 80°C por 10 minutos para eliminação de formas vegetativas.

Os açúcares redutores foram medidos pelo método do DNS (Miller, 1959).

A avaliação da formação de endotoxinas foi realizada em sistema desnaturante de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), utilizando amostras provenientes dos cultivos realizados. As amostras foram tratadas com SDS e 2-mercaptoetanol e utilizadas diretamente na eletroforese em gel descontínuo, formado por um gel concentrador (4,5% de acrilamida) e um gel separador (12% de acrilamida), a 80 e 150 V, respectivamente. Após a

eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (50 mg/100 mL).

Resultados e Discussão

Nos ensaios fermentativos com temperaturas entre 23 e 30°C, maiores valores para a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) foram alcançados com 27°C, em 7,5 horas de cultivo, chegando a 88,5 mmolO₂/L/h. Com a temperatura de 30°C, a OUR cresceu linearmente nas 2 primeiras horas de cultivo atingindo valores entre 50 e 67 mmolO₂/L/h, mantendo-se neste patamar até 7 horas de processo. Nos cultivos realizados nas temperaturas de 23 e 25°C, a OUR foi menor e mais tardia chegando a 16,8 e 45,3 mmolO₂/L/h, respectivamente, em 8 horas.

Com relação à concentração celular e o consumo de substrato, observou-se uma grande influencia da temperatura nos cultivos estudados, conforme mostrado na Figura 1.

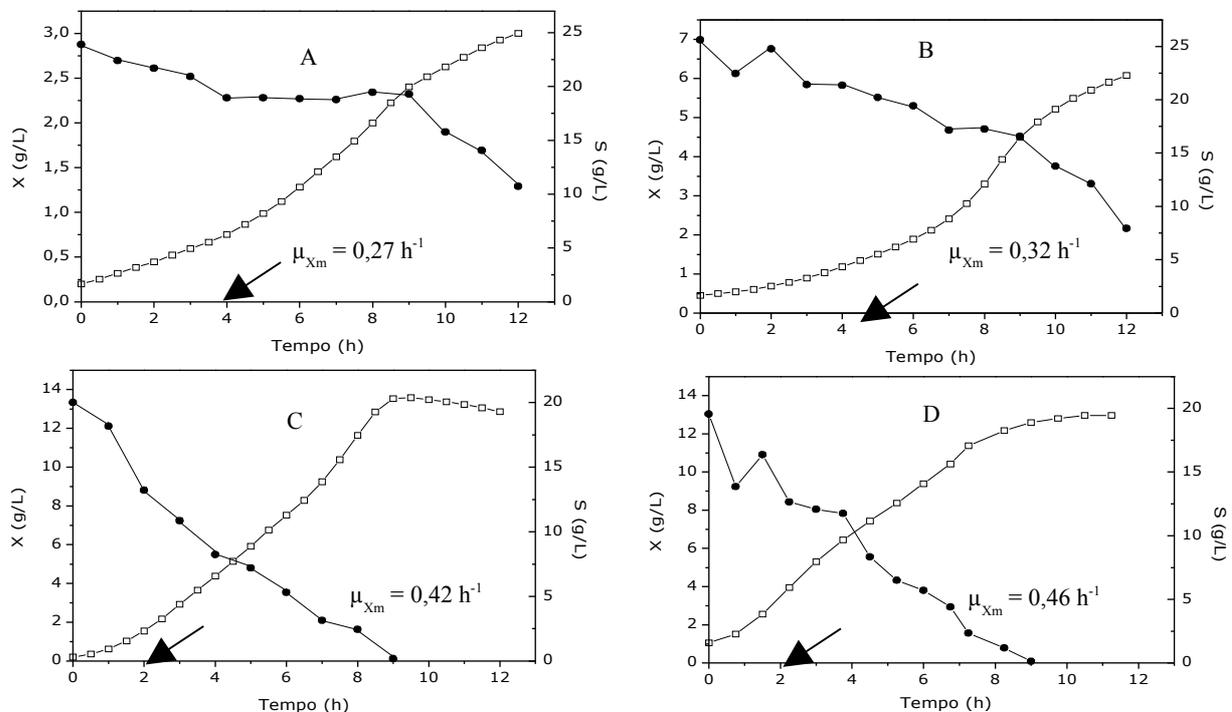


Figura 1 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de às temperaturas de [A] 23°C; [B] 25°C; [C] 27°C e [D] 30°C: (→); variação da concentração celular (X) (□) e substrato (S) (●) com o tempo. A s flechas indicam o tempo em foi atingida a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{Xm}) de cada ensaio.

Um baixo crescimento e uma máxima velocidade específica de crescimento (μ_{Xm}) no cultivo em que a temperatura foi mantida a 23°C foi observado, atingindo 3,0 g/L e 0,27 h⁻¹, respectivamente. Neste mesmo cultivo, observaram-se altos valores residuais de substrato (10 g/L) ao final de 12 horas. Quando a temperatura foi aumentada para 25°C foi evidenciado um incremento nestes valores chegando a 6,1 g/L e 0,32 h⁻¹ para concentração celular e μ_{Xm} , respectivamente. Neste mesmo cultivo, o consumo de substrato pelo microrganismo foi maior, restando 7,0 g/L ao final de 12 horas. Com 27 e 30°C, os valores obtidos foram semelhantes chegando a 13,0 g/L em ambos cultivos. A μ_{Xm} foi de 0,41 e 0,46 h⁻¹ para 27 e 30°C, respectivamente. Nestes ensaios, o consumo de glicose foi total, não havendo valores residuais em 12 horas.

Os resultados até aqui discutidos indicam que Bti apresenta um melhor crescimento nas temperaturas de 27 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 em temperaturas de 26 a 30°C.

A Tabela 1 resume os resultados gerais encontrados nestes ensaios.

Tabela 1: Resultados gerais dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados em biorreator de bancada, controlados em diferentes temperaturas. ΔS – variação do consumo de substrato ao final de 12 horas; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; μ_{Xm} – máxima velocidade específica de crescimento; Esp/CV – relação entre esporos e células viáveis totais

Temperatura (°C)	ΔS (g/L)	$Y_{X/S}$	μ_{Xm} (h ⁻¹)	Esp/CV	Esporulação 24 h (esporos/mL)
23	13,2	0,21	0,27	2.10 ⁻²	8.10 ⁹
25	17,7	0,32	0,32	3.10 ⁻²	6.10 ¹⁰
27	22,8	0,55	0,41	7.10 ⁻²	8.10 ¹⁰
30	19,6	0,58	0,46	7.10 ⁻³	7.10 ¹⁰

Foram atingidos valores de fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) crescentes à medida que as temperaturas de cultivo foram aumentadas de 23 até 30°C. Com relação à esporulação, entretanto, esta diferença, não foi tão marcante, sendo obtidas contagens na mesma ordem de grandeza para os cultivos realizados entre 25 27 e 30°C. Já a

razão entre esporos e células viáveis foi maior no cultivo em que a temperatura foi mantida a 27°C.

Na figura 2 podem ser evidenciados os resultados da expressão das endotoxinas. Apesar de Içgen *et al.* (2002) terem reportado que a 25°C foi melhor a produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*, no presente trabalho, uma maior expressão foi evidenciada nos cultivos em que a temperatura foi mantida a 27 ou 30°C. As bandas referêntes às endotoxinas em estudo foram as de 70 (Cry 11Aa) e 26 kDa (Cyt 1Aa), em 24 horas.

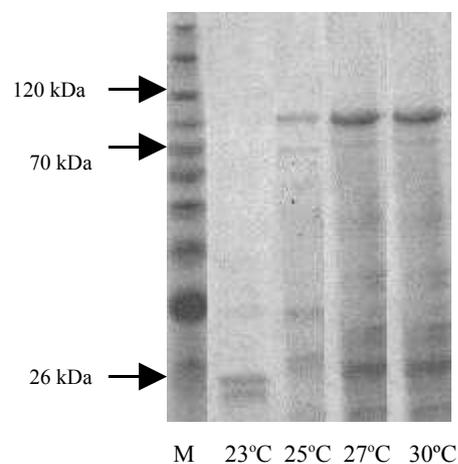


Figura 2 – Perfil eletroforético da produção de endotoxinas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivos mantidos a 23, 25, 27 e 30°C por 24 horas em que: M – marcador molecular.

Os resultados deste trabalho confirmam a grande influência da temperatura sobre o cultivo de Bti, como já reportado por Maldonado-Blanco *et al.* (2003). As melhores temperaturas para crescimento celular, esporulação e produção de endotoxinas foram as de 27 e 30°C; porém, a temperatura de 27°C pode ser considerada como mais interessante para o processo já que neste valor a solubilidade do oxigênio é maior que a 30°C, facilitando o suprimento de O₂ para o cultivo de Bti.

Quanto à avaliação do pH, no cultivo sem controle, que foi iniciado a um valor de 6,4, observou-se uma rápida queda do pH nas primeiras 3 horas de processo chegando a 5,1,

devido especialmente à formação de ácido acético, como já constatado por Hanson *et al.* (1963). A μ_{Xm} foi obtida quando o pH voltou a subir em 4,5 horas de cultivo, chegando a $0,38 \text{ h}^{-1}$ e o pico de demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) foi atingido com 6,5 horas, chegando a $55,0 \text{ mmolO}_2/\text{L/h}$. Já quando o pH iniciou em 7,0 e foi controlado no nível mínimo de 5,5, houve a queda do valor deste parâmetro nas primeiras horas de processo, de forma semelhante ao verificado no cultivo em que não houve controle. Porém, o pH mais alto no início do cultivo parece ter favorecido a OUR, que chegou a $60 \text{ mmolO}_2/\text{L/h}$, e o crescimento celular, sendo medido uma μ_{Xm} de $0,46 \text{ h}^{-1}$. Os valores de concentração de biomassa obtidos ao final de 12 horas foram de 6,1 e $12,3 \text{ g/L}$ para os cultivos com o pH não controlado e mantido entre 7,0 e 5,5, respectivamente. Estes dados são mostrados na Figura 3.

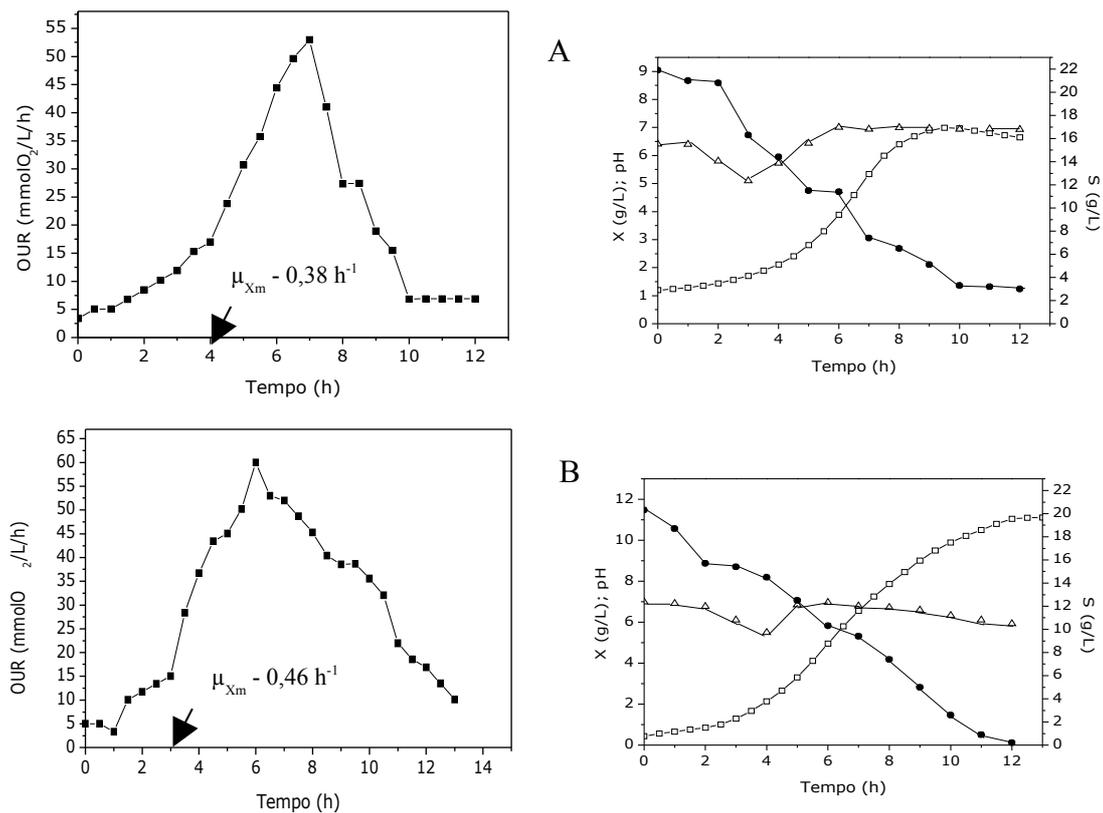


Figura 3: Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator com [A] pH não controlado e [B] pH controlado em 7,0 e 5,5: variação da demanda de oxigênio pelo cultivo em função do tempo – OUR – em função do tempo, tempo em foi atingida a máxima velocidade específica de crescimento – μ_{Xm} , (→), variação do pH (▲), da concentração celular – X(□) e .substrato – S – (●) em função do tempo.

Quando os cultivos foram realizados com o pH controlado em 5,5, 6,2 e 7,0, foram obtidos valores de OUR de 48,5 (7 h), 75,2 (5 h) e 96,2 (5,5) mmolO₂/L/h. A μ_{xm} foi de 0,31, 0,35 h⁻¹ e 0,42 h⁻¹, atingida em 5,5, 4,0 e 4,5 horas de cultivo, respectivamente.

A concentração celular ao final dos cultivos foi influenciada negativamente apenas quando o pH foi controlado em 5,5 ou não houve controle, chegando a 9,5 g/L em ambos os cultivos. Já quando o pH foi controlado em 6,2, 7,0 e entre 7,0 e 5,5 os valores foram semelhantes chegando a 12,3, 13,0 e 12,0 g/L. No cultivo em que não houve controle, o crescimento logo após a fase "lag" não foi prejudicado pois foi iniciado em cerca de 6,4, porém a queda do pH abaixo de 5,5, após cerca de 3 horas de cultivo, pode ter prejudicado o crescimento final. Em um trabalho realizado por Dulmage *et al.* (1990), é reportado que valores de pH abaixo de 5,6 afetam o crescimento e a esporulação de Bti.

Com relação à esporulação, todas as condições apresentaram valores na ordem de 10¹² esporos/mL, em cerca de 28 horas, exceto o cultivo sem controle do pH em que contaram-se 8.10¹¹ esporos/mL. Houve uma maior relação entre esporos e células viáveis no cultivo de pH 5,5 (5.10⁻¹ esp/CV), seguido pelo cultivo de pH 7,0 que alcançou 5.10⁻² esp/CV. A relação esporos por células viáveis nas demais condições foram as seguintes: pH sem controle, 1.10⁻³ esp/CV; pH 6,2, 3.10⁻² esp/CV; pH 5,5 – 7,0, 8.10⁻⁴ esp/CV (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados gerais dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados em biorreator de bancada, controlados em diferentes valores de pH. ΔS – variação do consumo de substrato ao final de 12 horas; $Y_{x/s}$ – fator de conversão de substrato em células; Esp/CV – relação entre esporos e células viáveis totais

Condição	X_f (g/L)	μ_{xm} (h ⁻¹)	ΔS (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Esp/CV	Esporulação (esp/mL)
SC	7,0	0,34	16,0	0,39	1.10 ⁻³	9.10 ¹¹ (28 h)
pH5,5	9,5	0,32	18,5	0,42	5.10 ⁻¹	3.10 ¹² (28 h)
pH6,2	12,3	0,35	20,8	0,5	3.10 ⁻²	5.10 ¹² (26 h)
pH7,0	13,0	0,45	20,7	0,50	5.10 ⁻²	3.10 ¹² (28 h)
pH5,5-7,0	12,0	0,46	20,1	0,52	8.10 ⁻⁴	3.10 ¹² (28 h)

Com relação à produção de endotoxinas, foi evidenciada a expressão das toxinas de 26 (Cyt 1Aa), 70 (Cry 11Aa) e 128 kDa Cry 4Aa), nas condições de 5,5, 6,2 e 7,0 (Figura 4).

Este perfil eletroforético corrobora o estudo feito por Park *et al.* 2001, em que esta endotoxinas foram observadas para a linhagem Bti IPS-82. Nos cultivos em que não houve controle a banda de massa molecular correspondente à 128 kDa não foi identificada. Isso indica que apesar de Bti crescer em uma ampla faixa de pH, há a necessidade de controle de deste parâmetro como já reportado por Bernhard & Utz (1993). A maior expressão de Cry 4B foi observada quando o cultivo foi controlado em pH 6,2 ou 7,0 como mostra a Figura 4. Já expressão da endotoxina de 70 kDa (Cry 11A) foi maior quando o pH foi 5,5 6,2 ou 7,0. Os resultados evidenciam que Bti cresceu e expressou endotoxinas em pHs próximos a neutralidade, confirmando os resultados descritos por Içgen *et al.* (2002) para uma linhagem de *B. thuringiensis*.

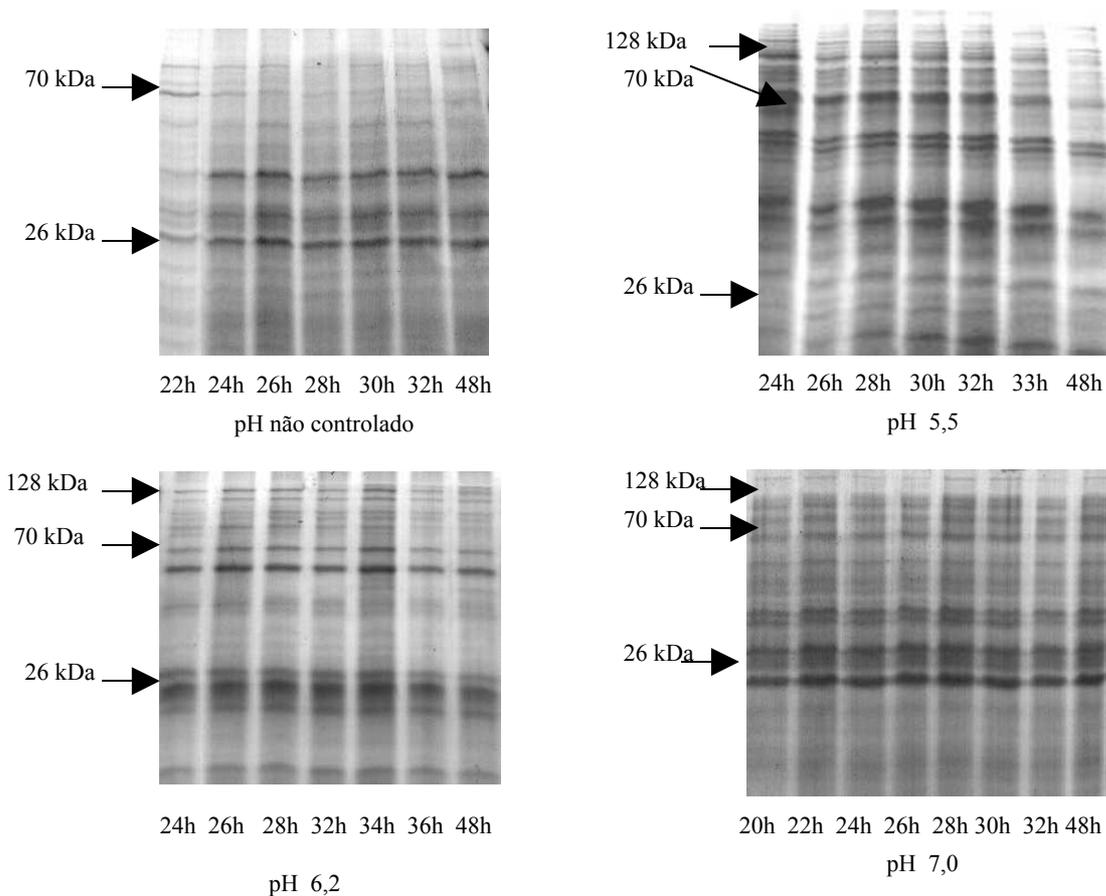


Figura 4 – Perfil eletroforético da produção de endotoxinas em cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em cultivos em que o pH não foi controlado e pH foi controlado em 5,5, 6,2 ou 7,0.

Conclusões

Melhores temperaturas para o crescimento, esporulação e produção de endotoxinas foram 27° e 30°C. A temperatura de 27°C foi considerada a mais adequada por facilitar a transferência de oxigênio, uma vez que neste valor a solubilidade deste componente é maior.

Quanto aos valores de pH, o crescimento celular foi negativamente afetado nos cultivos em que o pH não foi controlado ou em que houve controle em 5,5. Quanto à produção de endotoxinas e à esporulação, valores de pH mais próximos da neutralidade levaram a melhores resultados.

Referências Bibliográficas

- Angus, T.A. (1956). Extraction, purification, and properties of *Bacillus soto* toxins. **Can. J. Microbiol.**, 2:416-426.
- Beckert, N.; Margalit, J. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. IN: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice***. 2 nd ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p.146-170.
- Bernhard, K.; Utz, R. (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: Entwistle. P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, An environmental biopesticide: Theory and Practice***. . 2 nd ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p.256-267.
- Dulmage, H.T.; Yousten, A.A.; Singer, S.; Lacey, L.A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/WORLD BANK/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, p42.
- Hanson, R.S.; Srinivasan, V.R.; Halvorson, H.O. (1963). Biochemistry of Sporulation.1. Metabolism of Acetate by Vegetative and Sporulating Cells. **J. Bacteriol.**, 85: 451-460.

- Höfte, H. & Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, 53:242-255.
- Hurley, J.M.; Lee, S.G.; Andrews Jr., R.e.; Klowden, J.M.; Bulla Jr., L.A. (1985). Separation of the Cytolytic and Mosquitocidal Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 126:961-965.
- Içgen, Y.; Içgen, B.; Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. **Res. Microbiol.**, 153:599-604.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.
- Maldonado-Blanco, M.G.; Solís-Romero, G.; Galán-Wong, L. J. (2003). The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 19:671-674.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426.
- Park, H.W.; Delécluse, A.; Federici, B. (2001). Construction and Characterization of a Recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* Strains That Produces Cry 11B. **J. Inverteb. Pathol.** 78:37-44.
- Praça, L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B; Dias, D.G.S; Gomes, A.C.M.M; Falcão, R.; Monnerat, R.G. (2004). Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesq. Agropec. Bras.**, 39:11-16.
- Rogoff, M.; Yousten, A.A. (1969). *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations. **Ann. Rev. Microbiol.** 23: 257-386.

Silveira, M. M.; Berbert-Molina, M. (2005). Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Braz. J. Chem. Eng.** . v.22, p.495-500.

Tyrell, D.J.; Bulla Jr., L.A.; Andrews Jr., R.E.; Kramer, K.J.; Davidson, L.I.; Nordin, P. (1981). Comparative Biochemistry of Entomocidal Paraesporal Crystals of Selected *Bacillus thuringiensis* Strains. **J. Bacteriol.**, 145:1052-1062.

Tokcaer, Z.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U.; Özcengiz, G.; Alaeddinoglu, N.G. (2006). Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-500. **Proc. Biochem.**, 41:350-355.

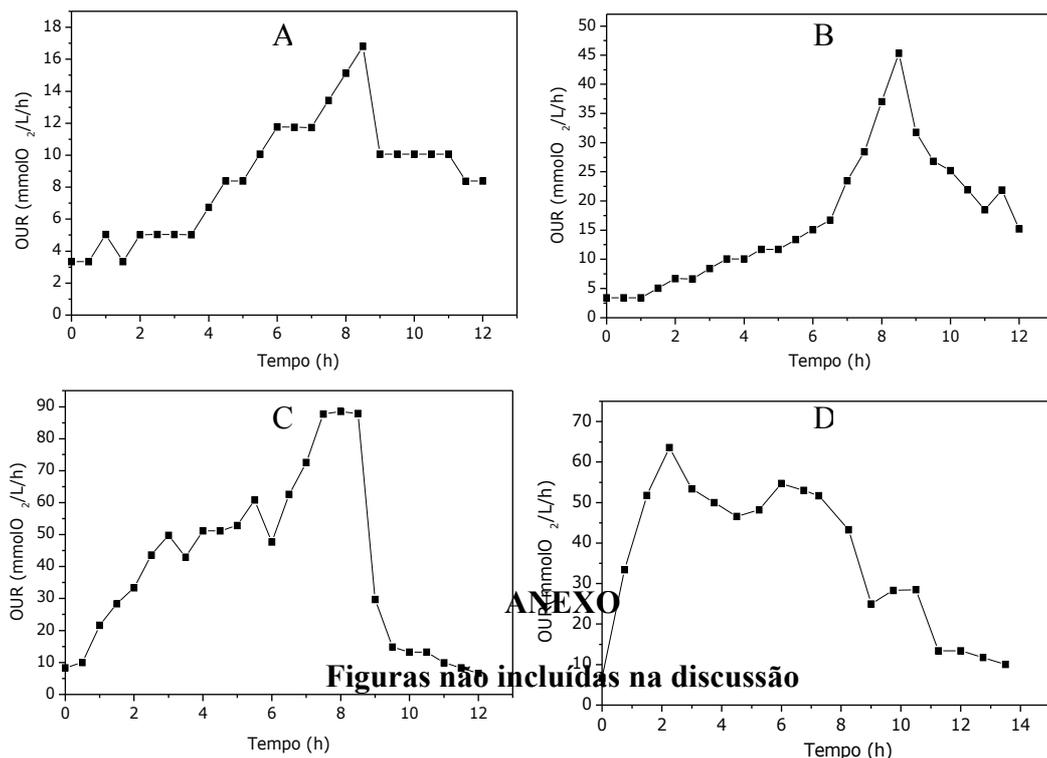


Figura 5 – Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator às temperaturas de 23°C [A], 25°C [B], 27°C [C] e 30°C [D]: variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR - em função do tempo.

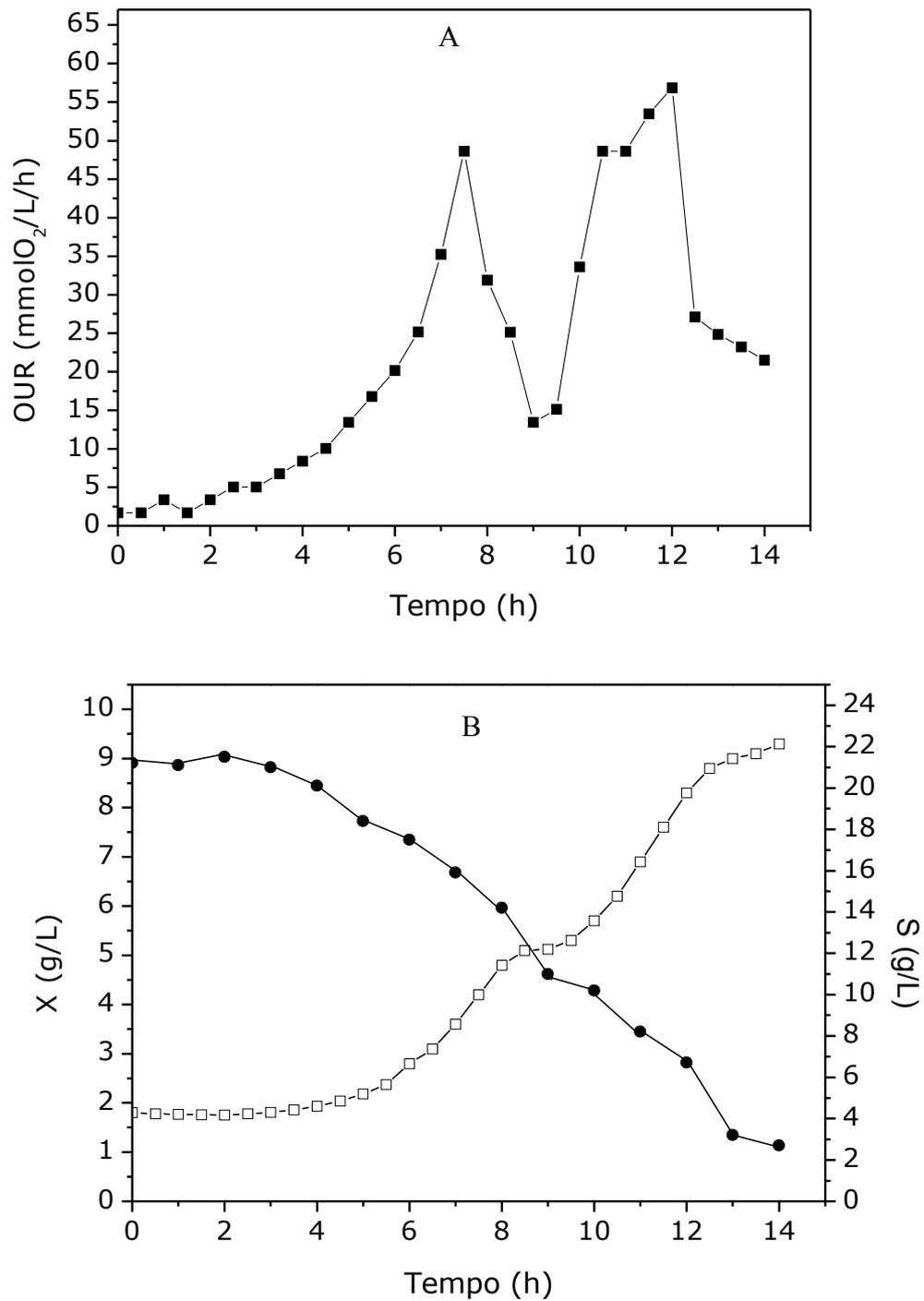


Figura 6 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada, em que o pH foi controlado em 5,5: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

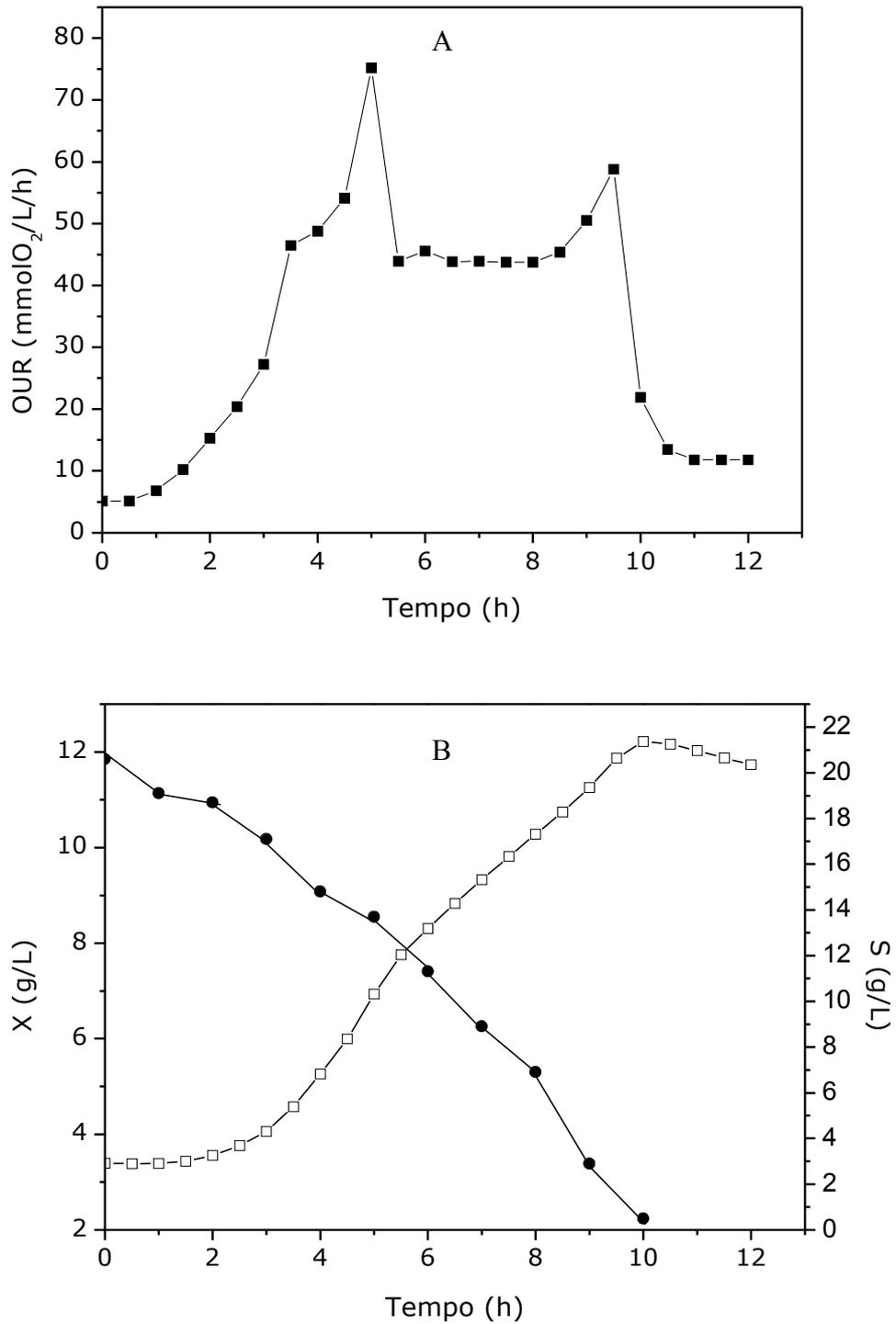


Figura 7 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada em que o pH foi controlado em 6,2: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular – X – (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

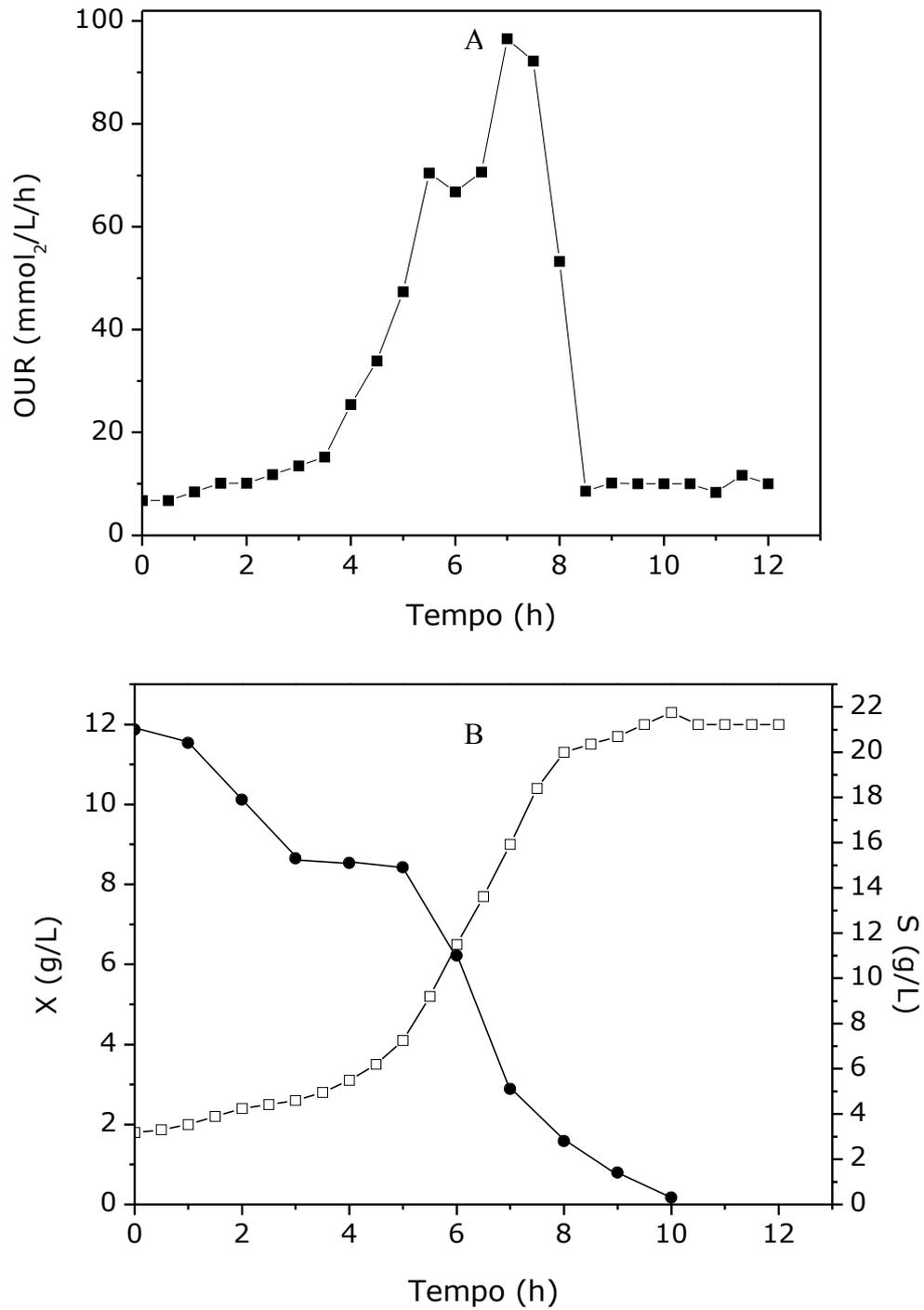


Figura 8 - Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em biorreator de bancada, em que o pH foi controlado em 6,2: [A] variação da demanda de oxigênio pelo cultivo – OUR – em função do tempo; [B] variação da concentração celular - X (□) e substrato - S (●) em função do tempo.

5. CONCLUSÕES

- Com a utilização de um oxímetro simples, foi possível estimar a concentração celular dos cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82 em biorreator de bancada, utilizando parâmetros respiratórios como a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR), os valores do fator de conversão de oxigênio em células (Y_{GO}) e do coeficiente de manutenção para o oxigênio (m_o).
- As medidas de absorvância, para a determinação da concentração celular, foram eficientes apenas nas primeiras horas de cultivo, uma vez que após este tempo, Bti tende a formar grumos e sofrer outras mudanças morfológicas durante todo o cultivo. Por esta técnica, foi possível calcular-se a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{x,m}$) em ensaios em agitador de bancada.
- Em ensaios realizados em frascos sob agitação em meios com diferentes fontes protéicas orgânico, foram observadas maiores esporulações, utilizando-se extrato de levedura bruto (ELB), de custo relativamente baixo, nas concentrações de 12, 15 e 18 g/L, extrato de soja em pó desengordurado, com 8 e 12 g/L, e farelo de soja, com 20 g/L.
- Em fermentador de bancada, todas as condições testadas apresentaram altos valores de esporulação. Entretanto, ELB 12 g/L foi considerado como uma fonte protéica mais adequada pelo fato de não conter sólidos em suspensão, como o farelo de soja, ou não interferir na reologia, pelo aumento da viscosidade do meio, como o extrato de soja em pó desengordurado, o que facilitaria a condução do processo em maiores escalas.
- Com relação aos bioensaios, menores CL_{50} foram encontradas em meios com extrato de levedura bruto (12 g/L) e farelo de soja (20 g/L), indicando a eficiência destas fontes protéicas na utilização de formulações posteriores do produto.
- Quanto à influência das diferentes fontes de carbono, constatou-se que tanto em agitador de bancada quanto em biorreator, a glicose nas concentrações de 10 e 20 g/L apresentou

maior eficiência para os parâmetros estudados, inclusive a produção de endotoxinas. A sacarose (10 g/L), apesar de apresentar valores mais tardios, pode ser utilizada com fonte de carbono. Já a lactose não apresentou resultados relevantes para o cultivo de Bti

- As melhores temperaturas para crescimento celular, esporulação e formação de endotoxinas foram 27 e 30°C. Dentre estas duas temperaturas, a de 27°C foi considerada mais adequada por facilitar a transferência de oxigênio em cultivo de Bti.
- Nos cultivos em que foi testada a influência do pH, melhores resultados com relação ao crescimento celular, esporulação e produção de endotoxinas foram alcançados com o pH controlado em 5,5, 6,2, 7,0 ou com variação entre 5,5 e 7,0, indicando que o pH deve ficar próximo à neutralidade.

Para a continuidade desse trabalho, sugere-se:

- a realização de novos estudos relacionados ao cultivo de Bti, avaliando-se a padronização do processo com respeito ao tempo de obtenção das mais altas atividades tóxicas em bioensaios e por eletroforese.
- a seleção e avaliação de novas linhagens de Bti com maior atividade em endotoxinas.
- a utilização de outros tipos de biorreatores, como o *airlift*, sempre com o objetivo de reduzir o custo do processo.
- formulações sólidas e líquidas para o produto, dependendo do tipo de aplicação visado, necessitam ser desenvolvidas e testadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hameed, A.; Carlberg, G.; El-Tayeb, O.M. (1990). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 Strains Isolated in Egypt – III. Selection of Media for δ -Endotoxin Production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 6:313-317.
- Abdel-Hameed, A.; Carlberg, G.; El-Tayeb, O.M. (1991). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 Strains Isolated in Egypt – IV. Selection of Media for δ -Endotoxin Production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 7:231-236.
- American Methods of Analysis for Nutrition Labeling (1993). A.O.A.C. EUA. n°920, p. 152.
- Arcas, J.; Yantorno, O.; Ertola, R. (1987). Effect of High Concentration of Nutrients on *Bacillus thuringiensis* Cultures. **Biotechnol. Lett.**, 9:105-110.
- Aronson, A. I.; Tyrell, D. J.; Fitz-James, D.C.; Bulla Jr. L.A. (1982). Relationship of the Synthesis of Spore Coat Protein and Paraesporal Crystal Protein in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.**, 151:399-410.
- Avignone-Rossa, C.; Arcas; J. Mignone, C. (1992). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Growth, Sporulation and δ -endotoxin Production in Oxygen Limited and No-limited cultures. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 8:301-304.
- Avignone-Rossa, C.A.; Mignone, C. (1993). Delta-endotoxin Activity and Spore Production in Batch and Fed-batch Culture of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnol. Lett.**, 15:295-300.
- Beckert, N.; Margalit, J. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. IN: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Praticce***. 2 ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p.146-170.
- Benoit, T.G.; Wilson, G.R; Baugh, C.L. (1990). Fermentation During Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Lett. Appl. Microbiol.**, 10:15-18.

- 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.
- Berbert-Molina, M.A.; Sato, S.; Silveira, M.M. (2001). Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio semi-sintético: simulação matemática de crescimento. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia. **Anais**. pp.178-183. São Paulo, 2001.
- Bernhard, K.; Utz, R. (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, An environmental biopesticide: Theory and Practice***. . 2 nd ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, Inc. p.256-267.
- Bobrowiski, V.L.; Pasquali, G.; Bodanese-Zanettini, M.H.; Fiuza, L.M. (2001). Detection of Cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia Gemmatalis* (Lepidoptera; Noctuidae). **Braz. J. Microbiol.**, 32:105-109.
- Borror, D.J.; De Long, D.M. (1988). **Introdução ao Estudo dos Insetos**. Edgard Blücher Ltda., São Paulo.
- Bulla Jr., L.A.; Kramer, K.J.; Davidson, L.I. (1977). Characterization of the Entomocidal Parasporal of *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.**, 130: 375-383.
- Clarke, J.L.; Rowley, W.A. (1984). Evaluation of Granular *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype H-14) Formulations Against Mosquito Larvae in Central Iowa. **Mosquito News**, 44:502-505.

- De Maagd, R.A.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, N.; Schnepf, E. (2003). Structure, Diversity, and Evolutions of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. **Annu. Rev. Genet.** 37:409-433.
- Dulmage, H.T. (1989). Production and use of *Bacillus thuringiensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84:113-122.
- Ernandes, S.; Oshiro, A.; Yamaoka, K.; Del-Bianchi, V.L. (2003). Estudo comparativo do crescimento celular e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em fontes comerciais e alternativas utilizadas em fermentação submersa. In: XIV Sinaferm - Simpósio Nacional de Fermentações. **CD ROM** Florianópolis – SC, 2003.
- Farrera, R.R.; Pérez-Guevara, F.; Torre, M. (1998). Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49:758-765.
- Ferreira, L.H.P.L.; Suzuki, M.T.; Itano, E.N.; Ono, M.A.; Arantes, O.M.N. (2003). Ecological Aspects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in an oxisol. **Sci. Agricol.**, 60:19-22.
- Finney, D.J. (1971). **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 333 p.
- Furlaneto, L.; Saridakis, H. O.; Arantes, O. M. N. (2000). Survival and conjugal transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* in aquatic environment. **Braz. J. Microbiol.**, 31:233-238.
- Glare, T.R.; O'Callaghan, N.M. (1998). Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Report for the Ministry of Health, Grasslands**, New Zealand. Lincol, 58 p.
- Hanson, R.S.; Srinivasan, V.R.; Halvorson, H.O. (1963). Biochemistry of Sporulation. 1. Metabolism of Acetate by Vegetative and Sporulating Cells. **J. Bacteriol.**, 85: 451-460.

- Höfte, H.; Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, 53:242-255.
- İçgen, Y.; İçgen, B.; Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. **Res. Microbiol.**, 153:599-604.
- İçgen, Y.; İçgen, B.; Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Res. Microbiol.**, 153:605-609.
- Joung, K.B.; Côté, J.C. (2000). **A Review of the Environmental Impacts of the Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis***. Technical Bulletin n° 29, Québec, 16 p.
- Kramer-Schafhalter, A.; Moser, A. (1996). Kinetic Study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Lab-Scale Batch Processes. **Bioproc. Eng.**, 14:139-144.
- Kumar, S.; Udayasuriyan, V. (2004). Cloning of *cry* 2Aa and *cry* 2Ab genes from new isolates of *Bacillus thuringiensis* and their expression in recombinant *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* strains. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 20:11–17.
- Khuzhamshukurov, N.A.; Yusupov, T.Y.; Khalilov, I.M.; Guzalova, A.G.; Muradov, M.M.; Davranov, K.D (2001). The Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cells. **Appl. Biochem. Microbiol.**, 37:596-598.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.
- Lee, S.G.; Eckblad, W., Bulla Jr., L.A. (1985). Diversity of Protein Inclusion bodies and Identification of Mosquitocidal Protein in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 126:953-960.

- Lereclus, D.; Delecluse, A.; Lecadet, M.M. (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis an Environmental Biopesticide: Theory and Praticce***. 2 ed. New York: John Wiley & sons Ltd. 805p.
- Lozovei, A.L.; Cunha, M.C.I.; Bassi. R.A. (1987). Estudo das Espécies de Simulídeos (Diptera: Simulium) que se Procriam em Vertedouros de Açudes de Piscicultura, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. In: VII Congresso de Entomologia. **Anais**.Campinas, 1987.
- Luna, C.L.; Silva, G.R.; Rios, E.M.M.M. (2004). *Bacillus thuringiensis* var. *isarelensis* production involving re-use of the supernatant. **Biotechnol. Lett.**, 26:143-145.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. Parker, J. (1997). **Brock Biology of Microorganisms**, 8 th ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall International Inc., USA, 986 p.
- Maldonado-Blanco, M.G.; Solís-Romero, G.; Galán-Wong, L. J. (2003).The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 19:671-674.
- Meadows, M.P. (1993). *Bacillus turingiensis* in the Enviromental: Ecology and Risk Assessment, In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, na Enviromental Biopesticide: Theory and Praticce***. 2 ed. New York: John Willey & Sons Ltda. 805p.
- Mignone, C.F.; Avignone-Rossa, C. (1996). Analysis of Glucose Fluxes in Continous Cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 46:78-84.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagente for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426.
- Nagai, S. (1979). Energy balance for microbial growth kinetics. **Adv. Biochem. Eng.**, 11:49-83.

- Nickerson, K.W.; Julian, G.S.T.; Bulla Jr. L.A. (1974). Physiology of Spore-forming Bacteria Associated with Insects: Radiorespirometric Survey of Carbohydrate Metabolism in the 12 Serotypes of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol.**, 28:129-132.
- Obeta, J.A.M.; Okafor, N. (1984). Medium for the Production of primary Power of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environm. Microbiol.**, 47:863-867.
- Özkan, M.; Dilek, F.B; Yetis, U.; Özcengiz, G. (2003). Nutritional and Cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Res. Microbiol.**, 154:49-53.
- Park, H.W.; Delécluse, A.; Federici, B. (2001). Construction and Characterization of a Recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Strains That Produces Cry 11B. **J. Inverteb. Pathol.** 78:37-44.
- Passos, R.F.; Silveira, M.M. (2004). Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio complexo com diferentes concentrações de glicose em regime descontínuo. In: do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **CD ROM**. Curitiba, 2004.
- Poopathi, S.; Kumar, K.A.; Arunachalam, N.; Tyagi, B.K.; Sekar, V. (2003). Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* produced on a new potato extract culture medium. **Biocontrol Sci. Technol.**, 13:743-748.
- Prabakaran, G.; Balaraman, K. (2006). Develop of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biol. Control**, 36:288-292.
- Praça, L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B.; Dias, D.G.S.; Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R.; Monnerat, R.G. (2004). Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesq. Agropec. Bras.**, 39:11-16.
- Reddy. S.T.; Kumar, N.S.; Venkatesuerlu, G. (1998). Comparative analysis of intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* strains. **Biotechnol. Lett.**, 20:279-281.

- Reddy Y.C.; Venkatesuerlu, G. (2002). Intracellular Proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and a Protease-Deficient Mutant *Btk-q*. **Curr. Microbiol.**, 45:405-409.
- Revina, L.P.; Kostina, L.I.; Ganushkina, L.A.; Mikhailova, A.L.; Zalunin, I.A.; Chestukhina, G.G. (2004). Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry 11A. Endotoxin from Fragments Corresponding to Its N- and C- Moieties Restores Its Original Biological Activity. **Biochem.**, 69:181-187.
- Rogoff, M.; Yousten, A.A. (1969). *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations. **Ann. Rev. Microbiol.** 23: 257-386.
- Rowe, G.E.; Margaritis, A. (1987). Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **CRC Critical Rev. Biotechnol.**, 6;87-123.
- Rowe, G. E.; Margaritis, A.; Wei, N. (2003). Specific oxigen uptake rate variation during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* var. *kusrtaki* HD-1. **Biotechnol. Progr.**, 19:1439-1443.
- Saar, J.H.; Silveira, M.M.; Passos, R.F.; Berbert-Molina, M.A.; Wuthstrack, G.H.; Jonas, R. (1996). Formulação de um meio de produção de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando resíduos agroindustriais. In: V Sincobiol (Simpósio de Controle Biológico), **Anais.** pp.203. Foz do Iguaçu, 1996.
- Saksinchai, S.; Suphanatarika, M.; Verduyn, C. (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: a physiological study. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 17:307-316.
- Sikdar, D.P.; Majumdar, M.K.; Majumdar, S.K. (1991). Effect of Minerals on the Production of the Delta Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biotechnol. Lett.**, 13:511-514.

- Schmidell, W. (2001). Agitação e aeração em biorreatores. In: Schmidell, W. ; Lima, V. A.; Aquarone, E. ; Borzani, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher LTDA. 2: 277-331.
- Silveira, M. M.; Berbert-Molina, M. (2005). Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Braz. J. Chem. Eng.**, 22:495-500.
- Sousa, A.B.; Arruda, R.O.M.; Moraes, R.O. (2005). Produção de *Bacillus thuringiensis* usando Soja como substrato. In: do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos. **CD ROM**. Recife, 2005.
- Souza-Dias, D.G., Silva, S. F., Martins, E.S., Soares, C.M.S., Falcão, R., Gomes, A.C.M.M., Praça, L.B., Dias, J.M.C.S.; Monnerat, R. G. (2002). Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. **Boletim de Pesquisa de Desenvolvimento Embrapa**.
- Souza, O.; Rüdiger, A.L.; Franczak, P.F.; Jesus, A.; Wonsiewski, D.; Furlan, S.A. (2005). Valorização dos Resíduos Agroindustriais na Produção de Bioinseticida Bti por Processo Fermentativo em Estado Sólido Visando o Controle de Borrachudo. In: XV Sinaferm -Simpósio Nacional de Bioprocessos.**CD-ROM**, Recife,2005.
- Sthaly, P.; Andrews, R.E.; Yousten, A.A. (1990). *In: The Procaryotes. The Genus Bacillus – Insect Pathogens*.
- Tokcaer, Z.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U.; Özcengiz, G.; Alaeddinoglu, N.G. (2006). Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-500. **Process Biochem.**, 41:350-355.
- 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.

- Vilarinhos, P.T.R.; Dias, J.M.C.S.; Andrade, C.F.S.; Araújo-Coutinho, C.J.P.C. (1998). Uso de Bactérias para o Controle Microbiano de Culicídeos e Simulídeos. *In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. FEALQ (Fundação de Estudos Agrários Luis de Queiroz) 2ed., v.4, Cap.13, 1163p.*
- Vilarinhos, P.T.R.; Dias, D.G.S.; Monnerat, R.G. (2003). Persistência larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa.**
- Vimala Devi, P.S.; Ravinder, T.; Jaidev, C. (2005). Barley-based medium for the cost-effective production of *Bacillus thuringiensis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 21:173-178.
- Vimala Devi, P.S.; Ravinder, T.; Jaidev, C. (2005). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. **J. Inverteb. Pathol.**, 88:163-168.
- Xiaoyan, L.; Yi, L.; Ming, S.; Peng, L.; Jucheng, Z.; Lin, L.; Songsheng, Q.; Ziniu, Y. (2005). Microcalorimetric investigation of the growth of the engineering *Bacillus thuringiensis* with different plasmid numbers and various promoters. **J. Therm. Anal. Calorim.**, 79:29-32.
- Wakisaka, Y.; Masaki, E.; Nishimoto, Y. (1982) Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- β -hydroxybutyric acid by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. En. Microbiol.**, 43: 1473-1480.
- Wu, D.; Chang, F. N. (1985). Synergism in Mosquitocidal Activity of 26 and 65 kDa Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Crystal. **FEBS Lett.**, 190:232-236.
- Zabriskie, D.W.; Humphrey, D.W. (1978). Real-time, estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by componente balancing. **AIChE Journal**, 24:138-146.