

## INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO INORGÂNICO SOBRE O CULTIVO DE *Bacillus thuringiensis* PARA A PRODUÇÃO DE TOXINA A PARTIR DE GLICEROL

Tabuchi, S.C.T., Ribas, O. A. O., Tessaro, D. Z., Rossi, A. A., Santos, R. S., Prata, A.M.R

Escola de Engenharia de Lorena – USP / Departamento de Biotecnologia, Estrada Municipal do Campinho, s/n - Lorena - SP, stephanie\_caroline@bol.com.br

**Resumo-** *Bacillus thuringiensis* é um agente biológico promissor no controle de larvas de insetos veiculadores de doenças, principalmente dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, transmissores da dengue, da elefantíase e da malária, respectivamente. O uso do glicerol, resíduo da produção de biodiesel, como substrato para fermentação pode tornar a produção do bioinseticida economicamente viável devido ao baixo custo desta fonte de carbono. Além disso, pode contribuir para diminuir o impacto negativo deste resíduo no ambiente. A composição do meio de fermentação e, principalmente a fonte de nitrogênio, tem uma grande influência na síntese de toxinas pela bactéria. No presente trabalho foi avaliada a influência de sulfato de amônio, nitrato de amônio e nitrato de potássio sobre o desempenho de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, no que diz respeito a crescimento, consumo de substrato e atividade larvicida. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que tanto o nitrato de amônio quanto o nitrato de potássio são fontes adequadas de nitrogênio inorgânico, pois os meios nos quais foram utilizados apresentaram excelente atividade larvicida sobre larvas de *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** bioinseticida; fonte de nitrogênio; glicerol, *Bacillus thuringiensis*.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos, aeróbia, e se destaca por sua habilidade de formar cristais protéicos durante a sua esporulação (HONGYU et al., 2000). Quando esses cristais são ingeridos pela larva e alcançam o seu intestino, são submetidos ao pH alcalino e a ação de proteases, que solubilizam as endotoxinas presentes nos cristais, causando a morte da larva (LUNA-FINKLER; FINKLER, 2008).

O glicerol, subproduto da reação de transesterificação que forma o biodiesel (CHI et al., 2007), sofre acentuada desvalorização devido à crescente produção deste biocombustível. Por esse motivo, seu uso como substrato para o crescimento de *Bacillus thuringiensis* pode contribuir para tornar a produção do bioinseticida economicamente viável, além de ser uma alternativa promissora para o uso desse subproduto excedente. O levedo de cerveja apresentou excelentes resultados em ensaios anteriores quando utilizado como fonte orgânica de nitrogênio no meio de fermentação, além de ser um componente de baixo custo, contribuindo para a diminuição do custo do meio de fermentação.

O uso de fontes de nutrientes adequadas é importante para a obtenção de altas concentrações de esporos e do cristal protéico responsável pela atividade larvicida dos meios fermentados por *Bacillus thuringiensis*. A concentração de nitrogênio tem uma grande

influência na síntese do cristal protéico por esta bactéria. Içgen et al. (2002) relatam que a fonte de nitrogênio inorgânico utilizada no meio de cultura influencia a formação das toxinas. Segundo Prabakaran e Hoti (2008), elevando-se o teor de nitrogênio de aminoácidos (orgânico) no meio de cultura, aumenta-se a biomassa, número de esporos e toxicidade.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio, nitrato de amônio e nitrato de potássio) sobre o desempenho de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, no que diz respeito a crescimento, consumo de substrato e atividade larvicida.

### Material e Métodos

O glicerol bruto, obtido da fabricação de biodiesel a partir de sebo bovino, foi primeiramente submetido a uma decantação em um funil separador por 24 horas para a separação de parte das impurezas da fase glicerínica. Após essa decantação o resíduo foi acidificado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, abaixando-se o pH até 7,0. Em seguida o material foi colocado em um funil separador, por 24 horas, para decantação. Após esse processo o material foi aquecido a 70 °C por 4 horas, seguido por uma nova decantação em funil separador por 24 horas.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sorotipo H-14 IPS 82, obtida do Instituto Pasteur de Paris, foi utilizada em todos os experimentos. A

cultura foi mantida na forma esporulada sob refrigeração a 4 °C. O meio denominado GLYS foi utilizado para o preparo de inóculo e tinha a seguinte composição (em g/L): glicerol, 10; extrato de levedura, 12; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,12; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,09; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5. Uma alíquota de esporos da cultura estoque foi transferida para um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 50 mL de meio GLYS, e os frascos foram incubados a 30 °C por 20 horas.

O meio de fermentação continha glicerol (proveniente do resíduo tratado) a 20 g/L e os demais componentes do meio GLYS, exceto o extrato de levedura, que foi substituído por uma solução de levedo de cerveja (20 g/L), e a fonte de nitrogênio inorgânico, que variou conforme descrito adiante. A solução de levedo de cerveja utilizada foi preparada conforme descrito a seguir: o levedo de cerveja foi misturado com água deionizada, homogeneizado e esterilizado em autoclave (121 °C por 20 min). Finalmente foi filtrado em papel de filtro qualitativo para remover as partículas sólidas em suspensão.

Os ensaios foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1.000 mL providos de chicanas, contendo 200 mL de meio, cobertos com fina manta de algodão e gaze. Os frascos foram inoculados com o *pellet* resultante da centrifugação de 10 mL de inóculo (5% v/v) a 3800 rpm por 30 minutos (centrífuga clínica marca Spencer), o qual foi ressuspenso com 10 mL do próprio meio de fermentação. Os frascos foram colocados em incubadora/agitadora de movimento circular (New Brunswick Sci.Co., modelo Innova 4000) a 30 °C e 180 rpm.

O sulfato de amônio, o nitrato de amônio e o nitrato de potássio foram avaliados como fontes de nitrogênio inorgânico, em ensaios em duplicata.

O final da fermentação correspondeu ao tempo de 2 horas após a completa dissociação dos grumos de células de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, comportamento característico da bactéria. Este fenômeno foi monitorado por observações de lâminas a fresco de amostras do cultivo em microscópio óptico.

A determinação da concentração celular foi feita de duas formas, segundo Berbert-Molina et al. (2008). Nas primeiras horas de cultivo, durante a fase vegetativa de crescimento, enquanto não se observou a formação de grumos ou inclusões no interior das células, a biomassa foi quantificada indiretamente por turbidimetria. Neste caso, medidas de absorbância a 600 nm de suspensões diluídas do meio fermentado foram convertidas em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por meio de uma equação que descreve o trecho linear de uma curva de calibração. A partir do momento de início da

formação de grumos no meio, a concentração foi determinada por gravimetria. Para isso, amostras do meio de fermentação foram centrifugadas, lavadas e o *pellet* resultante seco em estufa a 100 °C por 24 horas. As variações da morfologia celular ao longo da fermentação foram acompanhadas pela observação de preparações a fresco, em microscópio ótico, com objetiva de contraste de fase, com aumento de 400x.

As concentrações de glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Waters), empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45 °C, fluxo do eluente 0,6 ml/min, volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep pak C18 (MILLIPORE) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida desgaseificado com ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

A atividade larvívora da suspensão obtida ao final do processo foi estimada, em tubos de ensaio, por meio da exposição de larvas de *Aedes aegypti* ao meio fermentado, em proporções variadas. Duas diferentes misturas de meio fermentado em água foram preparadas (volume total de 6 mL). Cada mistura foi testada cinco vezes, ou seja, cinco larvas para cada teste. Os volumes foram: 0,2 mL de meio em 5,8 mL de água e 1,0 mL de meio em 5,0 mL de água. As larvas de *Aedes aegypti* foram acrescentadas às misturas nos tubos e observou-se a taxa de morte em cada uma delas no tempo de 24 horas. A morte da larva é constatada quando ocorre o seu estiramento e completa imobilidade.

## Resultados

O resíduo utilizado foi obtido por decantação do material obtido na etapa final do processo de produção de biodiesel a partir de sebo bovino. Como mostrado na Tabela 1, a concentração de glicerol do resíduo alcançou 1083 g/L após o tratamento por precipitação utilizando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> até pH 7,0 e aquecimento a 70 °C por 4 horas.

Tabela 1 - Concentração do glicerol antes e depois do tratamento.

Amostra	Glicerol (g/L)
Glicerol bruto	953,0
Glicerol tratado	1083,0

A Figura 1 apresenta a variação da concentração de células e de glicerol em função do tempo de fermentação para o ensaio em que se utiliza sulfato de amônio.

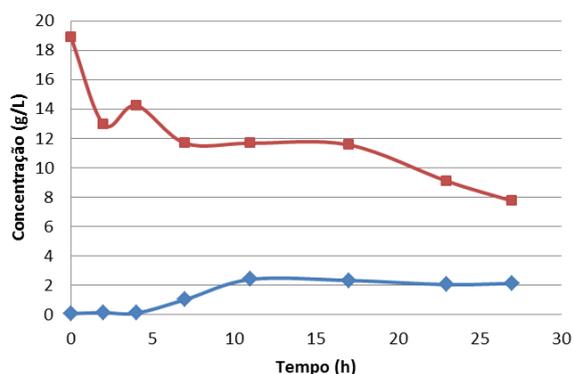


Figura 1 – Concentração celular (—◆—) e de glicerol (—■—) em função do tempo, no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando sulfato de amônio.

Observa-se que nas primeiras 5 horas de fermentação praticamente não houve crescimento celular. A concentração máxima de células ocorreu com aproximadamente 11 horas de fermentação, tempo no qual se observou a presença de grumos grandes em lâminas realizadas a fresco do meio. Os grumos da bactéria dissociaram-se completamente em 24 horas. O final da fermentação foi considerado com 26 horas, 2 horas após a dissociação dos grumos. Foi observada a presença de grande quantidade de esporos no fim da fermentação. A concentração máxima de células obtida foi de 2,4 g/L.

No ensaio no qual foi utilizado nitrato de amônio a concentração máxima de células ocorreu com aproximadamente 10 horas de fermentação, período no qual se observou a presença de grumos grandes no meio. A variação de concentração de células e de glicerol em função do tempo de fermentação para este ensaio está apresentada na Figura 2.

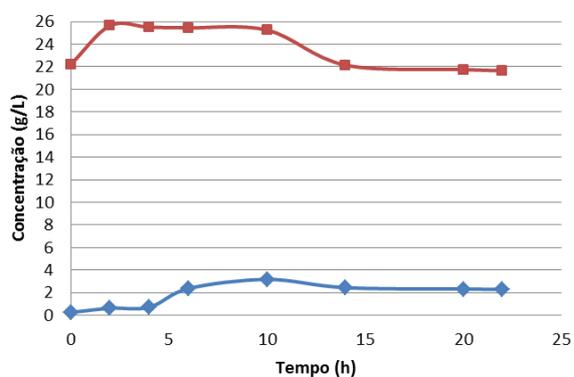


Figura 2 – Concentração celular (—◆—) e de glicerol (—■—) em função do tempo, no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando nitrato de amônio.

Destaca-se que houve aumento na concentração do substrato desde o início da fermentação até 10 horas, e, ainda assim, houve crescimento celular. A concentração máxima de células obtida foi de 3,18 g/L. Os grumos da bactéria dissociaram-se completamente em 20 horas. A queda da concentração de células após o pico deve-se à lise de algumas células após a dissociação dos grumos. Com 22 horas, 2 após a dissociação dos grumos, a fermentação foi encerrada, com presença de grande quantidade de esporos.

No ensaio de fermentação com nitrato de potássio a concentração máxima de células ocorreu com aproximadamente 10 horas de fermentação, como mostrado na Figura 3.

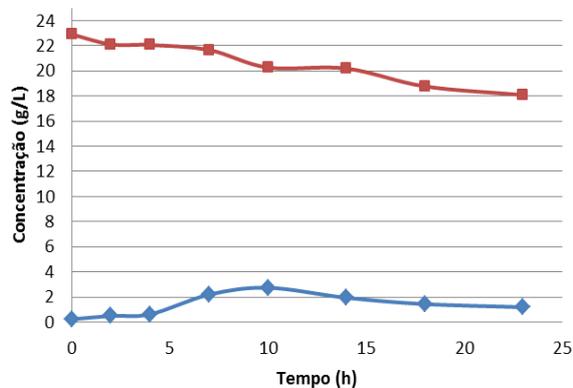


Figura 3 – Concentração celular (—◆—) e de glicerol (—■—) em função do tempo, no cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando nitrato de potássio.

Os grumos da bactéria dissociaram-se completamente em 21 horas e o final da fermentação foi considerado com 23 horas. Foi observada a presença de grande quantidade de esporos no fim da fermentação, assim como nos ensaios anteriores. A concentração máxima de células obtida foi de 2,75 g/L.

Em todos os ensaios foi possível observar as fases de crescimento descritas por Berbert-Molina et al. (2008), assim como o comportamento característico de formação de grumos pela bactéria.

Os bioensaios indicaram que os melhores resultados foram obtidos com nitrato de amônio e nitrato de potássio, conforme apresentado na Tabela 2. Os dois ensaios apresentaram 100% de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* tanto com 1 mL quanto com 0,2 mL de meio fermentado, enquanto que o ensaio com sulfato de amônio apresentou 80%.

Tabela 2– Porcentagens de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* expostas a diferentes volumes de meio fermentado.

Ensaio	Volume de meio (mL)	Mortalidade das larvas (%)
Sulfato de Amônio	1,00	80
	0,20	80
Nitrato de Amônio	1,00	100
	0,20	100
Nitrato de Potássio	1,00	100
	0,20	100

## Discussão

O aumento na concentração de glicerol no resíduo tratado mostrou-se coerente com o resultado obtido por Barbosa (2009) utilizando o mesmo tratamento.

A concentração máxima de células obtida em todos os ensaios foi baixa quando comparada a outros experimentos realizados com *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Barbosa (2009) obteve concentração máxima de células igual a 9,4 g/L para meio GLYS com 20 g/L de glicerol. Porém, essa baixa concentração celular deve-se à falta de nitrogênio orgânico no meio. Observou-se em ensaios anteriores que o levedo de cerveja, na concentração utilizada, não proporcionou um crescimento celular satisfatório quando comparado a outras fontes de nitrogênio orgânico, porém apresentou os melhores resultados quanto à atividade larvicida. Essa baixa concentração celular é indesejável, pois, considerando que a produção de toxina é dependente do crescimento, quanto maior a biomassa celular, maior a formação do produto.

Com relação ao crescimento, destaca-se ainda, que foi observada a ocorrência de todas as fases características da bactéria descritas por Berbert-Molina et al. (2008). Este fato indica que os compostos utilizados como fonte de nitrogênio inorgânico são adequados para o cultivo da bactéria e produção de toxina. Contudo, aquele mais viável para o processo será identificado em função das atividades larvicidas dos respectivos meios.

Observa-se em todos os ensaios que não houve o consumo de todo o glicerol, provavelmente devido à falta de nitrogênio orgânico no meio para que a bactéria utilizasse toda a fonte de carbono disponível para o seu crescimento. Anderson e Jayaraman (2003) avaliaram a influência da relação C:N sobre a

produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* e observaram que a glicose não foi completamente consumida em meios com baixas concentrações de extrato de levedura. Farrera et al. (1998) relatam que o meio com uma relação C:N de 7:1 foi o que teve maior produção de toxinas, enquanto que a maior contagem de esporos foi obtida com uma baixa relação C:N (4:1) e alta concentração total de sólidos no meio. Salienta-se que ainda não foi realizado o estudo para determinar a concentração ideal de nitrogênio orgânico, tendo como fonte o levedo de cerveja.

Observa-se que há um aumento na concentração de glicerol nas 2 primeiras horas de fermentação do ensaio com nitrato de amônio. Segundo Arnaud e Guiraud (1985) algumas bactérias produzem lipases que são capazes de degradar moléculas de lipídeos em glicerol e ácido graxo, o que pode explicar o aumento da concentração de glicerol, uma vez que, apesar do tratamento empregado, podem estar presentes alguns trigliceróis que ainda não foram removidos. O crescimento celular observado nesse período, provavelmente deve-se à presença de alguma outra fonte de carbono na solução de levedo de cerveja. Uma hipótese é a presença de glicose, uma vez que, no extrato de levedura, que apresenta em sua composição fonte de carbono (carboidratos), este comportamento já foi observado, ou seja, crescimento da bactéria em meio sem adição de substrato.

O ensaio no qual foi utilizado sulfato de amônio apresentou a menor porcentagem de mortalidade de larvas, indicando que esta fonte de nitrogênio inorgânico é menos favorável para a produção da toxina pela bactéria, em comparação com as outras fontes. Embora o sulfato de amônio seja a fonte de nitrogênio inorgânico empregada na maioria dos meios de cultivo desta bactéria, (PRABAKARAN, HOTI, 2008; BERBERT-MOLINA et al., 2008; IÇGEN et al., 2002), é a primeira vez que está sendo empregado como componente de um meio contendo glicerol residual como substrato. Normalmente emprega-se glicose como substrato, e há trabalhos em que se avaliaram sacarose, lactose, maltose (ÖZKAN et al., 2003). Portanto, para o meio em estudo, conclui-se que o sulfato de amônio não é a melhor fonte de nitrogênio inorgânico. Por outro lado, tanto o ensaio com nitrato de amônio quanto o com nitrato de potássio apresentaram 100% de mortalidade nos volumes de meios testados. Porém, o nitrato de potássio apresenta-se como uma melhor opção para a formulação de meio para a produção do bioinseticida a partir de glicerol residual, pois é um produto de mais fácil aquisição do que o nitrato de amônio. Contudo, é possível, ainda, verificar se há uma diferença significativa entre estes dois compostos, determinando-se a atividade larvicida

dos respectivos meios, utilizando menores volumes de meio no bioensaio, ou ainda avaliando-se o tempo necessário para a morte das larvas.

### Conclusão

A partir dos resultados obtidos conclui-se que as três fontes de nitrogênio inorgânico avaliadas são adequadas para a produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a partir de glicerol residual da fabricação de biodiesel. Contudo, é evidente a maior eficiência do nitrato de amônio e do nitrato de potássio, pois os ensaios nos quais foram utilizados apresentaram 100% de mortalidade das larvas nos volumes de meio testados. Para a formulação de meio, opta-se pelo nitrato de potássio, uma vez que o nitrato de amônio, por ser um produto controlado, apresenta restrições de comercialização.

### Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

### Referências

- ANDERSON, R.K.I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. **Chemical and Biochemistry Engineering Quarterly**, V.17, n.3, p.225-231, 2003.

- ARNAUD, A.; GUIRAUD, J-P. Bioquímica Microbiana. In: SCRIBAN, R. Coordenador, **Biociencia**. São Paulo: Ed. Manole, 1985.

- BARBOSA, C.R. Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. 2009, 135 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena/USP, Lorena, 2009.

- BERBERT-MOLINA, M.A.; PRATA; A.M.R.; PESSANHA, L.G.; SILVEIRA, M.M. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. **J. of Ind. Microbiol. Biotechnol.** V.35, p.1397-1404, 2008.

- CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahesanoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochem.** V.42, p.1537-1545, 2007.

- FARRERA, R. R.; PÉREZ-GUEVARA, F.; TORRE, M. Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V.49, p.758-765, 1998.

- HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. **Crop Prot.** V.19, p.449-454, 2000.

- IÇGEN, Y.; IÇGEN. B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources, **Res. Microbiol.** V.153, p.605-609, 2002.

- LUNA-FINKLER, C.L.; FINKLER, L. Production of concentrates of bacterial bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by flocculation/ sedimentation, **Acta Trop.** V.107, p.134-138, 2008.

- ÖZKAN, M.; DILEK, F.B.; YETIS, U.; ÖZCENGİZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing anti-dipteran delta-endotoxin production. **Res. Microbiol.**, V. 154, p.49-53, 2003.

- PRABAKARAN, G.; HOTI, S.L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of  $\delta$ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** V.35, p.961-965, 2008.