



Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica da *Chromobacterium subtsugae* *Use of a central rotational composite design for microbiological evaluation of *Chromobacterium subtsugae**

Saihonara Pereira Araújo¹, Sabrina Ávila Rodrigues², Ivo Mottin Demiate²

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, Brasil

² Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Contato: saihonara15@gmail.com

Palavras-Chave

fermentação
DCCR
Chromobacterium subtsugae
bioinseticida

Key-word

fermentation
DCCR
Chromobacterium subtsugae
bioinsecticide

RESUMO

A necessidade de proteger as culturas agrícolas das pragas resistentes e de combater vetores de doenças endêmicas fez com que ocorresse o uso indiscriminado de agrotóxicos no Brasil, gerando preocupação tanto em relação à saúde quanto ao meio ambiente. A partir de então, começaram a surgir inovações no controle biológico de pragas, e uma das inovações passa pela produção de bioinsumos. Bioinsumos são produtos originados de microrganismos e podem ser defensivos biológicos como bioinseticidas, biofungicidas, bioacaricidas e também inoculantes. Neste artigo o foco foi o bioinseticida produzido a partir da fermentação da bactéria *Chromobacterium subtsugae*. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) na tentativa de realizar uma otimização do processo fermentativo da *C. subtsugae*. As variáveis testadas no DCCR foram: a temperatura, NaCl e glicose. Os resultados mostraram que os modelos desenvolvidos para todas as variáveis não foram significativos ($p > 0,001$), no intervalo de confiança de 90%. Embora os parâmetros independentes não tenham afetado de modo significativo a resposta, a temperatura e a concentração de NaCl foram os fatores mais significativos que influenciaram a resposta.

ABSTRACT

The need to protect agricultural crops from resistant pests and to combat vectors of endemic diseases, led to the indiscriminate use of pesticides in Brazil and this indiscriminate use of pesticides generated concern about health and the environment. Innovations in the biological control of pests are emerging, and one of the innovations is the production of bioinputs. Bioinputs are products originated from microorganisms and can be biological pesticides such as bioinsecticides, biofungicides, bioacaricides and also inoculants. In this work the focus was the bioinsecticide produced from the fermentation of the bacterium *Chromobacterium subtsugae*. A central composite rotational design (CCRD) was carried out in an attempt to optimize the fermentation process of *C. subtsugae*. The variables tested in the (CCRD) were: temperature, NaCl and glucose. The results showed that the models developed for all variables were not significant ($p > 0.001$), in the 90% confidence interval. Although the independent parameters did not significantly affect the response, temperature and NaCl concentration were the most significant factors that influenced the response.

Informações do artigo

Recebido: 28 de julho, 2022
Aceito: 11 de março, 2023
Publicado: 30 de abril, 2023

Introdução

Segundo Arthurs et al. (2019) o controle microbiológico de insetos vem ganhando mercado, em todo mundo, nos últimos anos. O controle microbiológico de insetos é uma prática utilizada desde meados do século XX, sendo o interesse pelo uso de produtos biológicos consequência de vários fatores, entre os quais: a crescente resistência dos insetos-praga aos agrotóxicos, os custos da aplicação dos produtos químicos, os impactos negativos que esses produtos têm sobre o meio ambiente e os trabalhadores rurais.

Os pesticidas biológicos, também conhecidos como 'biopesticidas', são baseados em bactérias que ocorrem naturalmente, fungos (incluindo leveduras), alguns protozoários, e vírus (ARTHURS et al., 2019). A maioria dos biopesticidas são considerados pesticidas de risco reduzido, com base em seu perfil toxicológico e têm menos requisitos de registro em comparação com agrotóxicos químicos (CAVALCANTE et al., 2022).

Tradicionalmente, os biopesticidas microbianos são produzidos por um número limitado de pequenas indústrias que comercializam produtos para controlar artrópodes em mercados especializados (FONTES, 2020). No entanto, eles estão cada vez mais sendo adotados por empresas de médio e grande porte e comercializados para uma gama mais ampla de culturas agrícolas.

As bactérias continuam a dominar o mercado de pesticidas microbianos devido à popularidade dos produtos da *Bacillus thuringiensis* (Bt) para o controle de lagartas. As bactérias são normalmente produzidas em grandes biorreatores e contêm uma mistura de esporos, proteínas cristalinas e transportadores inertes (LOBO et al., 2018).

A partir desta popularidade da *B. thuringiensis* (Bt), foram descobertas muitas outras bactérias que controlam pragas. Uma dessas bactérias foi *C. subtsugae*, isolada em 2007 e sua produção comercial iniciou em 2011 (CAVALCANTE et al., 2022).

Chromobacterium subtsugae é uma bactéria Gram-negativa que possui mobilidade flagelar (FONTES et al., 2020) e sua identificação ocorreu em 2007, sendo isolada do solo de Maryland, EUA. Essa espécie apresenta colônias pigmentadas de violeta com crescimento ocorrendo de 24h a 48h, sendo constituída por bastonetes de 0,7 x 2,4 μm . O crescimento ideal se observa em temperaturas de 25°C a 28°C, pH 6,5–8,0 com até 1,5% de NaCl adicionado ao meio (MARTIN et al., 2007).

C. subtsugae é usada na agricultura como controle biológico de pragas por possuir atividade tóxica para algumas ordens de insetos, tais como: Coleoptera (besouros), Diptera (moscas), Hemiptera (cigarrinhas e pulgões) e Lepidoptera (mariposas e borboletas) (FONTES et al., 2020). *C. subtsugae* foi a espécie escolhida para este trabalho pois existem poucas publicações disponíveis sobre seu processo fermentativo e ela vem ganhando popularidade por seu uso como bioinseticida na agricultura.

O objetivo deste trabalho foi testar algumas variáveis, sendo elas a temperatura, NaCl e glicose, no processo fermentativo da *C. subtsugae* por intermédio de um delineamento composto central rotacional, e também realizar a avaliação microbiológica da *C. subtsugae*.

Material e Métodos

Microrganismo

Foi utilizada a bactéria *C. subtsugae* (1092), linhagem adquirida a partir da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI, CPQBA/Unicamp, Paulínia, SP).

Meio de Cultura

Para a diluição e contagem dos microrganismos previamente foi realizado o preparo dos meios de cultivo e soluções, além da esterilização dos materiais utilizados nas análises. Água peptonada 1% (p.v⁻¹) foi utilizada para a diluição das amostras. Após diluição completa a solução foi acondicionada em frasco Erlenmeyer e esterilizada a 121°C por 15 min em autoclave. Na contagem dos microrganismos foi utilizado o meio YPD (*Yeast - extract-peptone-dextrose*), contendo (g.L⁻¹) 10,0 de extrato de levedura 20,0 de dextrose e 10,0 de ágar bacteriológico (KANEKO et al., 2019).

O meio utilizado no processo fermentativo também foi o YPD para meio líquido com a concentração de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose (KANEKO et al., 2019).

Preparo do Inóculo

Com uma pipeta graduada pegou-se 5 mL do inóculo puro e transferiu-se para um Erlenmeyer contendo 150 mL do meio YPD já adicionado e previamente esterilizado; este mesmo processo foi realizado nos quatro erlenmeyers que foram colocados em uma incubadora com agitação orbital (f) nas seguintes temperaturas: 31°C, 25°C, 23°C, 33°C, 28°C por 96 h, com retirada de amostra para contagem de células a cada 24 h

O processo fermentativo teve início com 155 mL em cada frasco, sendo 5 mL do inóculo mais 150 mL do meio YPD (líquido), com a concentração do meio em (g.L⁻¹) 1,5 extrato de levedura, 2,0 de peptona e 2,0 de dextrose (KANEKO et al., 2019).

Determinação do número de bactérias

A estimativa numérica de células bacterianas foi feita por intermédio da contagem em placas de Petri e por meio da densidade óptica no comprimento de onda de 660 nm.

Contagem em Placas

Neste trabalho a técnica de contagem utilizada foi a técnica da microgota. Segundo Guerra (2016), a técnica da microgota consiste em pegar uma alíquota de 0,025mL (25 μL) de cada diluição que deve ser transferida para placa de Petri já contendo meio de cultura sólido. Posteriormente, a placa é deixada em repouso sobre uma superfície plana até absorção da alíquota pelo meio. Após, as placas são incubadas na temperatura ótima de 28°C

(MARTIN et al., 2007) de crescimento microbiano. Esta técnica possibilita a contagem de células viáveis, ou seja, aquelas que estão com seu metabolismo ativo apresentam capacidade reprodutiva.

Para a inoculação das diluições das amostras, transferiu-se uma alíquota de 0,025mL (25µL) de cada diluição para placas de Petri já contendo meio de cultura sólido, formando uma microgota sobre a superfície do meio. Posteriormente, as placas foram deixadas em repouso sobre uma superfície plana perto do bico de Bunsen até absorção da alíquota pelo meio. Em seguida, as placas contendo as microgotas foram incubadas na temperatura ótima de crescimento microbiano (28°C) durante 24 a 48 horas (MARTIN et al., 2007).

Ao final deste período as placas foram retiradas da incubadora e foi realizada a contagem das colônias observadas. Foram contadas as diluições que apresentavam crescimento entre 10 e 70 colônias. Feita a média das duplicatas para a diluição escolhida.

A alíquota inoculada foi de 0,025 mL e ela foi multiplicada pela diluição escolhida, tendo sido de 10^{-6} , ou seja, 0,0000001mL da solução.

Depois desta multiplicação foi realizada uma regra de três para transformar o resultado em UFC/mL, dividindo o valor do resultado da média das colônias pelo resultado da alíquota multiplicada pela diluição. O resultado foi expresso em notação científica.

Densidade Óptica

As amostras do processo fermentativo foram retiradas a cada 24 h para a medição da densidade óptica em espectrofotômetro. Foi analisado 1 mL de cada amostra retirada na diluição de 10^{-5} , com o comprimento de onda ajustado a 660 nm.

Este método não permite distinguir entre células viáveis e células mortas e não permite obter diretamente valores absolutos da concentração de células, sendo especialmente utilizado quando se pretende confirmar se uma dada cultura se encontra em crescimento ou para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da D.O. medida a um comprimento de onda particular (ALBIERO, 2013).

A curva de calibração relaciona densidade óptica (D.O.) à medida de massa. Tal curva pode ser não linear a altos valores de D.O. $> 0,3$ e depende da extensão do estado fisiológico da célula. Neste trabalho foi realizada apenas a medida da densidade óptica sem a relação com a medida da massa.

A relação foi feita em contagem em placas e em densidade óptica para avaliar se estava ocorrendo crescimento bacteriano à medida que as variáveis foram testadas.

Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) analisado no software Minitab, versão disponível para testes, para avaliar a interação entre as variáveis, temperatura (°C), NaCl (Cloreto de sódio) e Glicose no processo fermentativo da *C. subtsugae* em estudo

na tentativa de otimizar os resultados alcançados em termos de produção de células viáveis.

Tabela 1. Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação das variáveis T°C, NaCl e Glicose no processo fermentativo para obtenção de *C. subtsugae*.

Ensaio	T° C		Glicose (g)		NaCl(g)	
	X ₁ (°C)		X ₂ (g.L ⁻¹)		X ₃ (g.L ⁻¹)	
1	31	+1	2,1	+1	2,1	+1
2	31	+1	2,1	+1	0,9	-1
3	31	+1	0,9	-1	2,1	+1
4	31	+1	0,9	-1	0,9	-1
5	25	-1	2,1	+1	2,1	+1
6	25	-1	2,1	+1	0,9	-1
7	25	-1	2,1	+1	2,1	+1
8	25	-1	0,9	-1	0,9	-1
9	23	-1,68	0,9	-1	1,5	0
10	33	+1,68	1,5	0	1,5	0
11	28	0	1,5	0	1,5	0
12	28	0	0,5	-1,68	1,5	0
13	28	0	2,5	+1,68	0,5	-1,68
14	28	0	1,5	0	2,5	+1,68
15	28	0	1,5	0	1,5	0
16	28	0	1,5	0	1,5	0
17	28	0	1,5	0	1,5	0

Fonte: Autores (2022)

O experimento foi composto de 17 ensaios, sendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 1 ponto central por período, sendo este replicado três vezes (Tabela 1). A cepa *C. subtsugae* foi produzida no meio de cultivo YPD, onde foram avaliadas três variáveis de entrada (Temperatura °C, NaCl, Glicose) ao longo de 24, 48, 72 e 96 h. As variáveis respostas foram o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e a Densidade Óptica (D.O.) no tempo 96 horas.

Resultados e Discussões

Para o estudo da otimização do processo fermentativo da *C. subtsugae* foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) analisado no software Minitab (versão livre experimental 30 dias).

Na Tabela 2 apresenta-se a matriz do DCCR com valores reais, codificados e os resultados de concentração de células da densidade ótica e em unidades formadoras de colônias (UFC).

Com os resultados experimentais da fermentação da *C. subtsugae* em função da relação da temperatura (X₁), Glicose (X₂), NaCl (X₃) realizou-se a otimização resultados estatísticos.

O experimento da otimização da fermentação da *C. subtsugae* de 96 h apresentou resultados mais expressivos do que os demais tempos de fermentação do microrganismo, o resultado da concentração de células medida por UFC em 96 h de fermentação apresentou um R² próximo de 0,5.

O melhor resultado foi o do ensaio de 96 h, que teve os valores mais elevados, com as análises feitas no software Minitab.

Embora o modelo não seja considerado preditivo, foi dado sequência à análise para inferir os valores ótimos de cada variável.

Tabela 2. Matriz do DCCR para o resultado de 96 horas da fermentação da *C. subtsugae*

Ensaio	T°C		Glicose (g)		NaCl (g)		UFC	D.O
	X ₁ (°C)		X ₂ (g.L ⁻¹)		X ₃ (g.L ⁻¹)			
1	31	+1	2,1	+1	2,1	+1	4,9	0,120
2	31	+1	2,1	+1	0,9	-1	4,3	0,062
3	31	+1	0,9	-1	2,1	+1	4,6	0,136
4	31	+1	0,9	-1	0,9	-1	5,0	0,092
5	25	-1	2,1	+1	2,1	+1	2,2	0,172
6	25	-1	2,1	+1	0,9	-1	2,2	0,171
7	25	-1	2,1	+1	2,1	+1	2,3	0,179
8	25	-1	0,9	-1	0,9	-1	2,1	0,019
9	23	-1,68	0,9	-1	1,5	0	2,8	0,005
10	33	+1,68	1,5	0	1,5	0	2,7	0,139
11	28	0	1,5	0	1,5	0	2,8	0,118
12	28	0	0,5	-1,68	1,5	0	2,9	0,001
13	28	0	2,5	+1,68	0,5	-1,68	2,9	0,301
14	28	0	1,5	0	2,5	+1,68	2,6	0,369
15	28	0	1,5	0	1,5	0	3,2	0,063
17	28	0	1,5	0	1,5	0	3,0	0,141

X₁=Temperatura (C°); X₂=Glicose (g.L⁻¹); X₃=NaCl (g); UFC=Unidades formadoras de colônias; D.O=Densidade ótica. Fonte: Autores (2022)

Os resultados da avaliação estatística para as variáveis da *C. subtsugae* em 96 h (UFC) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeitos e interações calculadas para as variáveis de *C.subtsugae* em UFC.

Termo	Coef	EP de		Valor-T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	3,023	0,541	5,59	0,001		
T°C	-0,042	0,254	-0,16	0,874	1,00	
Glicose	0,042	0,254	0,16	0,874	1,00	
NaCl	-0,769	0,254	-3,03	0,019	1,00	
T°C*T°C	0,040	0,280	0,14	0,891	1,16	
Glicose*Glicose	0,075	0,280	0,27	0,796	1,16	
NaCl*NaCl	0,040	0,280	0,14	0,891	1,16	
T°C*Glicose	0,100	0,332	0,30	0,772	1,00	
T°C*NaCl	0,000	0,332	0,00	1,000	1,00	
Glicose*NaCl	-0,050	0,332	-0,15	0,884	1,00	

Fonte: Autores (2022)

Os valores demonstrados são significativos a um intervalo de confiança de 90%. A partir das variáveis significativas, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) que é apresentada na Tabela 4.

Segundo Box et al. (1978) para que uma regressão seja não apenas significativa, mas também útil para fins preditivos, a relação de Fcalculado/Ftabelado deve ser superior a três.

No caso deste estudo, a relação para a regressão apresentou um valor de 3,023%. A relação entre o Fcalculado/Ftabelado fica acima do esperado.

A significância do modelo é verificada pelo procedimento de ANOVA (Análise de Variância). Onde é analisada a variação média das respostas e é importante para avaliar se o modelo é estatisticamente significativo (MONTGOMERY, 2009). Também é possível verificar quais entre os termos do modelo são significativos e os não significativos podem ser removidos da equação.

Tabela 4. Análise da variância para as variáveis da *C. subtsugae* em UFC.

Fonte	GL	QM		Valor f	Valor p
		SQ(A _j)	(A _j)		
Modelo	9	8,2972	0,92191	1,05	0,487
Linear	3	8,1271	2,70904	3,08	0,100
T°C	1	0,0236	0,02364	0,03	0,874
Glicose	1	0,0236	0,02364	0,03	0,874
NaCl	1	8,0798	8,07985	9,17	0,019
Quadrado	3	0,0700	0,02335	0,03	0,994
T°C*T°C	1	0,0179	0,01791	0,02	0,891
Glicose*Glicose	1	0,0638	0,06378	0,07	0,796
NaCl*NaCl	1	0,0179	0,01791	0,02	0,891
Interação com 2 Fatores	3	0,1000	0,03333	0,04	0,989
T°C*Glicose	1	0,0800	0,08000	0,09	0,772
T°C*NaCl	1	0,0000	0,00000	0,00	1,000
Glicose*NaCl	1	0,0200	0,02000	0,02	0,884
Erro	7	6,1652	0,88074		
Falta de ajuste	5	6,1385	1,22770	92,08	0,011
Erro puro	2	0,0267	0,01333	*	*
Total	16	14,4624			

Fonte: Autores (2022)

A verificação da igualdade entre as médias compara a variação nas repetições do ponto central e a variação entre os tratamentos.

O “p-valor” indica o nível de significância da variável independente sobre a variável resposta, representando a probabilidade de ocorrência de um dado evento. Quando se escolhe trabalhar com um intervalo de confiança de 95%, ou seja, um “p-valor” inferior a 0,05 pode-se afirmar que a variável estudada é estatisticamente significativa. Neste trabalho o intervalo de confiança utilizado foi de 90%, indicando um “p-valor” inferior a 0,100. Ou seja, caso o P-valor de um fator seja inferior ao nível de significância α estabelecido, ele será considerado como um fator significativo (MATTIETTO et al.,2012).

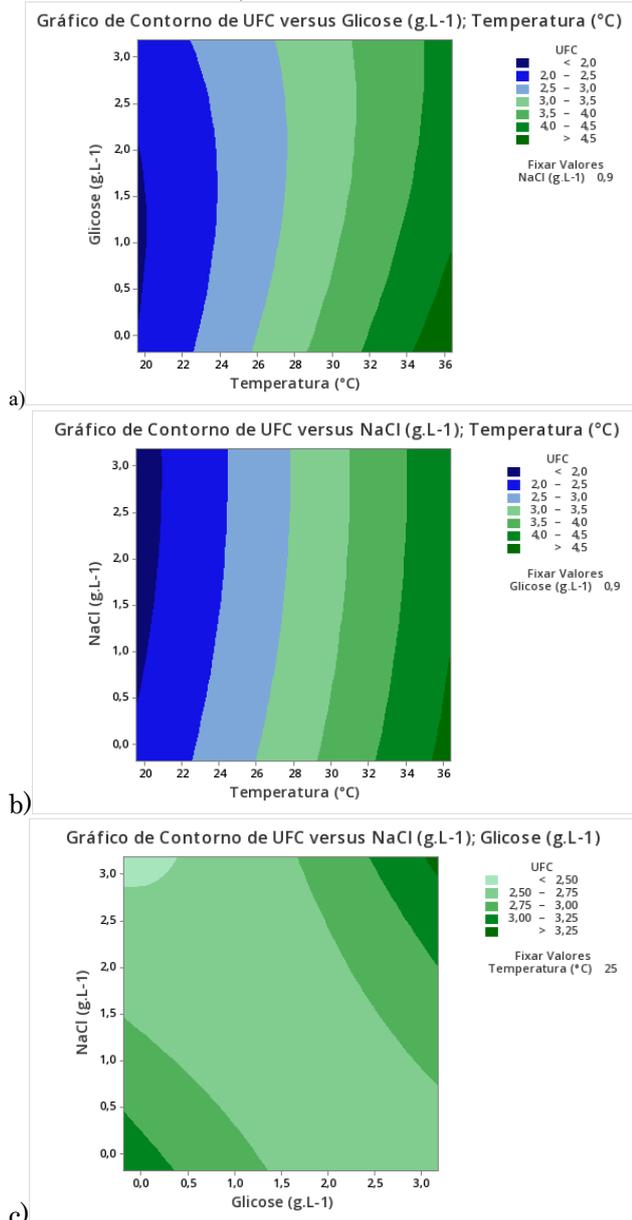
Ratificando a falta de ajuste do modelo, o valor de F calculado para a falta de ajuste foi superior (92,08) que o F tabelado (2,725) para o mesmo, fornecendo uma alta relação, o que igualmente não é ideal para a validação do modelo. Para que um modelo seja considerado bem ajustado o mesmo deve apresentar uma relação menor que 0,10 entre o F calculado para a falta de ajuste e o F tabelado para este parâmetro (MATTIETTO et al.,2012).

Apesar dos resultados obtidos não proporcionarem a geração de um modelo matemático, gráficos de contorno foi gerado e indica a tendência do processo.

O analisar os gráficos da Figura 1a), b) e c) verificou-se que a tendência do processo de aumentar o número de UFC.mL⁻¹ quando ocorre o aumento da temperatura (°C). Assim como ao observar a Figura 2 fica demonstrado o efeito significativo da variável Temperatura no resultado UFC (Unidade Formadora de Colônias).

As demais variáveis causam efeitos que não apresentam significância estatística ($\alpha=0,1$) no resultado de Unidades Formadoras de Colônia após 96 horas de decorrência do processo fermentativo.

Figura 1. 1a) Contorno de UFC versus Glicose; T°C; 1b) Contorno de UFC versus NaCl; T°C; 1c) Contorno de UFC versus NaCl; Glicose



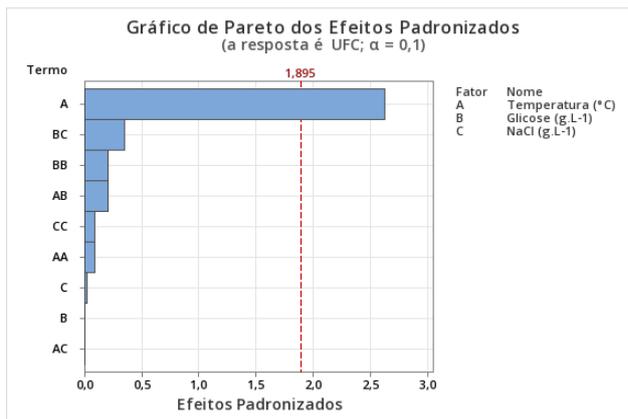
Legenda: Valores de UFC > 10⁸ /mL Fonte: Autores (2022)

Segundo Silva et al. (2021) a temperatura é um dos fatores que mais influenciam no desenvolvimento fermentativo, sua participação influencia no processo reprodutivo, enzimático e metabólico.

Análise do modelo e gráfico de Pareto

O modelo obtido através dos dados experimentais com relação a resposta da concentração de células em UFC, resultou em um modelo de R² igual a 50,15. Ou seja, o modelo tem uma capacidade baixa de explicar a variância dos dados obtidos. Quanto maior o valor do coeficiente de determinação R² mais explicativo é o modelo, o que não ocorre neste caso.

Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados da UFC.



Fonte: Autores (2022)

Observa-se no gráfico de Pareto revelou que o efeito da primeira ordem (temperatura) afetou positivamente o processo fermentativo da *C. subtsugae*, em contraste o efeito da segunda ordem e da terceira ordem não demonstraram significância positiva ou negativa no processo fermentativo da *C. subtsugae* de acordo com o gráfico Pareto.

Produção da fermentação de *C.subtsugae* em 96 h (D.O.)

O experimento da otimização da fermentação da *C. subtsugae* de 96 h em D.O teve os resultados mais expressivos do que em UFC, o resultado da concentração de células medida por D.O. em 96 h de fermentação apresentou um R² próximo de 0,7. Ainda assim o modelo obtido não foi considerado preditivo.

Resultados estatísticos para as variáveis da fermentação da *C. subtsugae* em 96 h (D.O.)

Os resultados da avaliação estatística para a variáveis da *C. subtsugae* em D.O estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeitos e interações calculadas para as variáveis de *C.subtsugae* em D.O

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	0,1172	0,0389	3,01	0,020	
T°C	-0,0028	0,0183	-0,15	0,884	1,00
Glicose	-0,0217	0,0183	-1,19	0,274	1,00
Nacl	0,0180	0,0183	0,98	0,358	1,00
T°C*T°C	-0,0238	0,0201	-1,18	0,275	1,16
Glicose*Gli cose	-0,0282	0,0201	-1,40	0,203	1,16
Nacl*Nacl	0,0692	0,0201	3,45	0,011	1,16
T°C*Glicos e	-0,0181	0,0238	-0,76	0,472	1,00
T°C*Nacl	-0,0074	0,0238	-0,31	0,766	1,00
Glicose*Nac	-0,0239	0,0238	-1,00	0,350	1,00

Fonte: Autores (2022)

Os valores destacados são significativos a um intervalo de confiança de 90%. A partir das variáveis significativas, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) que é apresentada na Tabela 7.

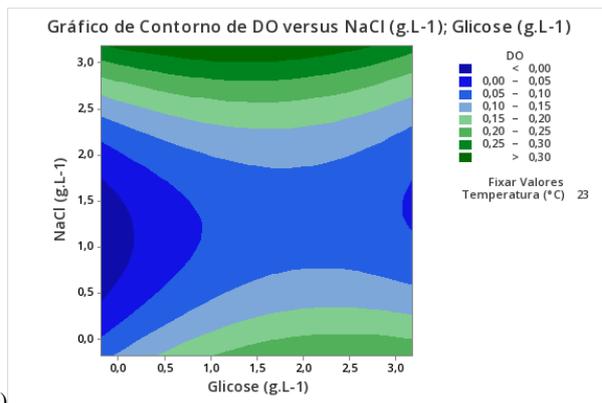
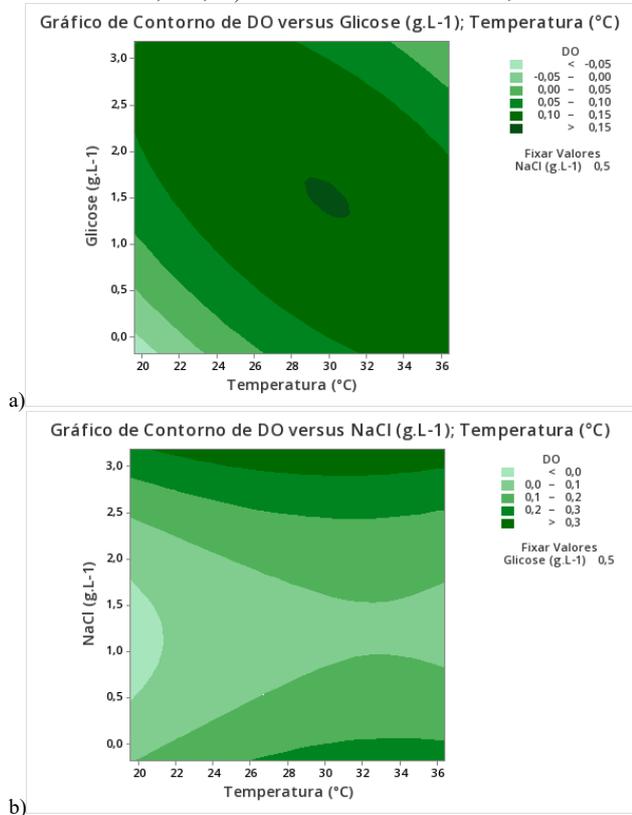
Tabela 7. Análise da variância para as variáveis da *C.subtsugae* em D.O

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor f	Valor p
Modelo	9	0,116062	0,012896	2,83	0,092
Linear	3	0,010918	0,003639	0,80	0,532
T°C	1	0,000104	0,000104	0,02	0,884
Glicose	1	0,006406	0,006406	1,41	0,274
NaCl	1	0,004408	0,004408	0,97	0,358
Quadrado	3	0,097521	0,032507	7,14	0,015
T°C*T°C	1	0,006367	0,006367	1,40	0,275
Glicose*Glicose	1	0,008956	0,008956	1,97	0,203
NaCl*NaCl	1	0,054014	0,054014	11,87	0,011
Interação com 2	3	0,007623	0,002541	0,56	0,659
Fatores					
T°C*Glicose	1	0,002628	0,002628	0,58	0,472
T°C*NaCl	1	0,000435	0,000435	0,10	0,766
Glicose*Nacl	1	0,004560	0,004560	1,00	0,350
Erro	7	0,031853	0,004550		
Falta de ajuste	5	0,027848	0,005570	2,78	0,285
Erro puro	2	0,004005	0,002002	*	*
Total	16	0,147915			

Legenda: Ftab (9,7); P<0,1 =2,725; Fonte: Autores (2022)

Para o modelo ser considerado preditivo a relação de $F_{calculado}/F_{tabelado}$ deve ser superior a três. Neste caso o valor da relação dos dois foi de 0,105, ficando bem abaixo da relação esperada. O modelo não foi preditivo.

Figura 3. 3a) Contorno de D.O versus glicose; T°C; 3b) Contorno de D.O versus NaCl; T°C; 3c) Contorno de D.O versus NaCl;Glicose



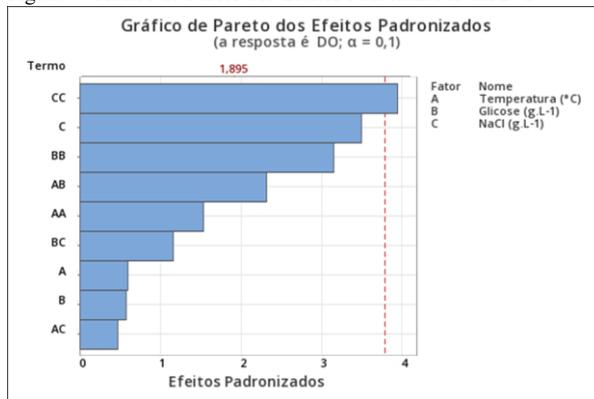
c) Legenda: Valores de UFC>10⁸/mL Fonte: Autores (2022)

Análise do modelo e gráfico de Pareto

O modelo obtido através dos dados experimentais com relação a resposta da concentração de células em UFC, resultou em um modelo de R² igual a 50,15%.

Esse modelo obtido para a *C.subtsugae* em D.O apresentou R² um valor maior do que o valor em UFC mesmo o valor de R² sendo maior do que o da UFC, ainda não é considerado preditivo. O gráfico de Pareto (Figura 4), apresenta as variáveis significativas na produção da *C.subtsugae* utilizando um nível de confiança de 90%.

Figura 4. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados em D.O



Fonte: Autores (2022)

Observou-se no gráfico de Pareto que o efeito de primeira ordem (NaCl) afetou positivamente o processo fermentativo da *C. subtsugae*; em contraste, o efeito de segunda ordem e de terceira ordem não demonstraram significância positiva ou negativa no processo fermentativo da *C. subtsugae* de acordo com o gráfico Pareto.

Segundo MARTIN et al. (2007), o crescimento ideal ocorre da *C. subtsugae* nas temperaturas de 25°C a 28°C, pH 6,5–8,0 com até 1,5% de NaCl adicionado ao meio. A variação de concentração de NaCl indicou relevância no crescimento microbiano avaliado por meio da densidade óptica (D.O).

Conclusão

Após a produção do processo fermentativo da *C. subsugae*, conclui-se que a análise variância dos resultados tanto em D.O. quanto em UFC foram considerados insatisfatórios para geração de um modelo preditivo.

No entanto é possível observar que a temperatura exerce efeito significativo sobre o número de unidades formadoras de colônias após 96 horas, bem como também foi significativo o efeito quadrático da concentração de NaCl sobre a Densidade óptica.

Desta maneira recomenda-se que novos estudos avaliem diferentes níveis destas variáveis assim como outros componentes do meio que não foram aqui estudados para o processo fermentativo visando obtenção de *C. subsugae*.

Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Campus Ponta Grossa Laboratório de Bioprocessos 1 e Bioprocessos 3 pela disponibilização de reagentes e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa. Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Ponta Grossa e Dois Vizinhos pelo suporte financeiro e apoio técnico ao desenvolvimento da pesquisa.

Referências

ALBIERO, A. **Desenvolvimento e avaliação de diferentes rotas de produção de Etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis –UFPR/Setor Palotina, como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnólogo em Biocombustíveis. Universidade Federal do Paraná. Palotina, p.47, 2013

ARTHURS, S.; SUREBDRA K. DARAB. **Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States.** Journal of Invertebrate Pathology. V.165, P.13-21, 2019.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building.** Nova York: Editora Wiley, 1978.

CAVALCANTE, Jéssica Karina Guedes, et al. "POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CHROMOBACTERIUM SUBTSUGAE: UMA BREVE REVISÃO VOLTADA AO MANEJO BIOLÓGICO DE ARTRÓPODES-PRAGA." *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais* 13.3 (2022).

FONTES, E.M.G., VALADARIS-INGLIS, M.C. **Controle biológico de pragas na agricultura.** Distrito Federal: Embrapa, 2020.

GLARE T, Caradus J, Gelemter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A. **Have biopesticides come of age?** *Trends Biotechnol.* 2012 May;30(5):250-8. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003. Epub 2012 Feb 13. PMID: 22336383.

GUERRA, A., 2016. **Métodos de contagem microbiana . 1ª edição.**

LEAHY, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R., Berckes, N., 2014. **Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency.** Gross, A.D., Coats, J.R., Duke, S.O., Seiber, J.N., *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*, pp. 3–18.

LOBO, Katiane dos Santos *et al.* Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Revista Brasileira de Entomologia* [online]. 2018, v. 62, n. 1, pp. 5-12. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>>. ISSN 1806-9665. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>.

MARTIN, P.A., Shropshire, A.D.S., Gundersen-Rindal, D.E., Blackburn, M.B., 2007. *Chromobacterium substugae* sp. nov for control of insect pests. *US Pat*, 7, B2

MATTIETTO, R.A.; *et al.* Utilização de um delineamento composto central rotacional para avaliação microbiológica de polpas de açaí pasteurizadas. *in: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*. 2012, Rio de Janeiro.

SILVA, R.N., MELO, A.F.L., FINKLER, L.L.C. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLN-01 for cellulase production. *Biotechnology Reports*. V.29, p. 55608-250, 2021.