

Comunicação Científica**Seleção de Matéria Prima para a Elaboração de Meio de Cultura para Produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner**Luis F. A. Alves¹, Sérgio B. Alves¹ e Deise M. F. Capalbo²¹Departamento de Entomologia, ESALQ/USP, Caixa postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP.²EMBRAPA/CNPMA, Caixa postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP.

An. Soc. Entomol. Brasil 26(2): 379-382 (1997)

Selection of Agroindustrial By-Products as Components of Media Used for Production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner

ABSTRACT - The spore production "in vitro" of 43 combinations of agroindustrial by-products (cheese whey, silkworm flour, soybean protein and foder yeast) was evaluated. All media tested showed to be suitable for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner production and the concentration of spores obtained in these media varied from 10^6 to 10^9 spores/ml.

KEY WORDS: Insecta, entomopathogen, bacteria, culture techniques.

Embora os primeiros isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner tenham sido obtidos no início deste século, somente no final da década de 30 e ao longo dos anos 40, é que este patógeno despertou o interesse como agente de controle microbiano (Lambert & Peferoen 1992, Cannon 1993). O uso de um agente entomopatogênico como bioinseticida exige sua produção em grande escala. Assim, Salama *et al.* (1983) e Capalbo *et al.* (1991) consideram o meio de cultura importante no custo de produção e sugerem a introdução de resíduos e subprodutos agroindustriais regionais na sua elaboração. Tem sido comum o uso de meios alternativos e a regionalização da produção, de acordo com os insetos-pragas ou vetores de doenças endêmicas, usando fermentadores pequenos (no máximo 200 litros). Tal estratégia permite controlar melhor a qualidade do produto, evitando-se degradação devido ao transporte (Foda *et al.* 1993, Pantuwatana *et al.* 1993). Neste contexto, o trabalho foi desenvolvido, visando

determinar o potencial de utilização de subprodutos e resíduos agroindustriais disponíveis na região Sudeste do Brasil, na composição de meios de cultura para a produção de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, por meio de fermentação líquida descontinua.

Os estudos foram conduzidos na Seção de Controle Biológico das Pragas (Instituto Biológico de São Paulo) e no Setor de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP), sendo que a bactéria utilizada foi isolada do produto comercial Dipel PM e mantida em tubos com meio de cultura a $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram elaborados 43 meios, sendo 42 considerados alternativos e 1 padrão (Caldo Nutriente + extrato de levedura), divididos em quatro grupos de acordo com a base de composição: levedura de cana, soro de leite bovino, proteína de soja e farinha de pupas de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Em todos os meios acrescentaram-se CaCO_3 e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, além de se corrigir o pH para 7,4. Em seguida, 50 ml de cada um

dos meios foram transferidos para frascos (250 ml) autoclavados a 120°C e 1 atm, e inoculados com 1 ml de cultura de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* pré-fermentada por 24 horas. Para cada meio foram preparados 5 frascos, sendo individualmente considerados como repetições. Após a inoculação, os frascos foram incubados em uma câmara agitadora-incubadora a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e 120 rpm, durante 48 horas. A análise da produção foi realizada tomando-se 2 ml de cada frasco, submetidos ao choque térmico (10 minutos em água a 80°C) e, em seguida, em gelo (5 minutos), para eliminar as células vegetativas e facilitar a observação. Procederam-se diluições em água destilada + espalhante adesivo (Tween 80) a 1% e contagem de esporos em câmara de Petroff-Hausser, sob microscópio óptico de contraste de fase. Os meios mostraram-se adequados ao crescimento e esporulação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, sendo observadas, porém concentrações variando na ordem de 10^6 a 10^9 esporos/ml (Tabela 1). A produção das 42 combinações elaboradas mostrou-se nume-

ricamente superior à concentração de esporos obtida no meio CNY (padrão). Como em todos os experimentos foram utilizados o mesmo isolado e as mesmas condições de incubação, a variação observada na concentração de esporos pode ser efeito da composição nutricional sobre o metabolismo das células bacterianas. Tal como o observado, Dulmage (1970) e Hertlein (1981) obtiveram resultados semelhantes, obtendo tanto formulações de meios que foram apropriadas para o crescimento e também para a esporulação de *B. thuringiensis*, como outras que foram apenas suficientes para um pequeno aumento na concentração do patógeno no meio.

Verificou-se, também, que na maioria dos meios formulados, a produção foi de 10^6 a 10^7 esporos/ml, exceto para a proteína de soja, cujas combinações proporcionaram, em sua totalidade, concentrações da ordem de 10^8 esporos/ml. Ressalta-se que as formulações baseadas em farinha de pupa proporcionaram produção com valores entre 10^7 e 10^8 , acima da maioria dos meios testados.

Tabela 1. Produção média ($\pm$ EP) de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em diferentes meios líquidos¹, em câmara agitadora-incubadora a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e 120 rpm, durante 48 horas.

Meio de Cultura	Esporos/ml
Levedura de cana 0,2%	$1,36 \times 10^6 \pm 0,23 \times 10^6$
Levedura de cana 1%	$8,08 \times 10^6 \pm 0,18 \times 10^6$
Levedura de cana 2%	$9,04 \times 10^6 \pm 0,44 \times 10^6$
Levedura de cana 2% + feijão 10%	$6,28 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^6$
Levedura de cana 2% + soja 10%	$6,76 \times 10^7 \pm 0,74 \times 10^7$
Levedura de cana 2% + soja 10% + melaço 1%	$2,16 \times 10^7 \pm 0,41 \times 10^7$
Levedura de cana 2% + sacarose 1%	$4,88 \times 10^7 \pm 0,68 \times 10^7$
Levedura de cana 2% + sacarose 2%	$3,60 \times 10^7 \pm 0,58 \times 10^7$
Levedura de cana 2% + melaço 1%	$5,48 \times 10^7 \pm 0,56 \times 10^7$
Levedura de cana 2% + melaço 2%	$5,32 \times 10^7 \pm 0,44 \times 10^7$
Levedura de cana 2% + leite de soja 10%	$4,88 \times 10^8 \pm 0,22 \times 10^8$
L. de cana 2% + l. de soja 10% + melaço 0,5%	$7,12 \times 10^8 \pm 0,42 \times 10^8$
L. de cana 2% + l. de soja 10% + melaço 0,5% + resíduo de industrialização de glutamato monossódico 0,5%	$6,40 \times 10^8 \pm 0,25 \times 10^8$
Soro de leite 50%	$4,32 \times 10^7 \pm 0,37 \times 10^7$
Soro de leite 50% + levedura de cana 2%	$2,40 \times 10^7 \pm 0,38 \times 10^7$
S. de leite 50% + leved. de cana 2% + feijão 5%	$6,00 \times 10^7 \pm 0,48 \times 10^7$

S.de leite 50% + leved. de cana 2% + melaço 0,5%	$2,56 \times 10^7 \pm 0,23 \times 10^7$
Soro de leite 50% + melaço 0,5%	$3,92 \times 10^7 \pm 0,26 \times 10^7$
Soro de leite 50% + melaço 1,0%	$3,68 \times 10^7 \pm 0,23 \times 10^7$
Soro de leite 50% + soja 5%	$5,24 \times 10^7 \pm 0,37 \times 10^7$
Soro de leite 50% + soja 5% + melaço 0,5%	$6,48 \times 10^7 \pm 0,30 \times 10^7$
Soro de leite 50% + feijão 5% + melaço 0,5%	$4,72 \times 10^7 \pm 0,31 \times 10^7$
S.de leite 50% + leite de soja 10% + melaço 0,5%	$6,24 \times 10^8 \pm 0,22 \times 10^8$
S.de leite 50% + l. de soja 10% + l. de cana 2%	$6,00 \times 10^8 \pm 0,26 \times 10^8$
S.de leite 50% + l. de soja 10% + Gludex ² 0,5%	$1,20 \times 10^9 \pm 0,33 \times 10^8$
S.de leite 50% + l. de soja 10% + Glicerol 0,5%	$1,07 \times 10^8 \pm 0,41 \times 10^7$
Samprosoy 90 5%	$5,80 \times 10^8 \pm 0,70 \times 10^8$
Samprosoy 90 5% + melaço 0,5%	$8,36 \times 10^8 \pm 0,67 \times 10^8$
Samprosoy 90 5% + glicerol 0,5%	$7,24 \times 10^8 \pm 0,35 \times 10^8$
Samprosoy 90 5% + Gludex ² 0,5%	$5,92 \times 10^8 \pm 0,41 \times 10^8$
Farinha de pupa de <i>Bombyx mori</i> 15% + melaço 0,2%	$2,72 \times 10^9 \pm 0,11 \times 10^9$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + melaço 0,5%	$3,39 \times 10^9 \pm 0,26 \times 10^9$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + glicerol 0,2%	$3,56 \times 10^9 \pm 0,41 \times 10^9$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + glicerol 0,5%	$1,73 \times 10^8 \pm 0,88 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + glicer. 0,5% - pH 6	$2,61 \times 10^7 \pm 0,37 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + glicer. 0,5% - pH 8	$4,65 \times 10^7 \pm 0,50 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + glicer. 0,5% - pH 10	$3,00 \times 10^7 \pm 0,28 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + glicer. 0,5% - pH 12	$4,49 \times 10^9 \pm 0,64 \times 10^9$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 6	$2,39 \times 10^7 \pm 0,38 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 8	$5,92 \times 10^7 \pm 0,68 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 10	$4,96 \times 10^7 \pm 0,34 \times 10^7$
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 12	$1,36 \times 10^9 \pm 0,86 \times 10^9$
Caldo Nutriente + extrato de levedura 0,1% (CNY)	$5,76 \times 10^6 \pm 0,16 \times 10^6$

¹Complementados com CaCO₃ 0,2% e MnSO₄H₂O (0,05%).

²Marca registrada de melaço de cana refinado.

As maiores produções (10⁹ esporos/ml), foram alcançadas nos meios compostos por farinha de pupas e soro de leite. Salama *et al.* (1983) testaram o potencial de diversas matérias primas como meio de cultura e também concluíram pela superioridade do soro de leite, principalmente quando complementado com levedura de cana-de-açúcar.

De forma geral, as formulações foram adequadas para a produção massal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, pois além de terem permitido seu crescimento e esporulação, são subprodutos agroindustriais, de baixo custo e de fácil aquisição no mercado. Entretanto, a contagem de esporos não deve ser usada como parâmetro único da adequabilidade do meio,

pois outros estudos (p.ex., Hertlein *et al.* 1981, Smith 1982, Perez & Gonzalez 1984) indicaram que meios com alta produção de esporos apresentaram baixa toxicidade para insetos. Por outro lado, Scherrer *et al.* (1973) e Avignone-Rossa & Mignone (1993) observaram relação direta entre produção de esporos elevada e toxidez do complexo esporo-cristal obtido. Sendo assim, esta avaliação inicial deve ser complementada com outros experimentos que venham a fornecer informações complementares às aqui obtidas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Antonio Batista Filho e ao Instituto Biológico que,

através da Seção de Controle Biológico das Pragas, e especialmente a dedicação de seus funcionários, prestou indispensável apoio para a condução deste trabalho.

Literatura citada

- Avignone-Rossa, C.A. & C. Mignone. 1993.** δ -endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. Biotech. Lett. 5:295-300.
- Cannon, R.J.C. 1993.** Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis* - based pesticides. Pest. Sci. 37: 331-335.
- Capalbo, D.M.F., I.O. Moraes, M.R. Sobrinho & H.H. Conti. 1991.** Obtenção de bioinsecitida à base de *Bacillus thuringiensis* em novos meios de cultura. Pest. Rev. Téc. Cient. 1: 13-19.
- Dulmage, H.T. 1970.** Production of the spore- δ -endotoxin complex variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 16: 385-389.
- Foda, M.S., H.S. Salama & M. Fadel. 1993.** Local production of *Bacillus thuringiensis* in Egypt. p. 149-165. In H.S. Salama, O.N. Morris & E. Rached (eds.), The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries. Cairo, Nat. Res. Centre, 339p.
- Hertlein, B.B., J. Hornby, R. Levy & T.W. Miller Jr. 1981.** Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potencial. p.53-60. In Proc. General Meeting Soc. Ind. Microbiol., 37, Flagstaff, 357p.
- Lambert, B. & M. Peferoen. 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Bioscience 42: 112-122.
- Pantuwatana, S., W. Panbangred, A. Bhumiratana. 1993.** Novel simple production and formulation techniques for *Bacillus thuringiensis* in Thailand. p.213-219. In H.S. Salama, O.N. Morris & E. Rached (ed.), The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries. Cairo, NCR, 339p.
- Perez, M. & F. Gonzalez. 1984.** Estudio comparativo de los medios liquidos para la reproducción de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Prot. Plant. 7: 75-80.
- Salama, H.S., M.S. Foda, H.T. Dulmage & A. El-Sharaby. 1983.** Novel fermentation media for production of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 41: 8-19.
- Scherrer, P., P. Lüthy & B. Trumpi. 1973.** Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. Appl. Microbiol. 25: 644-646.
- Smith, R.A. 1982.** Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Can. J. Microbiol. 28: 1089-1092.

Recebido em 13/02/96. Aceito em 21/05/97.