

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2005

Autores

Fernando Hercos Valicente
Eng. Agr., Ph. D. Embrapa
Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-
970 Sete Lagoas, MG E-mail:
valicent@cnpmis.embrapa.br

Rodrigo F. Zanasi
Estagiário na Embrapa Milho e
Sorgo. Estudante de Biologia
da PUC-BH

Uso de Meios Alternativos para Produção de Bioinseticida à Base de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria gram positiva, encontrada no solo, na água e em insetos mortos que, durante o processo de esporulação, produz um cristal protéico tóxico para insetos. Estas proteínas, chamadas de δ endotoxinas, formam cristais (Figura 1) que somam entre 20 a 30% da proteína total da bactéria na fase de esporulação. Os genes *cry* codificam para a formação destas proteínas de ação inseticida. As atividades destas proteínas são restritas ao trato digestivo dos insetos. O consumo de alimento tratado com endotoxinas geralmente resulta na parada da alimentação de larvas de lepidópteros e a paralisação do intestino, que retarda a passagem de material vegetal ingerido. Quando as larvas se alimentam com altas doses da toxina sofrem uma paralisia geral seguida de morte. Estudos têm demonstrado que as toxinas liberadas e proteoliticamente ativadas no intestino se ligam a sítios de receptores específicos nas membranas das células colunares do intestino médio, formando poros que interferem com o sistema de transporte de íons da célula.

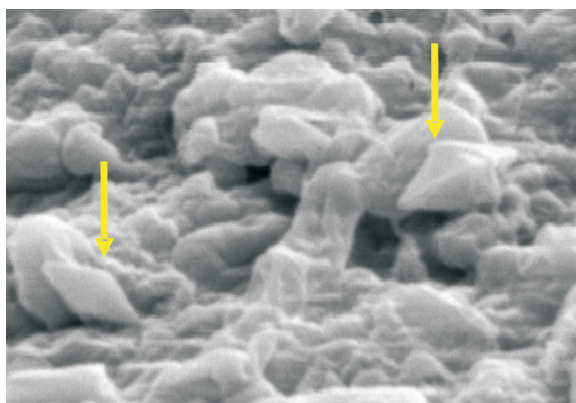


Figura 1. Cristal de forma bipiramidal da cepa 344 de *Bacillus thuringiensis*.

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil. O ataque deste inseto pode reduzir a produção de grãos em até 34%, sendo o controle feito essencialmente com inseticidas químicos. As larvas mais novas consomem tecidos de folha de um lado, deixando a epiderme oposta intacta. Depois de segundo ou terceiro instar, as larvas começam a fazer buracos nas folhas, se alimentando em seguida do cartucho das plantas de milho e produzindo uma característica fileira de perfurações nas folhas. A densidade de larvas no cartucho pode ser reduzida devido ao comportamento canibal desse inseto. O ciclo de vida desse inseto é completado em 30 dias em condições de laboratório e o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea (Figura 2), sendo que um total de 1500 a 2000 ovos pode ser colocado por uma única fêmea. A lagarta pode atingir 2,5cm e a fase de pupa ocorre no solo. Assim, percebe-se o potencial de dano que este inseto pode causar no campo.

O Bt pode se tornar uma alternativa viável e econômica para controle desta praga, evitando a contaminação do meio ambiente, de aplicadores e a morte de inimigos

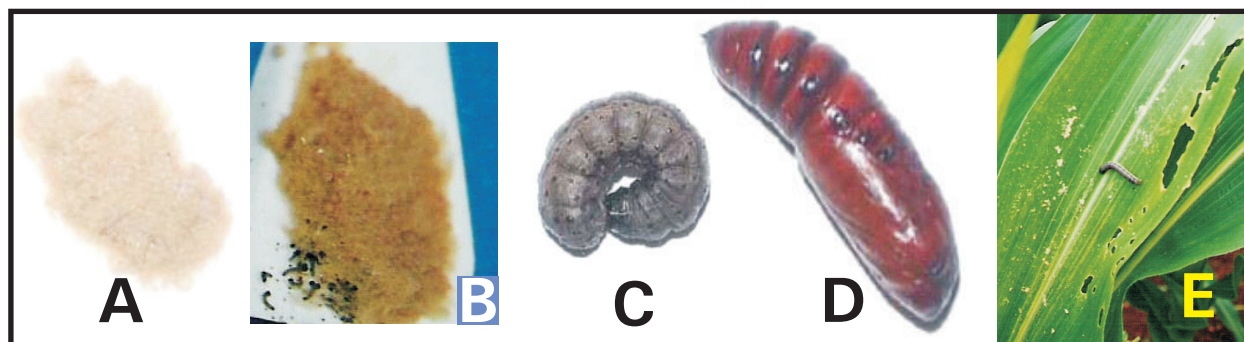


Figura 2. A- Massa de ovos de *Spodoptera frugiperda*, B- Observa-se a emergência de larvas apresentando cor escura, C- Lagarta de *Spodoptera frugiperda* que chega a medir 2.5cm, D- Pupa da lagarta do cartucho, E- Dano causado pela lagarta do cartucho em plantas de milho.

naturais. Esse agente de controle biológico pode ser cultivado em meio sólido, líquido e semi-sólido. O uso de água de milho, vinhaça, glucose de milho, arroz, água de beterraba, fubá, farinha ou farelo de soja é uma alternativa viável e econômica na utilização de subprodutos para produção deste patógeno.

Meios alternativos para o cultivo de *B. thuringiensis*

Meio semi-sólido

Foi usada a cepa 344 (*Bacillus thuringiensis tolworthi*) do Banco de Microorganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Para cada litro de água foram adicionados 5g de farinha de soja e 15g de glucose de milho. Os tratamentos utilizados no experimento foram: T1- o meio de cultura foi fervido e com agitação constante, T2- meio fervido e sem agitação, T3- meio não fervido e com agitação constante, T4- meio não fervido e sem agitação e T5- testemunha – somente água com *Bt*, sob agitação constante. Para os tratamentos 1 e 2, o meio foi fervido em uma chapa aquecedora por 2 minutos e depois deixado em temperatura ambiente. Quando o meio atingiu a temperatura de aproximadamente 30°C, foi inoculado com cepa 344 de *Bt*, previamente crescido em meio líquido e estéril, que foi agitado por 4 dias a 30°C. Para os tratamentos 3 e 4, o material foi inoculado em temperatura ambiente, sendo que somente os tratamentos 1 e 3 permaneceram sob agitação constante. A agitação para todos os tratamentos foi de 180rpm. Para uma maior precisão, foi realizada uma diluição seriada do material fermentado, sendo as diferentes concentrações testadas em lagartas de 2 dias de

idade, provenientes da criação artificial. A cepa de *Bt* fermentada foi colocada sobre a dieta artificial e fornecida aos insetos e a mortalidade avaliada diariamente. A Tabela 1 mostra o resultado da mortalidade da lagarta do cartucho com o *Bt* cultivado em meio alternativo contendo glucose de milho e farinha de soja.

Os resultados mostram que o *B. thuringiensis* pode ser cultivado usando meio alternativo, contendo fontes de carbono e nitrogênio com traços de sais e aeração constante para um melhor crescimento do *Bt*. A eficiência em relação ao inseto-alvo é a mesma do que quando cultivado em meio convencional.

Meio sólido

Todo meio sólido testado foi inoculado com a cepa T09 (*B. thuringiensis tolwothi*) previamente crescida em meio contendo caldo nutriente complementado com sais ($MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e $MnSO_4$), com agitação constante por 4 dias a 30°C. Foram usados 50 e 100 gramas de arroz misturados com glucose de milho e farelo de soja, autoclavados a 120°C por 20 minutos e inoculados com 20mL da cepa T09 (para 50 gramas) e 40 mL (para 100 gramas). O arroz inoculado foi mantido a 30°C por 5 dias em estufa. Após esse período, o arroz foi lavado de 4 a 5 vezes com água e essa água contendo *Bt* foi usada nos bioensaios. Para uma maior precisão, foi realizada uma diluição do estoque, sendo as diferentes concentrações obtidas testadas em lagartas de 2 dias de idade provenientes da criação artificial. A mortalidade chega a 100% como pode ser observada pela Tabela 2.

Tabela 1. Mortalidade da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o *B. thuringiensis* cultivado em meio semi-sólido contendo glucose de milho e farinha de soja.

Tratamento	Concentração	Mortalidade (%)
T1 – Material fervido e com agitação constante	$3,8 \times 10^6$	25
	$3,8 \times 10^7$	78,3
	$3,8 \times 10^8$	100
T2 – Material fervido e sem agitação	$1,1 \times 10^6$	37,5
	$1,1 \times 10^7$	58,5
	$1,1 \times 10^8$	81,5
T3 – Material não fervido e com agitação	$2,5 \times 10^6$	16,7
	$2,5 \times 10^7$	54,2
	$2,5 \times 10^8$	79,2
T4- Material não fervido e sem agitação	$2,0 \times 10^6$	18,2
	$2,0 \times 10^7$	50,0
	$2,0 \times 10^8$	79,2
T5- água	$2,9 \times 10^6$	33,3
	$2,9 \times 10^7$	87,5

O arroz pode ser usado como substrato para o crescimento do *Bt* a um custo muito baixo. Mas como foi comprovado pelos resultados acima, a adição de fontes de carbono e nitrogênio torna o arroz um meio mais rico para a produção do *Bt*. A Figura 3 mostra sacos de arroz esterilizados e inoculados com *B. thuringiensis*.

Para a realização de um outro bioensaio, as cepas de *Bt* T09, 344 e 1644 foram crescidas em meio líquido por 4 dias a 30°C, como descritas anteriormente. Foram usados 50 e 100 gramas de arroz autoclavado a 120°C por 20 minutos, que foram inoculados somente com 20 mL das cepas de *Bt* e incubados a 30°C por 5 dias. Após esse período, o arroz foi lavado 4 a 5 vezes com água e, do líquido resultante, obteve-se o *Bt* a ser testado. Foi realizada uma diluição

seriada para uma melhor aferição dos biotestes contra a lagarta do cartucho. Os resultados de mortalidade das diferentes diluições são mostrados na Tabela 3. Os resultados do quarto bioensaio mostraram que a produção final de esporos foi a mesma (entre 3 e 4 x 10⁸ esporos/mL), tanto para 50 como para 100 gramas de arroz. A mortalidade foi máxima (100%) para as doses mais altas para a maioria das cepas utilizadas.

O meio semi-sólido descrito no primeiro bioensaio e os meios de arroz mais glucose de milho mais farinha de soja são muito eficientes na produção deste biopesticida. Os resultados mostram que se pode produzir o *Bt* em meios alternativos, baratos e que às vezes são considerados descarte pela indústria. Podem ser usados tanto por pequenos, como por médios e

Tabela 2. Mortalidade da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *B. thuringiensis* cultivado em arroz enriquecido com glucose de milho e farinha de soja.

Quantidade de arroz	Inóculo da cepa T09	Concentração	Mortalidade (%)
100g	40ml	1.4×10^7	21
		1.4×10^8	55
		1.4×10^9	100
50g	20ml	1.2×10^7	26
		1.2×10^8	87
		$1,2 \times 10^9$	100



Figura 3. Sacos de plástico contendo arroz autoclavado enriquecido com fontes de carbono e nitrogênio, inoculado com *B. thuringiensis* e incubado em estufa a 30°C, por cinco dias.

grandes produtores rurais. A grande vantagem destes métodos é que a maioria deles pode ser executado dentro da própria fazenda. Para isto, basta ter o inóculo mantido em ambiente estéril.

Bibliografia Consultada

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, p. 587-616, 1992.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **Bioscience**, Washington, v. 42, p. 112-122, 1992.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 639-644, 2003.

Tabela 3. Mortalidade da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com três diferentes isolados de *B. thuringiensis*, cultivado em arroz esterilizado.

Cepa	Inóculo	Concentração	Mortalidade (%)
T09	50g/20ml	$4,5 \times 10^6$	8,3
		$4,5 \times 10^7$	91,6
		$4,5 \times 10^8$	100
T09	100g/20ml	$7,4 \times 10^6$	8,3
		$7,4 \times 10^7$	86,4
		$7,4 \times 10^8$	100
1644	50g/20ml	$4,0 \times 10^6$	30,4
		$4,0 \times 10^7$	35,0
		$4,0 \times 10^8$	100
1644	100g/20ml	$4,4 \times 10^6$	13
		$4,4 \times 10^7$	21,7
		$4,4 \times 10^8$	90,5
344	50g/20ml	$4,8 \times 10^6$	21,7
		$4,8 \times 10^7$	75,0
		$4,8 \times 10^8$	100
344	100g/20ml	$3,1 \times 10^6$	31,8
		$3,1 \times 10^7$	90,5
		$3,1 \times 10^8$	100

Circular Técnica, 60

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: MG 424 Km 45 Caixa Postal 151 CEP
35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3779 1000

Fax: (31) 3779 1088

E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2005): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães

Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade,
Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela,
José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro

Expediente

Supervisor editorial: Clenio Araujo

Revisão de texto: Clenio Araujo

Editoreção eletrônica: Dilermando Lúcio de Oliveira