

Avaliação de toxicidade de *Bacillus thuringiensis* em diferentes condições de armazenamento

Toxicity evaluation of Bacillus thuringiensis under different storage conditions

Larita Veruska José Bezerra da Silva¹ * , Túlio Alexandre Freire Silva² , José de Paula Oliveira¹ , Ana Lúcia Figueiredo Porto² , Liane Maria de Almeida Castro Maranhão¹, Beatriz Rayana Damásio de Andrade¹ , Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva¹ 

¹Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

* autor correspondente

✉ laritaveruska@gmail.com

RESUMO: O controle biológico feito através de bioinseticidas com base em *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um dos métodos de manejo sustentável de pragas agrícolas. Entretanto, a efetividade contínua das cepas armazenadas por meio de diferentes métodos de conservação é uma questão pouco estudada nos meios acadêmico e industrial. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar o método mais adequado para a manutenção das subespécies *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*), visando verificar seus respectivos graus de toxicidade após o período de armazenamento. As cepas de *Bt* foram pré-inoculadas, incubadas e, posteriormente, inoculadas e armazenadas nos seguintes métodos de conservação: discos de papel, submersão em óleo mineral e *pellet* congelado, nos períodos de dois, quatro e seis meses. Após esses períodos, as biomassas, os esporos e as delta-endotoxinas de *Bt* foram recuperados, e observou-se que o armazenamento em *pellet* congelado permitiu uma maior estabilidade do microrganismo, com uma diferença de produção de apenas 12% entre a amostra inicial e a final do período de armazenamento. Este método manteve, principalmente, a estabilidade genética da cepa, ocorrendo um decaimento na produção de delta-endotoxinas após o período de seis meses, de 1.089,44 mg/L para *Btk* e 1.251,67 mg/L para *Btb*. Quanto à toxicidade contra *Spodoptera frugiperda*, após seis meses de armazenamento utilizando o método de *pellet* congelado, não foi notada nenhuma alteração na atividade entomotóxica das delta-endotoxinas produzidas por *Bt*, apresentando taxas de mortalidade de 90,45% e 91,03% para *Btk* e *Btb*, respectivamente. Os demais métodos mantiveram a viabilidade celular, porém a produção de delta-endotoxinas e a sua toxicidade foram significativamente menores quando comparadas às verificadas com o método *pellet* congelado, indicando que a técnica de armazenamento em *pellet* congelado é um método de conservação viável e específico para *Bt*.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*, armazenamento, microrganismos, delta-endotoxinas, manutenção.

ABSTRACT: One of the methods of sustainable management of agricultural pests is the biological control using bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). However, the concern with the continued effectiveness of strains stored through different conservation methods is an issue that has been little studied in academia and industry. Therefore, this work aimed to identify the most suitable method for the maintenance of subspecies *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) and *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*), aiming at its degree of toxicity after the storage period. The *Bt* strains were pre-inoculated, incubated, and subsequently inoculated and stored in the following conservation methods: paper discs, submersion in mineral oil, and frozen pellet for periods of two, four, and six months. After these periods the biomass, spores, and delta-endotoxins of *Bt* were recovered and we observed that the storage in frozen pellet allowed greater stability of the microorganism, with a production difference of only 12% from the initial sample to the end of the storage period. This method mainly maintained the genetic stability of the strain, with a decrease in the production of delta-endotoxins after six months, of 1089.44 mg/L for *Btk* and 1251.67 mg/L for *Btb*. As for the toxicity against *Spodoptera frugiperda*, after 06 months of storage using the frozen pellet method, no change in the entomotoxic activity of delta-endotoxins produced by *Bt* was noted, with mortality rates of 90.45% and 91.03% for *Btk* and *Btb*, respectively. The other methods-maintained cell viability; however, the production of delta-endotoxins and their toxicity were significantly lower when compared to the frozen pellet method, proving that the frozen pellet storage technique is a viable and specific conservation method for *Bt*.

KEYWORDS: *Bacillus thuringiensis*, storage, microorganisms, delta-endotoxins, maintenance.

Introdução

A produção de alimentos no mundo vem sendo ameaçada por pragas agrícolas. A presença de insetos nas lavouras causa prejuízos anuais de US\$470 bilhões por ano (CULLINEY, 2014). Espécies invasoras diminuem a produção de alimentos além da suspensão dos serviços para o ecossistema, danos às condições indispensáveis de uma economia avançada ou extensão de doenças em seres humanos (BRADSHAW et al., 2016; PAINI et al., 2016).

O controle das pragas agrícolas é realizado principalmente utilizando pesticidas químicos, mas seu uso exagerado causa problemas à saúde humana e ao meio ambiente, como a contaminação de solos, rios, lagos e lençõs freáticos. Além disso, o uso de agrotóxicos degrada o solo e dificulta a fixação de nitrogênio pelos microrganismos que habitam os solos das lavouras, tornando-os improdutivos (GALZER; AZEVEDO FILHO, 2016).

Nos últimos 60 anos, seu emprego vem se difundindo bastante e não simplesmente na lavoura, sendo também usados em domicílio e campanhas de saúde pública para o combate de doenças, como malária e dengue (SOARES et al., 2019). O Brasil é, desde 2008, o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, amplificando o uso de 2,7 quilos por hectare, no ano de 2002, para 6,9 quilos por hectare, em 2012, configurando assim uma ascensão de 155% em um espaço de 10 anos (MOISÉS et al., 2011; RUTHS; SIMCH, 2021).

A obra *Primavera Silenciosa*, lançada no ano de 1962 pela bióloga norte-americana Rachel Carson, atuou como um símbolo internacional para a compreensão ambiental e ecológica, tornando-se um aviso aos pertinentes efeitos negativos dos agrotóxicos relacionados à saúde pública e ao meio ambiente (CARVALHO et al., 2017). Portanto, para mitigar os impactos negativos causados por defensivos químicos, surge o controle biológico realizado por microrganismos, que tem se mostrado promissor no combate à proliferação de pragas e vetores, em que os entomopatógenos constituem os componentes ativos dos inseticidas biológicos. Esta alternativa resulta em menor risco para a saúde humana e ambiental por conta da sua especificidade para os insetos-alvos (BUENO et al., 2011; LACEY et al., 2015).

Um dos entomopatógenos utilizados em formulações de bioinseticidas é a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), pois sua atividade tóxica permeia pragas agrícolas e mosquitos vetores de doenças infecciosas (CONSTANSKI et al., 2015). *Bt* produz proteínas formadoras de cristal ou delta-endotoxinas que compreendem as toxinas Cry, com atividade inseticida específica, e Cyt, com atividade citolítica inespecífica, sendo estas estudadas atualmente para aplicação no controle biológico (CRICKMORE et al., 2018).

Perante as expansões biotecnológica e científica que envolveram a fabricação de bioinseticidas e as pesquisas que manipulam o *Bt*, há a necessidade de confirmar a sobrevivência das culturas e preservar suas particularidades morfológicas, fisiológicas e genéticas, por meio de métodos propícios de manutenção (SOLA, 2012). Assim, o gerenciamento da *Bt* em aglomerações laboratoriais vem afirmando a subsistência, a permanência e a autenticidade de estirpes no decorrer de períodos, usando vários métodos de manutenção e, principalmente, disponibilizando-as

para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (RODIONOVA et al., 2016). Contudo, este trabalho teve como objetivo avaliar o método mais adequado para a manutenção de cepas de *Bacillus thuringiensis*, visando seu grau de toxicidade após o período de armazenamento.

Metodologia

Microrganismos

O trabalho foi realizado utilizando as cepas *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) - (UFPEDA-1022b) e *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*) - (UFPEDA-370), pertencentes ao Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Biotecnologia do Instituto Agrônomo de Pernambuco (LABIO/IPA), obtidas no Departamento de Antibióticos da UFPE.

Preparação do pré-inóculo e condições de fermentação

Btk (UFPEDA-1022b) e *Btb* (UFPEDA-370) foram pré-inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio Luria-Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extrato de levedura), no qual permaneceu em mesa agitadora a 200 rpm e 37 °C por 24h. Posteriormente, as células de *Btk* e *Btb* foram recuperadas e inoculadas com densidade óptica inicial de 0,15 (600 nm) em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultura (UG) (7,5g/L de peptona de carne, 6,8 g/l de KH₂PO₄, 10g/L de glicose), no qual permaneceu por 72h nas mesmas condições citadas anteriormente (ZGHAL et al., 2018). Após o crescimento e a esporulação, iniciaram-se os armazenamentos do microrganismo nos métodos dos discos de papel, submersão em óleo mineral e *pellet* congelado.

Avaliação dos métodos de armazenamento

Os métodos de manutenção foram selecionados, buscando assegurar a viabilidade do microrganismo, sendo eles: manutenção em disco de papel filtro; manutenção em óleo mineral, e manutenção em *pellet* congelado. Cada método de manutenção foi avaliado durante dois, quatro e seis meses. Após o tempo de estoque determinado, as *Btb* e *Btk* foram pré-inoculados e fermentados como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia (LABIO) do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

Armazenamento das culturas em discos de papel

A manutenção em discos de papel foi feita de acordo com Finkler et al. (2010). Os discos de papel (gramatura 200 g/m²), com 0,5 cm de diâmetro, foram transferidos para placas de Petri, esterilizados em autoclave a 121°C durante 60 min e posteriormente secos em estufa com ventilação a 110 °C por duas horas. Em seguida, as culturas foram mantidas em forma de esporos na superfície dos discos de papel, impregnados com alíquotas de 20 µL da suspensão bacteriana concentrada (esporos/mL), depois secos em estufa a 35 °C durante 24 horas e mantidos sob refrigeração a -4 °C, durante dois, quatro e seis meses.

Armazenamento das culturas em óleo mineral

Para a manutenção das cepas *Btk* (UFPEDA-1022b) e *Btb* (UFPEDA-370) submersas em óleo mineral, foi seguida a metodologia descrita por Finkler et al. (2010). Os caldos fermentados obtidos da fermentação foram repicados em meio de cultura Ágar Nutritivo (AN) inclinado em tubos de ensaio (1,0 g/L extrato de carne, 5,0 g/L de peptona de carne, 25 g/L de ágar, pH = 7,0) e incubados em estufa (30 °C) durante 72 horas. Após o crescimento, os cultivos foram cobertos com uma camada de aproximadamente 2 cm de óleo mineral esterilizado e mantidos em temperatura ambiente (28 °C), por dois, quatro e seis meses antes da reativação.

Armazenamento das culturas em *pellet* congelado

Para manutenção em *pellet* congelado, 700 µL dos líquidos metabólitos das cepas de *Btk* (UFPEDA-1022b) e *Btb* (UFPEDA-370) obtidos da fermentação foram recuperados e estocados com 300 µL de glicerol (30%) em microtubos de polipropileno de 2 mL, sob refrigeração a -20 °C, durante dois, quatro e seis meses.

Preparo dos inóculos

Foram utilizados um disco de papel (manutenção em disco de papel), uma alçada do microrganismo (óleo mineral) e uma alíquota de 100 µL da suspensão previamente descongelada (*pellet* congelado) para a recuperação das cepas armazenadas em meio LB. No final da fermentação, foram determinadas as produções de endotoxinas, esporos e biomassa.

Métodos analíticos

Dosagem de delta-endotoxinas

Para a determinação da dosagem de delta-endotoxinas, utilizou-se 1 mL do meio de cultura fermentado, que foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 rpm. O precipitado foi lavado duas vezes com solução de NaCl (1 M) e duas vezes com água destilada. Em seguida, foi suspenso em 1 mL de NaOH (50 mM, pH 12,5) para solubilizar os cristais de delta-endotoxinas, permanecendo assim por duas horas a 37 °C e, posteriormente, centrifugado para a separação dos esporos e endotoxinas. Após o processo de extração, foram utilizados 30 µL da amostra para 1,5 mL do reagente, deixando reagir durante 30 minutos, em temperatura ambiente, e realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 595 nm. Os ensaios foram feitos em triplicatas (KRUGER, 1994; SHOJAADDINI et al., 2010).

Dosagem de proteínas totais

Foram determinadas as proteínas totais utilizando albumina de soro bovino como padrão. Para a curva de calibração, foram pipetados volumes duplicados de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL para 1 mg/mL de solução padrão de albumina em Eppendorf (2 mL), sendo respectivamente adicionados 100 µL com água destilada. Para o teste em branco, foram adicionados 100 µL de água destilada mais o reagente (KRUGER, 1994; SHOJAADDINI et al., 2010).

Quantificação de esporos

Foram retiradas alíquotas de 50 µL e diluídas em 5 mL de água destilada esterilizada (100×). Posteriormente, foi realizada a contagem em microscópio óptico usando a câmara de Neubauer.

Produção de biomassa

Ao final da fermentação, foram retiradas amostras de 2 mL em microtubos Eppendorf e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* secos em estufa a 60 °C até atingirem peso constante. Seu peso foi calculado e expresso em grama por litro (g/L), como descrito em Shojaaddini et al. (2010).

Atividade larvicida

A determinação da atividade larvicida foi realizada contra lagartas do segundo instar, utilizando a metodologia da superfície contaminada, segundo a qual 5 mL da dieta artificial foram despejados em placas de Petri de 60 × 15 mm. Após o endurecimento da dieta, 300 µL das soluções de cristais padronizadas em 10⁵ esporos por mililitro foram despejados na superfície e, após a secagem da solução, seis larvas foram colocadas em cada placa, totalizando 60 indivíduos por amostra (SANTOS; ÁVILA, 2009).

Análise estatística

A determinação da quantificação de delta-endotoxinas e esporos, a produção de biomassa e a taxa de mortalidade foram apresentadas em valores médios e desvio padrão dos experimentos conduzidos em triplicata. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Microsoft Excel 2010.

Resultados e Discussão

Produção de delta-endotoxinas

Dentre as técnicas utilizadas, pode-se observar que a técnica de conservação em *pellet* congelado conservou o microrganismo de acordo com o objetivo, apresentando um leve decaimento de 12% quando comparado à amostra inicial e à final de *Btk* (6 meses de estoque); para *Btb*, a produção do estoque final foi semelhante à inicial. Quanto aos métodos de conservação por disco de papel e óleo mineral, após seis meses, decaíram 24 e 65% para *Btk* e 46 e 37% para *Btb*, respectivamente (Tabela 1).

Pode-se perceber que o método de estocagem por *pellet* congelado manteve, principalmente, a estabilidade genética das cepas, com uma produção significativa de delta-endotoxinas após seis meses de estocagem, obtendo uma produção de 1.089,44 mg/L para *Btk* e 1251,67 mg/L para *Btb* (Tabela 1). Segundo Tortora, Funke e Case (2012), a metodologia de *pellet* congelado proporciona boa segurança para a estocagem de vários microrganismos entre três meses e dois anos, por conta da redução significativa do metabolismo celular.

A baixa produção de delta-endotoxinas quando estocada em óleo mineral pode ser atribuída à instabilidade genética do plasmídeo de *Bt*, pois o mesmo foi demonstrado no estudo de Marston et al. (2005), no qual observou-se que 43% dos

plasmídeos de isolados de *Bacillus anthracis* podem ser danificados após estoque em óleo mineral.

Entretanto, não se pode dizer o mesmo do método de estoque em discos de papel, pois é uma das técnicas mais utilizadas por ser relativamente simples e barata, preservando por um longo período de tempo e mantendo seu controle de qualidade (GHERNA; REDDY, 2007), tal como reportado por Rajendram et al. (2006), que demonstram que diversas espécies de *Bacillus* formadores de esporos permanecem viáveis após um longo período de tempo estocadas em discos de papel; no entanto, os métodos de preservação por secagem são baseados em ensaios empíricos, sem alguma teoria genérica para todas as cepas de bactérias, ou seja, a literatura acadêmica traz métodos de estoque em disco de papel para bactérias específicas; portanto, para uma boa viabilidade deste método, variáveis,

como resistência à dissecação, e métodos de reidratação devem ser examinados (MORGAN et al., 2006).

Produção de biomassa

Os armazenamentos em *pellet* congelado, disco de papel filtro e óleo mineral obtiveram decaimentos similares em relação à produção de biomassa e esporos em ambas as cepas (Tabelas 2 e 3). Isto significa que, provavelmente, os aspectos físicos e fisiológicos do microrganismo se mantiveram estáveis durante a fase de manutenção. Contudo, supostamente, houve variação genética, influenciando a produção de proteínas e a efetividade das mesmas (Tabelas 1 e 4). Perante as expansões biotecnológica e científica que envolveram a fabricação de bioinseticidas e das pesquisas que manipulam o *Bt*, há a necessidade de confirmar a sobrevivência das culturas e preservar

Tabela 1. Produção de delta-endotoxinas dos *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*) ao final da fase esporulativa em diferentes métodos de armazenamento nos tempos 0, 2, 4, e 6 meses.

AMOSTRAS	AMOSTRA INICIAL		2 MESES		4 MESES		6 MESES	
	mg/L	(%)	mg/L	↓ (%)	mg/L	↓ (%)	mg/L	↓ (%)
1	1236	100%	1157	-6%	1139	-8%	1089	-12%
2	1112	100%	1025	-8%	935	-16%	852	-24%
3	1214	100%	976	-20%	665	-54%	436	-65%
4	1419	100%	1306	-8%	1293	-9%	1251	-11%
5	1209	100%	1109	-9%	1036	-15%	657	-46%
6	1229	100%	1129	-9%	925	-25%	769	-37%

Legenda: 1 - *Btk pellet* congelado; 2 - *Btk* disco de papel; 3 - *Btk* óleo mineral; 4 - *Btb pellet* congelado; 5 - *Btb* disco de papel; 6 - *Btb* óleo mineral.

Tabela 2. Produção de biomassa dos *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*) medida ao final do processo fermentativo em diferentes métodos de armazenamento nos tempos 0, 2, 4, e 6 meses.

AMOSTRAS	AMOSTRA INICIAL		2 MESES		4 MESES		6 MESES	
	mg/mL	%	mg/mL	↓ (%)	mg/mL	↓ (%)	mg/mL	↓ (%)
1	5,38	100%	5,25	-3%	5,24	-3%	5,21	-4%
2	4,55	100%	4,25	-7%	4,19	-8%	4,15	-9%
3	4,13	100%	3,75	-10%	3,71	-11%	3,66	-12%
4	5	100%	4,75	-5%	4,73	-6%	4,65	-7%
5	3,54	100%	3,25	-9%	3,18	-10%	3,15	-11%
6	3,89	100%	3,5	-10%	3,41	-12%	3,34	-14%

Legenda: 1 - *Btk pellet* congelado; 2 - *Btk* disco de papel; 3 - *Btk* óleo mineral; 4 - *Btb pellet* congelado; 5 - *Btb* disco de papel; 6 - *Btb* óleo mineral.

Tabela 3. Quantificação dos esporos dos *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*) produzidos durante a fase esporulativa em diferentes métodos de armazenamento nos tempos 0, 2, 4, e 6 meses.

AMOSTRAS	AMOSTRA INICIAL		2 MESES		4 MESES		6 MESES	
	E/mL	%	E/mL	↓ (%)	E/mL	↓ (%)	E/mL	↓ (%)
1	$5,67 \times 10^8$	100%	$5,59 \times 10^8$	-2%	$5,43 \times 10^8$	-4%	$5,37 \times 10^8$	-5%
2	$4,26 \times 10^8$	100%	$4,01 \times 10^8$	-6%	$3,92 \times 10^8$	-8%	$3,88 \times 10^8$	-9%
3	$2,23 \times 10^8$	100%	$1,99 \times 10^8$	-10%	$1,89 \times 10^8$	-15%	$1,76 \times 10^8$	-21%
4	$4,22 \times 10^8$	100%	$4,14 \times 10^8$	-1%	$4,05 \times 10^8$	-4%	$3,99 \times 10^8$	-5%
5	$2,23 \times 10^8$	100%	$2,09 \times 10^8$	-7%	$1,99 \times 10^8$	-10%	$1,86 \times 10^8$	-16%
6	$2,57 \times 10^8$	100%	$2,31 \times 10^8$	-10%	$2,17 \times 10^8$	-16%	$2,09 \times 10^8$	-18%

Legenda: 1 - *Btk pellet* congelado; 2 - *Btk* disco de papel; 3 - *Btk* óleo mineral; 4 - *Btb pellet* congelado; 5 - *Btb* disco de papel; 6 - *Btb* óleo mineral.

Tabela 4. Mortalidade (%) de *Spodoptera frugiperda* submetida a toxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *berliner* (*Btb*) em diferentes métodos de armazenamento nos tempos 0, 2, 4, e 6 meses.

AMOSTRAS	AMOSTRA INICIAL		2 MESES		4 MESES		6 MESES	
	10 ⁵ E/ml	%	10 ⁵ E/ml	↓ (%)	10 ⁵ E/ml	↓ (%)	10 ⁵ E/ml	↓ (%)
1	98,57%	100%	93,33%	-5%	91,24%	-7%	90,45%	-8%
2	95,63%	100%	89,45%	-7%	73,67%	-22%	64,33%	-32%
3	87,51%	100%	78,33%	-10%	63,97%	-26%	55,62%	-36%
4	98,99%	100%	94,14%	-4%	92,32%	-6%	91,03%	-8%
5	88,24%	100%	79,17%	-10%	65,98%	-25%	56,42%	-36%
6	83,40%	100%	72,53%	-13%	60,79%	-27%	51,89%	-38%

Legenda: 1 - *Btk pellet* congelado; 2 - *Btk* disco de papel; 3 - *Btk* óleo mineral; 4 - *Btb pellet* congelado; 5 - *Btb* disco de papel; 6 - *Btb* óleo mineral.

suas particularidades morfológicas, fisiológicas e genéticas, por meio de métodos propícios de manutenção (SOLA, 2012).

Já a toxicidade, após o período de manutenção, manteve uma constante de efetividade ao longo dos meses com leves alterações, apresentando uma taxa de mortalidade de 90,45% e 91,03% para *Btk* e *Btb*, respectivamente (Tabela 4), e consistindo em um resultado excelente a partir da metodologia utilizada. O gerenciamento da *Bt* em aglomerações laboratoriais vem afirmando a subsistência, a permanência e a autenticidade de estirpes no decorrer de períodos, usando vários métodos de manutenção e, principalmente, disponibilizando-as para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (POMERANTSEV et al., 2016).

Para culturas bacterianas, técnicas de congelamento tornaram-se o método convencional para manutenção em longo prazo (AGUIAR et al., 2012). O glicerol comprovou sua eficácia como agente protetor, pois impede os danos promovidos pela desidratação celular, correspondente ao processo de congelamento, por meio da estabilização da bicamada lipídica, proporcionando modificações na permeabilidade e na divisão lateral dos componentes da membrana plasmática (CROWE et al., 1987; ROWLEY, 1992), justificando os excelentes resultados na utilização desta técnica.

Os condicionamentos em óleo mineral e em papel filtro viabilizam maior resistência ao microrganismo. Diversas bactérias e fungos são conservados utilizando essas metodologias. No entanto, essas técnicas possibilitam instabilidade genética (CANHOS et al., 2004; COSTA et al., 2009). Dessa forma, independentemente de existir uma diversidade de protocolos de armazenamento e conservação com aplicação própria a inúmeros microrganismos apresentados por muitos autores, permanece a indispensabilidade de se aprimorarem os já existentes e de se criarem metodologias eficientes, proporcionando maior preservação a cada microrganismo especificamente.

Conclusão

Entre os métodos de armazenamento estudados, observou-se que o *pellet* congelado foi o método de conservação mais viável para *Bacillus thuringiensis*, por acondicionar características específicas, fato que não acontece nas demais técnicas.

Referências

- AGUIAR, T. D. F. et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012.
- BRADSHAW, C. J. A. et al. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2016.
- BUENO, R. C. O. F. et al. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 2, p. 170-174, 2011.
- CANHOS, V. P. et al. **Coleções de culturas de microrganismos**. São Paulo: Centro de Referência em Informação Ambiental, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2004.
- CARVALHO, M. M. X. et al. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.
- CONSTANSKI, K. C. et al. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 8, p. 730-733, 2015.
- COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p. 111-122, 2009.
- CRICKMORE, N. et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2018. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 14 mar. 2021.
- CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, London, v. 242, n. 1, p. 1, 1987.
- CULLINEY, T. W. **Integrated pest management: crop losses due to arthropods**. Dordrecht: Springer, 2014. cap. 8, p. 201-205.
- FINKLER, C. L. L. et al. Técnicas biotecnológicas aplicadas à agricultura: produção de biolarvicidas à base de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para o controle de insetos. In: FIGUEIREDO, M. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura**: textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônomico de Pernambuco, 2010. cap. 1, p. 608-624.
- GALZER, E. C. W.; AZEVEDO FILHO, W. S. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, Caxias do Sul, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016.

- GHERNA, R. L.; REDDY, C. A. Culture preservation. In: REDDY, C. A. (Ed.). **Methods for general and molecular microbiology**. Washington: ASM Press, 2007. p. 1019-1033.
- KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. In: WALKER, J. M. (Ed.). **Basic protein and peptide protocols**. Totowa: Humana Press, 1994. v. 32 cap. 3, p. 9-16.
- LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 132, n. 1, p. 1-41, 2015.
- MARSTON, C. K. et al. Effects of long-term storage on plasmid stability in *Bacillus anthracis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 7778-7780, 2005.
- MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying: a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.
- MOISÉS, M. et al. Reflexões e contribuições para o Plano Integrado de Ações de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS) de Populações Expostas a Agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 3453-3460, 2011.
- PAINI, D. R. et al. Ameaça global para a agricultura de espécies invasoras. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 113, n. 27, p. 7575-7579, 2016.
- POMERANTSEV, A. P. et al. The IntXO-PSL recombination system is a key component of the second maintenance system for *Bacillus anthracis* plasmid pXO1. **Journal of bacteriology**, v. 198, n. 14, p. 1939-1951, 2016.
- RAJENDRAM, D. et al. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 582-592, 2006.
- RODIONOVA, O. Y. et al. Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 78, p. 17-22, 2016.
- ROWLEY, S. D. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. **Journal of Hematotherapy**, New York, v. 1, n. 3, p. 233-250, 1992.
- RUTHS, J. C.; SIMCH, F. B. L. Vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos: revisão de escopo. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 2, e11410212330, 2021.
- SANTOS, V.; ÁVILA, C. J. Aspectos biológicos e comportamentais de *Liogenys suturalis* Blanchard (*Coleoptera: Melolonthidae*) no Mato Grosso do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 734-740, 2009.
- SHOJAADDINI, M. et al. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. **Journal of Plant Protection Research**, Poznan, v. 50, n. 1, p. 9-14, 2010.
- SOARES, M. M. A. et al. Percepção de conselheiros de saúde acerca do tema agrotóxicos: o papel da participação social em uma sociedade que adocece. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 28, p. 337-349, 2019.
- SOLA, M. C. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. 2012. 98f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. p. 934-934, 2012.
- ZGHAL, R. Z. et al. Genome sequence analysis of a novel *Bacillus thuringiensis* strain BLB406 active against *Aedes aegypti* larvae, a novel potential bioinsecticide. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 116, p. 1153-1162, 2018.

Recebido: 25 jun. 2021
Aprovado: 27 out. 2021