



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017018249-5 A2



(22) Data do Depósito: 25/08/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 19/03/2019

(54) Título: PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA BACILLUS THURINGIENSIS BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA AEDES AEGYPTI

(51) Int. Cl.: C12P 1/04; C12N 1/20; C12R 1/07; A01N 63/02.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): LIANY FIGUERÊDO DE ANDRADE MELO; CHRISTINE LAMENHA LUNA FINKLER; CARLOS DANIEL PÉREZ; IVONE ANTÔNIA DE SOUZA.

(57) Resumo: PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA *Bacillus thuringiensis* BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti*. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo fermentativo em meio líquido desprovido de carboidratos e realizado em biorreator para a produção de cristais de toxinas pela cepa marinha *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 (isolada a partir do muco produzido por colônias do cnidário *Palythoa caribaeorum*) com a finalidade de controle biológico de larvas do vetor *Aedes aegypti*.

RELATÓRIO DESCRITIVO

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA
Bacillus thuringiensis BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti*.

Campo da Invenção

[001] A presente invenção enquadra-se no campo de produção de biolarvicidas para o controle de vetores culicídeos a partir de fermentação microbiana, mais particularmente, a produção de cristais proteicos de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Aedes aegypti*.

[002] São descritos os métodos de produção de endotoxinas por fermentação em biorreator usando-se a cepa marinha *B. thuringiensis* BCLTHR-01 (isolada a partir do muco produzido por colônias do cnidário *Palythoa caribaeorum*) para a obtenção da biomassa concentrada ativa contra larvas de *A. aegypti*.

Antecedentes da Invenção

[003] A expressão “controle biológico” foi empregada pela primeira vez por Harry S. Smith em 1919 para indicar o uso de inimigos naturais no controle de insetos pragas em lavouras. Posteriormente, o termo passou a ser utilizado para referenciar todos os métodos de controle baseados no uso de organismos vivos (ou de substâncias por eles produzidas) como alternativa ao uso de produtos químicos que, além de promover o surgimento de linhagens resistentes, também são prejudiciais ao meio ambiente devido ao seu amplo espectro de ação (Akta et al., 2009. Interdiscip Toxicol, 2(1):1-12. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7).

[004] No campo da saúde pública, uma das pragas que tem ganhado destaque no cenário epidemiológico mundial é o mosquito *A. aegypti* (Diptera: Culicidae), conhecido por ser o vetor de arbovírus que causam Dengue, Chikungunya e Zika (Grard et al., 2014. PLoS Negl Trop Dis, 8(2):e2681, DOI: 10.1371/journal.pntd.0002681). Trata-se de uma espécie holometabólica, cujo ciclo de vida apresenta as fases de ovo, larva (L₁, L₂, L₃ e L₄), pupa e mosquito adulto. *A. aegypti* é uma espécie

predominantemente urbana que deposita seus ovos separadamente na parede interna de objetos localizados próximos à superfície de água limpa (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228p). Ao entrarem em contato com a água acumulada no período de chuvas, os ovos eclodem e liberam as larvas (Beaty e Marquardt, 1996. The biology of disease vectors. Colorado: University Press of Colorado, 632p.). Uma vez que os criadouros (ex.: garrafas vazias, pneus, caixas d'água descobertas, vasos de plantas, bromélias, troncos de árvores) são difíceis de serem completamente eliminados do ambiente por questões naturais ou problemas de saneamento, os mesmos tornaram-se alvos para a aplicação de inseticidas (Ministério da Saúde, 1996. Plano diretor de erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil).

[005] Uma das alternativas mais eficientes para o controle biológico de populações desse vetor é o uso de bioinseticidas à base de diferentes micro-organismos (Charles et al., 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95(Suppl. 1):201-206. DOI: 10.1590/S0074-02762000000700034), principalmente linhagens de *B. thuringiensis* (Bt), uma espécie de bactéria esporulante capaz de produzir proteínas tóxicas na forma de cristais parasporais (Usta, 2013. Cap. 13, p. 287-317, DOI: 10.5772/55786). Essas toxinas são altamente específicas ao inseto alvo, completamente biodegradáveis e não apresentam danos a seres humanos, vertebrados ou plantas. Uma vez ingeridas por larvas de insetos específicos, as toxinas são ativadas no intestino e passam a promover a necrose das células epiteliais, levando à morte (Bravo et al., 2006. Toxicon, 49(4):423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022).

[006] Vários esforços têm sido concentrados para o desenvolvimento de produtos de Bt para o controle de nematoides, lepidópteros, coleópteros e dípteros (Bravo et al., 2006. Toxicon, 49(4):423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022), objetivando-se a obtenção de produtos com custo reduzido e com alto rendimento. Dentre as várias abordagens empregadas, tem sido realizado o isolamento (ex.: “Novel *Bacillus thuringiensis* isolates active against dipteran pests”, documento EP0480762A2) ou melhoramento genético de novas linhagens de Bt (ex.: “Microorganisms as pesticides”,

documento EP0200344A2), o fornecimento de proteínas ou genes para produção de organismos transgênicos (ex.: “*Bacillus thuringiensis* α -endotoxin fragments”, documento US5710020A; “Methods and compositions for expression of bti endotoxin”, documento EP0153166A2; “*Bacillus thuringiensis* crystal polypeptides, polynucleotides, and compositions thereof”, documento US7208474B2), bem como o desenvolvimento formulações para aplicação em campo objetivando-se o controle de diferentes pragas de insetos (ex.: “Carrier and dispersal mechanism for a microorganic larvicide”, documento US4187290A; “Insecticide composition for controlling insects which have an aquatic breeding site”, documento US4707359A; “*Bacillus*-containing pesticide granules”, documento US5283060A).

[007] A produção de endotoxinas é realizada por fermentação submersa utilizando um meio de cultura adequado, cuja composição pode variar de acordo com a linhagem bacteriana empregada.

[008] Na patente "Composição de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* e o respectivo processo de preparação" (documento PI 0003314-6 A), são descritos os processos para produção de formulados à base de fermentação utilizando um meio de cultura contendo amino-fértil, proteína de soja, ureia, manitol, cloreto de sódio e uma mistura de sais composta por MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 e CaCl_2 . Da mesma forma, a patente "Processo de fabricação de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti) e produto dele resultante" (documento PI 0002554-2 A) descreve o preparo de formulados a partir de fermentados de Bti em meio contendo peptona, glicose, KH_2PO_4 e os micronutrientes $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Em ambos os casos, o meio de produção compreende fontes de nitrogênio, uma fonte de carbono (geralmente um açúcar) e micronutrientes. Para a cepa marinha BCLTHR-01, objeto da presente invenção, o desenvolvimento celular e a produção de cristais não ocorrem adequadamente em meios contendo glicose como fonte de carbono.

[009] A patente “Method for production of pesticide” (documento KR20110016693 (A)), por sua vez, relata a produção de um pesticida para o controle de lepidópteros à

base de fermentado *B. thuringiensis* serovar *colmeri* em meio contendo farelo de soja e leite desnatado, sendo mencionado também a produção de toxinas em meio LB acrescido de MnSO_4 .

[010] As diferenças na composição dos meios de produção refletem as diferentes preferências nutricionais demonstradas pelas diversas linhagens. Além disso, o fato que espécies oriundas de ambientes diversificados, como o ambiente marinho, sofrem pressões ambientais diversas pode refletir em seu arsenal genético e proteico, tornando-as candidatas em potencial na busca por novas linhagens com amplo espectro de atividade ou alto rendimento produtivo.

[011] Ao se utilizar linhagens naturais, é importante considerar a adequação dos componentes do meio para garantir não apenas o desenvolvimento do micro-organismo, como também a produção das moléculas de interesse, sendo necessária a seleção de fontes alternativas de nutrientes e o desenvolvimento de novos processos que contornem as limitações impostas pelas condições de fermentação já existentes.

Descrição da Invenção

[012] A presente invenção descreve um processo para obtenção de uma biomassa concentrada formada principalmente por esporos e cristais de toxinas após fermentação líquida submersa em batelada realizada em biorreator para uma cepa marinha de Bt denominada BCLTHR-01, a qual apresenta propriedades biolarvícida contra *A. aegypti*. O emprego de biorreatores permite o controle e monitoramento de parâmetros importantes para o desenvolvimento microbiano e a produção de compostos de interesse, tais como variações de pH, temperatura e oxigênio dissolvido, bem como níveis de aeração e agitação do cultivo. O monitoramento detalhado dessas variáveis permite a reprodução precisa do método, sendo útil nos processos de otimização das condições de cultivo.

Etapas 1 – Obtenção do micro-organismo

[013] A cepa de Bt objeto da presente invenção foi isolada a partir do muco do zoantídeo marinho *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) através de plaqueamento em meio Ágar Marinho Zobell. As culturas puras foram analisadas por

microscopia de contraste de fase e então preservadas por liofilização usando um meio composto por 10% de sacarose e 1% de gelatina. A identificação foi realizada por sequenciamento do gene 16S rDNA, utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') e do gene rpoB por uso dos iniciadores rpoB-F (5'-AARYTIGGMCCTGAAGAAAT-3') and rpoB-R (5'-TGIARTTTRTCATCAACCATGTG-3') (Durak et al 2006, *J Food Sci* 71:M50-M56).

Etapa 2 – Obtenção da biomassa concentrada ativa

[014] A cepa marinha *B. thuringiensis* BCLTHR-01 foi utilizada para a obtenção da biomassa concentrada ativa contra larvas de *A. aegypti*. O meio de cultura utilizado foi composto por (p/v): 1% de peptona de carne como fonte de nitrogênio, 0,1% de extrato de levedura como fonte de carbono e como micronutrientes 0,1% de KH_2PO_4 , 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,001% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,2 utilizando-se NaOH 5 M.

[015] Inicialmente, o inóculo da fermentação (proporção de 10%) foi preparado em dois frascos tipo Erlenmeyer (capacidade para 1 L) com concentração inicial de células na ordem de 10^6 unidades formadoras de colônias por mililitro de meio (UFC/mL), perfazendo um volume total de 150 mL de cultivo por frasco.

[016] Após incubação a 200 rpm por 16h a 30°C, o conteúdo dos frascos (com concentração de células totais em 10^7 UFC/mL) foi utilizado para inocular meio estéril em biorreator operando em batelada com capacidade nominal de 5 L e volume útil de 3 L. A fermentação foi realizada em duplicata por 48h a 30°C com vazão de ar de 0,8 vvm e agitação a 250 rpm. O nível de espuma foi controlado por adição de óleo vegetal como antiespumante

Etapa 3 – Métodos analíticos

[017] Monitoramento de pH e oxigênio → Durante todo o processo, o monitoramento das variáveis pH e oxigênio dissolvido foi realizado automaticamente pelo biorreator.

[018] Cinética de crescimento → A cada 24h, amostras foram coletadas para o acompanhamento do crescimento microbiano através da quantificação de células totais e esporos por plaqueamento de diluições das amostras antes e após choque térmico (80°C por 12min), respectivamente.

[019] Proteínas → As proteínas totais foram inicialmente precipitadas com acetona gelada (na proporção de 1:8) por 1h a -20°C e, em seguida, solubilizadas com NaOH 50 mM por 1h à temperatura ambiente. Após centrifugação (7467 x g, 10°C, 20min), o sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford (*Anal Biochem* 72:248-254, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

[020] Produção de toxinas → A produção de cristais de toxina foi monitorada diariamente através da análise de esfregaços dos caldos fermentados corados com Azul de Coomassie 0,25%. Após 48h de fermentação, os cristais foram extraídos segundo o método proposto por Mounsef e colaboradores (*J Microbiol Methods* 107:147-149, 2014) e quantificados por Bradford.

Etapa 4 – Avaliação da atividade larvicida contra A. aegypti

[021] Ao término da fermentação, a biomassa foi floculada com posterior sedimentação por até 24h a 4°C. Após descarte do sobrenadante, a biomassa concentrada foi submetida a bioensaios frente larvas L₄ de *A. aegypti* para determinação das concentrações letais para 50% (CL₅₀) das larvas segundo o método de Larget-Thiéry (VBC/84.892, WHO, 1984). A cepa IPS-82 do Instituto Pasteur foi utilizada como padrão.

[022] Nas condições propostas na presente invenção, o cultivo de BCLTHR-01 encontra-se totalmente esporulado após 24h de incubação, com lise celular e liberação de cristais parasporais após 48h. A contagem de células totais/esporos da biomassa concentrada ao término da fermentação fica em torno de 10⁹ UFC/mL, a qual apresenta boa atividade larvicida contra *A. aegypti*, com valores de CL₅₀ de 0,849 ppm (intervalo de 0,792 a 0,900).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo fermentativo para produção de toxinas caracterizado por fermentação submersa em biorreator usando a cepa marinha *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 em um meio desprovido de carboidratos como fonte de carbono, que permite a obtenção de uma biomassa concentrada (10^9 UFC/mL) ativa contra larvas de *Aedes aegypti* (CL₅₀ de 0,849 ppm, intervalo de 0,792 a 0,900).

RESUMO

PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA CEPA MARINHA
Bacillus thuringiensis BCLTRH-01 COM POTENCIAL LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti*.

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo fermentativo em meio líquido desprovido de carboidratos e realizado em biorreator para a produção de cristais de toxinas pela cepa marinha *Bacillus thuringiensis* BCLTHR-01 (isolada a partir do muco produzido por colônias do cnidário *Palythoa caribaeorum*) com a finalidade de controle biológico de larvas do vetor *Aedes aegypti*.