

ASPECTOS DA PRODUÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*Deise Maria Fontana Capallo<sup>(1)</sup>Iracema de Oliveira Moraes<sup>(2)</sup>1. INTRODUÇÃO

Na busca por métodos alternativos mais seguros e seletivos para controle de insetos-praga, tem sido sugeridos reguladores de crescimento do inseto, feromônios, esterilizantes, parasitos, predadores e entomopatôgenos como agentes de biocontrole. Entende-se por entomopatôgenos, os microorganismos que afetam os insetos, causando doenças que geralmente diminuem e, em alguns casos eliminam totalmente, populações de insetos. Entre as alternativas acima citadas, nenhuma é mais aplicável ou oferece maiores possibilidades de sucesso rápido do que o uso dos entomopatôgenos.

Uma vez que os entomopatôgenos estão disponíveis na natureza, são eficazes e se mostram seguros e específicos, questiona-se porque um maior esforço não tem sido dispendido no seu desenvolvimento quando se compara com o desenvolvimento de inseticidas químicos que devem ser sintetizados e selecionados por atividade. Com efeito, entre milhares de produtos químicos testados por ano, apenas uma pequena parte possui características desejáveis que encorajem outras etapas de desenvolvimento. Em contraste, inseticidas microbianos em potencial tem sido naturalmente selecionados por milhões de anos quanto à sua especificidade, segurança e eficiência. Além

---

(1) Eng.<sup>a</sup> de Alimentos, M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura.

(2) Eng.<sup>a</sup> de Alimentos, Dr., Professora titular, Faculdade Engenharia Alimentos - UNICAMP, C.P.6121-13081, Campinas, SP.

disso, novos entomopatógenos tem sido observados a cada dia. Nos últimos 20 anos, o número de entomopatógenos potencialmente ativos, cresceu em aproximadamente 30%, e as preparações com nomes comerciais aumentou em torno de 20 vezes.

Aspectos de produção, segurança de aplicação e eficiência alcançada são termos decisivos no desenvolvimento de inseticidas microbianos.

## 2. FASES NO DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA MICROBIANO

A natureza se encarregou da primeira fase de desenvolvimento de um inseticida microbiano, fazendo a seleção dos mesmos por atividade. A transformação de um entomopatógeno em um produto inseticida se inicia com a observação na natureza, continua através de experimento em laboratório, passa por uma fase de plantas piloto e alcança realização técnica final como um produto comercial. Durante cada fase de seu desenvolvimento, três parâmetros são avaliados: (a) facilidade de produção; (b) segurança aos homens vertebrados, insetos benéficos e plantas; (c) eficiência contra pragas importantes.

Se considera como sucesso técnico, quando um entomopatógeno pode ser continuamente produzido, é seguro e será eficiente como controlador da praga. Se considera como sucesso comercial, quando o produto é obtido, é eficiente e apresenta viabilidade econômica, isto é, trará um retorno razoável ao produtor. Geralmente demora de cinco a sete anos para se desenvolver um entomopatógeno em um inseticida microbiano, sendo que este tempo é variável em função do tipo de microorganismo envolvido e da necessidade ou não de maiores conhecimentos sobre segurança de sua aplicação.

Do ponto de vista tecnológico é simples se obter entomopatógenos em substratos naturais ou artificiais. Os fungos e bactérias entomopatogênicos são produzidos em substratos artificiais através de fermentação submersa ou de superfície, com exceção de algumas bactérias que só se desenvolvem em células vivas. Utiliza-se fermentação na produção comercial

dos seguintes inseticidas microbianos: bactérias - *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus moritai*; fungos - *Aschersonia*, *Beauveria*, *Metarrhizium* e *Verticillium*. Pode-se produzir de 10 a 500 metros cúbicos de produto por fermentador.

Qualquer resultado que gere redução de custos de produção significativa, pode transformar um entomopatôgeno tecnicamente promissor em um inseticida microbiano comercialmente viável.

### 3. O CASO DO *Bacillus thuringiensis*

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos se iniciou em torno de 1950, quando se percebeu a possibilidade de manipular microorganismos para causar epizootias em insetos susceptíveis, à velocidades próximas àsquelas dos produtos químicos, sem contudo causar danos às espécies benéficas.

Primeiramente foram as empresas de fermentação que, na procura de novos mercados, se lançaram no estudo da produção do *B. thuringiensis*, que se apresentava tecnicamente viável para crescimento "in vitro". A seguir, as indústrias de produtos químicos, já estabelecidos na produção e venda de inseticida, demonstraram interesse devido à potencialidade que o inseticida microbiano representava. Finalmente durante a última década, as pesquisas sobre *B. thuringiensis* se expandiram em diferentes campos: metabolismo da bactéria, relação entre esporulação e formação do cristal, análise química e ativação do cristal proteico, modo de ação do cristal, melhoramento genético, melhores técnicas de aplicação, formulação.

#### 3.1. Produção

Durante o desenvolvimento comercial da produção de microorganismos, efetua-se a seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo, e executa-se variações de processo necessárias à maximização de produção e realização do crescimento em condições econômicas.

## Microorganismo

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° - 80° C por 10 a 20 minutos.

O início de germinação pode ser induzido por substâncias como a açúcares e aminoácidos. Eles se ligam a sítios específicos na membrana e levam a mudanças na permeabilidade da mesma. Ocorre então a perda da resistência ao calor, refratilidade e eliminação do ácido dipicolínico, entre outros acontecimentos. Essas reações degradativas são seguidas por um período de atividade de biossíntese, necessária para o desenvolvimento de células vegetativas.

Até hoje, são poucos os estudos sobre as necessidades nutricionais do *B. thuringiensis*. 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 *B. thuringiensis*. Durante o crescimento vegetativo, o bacilo cataboliza açúcares, levando a um acúmulo de ácidos orgânicos que é o responsável pela queda do pH do meio de cultura durante esse período. Nesta etapa a bactéria assimila nitrogênio para a etapa de esporulação, e é também produzida a exotoxina termoestável que juntamente com outros metabólitos, passa para o meio de cultura.

Assim, num meio com bom suprimento de carbono, nitrogênio e sais, o *B. thuringiensis* cresce vegetativamente e a esporulação não ocorre. Ao final, ocorre a exaustão do meio em seus nutrientes, o que induz à esporulação. Neste período os ácidos orgânicos são metabolizados, aumentan

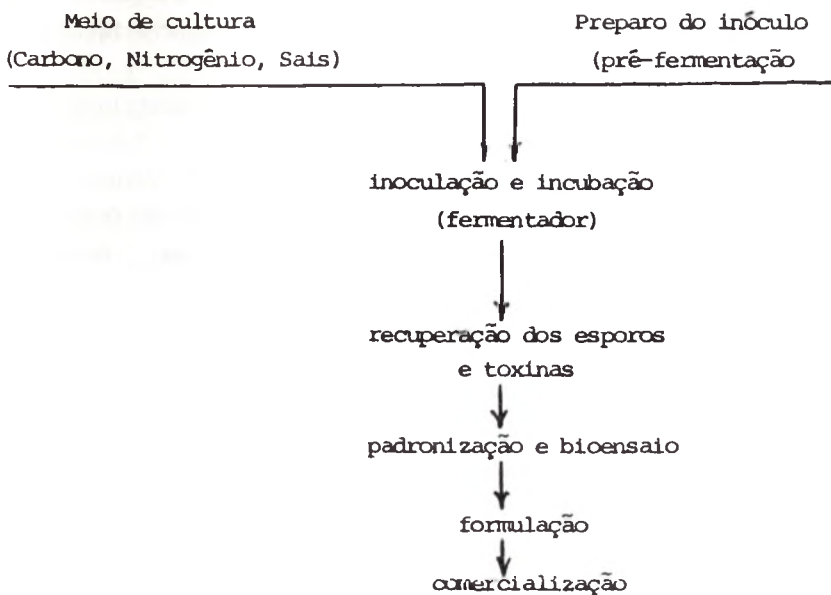
do o pH do meio. E é também nesta etapa que ocorre o aparecimento do cristal tóxico aos insetos.

### Processo fermentativo

Desde meados do século, todos os produtos contendo *B. thuringiensis* tem sido obtidos por fermentação submersa, variando apenas a forma de recuperação dos esporos e a formulação final. A fermentação em meio sólido tem sido testada em laboratório e se apresenta promissora. Relato de viagem de pesquisadores à China revelam que esse tipo de fermentação é realizado pelas comunas e tem obtido bons resultados de aplicação no campo.

A maioria dos processos industriais atualmente conhecidos, dizem respeito à técnica de produção do inseticida em bateladas. Porém, a técnica de cultivo contínuo foi testada por alguns autores com resultados positivos quando efetuada em dois estágios, onde o segundo atuava como fermentador descontínuo, promovendo assim a máxima maturação de esporos.

Podemos esquematizar a produção comercial do inseticida à base de *B. thuringiensis*, por fermentação submersa, conforme segue.





A composição do meio de cultura para fermentação, submersa ou em superfície, deve constar de água, carbono e nitrogênio, para biossíntese e energia, e traços minerais. Os níveis e formas desses elementos dependem do processo de fermentação usado.

Uma das chaves para o processo de produção e comercialização do inseticida bacteriano tem sido o desenvolvimento do meio de cultura. A maioria dos meios empregados usa produtos totalmente naturais, muitas vezes subprodutos industriais e constantemente de baixo custo. Para produção no Brasil pode-se utilizar o melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho, água de côco, e outros. A composição do meio, no entanto, será determinada através da análise de custos comparada com o rendimento da fração tóxica desejada.

A esterilização deste meio de cultura é indispensável para que a produção seja máxima e não acarrete contaminantes indesejáveis. O pH do meio é corrigido para um valor neutro onde a bactéria melhor se desenvolve.

A próxima etapa é a inoculação do meio com *B. thuringiensis* proveniente de uma pré fermentação que assegure que o microorganismo está em estado de desenvolvimento vegetativo exponencial. Após a inoculação, caracterizada pelos cuidados com assepsia e esterilidade de manipulação, o fermentador é ligado, de forma a se obter agitação e aeração adequados ao volume de fermentação, à linhagem do microorganismo e às características intrínsecas ao desenho do fermentador.

As condições de operação comumente utilizadas industrialmente, descritas por vários autores, indicam um pH inicial de 7,2 a 7,6 para o meio de fermentação. O volume de inóculo varia de 2 a 5% do volume total de fermentação. A temperatura utilizada é de 30°C. O ciclo de fermentação pode variar de poucas horas (6-8 horas) até dias (3 a 5 dias) dependendo do processo em uso.

### Recuperação

Em entomologia, definem-se as endotoxinas produzidas pelos mi

croorganismos entomopatogênicos como sendo aquelas toxinas ligadas à célula microbiana, enquanto que as exotoxinas são aquelas excretadas no meio da cultura.

Entre os metabólitos biologicamente ativos, produzidos pelo *B. thuringiensis*, a delta-endotoxina merece destaque. Ela está contida no cristal proteico paraesporal, o qual é termolábil e solúvel em soluções alcalinas. Com raras exceções, apenas um cristal é produzido por esporo. Essa toxina é específica para Lepidoptera (cerca de 150 espécies são suscetíveis) pragas da agricultura e de grãos armazenados.

A recuperação da delta-endotoxina pode ser realizada por filtração ou centrifugação do meio fermentado, sendo que o creme (esporos + cristal) obtido em qualquer destes processos pode ser lavado com soluções de lactose e precipitado com acetona, para ser seco a seguir.

Além desta fração tóxica, o *B. thuringiensis* produz outra toxina - a beta-exotoxina - que se diferencia da delta-endotoxina por vários aspectos: é termostável, é excretada para o meio durante a fase de crescimento logarítmico; é ativa principalmente contra Diptera e alguns Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Ortoptera; seu espectro de atuação é grande, envolvendo vertebrados e invertebrados.

Ela é separada do mosto fermentado, através de centrifugação, permanecendo na fase líquida separada. Esse líquido é submetido à esterilização a 121°C por 15 minutos e purificado por absorção em carvão para posterior eluição em solução de etanol.

### Ensaio e formulação

Com inseticidas químicos, a produção pode ser bem controlada, pois a normalização desses produtos pode ser expressa em porcentagem de ingrediente ativo, já que os mesmos são quimicamente definidos e seus efeitos bem determinados. Já os produtos à base de *B. thuringiensis* contendo três princípios ativos (cristal, exotoxina e o próprio esporo) necessitam de bioteste: contagem de esporos (método presuntivo) e bioensaios com insetos (conclusivo) para determinar a potência do produto.

Na rotina industrial a constância das características do produto deve ser verificada através de amostra referência, sendo que cada produtor terá seu próprio padrão de qualidade.

### Comercialização

Todos os inseticidas à base de esporos e cristais de *B. thuringiensis* receberam a isenção de tolerância de resíduos da "Food and Drug Administration" (USA) para vários hortigranjeiros, significando que as agências federais americanas acreditam na inocuidade do produto.

Atualmente pode-se fazer uma estimativa de produção mundial ao redor de 2.500t/ano, sendo os EUA o maior produtor (cerca de 1000t/ano) seguido da França e Inglaterra. Da URSS não se tem dados exatos mas estima-se em até 1000t/ano. As perspectivas de uso de *B. thuringiensis* parecem favoráveis, prevendo-se um aumento de produção mundial entre 10 e 20% até meados da próxima década.

A segurança do uso de *B. thuringiensis* baseia-se no conceito de que, quando se utiliza um inseticida (seja ele biológico ou químico) é interessante para o ecossistema que permaneçam vivos alguns insetos (abaixo do nível econômico de danos) para que a cadeia alimentar não se rompa. No entanto é necessário esclarecer melhor os agricultores para se fazer um acompanhamento correto da cultura e suas pragas, quando do uso de *B. thuringiensis*.

Outro ponto que se deve ressaltar quando se discute a segurança do uso de *B. thuringiensis* é a sua distribuição na natureza. Ele foi isolado inicialmente de lagartas de bicho-da-seda, e posteriormente foi comprovado que ele ocorre com certa frequência em insetários. Porém o mais interessante é que apesar de ser encontrado em insetos, quase nunca ele foi o causador de uma epizootia. Isso demonstra que o *B. thuringiensis* no seu habitat é um agente infectivo ineficiente, porém por fermentações é um efetivo produtor de toxinas específicas.



LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1986, 407 p.
- BRIGGS, J.D. Commercial production of insects pathogens. In: Insect Pathology: an advanced treatise. New York, Acad. Press, 1963. Vol. 2, p. 519-548.
- BURGESS, H.D. Insect control by microorganisms. Accademie Nazionale dei Lincei, Roma, 128: 189, 1963.
- BURGESS, H.D. Standardization of *Bacillus thuringiensis* products: homology of the standard. Nature 215: 664, 1967.
- BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. ed. Microbial control of insects and mites. 2. ed. London, Academic Press Inc. Ltd. 1973. 861 p.
- BURGESS, H.D. ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980. London, Academic Press Inc. Ltd, 1981. 949p.
- CAPALBO, D.M.F. Contribuição ao estudo da fermentação contínua de *Bacillus thuringiensis*. Campinas, FEA/UNICAMP, 1982. Tese (Mestrado).
- COUCH, T.L. and ROSS, D.A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. Biotechn. Bioeng. 22 (7): 1295, 1980.
- DUBOIS, N.R. Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. Appl. Microb. 16: 1098, 1968.
- FREIMAN, Y.B. & CHUPIN, A.A. Aspects of continuous cultivation of spore-forming microbes from the group *Bacillus thuringiensis*. Adv. Microb. Eng. Part I. Biotech. Bioeng. Symposium, nº 4, p. 259, 1973.
- GOLDBERG, I.; SNEH, B.; BATTAT, E. & KLEIN, D. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. Boisd. Biotechn. Lett. 2 (10): 419-26, 1980.
- HERTLEIN, B.C.; HORNBY, J.; LEVY, R. & MILLER, T.W.JR. Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potencial. Dev. Ind. Microb. 22: 53-60, 1981.

- MORAES, I.O. Produção, separação e bioensalo da exotoxina termostável de *Bacillus thuringiensis* obtida por fermentação submersa. Campinas, FEA/UNICAMP, 1981. Tese (Livre Docência).
- ROGOFF, M.H. & YOSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*: microbiological considerations. Ann. Rev. Microb. 23: 357-386, 1969.