



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDOTOXINAS POR *Bacillus thuringiensis*
CULTIVADO COM SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

LÍVIA SANTOS DE FREITAS

RECIFE

2019

LÍVIA SANTOS DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDOTOXINAS POR *Bacillus thuringiensis*
CULTIVADO COM SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto.

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F866a Freitas, Lívia Santos de
Avaliação da produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* cultivado com substratos agroindustriais / Lívia Santos de Freitas. - 2019.
36 f. : il.
- Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Coorientadora: Raquel Pedrosa Bezerra.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2023.
1. Endotoxinas. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Soro de leite. 4. Palma forrageira. 5. Xarope de sorgo. I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Bezerra, Raquel Pedrosa, coorient. III. Título

LÍVIA SANTOS DE FREITAS

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENDOTOXINAS POR *Bacillus thuringiensis* CULTIVADO COM SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Comissão Avaliadora:

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto – UFRPE
Orientadora

Prof^a Dr^a Raquel Pedrosa Bezerra – UFRPE
Titular

Dr^o José Manoel Wanderley Duarte Neto – IPA
Titular

MSc Túlio Alexandre Freire da Silva – UFRPE
Suplente

RECIFE

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus pela existência, luz e carinho.

À espiritualidade por me guiar, me reconfortar e ressignificar minha vida constantemente.

A minha família pelo apoio, acolhimento e incondicional amor depositado em mim.

A minha querida Luana, minha irmã de alma, pelo incentivo e por me fazer sentir leveza e felicidade no viver.

A Túlio por ter salvado meus experimentos várias vezes e ter se tornado um grande amigo.

À prof^a Ana e prof^a Raquel por serem pessoas maravilhosas e verdadeiras mães para seus(uas) orientandos(as).

A José Manoel pela sua paciência, delicadeza e simpatia.

A UFRPE, universidade maravilhosa que me proporcionou momentos e oportunidades inesquecíveis.

A FACEPE e ao IPA pelo grande apoio, parceria e suporte no desenvolvimento das pesquisas.

E a todos(as) os(as) amigos(as) e pessoas bondosas que de alguma forma me ajudaram e estão comigo nessa trilha da vida.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
1.1. Agrotóxicos e Bioinseticidas.....	9
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
1.2.1. Contexto histórico.....	10
1.2.2. Toxinas.....	11
1.2.2.1. Toxinas Cry.....	13
1.2.2.2. Toxinas Cyt.....	14
1.2.2.3. Proteínas inseticidas vegetativas (VIP).....	15
1.2.2.4. Fatores que afetam o crescimento, esporulação e produção de toxinas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
1.3. Meios de cultura.....	17
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

CAPÍTULO 2

Resumo.....	30
Abstract.....	30
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	32
Conclusões.....	35
Agradecimentos.....	35
Referências.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações nutricionais da porção de 100 g de xarope de sorgo..... 18

Tabela 1. Valores médios das análises de 96 horas de fermentação de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* (Btb370) em sete diferentes meios de cultura.....33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre a formação de esporos ($\times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹) e de delta-endotoxinas (mg.L⁻¹) por Btb370 em sete diferentes meios de cultura após 96 horas de fermentação. LB: Luria-Bertani; PM: extrato de palma forrageira; PUM: extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹; SM: xarope de sorgo; SUM: xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹; WM: soro de leite; WUM: soro de leite com ureia 1 g.L⁻¹....33

Figura 2. Relação entre a atividade proteásica (U.mL⁻¹) e a produção de delta-endotoxinas (mg.L⁻¹) por Btb370 em sete diferentes meios de cultura após 96 horas de fermentação. LB: Luria-Bertani; PM: extrato de palma forrageira; PUM: extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹; SM: xarope de sorgo; SUM: xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹; WM: soro de leite; WUM: soro de leite com ureia 1 g.L⁻¹....33

Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de Btb370 cultivado em extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹ (A), Luria-Bertani (B), xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹ (C) e soro de leite (D). E: esporos; BP: cristal bipiramidal; EF: cristal esférico; CB: cristal cuboidal.....34

RESUMO

Em contrapartida ao uso exacerbado de pesticidas químicos, o controle biológico de pragas não acarreta danos socioambientais, além de ser altamente específico e eficiente. Um dos agentes biológicos amplamente utilizado é a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que se caracteriza por produzir cristais proteicos, denominados de delta-endotoxinas, que apresentam alta toxicidade e especificidade para vários membros de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera. Bt pode ser cultivado em diferentes tipos de meios de cultura, sendo fundamental a utilização de substratos menos onerosos a fim de baratear o produto final. Assim, visando desenvolver meios de cultura de baixo custo, o presente trabalho utilizou o extrato de palma forrageira (*Opuntia*), o xarope de sorgo (*Sorghum*) e o soro de leite como substratos alternativos para o cultivo de *B. thuringiensis* var. *berliner* 370 (Btb370). A necessidade de suplementação de nitrogênio foi avaliada através da adição de ureia 1 g/L. O meio de cultura Luria-Bertani líquido foi usado como meio de controle. Os meios de cultura foram submetidos a agitador rotativo a 200 rpm, 30 °C por 96 horas e foram avaliados o crescimento celular e a produção de delta-endotoxinas, esporos e proteases por Btb370. Além disso, houve também a análise morfológica dos cristais proteicos de Btb370 através de microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que o meio à base de soro de leite sem a adição de ureia 1 g/L foi o que apresentou maior crescimento celular (4,28 g/L) e maior produção de delta-endotoxinas (568,26 µg/mL) e esporos ($9,61 \times 10^{10}$ UFC/mL) pela bactéria, superiores inclusive ao meio de controle. Os meios constituídos por xarope de sorgo e soro de leite sem suplementação de ureia proporcionaram os maiores valores de atividade proteásica (6013 U/mL e 5962 U/mL, respectivamente). Os meios à base de extrato de palma forrageira não apresentaram produção mensurável de delta-endotoxinas por Btb370. As morfologias dos cristais proteicos observadas foram: bipiramidal, esférica e cuboidal. Desta forma, verifica-se que o soro de leite foi o substrato mais eficiente para o crescimento, esporulação e produção de delta-endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 370.

Palavras-chave: Cristais proteicos, Meio de cultura alternativo, Palma forrageira, Soro de leite, Xarope de sorgo

CAPÍTULO 1

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Agrotóxicos e Bioinseticidas

O Ministério do Meio Ambiente afirma que os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Ele visa alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Quando utilizado um agrotóxico, independentemente do modo de aplicação, ele possui grande potencial de atingir o solo e as águas, principalmente devido aos ventos e à água das chuvas, que promovem a deriva, a lavagem das folhas tratadas, a lixiviação e a erosão. Além disso, qualquer que seja o caminho do agrotóxico no meio ambiente, invariavelmente o homem é seu potencial receptor.

Dessa maneira, o uso indiscriminado de inseticidas químicos, muitas vezes facilitado pela comercialização, rápido resultado e facilidade de aplicação, provoca sérios danos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente, como a contaminação de alimentos, águas, solo e animais; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras; a intoxicação de agricultores; o desequilíbrio biológico com a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (WIT et al., 2009; KORBES et al., 2010). Diante disso, meios alternativos de controle de insetos têm sido cada vez mais procurados, como o uso de entomopatógenos, que constituem os componentes ativos dos bioinseticidas. Dentre as vantagens destes produtos, pode-se citar: alta especificidade, menor risco ambiental e à saúde humana, menor frequência de resistência nos insetos alvo, entre outros (ANGELO et al., 2010).

Segundo informações da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), existe uma ampla variedade de entomopatógenos utilizados na composição dos bioinseticidas, por exemplo: fungos, como o *Beauveria bassiana*, utilizado contra a broca-do-olho-do-coqueiro, considerada uma das principais pragas

da cultura do coqueiro no Brasil; vírus, como o Baculovírus que é específico para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*); e bactérias, como o *Bacillus thuringiensis* que possui ampla toxicidade contra diversas ordens de insetos, estando entre os entomopatógenos mais utilizados mundialmente para o controle biológico de pragas.

Segundo dados do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), que é um banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins registrados no Ministério da Agricultura, existem atualmente 24 inseticidas microbiológicos formulados que possuem o *Bacillus thuringiensis* como ingrediente ativo, utilizados para o controle de diversas pragas agrícolas no Brasil. Porém, grande parte dos produtos à base de *B. thuringiensis* encontrados no mercado nacional possui um elevado custo de produção e/ou é importada, causando, desta forma, aumento no preço final ao consumidor e conseqüente diminuição da competitividade destes produtos em relação aos inseticidas sintéticos (ANGELO et al., 2010).

1.2. *Bacillus thuringiensis*

1.2.1. Contexto histórico

O Bt foi descoberto pela primeira vez em 1901, no Japão, pelo bacteriologista japonês Ishiwata Shigetane, que descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, e chamou de *Satta bacillus*. Em 1912, o cientista Ernst Berliner isolou, na Alemanha, a mesma bactéria obtida a partir de lagartas da traça da farinha, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae Zeller, 1879), chamando-a de *Bacillus thuringiensis* em homenagem a província de Thuringia, onde as lagartas foram encontradas (BRAVO et al., 2013; KESHAVAREDDY e KUMAR, 2016). Ele observou que um corpo de inclusão de cristais estava presente dentro das células esporuladas da bactéria, o nomeando de corpo parasporal, mas não correlacionou a presença desse corpo de inclusão diretamente à patogenicidade (OSMAN et al., 2015). Mattes (1927) isolou a cepa Bt descoberta por Berliner e a testou em subseqüentes ensaios de campo contra a broca europeia de milho (*Ostrinia nubilalis*), no sudeste da Europa, obtendo resultados promissores.

Um inseticida comercial Bt baseado em esporina ("Sporeine") foi usado pela primeira vez em 1938, na França (LUTHY et al., 1982). A empresa suíça Sandoz seguiu o exemplo e empreendeu a primeira produção e comercialização em larga escala de um "Thuricide" em 1940. Hannay (1953) observou novamente um corpo de inclusão de cristal presente no isolado Bt responsável pelos sintomas patogênicos em outras espécies de insetos lepidópteros. Ele propôs que a purificação parcial dos peptídeos do cristal parasporal fosse realizada e que os próprios cristais proteicos fossem diretamente responsáveis pela atividade inseticida de Bt (HANNAY, 1953). Então, reuniram-se evidências citológicas suficientes para mostrar conclusivamente que as proteínas cristalinas purificadas transmitiam a atividade inseticida de Bt (ANGUS, 1953).

O primeiro procedimento industrial bem documentado para a produção de um produto à base de Bt data de 1959, com a fabricação de "Bactospeine" sob a primeira patente francesa para uma formulação de biopesticida (MARVIER et al., 2007). Na década de 1960, outros produtos Bt baseados principalmente na subespécie *kurstaki* da linhagem HD1, como Thuricide, Biobit e Dipel, já estavam no mercado e eram utilizados contra pragas de lepidópteros (BAUM et al., 1999). Apesar de suas propriedades benéficas, esses produtos Bt iniciais não competiam bem contra pesticidas químicos por causa de seu fraco desempenho. As atividades comerciais concentraram-se em duas estratégias para superar esses desafios: o desenvolvimento de processos para aumentar a eficácia dos produtos Bt e a melhora das estirpes para aumentar a toxicidade intrínseca da bactéria (OSMAN et al., 2015).

1.2.2. Toxinas

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete e aeróbica ou anaeróbica facultativa, que ocorre naturalmente nos solos, água, restos vegetais, etc. (EL-BENDARY, 2006). É caracterizada pelos cristais proteicos que produz na célula mãe e que são constituídos, principalmente, por delta-endotoxinas (RAYMOND et al., 2010). Estas proteínas tornaram a bactéria famosa no campo da agricultura, microbiologia, entomologia e bioquímica por serem altamente específicas para vários membros de Lepidoptera (lagartas), Diptera (mosca) e Coleoptera (besouro). Algumas cepas de Bt são eficazes contra as ordens

de insetos Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga (SCHNEPF et al., 1998) e também é relatada eficácia contra nematóides, ácaros e protozoários (FEITELSON et al., 1992).

Os cristais de Bt possuem várias formas: bipiramidais, cuboidais, romboides planos ou um composto com dois ou mais tipos de cristais, onde seus principais componentes são as δ -endotoxinas, que atuam como fator primário de virulência para esse patógeno (RAYMOND et al., 2010). No entanto, outros pesquisadores reconhecem a presença de vários compostos extracelulares que podem contribuir para a virulência, incluindo várias proteases (LOVGREN et al., 1990), exotoxinas lábeis ao calor e tolerantes ao calor (BEEGLE e YAMAMOTO, 1992), lectinases (KUMAR e SHARMA, 1994), proteínas inseticidas vegetativas segregadas (VIPs) (ESTRUCH et al., 1996) e quitinases.

De acordo com Rowe e Margaritis (1987) e Who (1999), existem nove toxinas diferentes descritas nas cepas de Bt, as quais são: α -exotoxina (fosfolipase C), β -exotoxina (exotoxina termoestável), γ -exotoxina (tóxica para moscas), δ -endotoxina (cristal parasporal de proteína), exotoxina fator de piolho (ativo apenas contra piolhos), exotoxina fator de camundongo (tóxico para ratos e Lepidoptera), toxina solúvel em água, Vips (proteína inseticida vegetativa) e enterotoxina (produzida por células vegetativas).

As toxinas de cristal (δ -endotoxina) pertencem a dois grupos estruturalmente diferentes: família Cry, com atividade citolítica específica como Cry1Aa1, Cry1Ba1, Cry2Aa1, etc. e atualmente composta por cerca de 300 membros diferentes (CRICKMORE et al., 2014). Família Cyt, que é um citolítico e hemolítico não específico como Cyt1Aa1, Cyt2Aa1, etc., embora apresente uma atividade principalmente específica para dípteros in vivo (SOBERON et al., 2013; WHO, 1999; DELECLUSE et al., 2000). Há também uma terceira família de toxinas proteicas, as Proteínas Inseticidas Vegetativas (Vips), que não são classificadas como toxinas de cristal, pois são secretadas pelas células em crescimento vegetativo e não incluídas no cristal durante a esporulação (de MAAGD et al., 2003).

As endotoxinas são geralmente produzidas como uma protoxina inativa com um peso molecular na faixa de 70 a 130 kDa, cuja ativação é alcançada pelo pH alcalino do intestino médio das larvas e por várias proteases exógenas e endógenas

que desempenham um papel importante na solubilização e na toxicidade (GRINGORTEN et al., 1992). Dessa maneira, são proteoliticamente clivadas em um fragmento de núcleo ativado de 55 a 60 kDa (KUMAR e SHARMA, 1994).

1.2.2.1. Toxinas Cry

As toxinas Cry são oficialmente definidas como proteínas que possuem similaridade de sequência significativa com as toxinas existentes na nomenclatura ou são uma proteína de inclusão parasporal de *B. thuringiensis* que exibe atividade de pesticidas ou algum efeito tóxico verificável experimentalmente em um organismo-alvo (CRICKMORE et al., 1998). A nomeação de toxinas baseia-se apenas na identidade da sequência de aminoácidos e não leva em consideração sua toxicidade; assim, toxinas que são ativas contra a mesma ordem de insetos não compartilham necessariamente nenhuma semelhança em seus nomes (ADANG et al., 2014). Mais de 500 diferentes sequências de genes *cry* foram estudados e categorizados em 75 grupos primários (Cry1-Cry75) (BRAVO et al., 2011; ADANG et al., 2014) e subdivididas em quatro famílias de proteínas filogeneticamente não relacionadas, mostrando diferentes modos de ação: representadas pela família de toxinas Cry (Mtx) mosquitocidas, a família de toxinas Cry (3D) de três domínios, a família Cyt e a família de toxinas binárias (Bin) (BRAVO et al., 2005).

A expressão da proteína Cry pode ser dependente da esporulação ou independente e 80% das proteínas cristalinas são sintetizadas simultaneamente durante o processo de esporulação (LECADET e DEDONDER, 1971). Proteínas Cry simples ou múltiplas formam diferentes cristais parasporais, por exemplo, o cristal parasporal de *Bt* subsp. *kurstaki* HD-73 contém apenas a proteína Cry1Ac, enquanto o cristal parasporal da cepa HD1, que pertence à mesma subespécie, é composto por cinco toxinas Cry diferentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry2Ab). Vale ressaltar que a mera presença de uma proteína no cristal de uma cepa de *B. thuringiensis* não é suficiente para que essa proteína seja classificada como uma toxina Cry, sendo esses mesmos critérios usados ao classificar as toxinas Cyt (ADANG et al., 2014). Outra característica das toxinas Cry é que suas protoxinas precursoras cocristalizam em várias formas e formatos, como evidenciado pela microscopia eletrônica (OSMAN et al., 2015).

A estrutura tridimensional conservada da maioria das toxinas Cry apoia um modo de ação comum, sendo as estruturas primárias e secundárias das proteínas Cry responsáveis pela especificidade da bactéria (de MAAGD et al., 2001). As toxinas inseticidas Cry têm como alvo enterócitos no intestino do inseto hospedeiro para comprometer a barreira epitelial intestinal, que é essencial para facilitar o acesso de *B. thuringiensis* à hemocele. Elas se ligam especificamente às vesículas das membranas das bordas em escovas das células do epitélio intestinal, favorecendo a germinação do esporo de Bt (DU e NICKERSON, 1996). Assim, as células vegetativas da bactéria crescem e se multiplicam na hemolinfa (JOHNSTON e CRICKMORE, 2009), resultando em septicemia e morte do inseto.

Apesar do consenso geral sobre o modo de ação das toxinas Cry do *B. thuringiensis*, há um modelo alternativo sobre isto, segundo Zhang e colaboradores (2006), no qual foi sugerido que a morte celular de insetos é desencadeada pela ligação da toxina monomérica Cry1Ab ao receptor de caderina, com consequentes aumentos nos níveis celulares de AMPc após a ativação da adenilil ciclase. O AMPc ativa a proteína quinase A, resultando em morte celular. Neste modelo, nem os receptores ancorados por GPI nem a formação de oligômeros estão envolvidos na toxicidade relacionada ao Cry.

1.2.2.2. Toxinas Cyt

As toxinas Cyt foram originalmente descobertas na subespécie Bt *israelensis* e parecem ser específicas para algumas subespécies de Bt (GOLDBERG e MARGALIT, 1977; TYRELL et al., 1981). São formadas por apenas um domínio, composto por duas cadeias externas em forma de α -hélice, e uma cadeia interna em forma de β -folha pregueada (BRAVO et al., 2007; CRICKMORE et al., 1998). No interior do inseto, as proteínas Cyt sofrem quebras, onde suas porções C-terminal e N-terminal são clivadas, liberando a toxina ativa e, ao contrário das proteínas Cry, Cyt não se liga a receptores específicos da membrana celular, e sim, diretamente aos lipídios da membrana (LAGADIC e CAQUET, 2014; BRAVO et al., 2007).

Dois mecanismos não exclusivos para a citólise induzida de Cyt1A (toxina estável de 25 kDa) foram propostos: formação de poros e rompimento de membrana tipo detergente (BUTKO, 2003). De acordo com a formação de poros por toxinas Cyt, a ligação aos lipídios da membrana leva a uma alteração conformacional da

toxina, resultando no movimento das hélices anfífilas para expor a face hidrofóbica da folha β para inserção da membrana, que é seguida por oligomerização para formar um poro β -barril propício à morte celular por choque osmótico (DU et al., 1999; LI et al., 1996). Em contraste a isto, o modelo de detergente defende que a morte celular ocorre através da localização da toxina na superfície da membrana para induzir defeitos do tipo detergente na embalagem lipídica, que resultam em vazamento de moléculas intracelulares (BUTKO et al., 1996). É geralmente aceito que ambos os modelos podem ocorrer in vivo, dependendo da concentração de toxinas: com concentrações mais baixas favorecendo os poros oligoméricos e concentrações mais altas levando a quebras na membrana (BUTKO, 2003).

1.2.2.3. Proteínas inseticidas vegetativas (VIP)

Pelo menos três toxinas VIP – proteínas inseticidas formadas durante o estágio vegetativo de *Bacillus thuringiensis* – foram caracterizadas, sendo descritas duas classes: sistema binário composto por duas proteínas, as VIP1 e VIP2 com tamanho de 100 kDa e 52 kDa, respectivamente, e eficientes para certas espécies de coleópteros (WARREN, 1997); e a VIP3 de 88,5 kDa, ativa contra um amplo espectro de insetos lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* e *Heliothis virescens*, alguns dos quais têm baixa suscetibilidade a maioria das δ -endotoxinas (ESTRUCH et al., 1996). Até o momento, existem aproximadamente 82 tipos de genes de proteínas inseticidas vegetativas que foram identificados e clonados (OSMAN et al., 2015).

Apesar de não integrarem o cristal proteico, elas contribuem para a toxicidade global das linhagens que as apresentam e possuem forma de intoxicação similar às das proteínas Cry (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000), na qual as células do epitélio intestinal de insetos suscetíveis são o alvo principal da proteína inseticida Vip3A e que a lise subsequente é o principal mecanismo de letalidade. Assim, a ruptura das células intestinais parece ser o principal mecanismo de letalidade das VIP (YU et al., 1997).

1.2.2.4. Fatores que afetam o crescimento, esporulação e produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis*

Os meios de cultivo para *B. thuringiensis* geralmente possuem uma fonte de nitrogênio, outra de carbono e sais minerais, adicionando ao meio, algumas vezes, tampões e anti-espumantes a fim de facilitar o processo (ANGELO et al., 2010). Segundo Ozkan e colaboradores (2003), Bt usa açúcares, geralmente glicose, frutose, maltose, ribose, melaço, amido, dextrina, farinha de trigo e inulina, produzindo ácido durante a fermentação. Eles também relataram que inulina, dextrina, maltose, lactose, sacarose, soro de leite e glicerol eram estimulantes para a síntese de δ -endotoxina específica para Diptera por Bt *israelensis* (Bti) HD500, enquanto glicose, amido e melaço eram supressores.

No que diz respeito às fontes de nitrogênio adequadas para o cultivo de Bt, a maioria das literaturas afirmou a incapacidade de grande parte das variedades de Bt de utilizar fonte de nitrogênio inorgânico como única fonte de nitrogênio no meio de crescimento. Por esse motivo, pelo menos um aminoácido, particularmente o glutamato, aspartato, valina, leucina, serina ou treonina, deve ser adicionado para permitir o crescimento do organismo em um meio mínimo (NICKERSON e BULLA, 1974; NORMANSELL et al., 1980; EL-BENDARY, 1994; AVIGNONE-ROSSA e MIGNONE, 1995; SADEK, 2000). Também foi verificado que o íon potássio é essencial para a produção de toxinas por Bt (OZKAN et al., 2003) e íons metálicos, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} , são essenciais para produção da maior esporulação e formação de δ -endotoxina por Bt (IÇGEN et al., 2002a).

Devido à síntese de enzimas específicas da esporulação e de proteínas cristalinas, a Bt deve mobilizar, durante a fase de esporulação, a maior parte do nitrogênio assimilado durante o crescimento vegetativo. Mais de 50% dos aminoácidos livres presentes são alanina e glutamato (AVIGNONE-ROSSA e MIGNONE, 1995). No entanto, os aminoácidos cisteína e cistina mostraram um efeito inibitório nítido no crescimento, esporulação e formação de toxinas por Bt (RAJALAKSHMI e SHETHNA, 1980; EL-BENDARY, 1994; SADEK, 2000), enquanto que Içgen et al. (2002b) descobriram que a peptona era a melhor fonte de nitrogênio orgânico que suporta a esporulação e a produção de toxinas pela bactéria.

Outra característica importante da BT é a forte produção de exoprotease observada quando os ácidos começam a ser metabolizados. Essas exoproteases são diferentes daquelas produzidas durante o crescimento vegetativo. Eles não são reprimidos pela amônia nem estimulados pelo glutamato (EGOROV et al., 1984). Além disso, possuem especificidades de substrato diferentes (BIBLOS e ANDREWS, 1988). O aparecimento de exoproteases é um evento precoce reconhecido por estar associado ao início da esporulação.

O crescimento de Bt ocorre na faixa de pH de 5,5 a 8,5 (IÇGEN et al., 2002a), sendo o pH inicial usual de 6,8 a 7,2, no qual diminui para 5,8 quando o acetato é liberado e depois aumenta para 7,5–8,0 à medida que é consumido (EL-BENDARY, 2006). A temperatura normal para o crescimento e produção de toxinas de Bt é de 30°C (EL-BENDARY, 2006). Foda e colaboradores (1985) observaram a falha do organismo em sobreviver ou esporular sob baixos níveis de aeração. A maior parte da fermentação submersa de Bt é feita usando taxas de aeração de aproximadamente um volume de ar/volume de meio/minuto, porém outros estudos sobre o metabolismo da Bt durante o crescimento e esporulação empregaram um nível de aeração mais alto, p. 1,4 volume de ar/volume médio/minuto (ROWE, 1990).

1.3. Meios de cultura

Sabe-se que os requisitos nutricionais de diferentes variedades de Bt são variáveis (DULMAGE et al., 1990). Um bom meio de cultura para uma variedade pode ser inútil para outra, o que implica a impossibilidade de definir um meio de fermentação específico para a Bt (SINGER et al., 1966; DUBOIS, 1968). Os meios para produção industrial são baseados em fontes complexas de carbono e nitrogênio (PRIEST e SHARP, 1989). É evidente que meios complexos fornecem à bactéria todos os nutrientes necessários para o crescimento, esporulação e produção de toxinas, e que a presença de aminoácidos nem sempre é suficiente para obter bons rendimentos. No entanto, os melhores resultados são alcançados quando fontes simples de carbono são empregadas (AVIGNONE-ROSSA e MIGNONE, 1995).

Formulações de meios de cultura para Bt que utilizam substratos alternativos têm se intensificado por apresentarem melhor custo-benefício em comparação aos que utilizam substratos convencionais. Muitos pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios utilizando meios de cultura alternativos: Salama et al. (1983)

investigaram vários subprodutos agroindustriais para a produção de endotoxina por Bt, como levedura de forragem, sangue bovino e resíduos de abate de frango que estavam entre os subprodutos que produziram alta esporulação e preparações potentes de δ -endotoxina; Montiel et al. (2001) utilizaram o lodo como matéria-prima para a produção de bioinseticidas à base de Bt *kurstaki*; Prabakaran et al. (2008) desenvolveram um meio de cultivo à base de água de coco; e Mounsef et al. (2014) que utilizaram um subproduto da moagem de cereais para a produção de Bt *kurstaki* em fermentação submersa.

A diversidade natural e a variabilidade da indústria brasileira tornam o uso de meios alternativos para a fermentação do entomopatógeno em questão uma opção bastante viável e econômica. Dentre esses potenciais substratos para o cultivo de Bt no Brasil, principalmente na região Nordeste, estão a palma forrageira (*Opuntia*), o sorgo (*Sorghum*) e o soro de leite.

O xarope de sorgo, também conhecido como melaço, sorgho ou sorgo, é um xarope pegajoso doce, de cor âmbar escuro com uma consistência espessa. É produzido fervendo o suco doce da cana de sorgo (*Sorghum bicolor*, anteriormente conhecido como *Holcus sorghum*). Possui em sua composição, principalmente, sacarose e pequenas quantidades de glicose e frutose. É também uma boa fonte de magnésio, potássio e manganês (Tabela 1), todos já mencionados como estimuladores da produção de delta-endotoxinas e esporulação de Bt (RATNAVATHI et al., 2016). A utilização do xarope de sorgo como substrato para meio de cultura é relatado por Keshavarzi et al. (2005), que usou algumas matérias-primas agrícolas, dentre elas o sorgo, para cultivo do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Tabela 1. Informações nutricionais da porção de 100 g de xarope de sorgo

Porção	100 g de xarope de sorgo	
% RECOMENDAÇÕES DIÁRIAS		
Energia Total	290 calorias	14%
Energia Total de Carboidratos	290 calorias	
Gordura Total	0 g	0%
Gordura Trans	0 g	0%
Colesterol	0 g	0%
Carboidrato Total	75 g	25%
Fibra Alimentar	0 g	0%
Açúcares	75 g	
Sacarose		
Glicose		
Frutose		

Proteína	0 g	0%
MINERAIS		
Cálcio	150 mg	15%
Ferro	3,8 mg	21%
Magnésio	100 mg	25%
Fósforo	56 mg	6%
Potássio	1000 mg	29%
Sódio	8 mg	0%
Zinco	0,4 mg	3%
Cobre	0,1 mg	6%
Manganês	1,5 mg	77%
Selênio	1,7 mg	2%
VITAMINAS		
Thiamine	0,1 mg	4%
Riboflavina	0,2 mg	10%
Niacina	0,1 mg	1%
Vitamina B6	0,7 mg	34%

Fonte: RATNAVATHI et al., 2016.

A palma é uma importante forrageira principalmente em zonas semiáridas e áridas do mundo. Apesar de ser uma planta exótica, sua resistência à seca e adaptabilidade possibilitou sua ampla difusão no semiárido brasileiro. Atualmente faz parte do cenário nordestino, constituindo a base alimentar de rebanhos da região com grande importância social e econômica. Possui baixo teor de proteína, altos teores de carboidratos totais, matéria mineral e umidade. A composição químico-bromatológica da palma forrageira varia bastante de acordo com a espécie e variedade envolvida, idade, estação do ano e condições agronômicas, como o tipo de solo, clima, condições de crescimento e disponibilidade de nutrientes (FROTA et al., 2015).

Em geral, a palma forrageira, independentemente do gênero, apresenta baixos teores de matéria seca (6,1% a 17,1%), proteína bruta (2,9% a 6,0%), fibra em detergente neutro (20,1% a 32,8%) e fibra em detergente ácido (9,5% a 22,5%). Por outro lado, apresenta teores consideráveis de carboidratos totais (73,8% a 85,2%), carboidratos não fibrosos (42,3% a 65,0%) e matéria mineral (8,1% a 17,7%), sobretudo cálcio, potássio e magnésio (FROTA et al., 2015). Demonstrando-se, assim, como ótima fonte de nutrientes para cultivo de microrganismos, apesar de ainda ser pouco explorada para esse fim.

O soro de leite é um subproduto obtido da indústria de laticínios e é utilizado, principalmente, na alimentação animal, como fertilizantes e suplementos alimentares. Caracteriza-se por reter cerca de 55% dos nutrientes do leite e, usualmente, para cada quilo de queijo produzido são necessários 10 litros de leite, sendo que deste processo produtivo saem 9 litros de soro de leite (FOX et al., 2000; BYLUND, 2003; MOREIRA et al., 2010) que, quando descartado em efluentes de maneira inadequada, é considerado um importante poluente ambiental, acarretando, para cada tonelada descartada, uma poluição diária de material orgânico equivalente a de cerca de 470 pessoas (ANDRADE e MARTINS, 2002).

De acordo com dados do IBGE, a produção anual de leite do Agreste de Pernambuco, em 2014, foi de aproximadamente 505 milhões de litros. E, segundo dados do Sebrae (2016), a região do Agreste representa cerca de 75% de todo o leite bovino produzido no estado, sendo assim a principal bacia leiteira de Pernambuco. Como do processo de fabricação de leite origina-se uma grande quantidade de soro de leite, as indústrias de pequeno porte e os pequenos produtores mostram dificuldades para lidar com o excedente do soro do leite e, em sua grande maioria, optam pelo descarte do produto diretamente na rede pública de esgoto, em rios e lagos (ANDRADE e MARTINS, 2002).

Uma alternativa para o aproveitamento do soro de leite produzido, tendo em vista sua gratuidade, elevado valor nutricional, grande disponibilidade e impacto ambiental de seu descarte inadequado, é sua utilização como substrato para crescimento de microrganismos. Várias pesquisas mencionam sua utilização para o cultivo de *B. thuringiensis*, por exemplo: Salama et al. (1983) utilizaram amostras de soro de leite para o crescimento, esporulação e produção de delta-endotoxina de doze culturas de *B. thuringiensis* investigadas; İçgen et al. (2002) utilizaram o soro de leite como fonte de carbono adicional no cultivo da cepa *B. thuringiensis* 81; e Salazar-Magallon et al. (2015) estudaram o soro de leite com 15 g/L de sacarose como fonte de carbono para a cepa *B. thuringiensis* GP 139.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 249-253, 2002.

ANGUS, T. A. Studies of *Bacillus* spp. pathogenic for silkworm. **Bi-Monthly Progress Report**, v. 9, p. 1-2, 1953.

AVIGNONE-ROSSA, C.; MIGNONE, C. F. *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity; Basic and applied considerations. **Mol. Biotechnol.**, v. 4, p. 55–71, 1995.

BAUM, J. A.; JOHNSON, T. B.; CARLTON, B. C. *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products. **Methods Biotechnol.**, v. 5, p. 189–209, 1999.

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner: research and development. **Canadian Entomologist**, v. 124, p. 587–616, 1992.

BIBILOS, M.; ANDREWS, R. E. Jr. Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translations. **Can. J. Microbiol.**, v. 34, p. 740-747, 1988.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (eds). **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier BV., 2005, p. 175–206.,

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, n. 7, p. 423–31, 2011.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2415–2422, 2003.

BUTKO, P.; HUANG, F.; PUSZTAICAREY, M.; SUREWICZ, W. K. Membrane permeabilization induced by cytolytic delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biochemistry**, v. 35, p. 11355–11360, 1996.

BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Lund: Tetra Pak Processing Systems. 2003. 480 p.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature (2018). Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em: 14 set. 2019.

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

de MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 09–13, 1999.

de MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, v. 37, p. 409–433, 2003.

de MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet.**, v. 17, p. 193–199, 2001.

DELECLUSE, A.; JUAREZ-PEREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NICLSEN-LEROUX, C. (eds). **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 101–125.

DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3722–3726, 1996.

DU, J.; KNOWLES, B. H.; LI, J.; ELLAR, D. J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. **Biochem. J.**, v. 338, p. 185–193, 1999.

DUBOIS, N. R. Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. **Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 1098-1099, 1968.

DULMAGE, H. T.; CORREA, J. A.; GALLEGOS-MORALES, G. Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* through standardization and fermentation development. In: de BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. (eds). **Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus***. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990..p. 110-133.

EGOROV, N. S.; LORIYA, Zh. K.; YUDINA, T. G. Influence of amino acids on the synthesis of exoprotease by *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 19, p. 487-491, 1984.

EL-BENDARY, M. A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. **J. Basic Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 158-170, 2006.

EL-BENDARY, M. A. E. **Studies on the production and stability of *Bacillus thuringiensis* endotoxin**. 1994. Dissertação – Faculty of Science, Ain-Shams University, Egypt, 1994.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal crystal protein with a wide spectrum of activities against Lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5389–5394, 1996.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 271–275, 1992.

FODA, M. S.; SALAMA, H. S.; SELIM, M. Factors affecting growth and physiology of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 50–52, 1985.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

FROTA, M. N. L.; CARNEIRO, M. S. S.; CARVALHO, G. M. C.; NETO, R. B. A. **Palma Forrageira na Alimentação Animal**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2015.

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

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguicalata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegyptii* and *Culex pipiens*. **Mosq. News**, v. 37, p. 355–358, 1977.

GRINGORTEN, J. L.; MILNE, R. E.; FAST, P. G.; SOHI, S. S.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Suppression of *Bacillus thuringiensis* 8-endotoxin activity by low alkaline pH. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 60, p. 47-52, 1992.

HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. **Nature**, v. 172, p. 1004-1004, 1953.

ICGEN, Y.; ICGEN, B.; OZCENGIZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 599–604, 2002a.

ICGEN, Y.; ICGEN, B.; OZCENGIZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 605–609, 2002b.

JOHNSTON, P. R.; CRICKMORE, N. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 5094–5099, 2009.

KUMAR, P. A.; SHARMA, R. P. Genetic engineering of insect resistant crop plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 3–8, 1994.

LAGADIC, L.; CAQUET, T. *Bacillus thuringiensis*. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 1, p. 355-359, 2014.

LECADET, M. M.; DEDONDER, R. Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. **European Journal of Biochemistry**, v. 23, p. 282–294, 1971.

LI, J.; KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **J. Mol. Biol.**, v. 257, p. 129–152, 1996.

LOVGREN, A.; ZHANG, M. Y.; ENGSTEON, A.; DALHAMMAR, G.; LANDEN, R. Molecular characterization of immune inhibitor a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 2137–2146, 1990.

LUTHY, P.; CORDIER, J.; FISCHER, J. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide. In: Kurstak, E. (ed.). **Microbial and Viral Pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 35–74.

MARVIER, M.; MCCREEDY, C.; REGETZ, J.; KAREIVA, P. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. **Science**, v. 316, p. 1475–1477, 2007.

MATTES, O. Parasitare Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. **Sitzber. Ges. Beförder. Ges. Naturw. Marburg**, v. 62, p. 381–417, 1927.

MONTIEL, M. D. L. T.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Wat. Res.**, v. 35, p. 3807–3816, 2001.

MOREIRA, R. W. M.; MADRONA, G. S.; BRANCO, I. G.; BERGAMASCO, R.; PEREIRA, N. C. Avaliação sensorial e reológica de uma bebida achocolatada elaborada a partir de extrato hidrossolúvel de soja e soro de queijo. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n. 4, p. 435–438, 2010.

NICKERSON, K. W.; BULLA, L. A. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 124, 1974.

NORMANSELL, P. J. M.; BURGESS, H. D.; JARRETT, P. Genetics of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (ed.). **Newsletter of the International Cooperative Program on *Bacillus thuringiensis***. 1980.

OZKAN, M.; DILEK, F. B.; YETIS, U.; OZCENGIZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Res. Microbiol.**, v. 154, p. 49–53, 2003.

PRABAKARAN, G.; BALARAMAN, K. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biol. Control**, v. 36, p. 288–292, 2006.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L.; MANONMANI, A. M.; BALARAMAN, K. Coconut water as a cheap source for the production of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 35-38, 2008.

PRIEST, F. G.; SHARP, R. J. Fermentation of bacilli. In: NEWAY, J. O. (ed.). **Fermentation Process Development of Industrial Microorganisms**. New York: Dekker, 1989. p. 73-132.

PRODUTOS agrotóxicos. In: Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/gestao-das-substancias-quimicas/produtos-agrot%C3%B3xicos.html>>. Acesso em: 02 dez. 2019.

RAJALAKSHMI, S.; SHETHNA, Y. I. Effect of L-cytine on macromolecular changes during spore and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **J. Biosci.**, v. 2, p. 311–319, 1980.

RATNAVATHI, C. V.; PATIL, J. V.; CHAVAN, U. D. **Sorghum biochemistry: an industrial perspective**. Chennai: Academic Press, 2016. 253 p.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends Microbiol.**, v. 18, p. 189–194, 2010.

ROWE, G. E. Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. 1990. Tese – The University of Western Ontario, Ontario, 1990.

ROWE, G. E.; MARGARITIS, A.; DULMAGE, H. T. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **Critical Rev. Biotechnol.**, v. 6, p. 87–127, 1987.

SADEK, K. H. H. A. **Studies on some factors affecting growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis***. 2000. Dissertação – Faculty of Science, Cairo University, Egypt, 2000.

SALAMA, H. S.; FODA, M. S.; SELIM, M. H.; EL-SHARABY, A. Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. **Zbl. Mikrobiol.**, v. 138, p. 553–563, 1983.

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

SINGER, S.; GOODMAN, N. S.; ROGOFF, M. H. Defined media for the study of bacilli pathogenic to insects. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 139, p. 16-23, 1966.

SISTEMA de agrotóxicos fitossanitários. In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 02 dez. 2019.

SOBERON, M.; LOPEZ-DIAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, v. 41, p. 87–93, 2013.

TYRELL, D. J.; BULLA Jr., L. A.; ANDREWS Jr., R. E.; KRAMER, K. J.; DAVIDSON, L. I.; NORDIN, P. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. **J. Bacteriol.**, v. 145, p. 1052–1062, 1981.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: Novel proteins for control of corn pests. In: CARROZI, N. B.; KOZIEL M. (eds). **Advances in insect control: The role of transgenic plants**. London: Taylors and Francis Ltd., 1997. p. 109-121.

World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. **Microbial pest control agent: *Bacillus thuringiensis***. Geneva: World Health Organization, 1999. 125 p.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREIN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 2, p. 532-535, 1997.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAUSSIG, R.; BULLA Jr., L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 9897–902, 2006.

CAPÍTULO 2

O TRABALHO CIENTÍFICO A SEGUIR FOI PUBLICADO NA REVISTA “PESQUISA AGROPECUÁRIA PERNAMBUCANA” (PAP)

DOI: <https://doi.org/10.12661/pap.2020.007>



Uso de substratos agroindustriais para produção de delta-endotoxinas por *Bacillus thuringiensis*

Use of agro-industrial substrates for delta-endotoxins production by Bacillus thuringiensis

Lívia Santos de Freitas^{1*}, José Manoel Wanderley Duarte Neto², Túlio Alexandre Freire da Silva¹, Caroline Fernanda Bezerra de Oliveira¹, Débora Pessoa de Oliveira¹, Daniela de Araújo Viana Marques³, Raquel Pedrosa Bezerra¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, CEP 521 71-900, Recife, PE, Brasil

²Instituto Agronômico de Pernambuco, Bongi, Recife, PE, Brasil

³Universidade de Pernambuco, Santo Amaro, Recife, PE, Brasil

* autor correspondente

✉ liviasfreittas36@gmail.com

RESUMO: Este trabalho teve o objetivo de avaliar o crescimento e a produção de delta-endotoxinas, esporos e proteases por *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*, utilizando substratos agroindustriais de palma forrageira (*Opuntia*), xarope de sorgo (*Sorghum*) ou soro de leite, com ou sem suplementação de ureia 1 g/L. Luria-Bertani foi utilizado como meio de cultura controle. Culturas de *B. thuringiensis* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer incubados em agitador rotativo a 200 rpm, 30°C, por 96 horas. Maior crescimento celular (4,28 g.L⁻¹), produção de delta-endotoxinas (568,26 mg.L⁻¹) e esporos (9,61 x 10¹⁰ UFC.mL⁻¹), superiores inclusive ao meio de controle, foram observados ao se utilizar o soro de leite sem ureia. Não se verificou relação direta entre a esporulação e a produção de delta-endotoxinas pelo Btb370 nos meios de cultura, como também entre a produção de proteases e de delta-endotoxinas. A suplementação com ureia 1 g.L⁻¹ foi viável para o substrato palma forrageira na atividade proteásica e para o xarope de sorgo em praticamente todas as análises, contudo não influenciou positivamente o soro de leite. Por meio de microscópio eletrônico de varredura, observou-se a predominância de cristais com morfologias bipiramidal, esférica e cuboidal. Portanto, os resultados sugerem o soro de leite como substrato mais eficiente para novas formulações de meios de cultura para produção de delta-endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*, superando os resultados do meio padrão Luria-Bertani.

PALAVRAS-CHAVE: Meio de cultura alternativo, biocontrolador, palma forrageira, xarope de sorgo, soro de leite.

ABSTRACT: This work aimed to evaluate the growth and production of delta-endotoxins, spores and proteases by *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*, using agro-industrial substrates of forage palm (*Opuntia*), sorghum syrup (*Sorghum*) or whey, with or without supplementation of 1 g/L urea. Luria-Bertani was used as control culture medium. *B. thuringiensis* cultures were grown in Erlenmeyer flasks incubated on a rotary shaker at 200 rpm, 30 °C for 96 hours. The highest cell growth (4.28 g.L⁻¹), production of delta-endotoxins (568.26 mg.L⁻¹) and spores (9.61 x 10¹⁰ CFU.mL⁻¹), even higher than the control medium, were observed using whey without urea. There was no direct relationship between sporulation and delta-endotoxins production for Btb370 in the culture media, as well as between proteases and delta-endotoxins production. Supplementation with urea 1 g.L⁻¹ was viable for palm forage substrate in protease activity and for sorghum syrup in practically all analyzes, however it did not positively influence whey. Through the scanning electron microscope, a predominance of crystals with bipyramidal, spherical and cuboidal morphologies could be observed. Therefore, results suggest whey as the most efficient substrate for new culture media formulations for production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*, surpassing the standard Luria-Bertani medium results.

KEYWORDS: Alternative culture medium, biocontroller, forage palm, sorghum syrup, whey.

Introdução

A bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um agente de controle biológico utilizado mundialmente

para formulações de biopesticidas. É conhecida por sua alta atividade inseticida derivada de proteínas de cristal, geralmente produzidas durante a esporulação e compostas, principalmente, de delta-endotoxinas (RAYMOND et al., 2010). Entre as vantagens de seu uso como biocontrolador, destacam-se: não liberação de resíduos poluentes; segurança para organismos não-alvo; inocuidade para plantas, animais e humanos; alta especificidade para insetos de várias ordens, como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (ADANG et al., 2014; PAN et al., 2017; SCHNEPF et al., 1998).

Além da importância industrial das endotoxinas e dos esporos de Bt na produção de biocontroladores, as proteases obtidas do gênero *Bacillus* representam aproximadamente 60% do total das vendas mundiais de enzimas e têm características notáveis para muitas aplicações industriais, como: na indústria de detergentes para a remoção de manchas de tecidos, devido à sua ampla faixa de atividade e à estabilidade de pH e temperatura; na indústria de alimentos para obter peptídeos bioativos e processar diferentes alimentos; na aplicação durante sínteses orgânicas, por possuírem estabilidade em solventes orgânicos (ANNAMALAI et al., 2013; BOUGATEF et al., 2012; OZCAN; KURDAL, 2012; CAILLE et al., 2002).

Meios de cultura econômicos para a produção de delta-endotoxinas por *B. thuringiensis* têm sido avaliados, uma vez que o uso de substratos comerciais geralmente encarece o preço final dos produtos à base de Bt e, conseqüentemente, reduz sua capacidade competitiva contra inseticidas químicos. A exemplo de potenciais substratos alternativos para cultivo de microrganismos, têm-se a palma forrageira (*Opuntia*), o xarope de sorgo (*Sorghum*) e o soro de leite, que se caracterizam por serem produtos encontrados abundantemente e que podem ser facilmente adquiridos por preço reduzido na região Nordeste do Brasil.

A palma forrageira constituiu a base alimentar de rebanhos da região Nordeste brasileira, possui baixo teor de proteínas e altos níveis de carboidratos totais, matéria mineral e umidade (FROTA et al., 2015). O xarope de sorgo é composto principalmente de sacarose e minerais, como magnésio, potássio e manganês (RATNAVATHI et al., 2016). O soro de leite é caracterizado por reter cerca de 55% dos nutrientes do leite durante a produção de queijo, incluindo lactose, proteínas solúveis e sais minerais (FOX et al., 2017).

Em muitos casos, o substrato para cultivo de Bt carece de fonte natural de nitrogênio suficiente para uma boa produção de endotoxinas e há, então, a necessidade de suplementação destas. Possíveis fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas para esse fim são glutamato, ureia, farinha de soja, farelo de algodão, peptona, sulfato de amônio, nitrato de potássio, entre outras. Entre estas, a ureia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] é caracterizada por possuir elevada concentração de nitrogênio (45%), baixo custo e alta solubilidade (MELGAR et al., 1999).

Devido à presença de nutrientes necessários à fermentação de *B. thuringiensis*, aliados à alta disponibilidade e ao baixo custo, a palma forrageira, o xarope de sorgo e o soro de leite foram selecionados para o estudo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso desses substratos no desenvolvimento de novos meios de cultura para crescimento e produção de

delta-endotoxinas, esporos e proteases por *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*, bem como estudar o padrão de cristais produzidos usando microscopia eletrônica de varredura.

Material e métodos

Microrganismo

Bacillus thuringiensis var. *berliner* 370 (Btb370) (cepa: Bt 370; SisGen nº AAC4727) foi adquirido da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil). A cepa foi cultivada e mantida em meio Luria-Bertani (LB) composto de peptona 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e ágar 15 g.L⁻¹, incubado a 30 °C, por 24 horas, e armazenado a -20 °C.

Meios de cultura

O extrato de palma forrageira (*Opuntia*), o xarope de sorgo (*Sorghum*) e o soro de leite foram utilizados como substratos para os meios de cultura alternativos e receberam a adição de ureia 1 g.L⁻¹. Os meios de cultura foram denominados: PM (extrato de palma forrageira), PUM (extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹), SM (xarope de sorgo), SUM (xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹), WM (soro de leite) e WUM (soro de leite com ureia 1 g.L⁻¹). Todos os meios alternativos receberam a adição de solução mineral composta de 20,3 g.L⁻¹ de MgCl₂, 10,2 g.L⁻¹ de CaCl₂ e 1,0 g.L⁻¹ de MnCl₂ (SHOJAADDINI et al., 2010). O meio LB líquido foi utilizado como meio controle.

Os cladódios maduros da palma forrageira e o xarope de sorgo foram obtidos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (Estação Experimental de Arcoverde, Pernambuco, Brasil). O extrato de palma forrageira foi preparado por trituração dos cladódios de palma em água destilada, previamente sanitizados com hipoclorito de sódio a 2% por 20 segundos. O extrato de palma e o xarope de sorgo foram diluídos 1:5 em água destilada e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. O soro de leite foi obtido de uma indústria de laticínios localizada em Garanhuns (Pernambuco, Brasil). O soro teve o pH ajustado para 7,0 e foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização, quando os coágulos são formados, o soro foi filtrado a vácuo dentro de uma capela de laboratório e o sobrenadante foi utilizado como meio de cultura.

Condições de cultivo

O pré-inóculo foi preparado com Btb370 cultivado em meio LB e incubado em agitador rotativo a 30 °C e 200 rpm, *overnight*. A preparação do inóculo foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio de cultura com absorbância inicial de 0,15 a 600 nm (ELLEUCH et al., 2015) para cada meio (PM, PUM, SM, SUM, WM, WUM e LB) e incubado em agitador rotativo a 30 °C e 200 rpm por 96 horas. Todos os meios de cultura do inóculo foram realizados em duplicatas. Amostras das culturas incubadas foram coletadas diariamente, para observação do crescimento celular, da formação de delta-endotoxinas e esporos e da atividade proteásica de Btb370.

Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por densidade óptica (D.O) a 600 nm e massa celular seca, na qual as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados celulares foram incubados a 30 °C até peso constante. O peso seco da biomassa foi obtido e expresso em gramas por litro (g.L^{-1}) (SHOJAADDINI et al., 2010).

Quantificação de delta-endotoxinas

A concentração de delta-endotoxinas foi determinada com base em uma preparação de cristal solubilizado de cada meio de cultura, de acordo com Prabakaran e Balaraman (2006). Para tanto, foi centrifugado 1 mL de cada meio a 10.000 rpm por 10 min e o precipitado resultante foi lavado duas vezes com NaCl (1 mol.L^{-1}), duas vezes com água destilada e centrifugado após cada lavagem. Em seguida, o precipitado foi, então, ressuspensionado em 1 mL de NaOH (50 mmol.L^{-1}), a fim de solubilizar os cristais de delta-endotoxinas. Por fim, a quantificação proteica foi feita utilizando o Kit BCA (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e os resultados foram expressos em mg.L^{-1} .

Quantificação de esporos

As amostras dos meios de cultura foram tratadas termicamente a 80 °C, por 15 minutos, diluídas em série e semeadas em placas com meio ágar LB. As placas foram incubadas a 37 °C por 20 horas e as colônias Btb370 desenvolvidas foram contadas e expressas em UFC (unidade formadora de colônias) por mL (SHOJAADDINI et al., 2010).

Atividade proteásica

A atividade proteásica foi realizada pelo método descrito por Alencar et al. (2003), no qual as amostras do sobrenadante dos meios de cultura foram incubadas com 1% (p/v) de azocaseína por 60 minutos a 25 °C, a reação foi interrompida com a adição de 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e, após 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por cinco minutos. Os sobrenadantes foram coletados e adicionados a uma solução de NaOH 1M em placa ELISA e a absorbância foi medida em um leitor ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-rad, São Paulo, Brasil) a 450 nm. Os resultados foram expressos em U.mL^{-1} , no qual 1 U representa a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a azocaseína, proporcionando um aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto.

Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras dos meios de cultura foram centrifugadas a 10.000 rpm, por dez minutos, em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e as massas celulares foram lavadas duas vezes com NaCl (1 mol.L^{-1}), duas vezes com água destilada e centrifugadas após cada lavagem (PRABAKARAN; BALARAMAN, 2006). Após a última centrifugação, os precipitados foram fixados e secos em suportes metálicos e cobertos com partículas de ouro por 90 segundos, com uma corrente elétrica de 30 mA, utilizando um metalizador Desk V®

(Denton Vacuum, Nova Jersey, EUA). A microscopia eletrônica das amostras foi realizada sob baixo e alto vácuo de 10 a 20 kV em um microscópio eletrônico de varredura VEGA 3® (Tescan, Fuveau, França), no Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Análise estatística

A determinação da concentração celular, a quantificação de delta-endotoxinas e esporos e a atividade proteásica foram apresentadas em valores médios e desvio padrão de dois experimentos independentes. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Microsoft Excel 2010.

Resultados e discussão

Avaliação da fermentação de Btb370 nos meios de cultura

Por meio de análises da fermentação de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* cepa Bt370 (Btb370) em sete diferentes meios de cultura, pôde-se perceber que o meio à base do substrato de soro de leite sem suplementação de ureia 1 g.L^{-1} (WM) foi o que indicou maiores resultados para o crescimento celular, produção de esporos e de delta-endotoxinas por Btb370 (Tabela 1). İçgen et al. (2002) também relataram que o soro de leite se apresentou como estimulante da formação de proteínas de cristal e da esporulação de *B. thuringiensis*. Além disso, WM foi o único substrato alternativo do presente trabalho que apresentou produção de delta-endotoxinas maior que o meio convencional LB, sendo este amplamente utilizado por outros pesquisadores para produzir toxinas por cepas de *B. thuringiensis* (ELLEUCH et al., 2015; JISHA et al., 2015; ZGHAL et al., 2018).

A adição de ureia 1 g.L^{-1} no meio de cultura à base de soro de leite (WUM) não favoreceu o crescimento, a produção de delta-endotoxinas, esporos nem proteases por Btb370, apresentando, inclusive, resultados inferiores aos do WM (Tabela 1) e indicando que esse substrato não requer suplementação dessa fonte de nitrogênio. Esse fato pode ser justificado pela grande quantidade de proteínas no soro de leite, que provavelmente supre as necessidades de nitrogênio das bactérias em crescimento (LAGRANGE; CLARK, 2019).

Os meios de cultura à base de xarope de sorgo (SM; SUM) demonstraram resultados superiores ou similares ao meio LB em praticamente todas as análises, exceto na produção de delta-endotoxinas por Btb370 (Tabela 1). A adição de ureia 1 g.L^{-1} ao meio de sorgo (SUM) proporcionou aumento na concentração celular e produção de delta-endotoxinas e esporos por Btb370. Esse efeito pode ser devido à alta concentração de carboidratos no xarope de sorgo e à menor concentração de nitrogênio disponível para o desenvolvimento microbiano (RATNAVATHI et al., 2016), que foi mais bem suprida com a presença de ureia no meio.

Os meios de cultura à base de extrato de palma forrageira (PM; PUM) indicaram menor crescimento celular, menos esporulação e não apresentaram produção mensurável de delta-endotoxinas por Btb370 (Tabela 1). Além disso, a adição de ureia 1 g.L^{-1} no meio de cultura (PUM) não influenciou

Tabela 1. Valores médios das análises de 96 horas de fermentação de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* (Btb370) em sete diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Densidade óptica (600 nm)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Esporos (x 10 ¹⁰ UFC.mL ⁻¹)	Delta-endotoxinas (mg.L ⁻¹)	Proteases (U.mL ⁻¹)
LB	3,15 ± 0,12	1,75 ± 0,76	0,77 ± 0,95	450,98 ± 60	573,33 ± 107
PM	1,05 ± 0,63	0,63 ± 0,27	0,22 ± 0,55	0	793,32 ± 339
PUM	1,18 ± 0,37	0,48 ± 0,25	1,57 ± 1,19	0	4682,22 ± 245
SM	2,87 ± 0,09	1,69 ± 0,66	7,95 ± 0,7	97,05 ± 85	6013,33 ± 589
SUM	4,81 ± 0,13	2,34 ± 0,35	9,05 ± 0,63	180,41 ± 86	2915,55 ± 576
WM	5,19 ± 0,46	4,28 ± 0,28	9,61 ± 0,7	568,26 ± 74	5962,22 ± 405
WUM	3,48 ± 0,82	3,64 ± 0,49	4,18 ± 0,53	395,15 ± 81	2643,33 ± 659

LB: Luria-Bertani; PM: extrato de palma forrageira; PUM: extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹; SM: xarope de sorgo; SUM: xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹; WM: soro de leite; WUM: soro de leite com ureia 1 g.L⁻¹.

o desenvolvimento do bacilo, com exceção da produção de proteases. Esse fato pode estar atrelado ao gênero da palma forrageira utilizada no presente trabalho, pois as palmas do gênero *Opuntia* são compostas, principalmente, de carboidratos pentose (xilose e arabinose) (TRACHTENBERG; MAYER, 1981), enquanto *B. thuringiensis*, preferencialmente, consome carboidratos hexose (MOUNSEF et al., 2014). Desse modo, a bactéria pôde ter apresentado dificuldades para desenvolver, esporular e produzir toxinas.

Não se verificou relação direta entre a esporulação e a produção de delta-endotoxinas de Btb370 no presente trabalho. A Figura 1 indica que mesmo com menor esporulação nos meios LB e WUM, houve significativa produção de delta-endotoxinas, enquanto nos meios de cultura PUM, SM e SUM, apesar de terem apresentado considerável esporulação, não indicaram produção elevada de delta-endotoxinas, ou seja, o fato de Btb370 demonstrar elevada esporulação em determinado meio de cultura não significa, necessariamente, que também produzirá elevada quantidade de delta-endotoxinas ou vice-versa.

Corroborando o fato mencionado anteriormente, Abdel-Hameed et al. (1990) e Ennouri et al. (2013) também relatam que o crescimento celular e a esporulação nem sempre estão correlacionados com o rendimento de toxinas por *B. thuringiensis*. Assim, a produção de delta-endotoxinas é um parâmetro mais confiável para avaliar a eficiência do substrato como constituinte de meio de cultura Bt do que outros parâmetros.

Relação entre proteases e delta-endotoxinas

Assim como ocorreu entre a produção de esporos e de delta-endotoxinas, também não se observou um padrão positivo ou negativo entre a produção de proteases e de delta-endotoxinas por Btb370 no presente trabalho. A exemplo disso, a Figura 2 mostra que, para a maioria dos meios de cultura analisados, quando houve mais atividade proteásica, ocorreu diminuição da quantificação de delta-endotoxinas, podendo esse fato ser derivado de uma ação inibitória das proteases sobre as delta-endotoxinas, enquanto os meios à base de soro de leite apresentaram atividade proteásica tão alta quanto a produção de delta-endotoxinas, podendo isto se derivar de uma ação estimulante.

Uma possível justificativa para a diferença da influência das proteases sobre as delta-endotoxinas de Btb370 nos diferentes

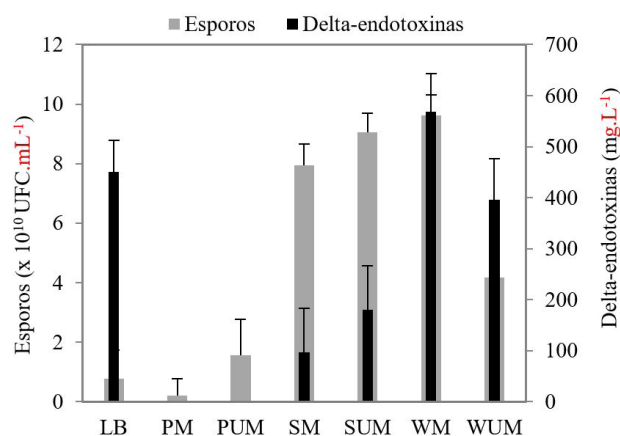


Figura 1. Relação entre a formação de esporos (x 10¹⁰ UFC.mL⁻¹) e de delta-endotoxinas (mg.L⁻¹) por Btb370 em sete diferentes meios de cultura após 96 horas de fermentação. LB: Luria-Bertani; PM: extrato de palma forrageira; PUM: extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹; SM: xarope de sorgo; SUM: xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹; WM: soro de leite; WUM: soro de leite com ureia 1 g.L⁻¹.

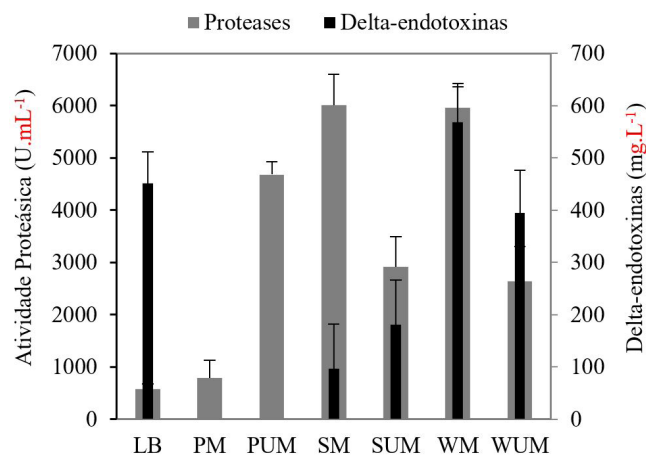


Figura 2. Relação entre a atividade proteásica (U.mL⁻¹) e a produção de delta-endotoxinas (mg.L⁻¹) por Btb370 em sete diferentes meios de cultura após 96 horas de fermentação. LB: Luria-Bertani; PM: extrato de palma forrageira; PUM: extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹; SM: xarope de sorgo; SUM: xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹; WM: soro de leite; WUM: soro de leite com ureia 1 g.L⁻¹.

meios de cultura estudados pode ser o fato de que a produção extracelular de proteases é fortemente influenciada pelos componentes do meio, como a variação na proporção C/N e a presença de açúcares facilmente metabolizáveis, como glicose, e íons metálicos (BRAR et al., 2007).

Além disso, segundo Brar et al. (2007), as proteases de *B. thuringiensis* podem atuar de maneiras diferentes sobre as endotoxinas. Existem as proteases envolvidas na síntese de esporos e delta-endotoxinas de Bt, assim como na disponibilização de componentes proteicos para formação subsequente de esporos e toxinas de cristal, na lise celular e liberação de esporos maduros e proteínas de cristal, o que provocaria, consequentemente, um aumento do número de endotoxinas presentes no meio de cultura, podendo isto ter ocorrido nos meios à base de soro de leite. Por outro lado, existem proteases de Bt que promovem a degradação de protoxinas em pequenos fragmentos polipeptídicos, portanto diminuiriam o número de endotoxinas no meio de fermentação, fato que pode ter ocorrido com os demais meios de cultura estudados.

Caracterização morfológica dos cristais proteicos de Btb370

Foram selecionadas amostras no período de 96 horas de fermentação de Btb370 dos meios de cultura LB, SUM e WM para a análise morfológica dos cristais proteicos por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), já que aqueles foram os meios que apresentaram produção razoável de delta-endotoxinas nesse período. Amostras do meio PUM às 96 horas também foram analisadas para verificar a presença ou não de cristais de Btb370.

De acordo com Schnepf et al. (1998), os cristais de Bt podem apresentar várias formas, como bipiramidal (Cry1), cuboidal (Cry2), retangular plano (Cry3A), irregular (Cry3B), esférico (Cry4A e Cry4B) e romboidal (Cry11A). Apesar de não ter sido identificada produção mensurável de delta-endotoxinas de Btb370 nos meios de cultura à base do extrato de palma forrageira, por meio do MEV se observou a presença de cristais esféricos, bipiramidais e cuboidais no meio PUM (Figura 3A), embora em quantidade inferior quando comparada às que ocorreram nos outros substratos.

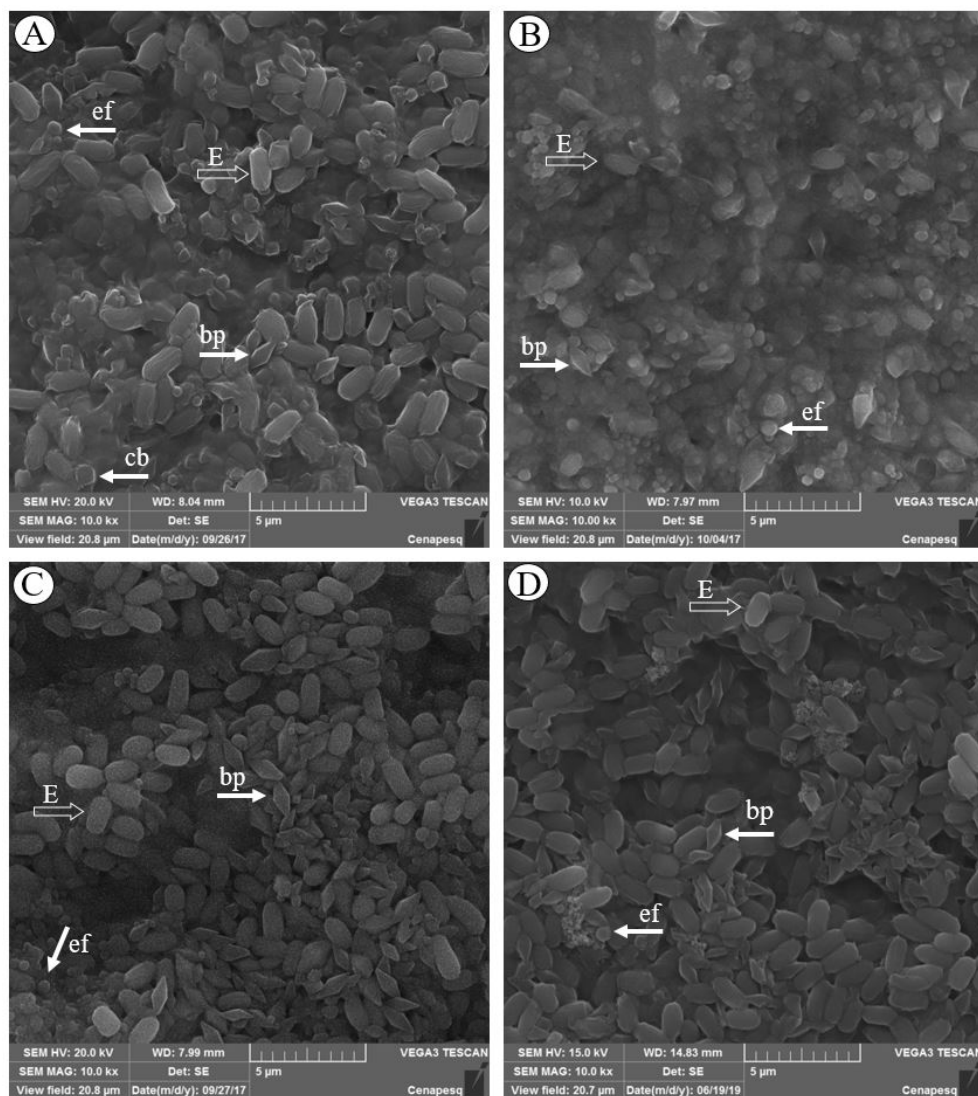


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de Btb370 cultivado em extrato de palma forrageira com ureia 1 g.L⁻¹ (A), Luria-Bertani (B), xarope de sorgo com ureia 1 g.L⁻¹ (C) e soro de leite (D). E: esporos; BP: cristal bipiramidal; EF: cristal esférico; CB: cristal cuboidal.

Corroborando as análises de quantificação de esporos e delta-endotoxinas produzidas por Btb370 mostradas na Figura 1, o meio LB apresentou poucos esporos e quantidade considerável de cristais esféricos e alguns bipiramidais (Figura 3B). Já os meios SUM (Figura 3C) e WM (Figura 3D) apresentaram quantidades significativas de esporos e delta-endotoxinas, com predominância de cristais bipiramidais e alguns esféricos.

A morfologia dos cristais bipiramidais foi a mais predominante na fermentação de Btb370. Da mesma forma, Bohorova et al. (1996) analisaram um total de 426 isolados de *B. thuringiensis*, tendo verificado que a maioria (84%) mostrou a presença de cristais bipiramidais e quando a morfologia dos cristais de isolados mais ativos contra lepidópteros (*Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea grandiosella* e *D. saccharalis*) foi comparada, nenhuma morfologia específica foi associada à atividade e também não houve correlação entre os níveis de toxicidade e o tamanho do cristal.

Conclusões

Entre os substratos alternativos estudados, observou-se que o soro de leite sem suplementação de ureia 1 g.L⁻¹ foi o meio de cultura mais eficiente para o crescimento celular, produção de delta-endotoxinas, esporos e proteases por *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* cepa Bt370 (Btb370), superando os resultados obtidos com o meio convencional Luria-Bertani, possibilitando, desta forma, a redução de custos para novas formulações de biocontroladores à base de Bt e para o acesso a proteases de importância industrial.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) a Bolsa de Produtividade em Pesquisa, 305719/2016-5, e a bolsa de pós-doutorado, PDJ-152774/2018-1. Agradecem à Facepe (Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) a bolsa de iniciação à pesquisa BIC-0912-2.12/17 e a bolsa de mestrado, IBPG-0475-5.05/17. Este estudo foi apoiado pela bolsa Facepe “Projeto Institucional Pesquisador Visitante” (SIN-0156-5.01/17) e Bolsa Universal MCTIC do CNPq (426192/2018-4).

Referências

- Abdel-Hameed, A.; Carlberg, G., E1-TAYEB, O. M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt—III. Selection of media for δ -endotoxin production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 6, p. 313-317, 1990. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01201303>.
- Adang, M. J.; Crickmore, N.; Jurat-Fuentes, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 47, p. 39-87, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6>.
- Alencar, R. B. et al. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, p. 279-284, 2003.
- Annamalai, N. et al. Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *Bacillus halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 36, p. 873-883, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-012-0820-3>.
- Bohorova, N. et al. Selection and characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga**, Paris, v. 41, n. 2, p. 153-165, 1996. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02764243>.
- Bougatef, A. et al. Protein hydrolysates from Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, South Korea, v. 17, p. 841-852, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-012-0053-y>.
- Brar, S. K. et al. *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism. **Process Biochemistry**, London, v. 42, p. 773-790, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.015>.
- Caille, J. et al. Hetero diels-alder-biocatalysis approach for the synthesis of (S)-3-[2-[(Methylsulfonyl)oxy]ethoxy]-4-(triphenylmethoxy)-1-butanol Methanesulfonate, a key intermediate for the synthesis of the PKC inhibitor LY33531. **Organic Process Research & Development**, Washington, v. 6, n. 4, p. 471-476, 2002. <http://dx.doi.org/10.1021/op020202a>.
- Elleuch, J. et al. Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 124, p. 90-97, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.005>.
- Ennouri, K. et al. Correlation between delta-endotoxin and proteolytic activities produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* growing in an economic production medium. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 756-767, 2013. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2013.791364>.
- Fox, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. 2nd ed. New York: Springer, 2017. 816 p.
- Frota, M. N. L. et al. **Palma forrageira na alimentação animal**. 1. ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2015. 47 p.
- Içgen, Y.; Içgen, B.; Ozcengiz, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, p. 605-609, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01366-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01366-9).
- Jisha, V. N. et al. Biphasic fermentation is an efficient strategy for the overproduction of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 175, p. 1519-1535, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1383-3>.
- Lagrange, V.; Clark, D. C. Nutritive and therapeutic aspects of whey proteins. In: DEETH, H. C.; BANSAL, N. **Whey Proteins: From Milk to Medicine**. London: Academic Press, 2019. p. 549-577.
- Melgar, R.; Camozzi, M. E.; Figueroa, M. M. Nitrogenados. In: MELGAR, R.; CAMOZZI, M. E.; FIGUEROA, M. M (Org.) **Guía de fertilizantes, enmiendas y productos nutricionales**. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 1999. p. 13-25.
- Mounsef, J. R. et al. Evaluation of a cereal milling by-product for the low cost production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* in submerged fermentation. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, Delhi, v. 1, n. 6, p. 10-16, 2014.
- Ozcan, T.; Kurdal, E. The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. **International**

- Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 65, p. 585-593, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00868.x>.
- Pan, X. et al. Biosorption and extraction of europium by *Bacillus thuringiensis* strain. **Inorganic Chemistry Communications**, New York, v. 75, p. 21-24, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.inoche.2016.11.012>.
- Prabakaran, G.; Balaraman, K. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biological Control**, Orlando, v. 36, p. 288-292, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.018>.
- Ratnavathi, C. V.; Patil, J. V.; Chavan, U. D. **Sorghum biochemistry: an industrial perspective**. London: Academic Press, 2016. 253 p.
- Raymond, B. et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 18, p. 189-194, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>.
- Schnepf, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 775-806, 1998.
- Shojaaddini, M. et al. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v. 50, n. 1, p. 9-14, 2010. <http://dx.doi.org/10.2478/v10045-010-0002-8>.
- Trachtenberg, S.; Mayer, A. M. Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2665-2668, 1981. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85263-6](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(81)85263-6).
- Zghal, R. Z. et al. Optimization of bio-insecticide production by Tunisian *Bacillus thuringiensis israelensis* and its application in the field. **Biological Control**, Orlando, v. 124, p. 46-52, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.002>.

Recebido: 25 jun. 2020
Aprovado: 09 set. 2020