

PRODUÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS

Deise M.F. Capalbo*

I - Considerações sobre *Bacillus thuringiensis*

1. Histórico

Bacillus thuringiensis foi isolado pela primeira vez no Japão em 1902 por Ishiwata, de lagartas do bicho da seda. Em 1915, foi demonstrado que apenas culturas esporuladas eram tóxicas às larvas do bicho da seda (*Bombyx mori*). Para os japoneses este microrganismo é de grande importância pelo perigo que apresenta à indústria da seda. Ainda em 1915, Berliner isolou *B. thuringiensis* (Bt) de larva de *Anagasta kuehniella* (traça das farinhas), na Thuringia, sendo portanto designada *Bacillus thuringiensis*. Ele comentou a presença de um corpo de inclusão no esporo mas não o relacionou com as propriedades inseticidas do microrganismo. Mencionou também a possibilidade de utilizá-lo no controle da traça.

Entre 1920 e 1950 sua utilização em campo trouxe resultados variáveis. Notou-se que seu controle se limitava à Lepi-

* Engã de Alimentos, Pesquisadora do Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, EMBRAPA.

doptera. Somente em 1956, Angus constatou que a atividade inseticida se localizava no corpo de inclusão.

O desenvolvimento do Bt como inseticida ficou entretanto relegado a plano inferior, visto que os inseticidas químicos eram produzidos a custos muito reduzidos e seu espectro de atuação era muito mais amplo. Entretanto, o desenvolvimento de resistência contra a maioria dos inseticidas, os distúrbios no balanço da população de insetos e o impacto ambiental provocado pelos produtos químicos favoreceu a pesquisa e aplicação em campo do Bt de 1960 para cá.

Os produtos que se encontram no mercado hoje em dia são confiáveis e apresentam resultados consistentes. O homem do campo sabe o que esperar do Bt: apesar do produto não eliminar totalmente a população do inseto-praga, ele assegura o controle suficiente para que o nível permaneça abaixo do nível de dano econômico.

Os produtos comerciais se utilizam de variedades com a delta-endotoxina (corpo de inclusão) mais potente, principalmente a variedade **Kurstaki** serotipo 3a, 3b.

Durante a última década, as pesquisas sobre Bt se expandiram em diferentes campos: metabolismo, relação entre esporulação e formação de esporo, análise química e ativação do cristal protéico, modo de ação do cristal, melhoramento genético e melhores técnicas de aplicação.

Mais especificamente no Brasil, desde 1972 vem sendo estudada a produção de Bt por processo fermentativo em meio líquido. Em 1976 foi depositada a patente do processo de fermentação submersa, hoje já registrada sob nº BR PI 7608688; pela profª

Iracema O. Moraes; em 1980 foi depositada pela mesma professora, a patente do processo de produção da exotoxina termoestável de Bt. Além dos processos de fermentação, foram realizados na UNICAMP, pesquisas sobre a cinética de crescimento e esporulação do Bt, influência da aeração e agitação no processo de fermentação e ainda estudos sobre a produção de Bt em fermentação contínua, e barateamento do meio de cultura líquido, através da utilização de resíduos industriais. A utilização de processo fermentativo semi-sólido foi assunto de projeto da EMBRAPA/CNPDA desenvolvido em colaboração com a UNICAMP.

Além dessas pesquisas sobre processo de produção outras foram desenvolvidas em diferentes Instituições nos últimos 4 anos, e as aplicações de campo vêm sendo realizadas separadamente em vários pontos do País, utilizando produtos comerciais.

2. Crescimento, esporulação e produção de toxinas

Os esporos bacterianos são extremamente resistentes e sobrevivem a condições desfavoráveis por um longo período. O processo de desidratação do protoplasto do esporo durante a esporulação, é o responsável pelo estado ametabólico e pela alta resistência química, à irradiação, dessecação e ao calor.

Sob condições naturais o esporo voltará à fase vegetativa por um processo de ativação muito lento. Em laboratório o processo pode ser acelerado por um choque térmico no qual suspensões de esporos são submetidas a temperaturas de 65-90°C/ 10-30 minutos. O início da germinação também pode ser induzido por substân-

cias como açúcares e aminoácidos.

Até hoje, são poucos os estudos sobre as necessidades nutricionais do Bt. Para fins gerais, entretanto, sabe-se que bons resultados são conseguidos com meios suplementados com extrato de levedura ou caseína hidrolizada. Sabe-se também que meios mínimos glicose-sais precisam ser complementados com pelo menos 0,2% de glutamato para promover crescimento de Bt.

É durante o crescimento vegetativo que essa bactéria deve assimilar nitrogênio (na forma de amônia) para a etapa de esporulação bem como "excreção" de metabólitos (como antibióticos). É também nessa etapa que ocorre a produção da exotoxina termolável que passa para o meio de cultura.

Então, em um meio com bom suprimento de carbono, nitrogênio e fósforo, o Bt cresce vegetativamente, e a esporulação não ocorre. Ao final, ocorre a exaustão do meio em seus nutrientes, o que induz à esporulação. Neste ponto a fase estacionária se inicia, e a célula começa sua transformação morfológica que gerará o esporo, após algumas horas. Neste período, os ácidos orgânicos são metabolizados, aumentando o pH do meio. E é também nesta etapa que ocorre o aparecimento do cristal.

3. As toxinas e seu significado

Entre os metabólitos biologicamente ativos produzidos pelo Bt, a delta-endotoxina merece destaque.

Essa toxina está contida no cristal proteico paraesporal, o qual é termolável e solúvel em soluções alcalinas. Com

raras exceções, apenas um cristal é produzido por esporo. Ele tem forma bipiramidal tendo dimensões médias de 0,8 x 2,0 um (note-se que a célula vegetativa tem 3,5 x 1,2 um e o cristal representa 30-40% do peso seco do esporo).

Apesar das muitas pesquisas realizadas até hoje, não se sabe ao certo a função exata desse cristal para a célula; a sua origem genética e as etapas metabólicas de sua produção carecem de resultados concisos.

A delta-endotoxina do Bt é específica para larvas de lepidopteros, apesar de outros tipos de insetos serem susceptíveis, como alguns besouros, moscas e mosquitos.

Outro metabólito, a beta-endotoxina difere da delta-endotoxina em diversos aspectos:

- é termo estável (15' a 120°C)
- é excretada para o meio durante a fase de crescimento logarítmico
- produz anomalias morfológicas no inseto
- causa morte durante a fase de pupa

Seu espectro de atuação é grande, envolvendo vertebrados e invertebrados, sendo que os dipteros são os mais susceptíveis (*Musca domestica* e *Aedes aegypti*).

Outros metabólitos de Bt com atividade inseticida tem sido comentados, sendo de menor ou nenhuma aplicação prática.

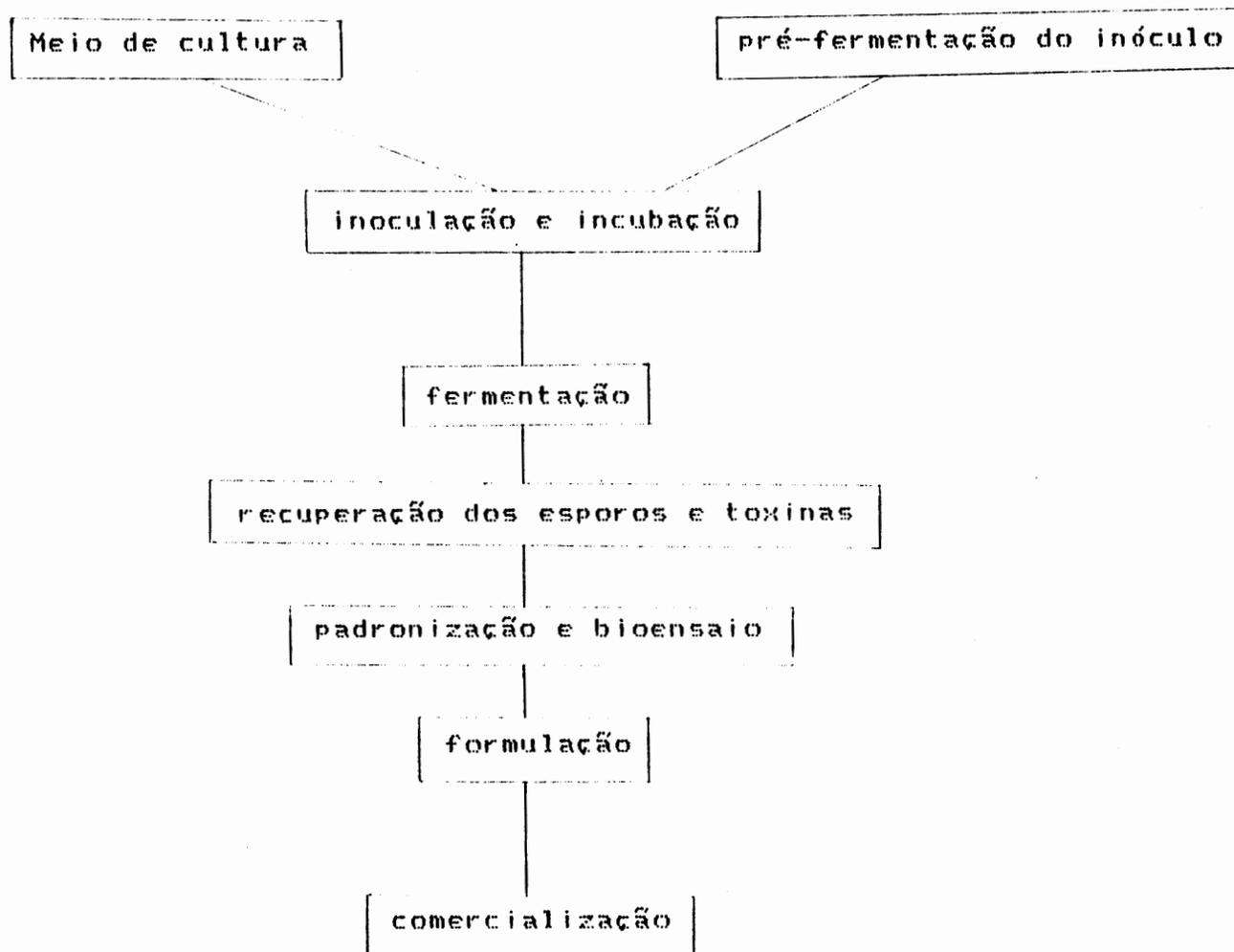
II - Produção

Assim como o Bt, a maioria das bactérias tidas como úteis para o controle biológico de insetos são aquelas que produzem esporos. O fato do esporo ser mais resistente que a célula vegetativa favorece seu processo de recuperação, formulação e aplicação em campo.

Desta forma, muito do que nos referimos à produção de Bt se aplica à produção de outros esporos bacterianos, reservando-se a cada um, naturalmente, suas peculiaridades nutricionais e bioquímicas.

A produção comercial de microrganismos ou de seus produtos invariavelmente requer a seleção de uma linhagem específica, mais bem adaptada ao processo, de forma a crescer sob condições econômicas de fermentação.

Pode-se esquematizar a produção comercial do inseticida *B. thuringiensis*, por fermentação submersa, conforme segue:



Meio de fermentação: As células microbianas requerem água, carbono (para biosíntese e energia), nitrogênio, minerais e fatores de crescimento. As quantidades de cada componente e a forma em que se apresentam dependerão do processo de fermentação utilizado.

O Bt pode utilizar como fontes de carbono, amido, melão, farelos de grãos, subprodutos industriais como, água de côco, soro de queijo, etc. O nitrogênio pode ser suprido por sais de amônio, aminoácido, peptídeos, farelos de cereais, água de mace-

ração de milho, farinhas, extratos de levedura, hidrolisados de caseína, e soro de queijo. Os sais inorgânicos, essenciais para a esporulação (como cálcio e magnésio) podem ser acrescentados ao meio ou, no caso de serem utilizados subprodutos, estes já tem quantidade suficiente de minerais presentes em sua composição. A própria água, não destilada, pode ser fonte de minerais.

Condições de crescimento: elas são estabelecidas em função do máximo rendimento em esporos/cristal tóxico, e não somente em função do crescimento celular.

O pH inicial da cultura fica ao redor do valor 7. Durante o crescimento há uma queda do pH (em razão da formação dos ácidos orgânicos pela degradação dos carboidratos) até um valor ao redor de 5. Quando o pH retorna ao valor 7 e o ultrapassa, a célula já completou seu ciclo e esporulou. Assim, o acompanhamento da fermentação do Bt através do pH é um fator de importância industrial: rapidez e simplicidade.

O suprimento de oxigênio (Bt é aeróbico) é fator importante tanto no rendimento como economicamente (alto volume de oxigênio = altos gastos de energia). A injeção de ar é realizada através de filtros para evitar contaminação, e a transferência de O_2 para o meio é auxiliada pela agitação.

Como se deduz, os gastos de energia com injeção e agitação costumam ser elevados.

A temperatura é mantida em $30^{\circ}C \pm 2^{\circ}$ visto ser o Bt um microrganismo mesófilo.

Processo fermentativo:

a) Semi-sólido:

Numa fermentação semi-sólida, o microrganismo cresce em um nutriente líquido que foi absorvido na superfície de pequenas partículas de suporte. Isso permite uma alta razão área superficial: volume, e utiliza pouco espaço para uma interface líquido-gás. Geralmente utiliza-se suporte orgânico (como farelo de trigo, de milho, farinha e farelos de oleaginosas) que além de suportes, fornecem nutrientes para a fermentação. Algumas vezes adiciona-se suporte inorgânico que reduz a tendência de alguns farelos se aglutinarem quando umedecidos. Apresenta vantagens: baixo custo; equipamento simples e sem grande sofisticação; recuperação do material é simples.

Como desvantagens, observa-se que não se mantém esterilidade absoluta, e que controle da fermentação pode ser difícil.

b) Fermentação submersa ou líquida

a fermentação submersa é realizada em frascos agitados ou em fermentadores com controles de entrada de ar e temperatura, dispersando-se uma cultura do microrganismo (proveniente de uma pré-fermentação líquida ou sólida) em um meio líquido. O ar é introduzido no fundo do tanque; o meio é agitado para melhorar a transferência de O_2 e de nutrientes para o microrganismo, a temperatura é controlada por mantas ou camisas ou ainda por serpentinas. O problema de formação de espuma é solucionado pela adição de anti espumantes (óleos, poliglícolis, silicones, etc.). Os

controles de agitação, retirada de amostras, entradas de ar e outros são desenhados de forma a manter a esterilidade do processo.

Os processos de recuperação do produto final podem ser por centrifugação ou filtração no caso de produto insolúvel, ou senão utilizados extracções e precipitações para produtos solúveis no meio. O processo de recuperação costuma ser caro, visto que há pequena quantidade de produto para o volume fermentado (para o Bt costuma-se citar 1-3g de célula/1000ml fermentação). Um bom rendimento é considerado $5 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ esporos/ml, correspondendo a 2-4g de produto formulado final.

Como o Bt será comercializado formulado para controle principalmente de pragas da ordem Lepidoptera, a indústria está interessada na delta endotoxina principalmente, e no esporo em 2º lugar, uma vez que ele pode ter alguma atuação no controle. Ambos são produzidos tanto em processo semi-sólido, como submerso e ambos são comercialmente viáveis.

III - Padronização e Formulação

A confiabilidade dos preparos de Bt reside na manutenção de sua qualidade. A padronização é relativamente difícil, uma vez que o ingrediente ativo não está na forma pura (endotoxina + esporo + restos do caldo de fermentação).

O método de padronização aprovado e adotado mundialmente é baseado em U.I. (Unidades Internacionais). A referência padrão (E-61) - preparada pelo I. Pasteur, contém 1000 UI/mg e tanto se usa traça das farinhas como outros lepidopteras como inseto tes-

te. Apesar dos muitos detalhes envolvidos, o mais importante é o ajuste das diferentes bateladas de fermentação ao mesmo nível de atividade.

A maior dificuldade, é o tempo que demora para se obter o resultado de um bioensaio e o custo envolvido, caso se deseje resultados confiáveis. O ideal seria um método de determinação direta do cristal proteico. Várias tentativas foram feitas neste sentido, com bons resultados, porém a restrição dos métodos costuma ser que só servem para comparar amostras derivadas de uma mesma linhagem de Bt, pois eles medem apenas a quantidade de cristal e não sua atividade específica.

A formulação do Bt é pouco estudada, porém é uma etapa crítica para que haja eficiência no campo.

LITERATURA CONSULTADA

ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. Editora Manole.
1986.

CAPALBO, D.M.F. & MORAES, I.O. Boletim de Pesquisaa 1. CNPDA/
EMBRAPA, 1987.

DE BARJAC, H. & BONNEFOI, A. (1962). Entomophaga Z(1): 5-31,
1962.

RODOFF, M.H. & YOUSSTEEN, A.A. (1969). Ann Rev. Microb. 23: 357-
386, 1969.

HEIMPEL, A.M. (1967). Ann. Rev. Entomol. 12: 287-232, 1967.

HEIMPEL, A.M. & ANGUS, T.A. (1963). In: "Insect Pathology, an
Advance Treatise" (E.A. Steinhans, ed.) Vol. 2. p. 21-73,
Acad. Press, N.Y.