

Produção de biopesticida de *Bacillus thuringiensis* usando meio comercial de laboratório e meios alternativos agrícolas como fonte de nutrientes

Corina Macedo Vieira¹, Maria Isabella Santos Leite¹, Fernanda Lyon Freire¹ e Fernando Hercos Valicente²

¹- Graduandas de Ciências Biológicas, MG, Brasil

²- PhD, Embrapa Milho e Sorgo. C.P. 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. Telefone: 55 31 3779 1184, fax: 55 31 3779 1179

Palavras chave: *Spodoptera frugiperda*, patologia de insetos, meio alternativo

INTRODUÇÃO

O controle biológico de pragas é considerado como o uso de organismos vivos para manter a população de determinada praga em equilíbrio no agrossistema, de modo a não ocasionar danos econômicos ao produtor. Os bioinseticidas são uma alternativa ecológica e sustentável, contribuindo para se manter o equilíbrio do ecossistema. Os agentes do controle biológico já representam mais de 2% do mercado de inseticidas do mundo.

A principal praga do milho *Spodoptera frugiperda* pertence à ordem Lepidoptera e a família Noctuidae. É responsável pelo ataque de mais de 60 culturas, podendo-se citar entre elas a cultura do milho, sorgo, arroz e pastagem. Trata-se de uma espécie de origem tropical-subtropical do hemisfério Oeste, abrangendo a maior parte do continente americano.

O controle biológico da *S. frugiperda* é feito comumente utilizando a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que é uma bactéria gram positiva, encontrada no solo, água e insetos mortos. Durante o processo de esporulação produz um cristal protéico que é tóxico para insetos. As proteínas (δ endotoxinas) que formam estes cristais somam entre 20 a 30% da proteína total da bactéria na fase de esporulação.

O *Bt* pode ser cultivado em meio sólido, líquido e semi-sólido. O uso comercial de meios alternativos como fonte de nutriente para o crescimento desta bactéria, pode ser uma forma econômica para a produção de biopesticida para o controle da lagarta do cartucho do milho.

O objetivo deste trabalho foi testar meio comercial de laboratório (LB) e meios alternativos agrícolas (glicose, farelo de soja e chorume suíno) como fonte de nutrientes para a produção de biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*, com o objetivo de controlar a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de cultura líquidos foram preparados, autoclavados e inoculados com cepas de *Bt* 344 (*B. thuringiensis tolworthi*) pertencente ao banco de *Bt* da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. A cultura semente foi produzida em frascos sob agitação constante, a 200rpm, por 96 horas a 30 °C . O

pH de cada meio de cultura foi acertado com para 7.5. O meio 1 foi composto por: Luria Bertani (LB), sais (FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4), e 2g de glicose; meio 2 foi composto por 18g de glicose, 6g de farelo de soja mais sais; e o meio 3 por chorume suíno(esterco líquido) a 4%. O pH foi medido a intervalos regulares (08:00, 11:00 e 15:00), a cada 24 horas, com a retirada de amostras de 30 mL de cada meio, por medição. A cada 24 horas, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada meio de cultura e incubada a 65 °C por 15 minutos. Posteriormente, retirou-se 100 μL de cada amostra e passou para um microtubo com 900 μL . A diluição seriada deste material foi realizada até se obter a concentração 10^3 esporos/mL.

Placas de Petri foram preparadas com meio LB sólido e foram semeadas com 100 μL de cada diluição preparada dos 3 meios. Após um período de 24 horas de incubação das placas semeadas, contaram-se os esporos viáveis, representados em c.f.u/mL. Diariamente, retirou-se 100mL de cada um dos meios e centrifugou-se esta amostra em 10.000rpm por 15 minutos. A massa celular produzida, representada em g/L, foi obtida após a liofilização do material centrifugado. Retirava-se também 1mL para a contagem dos esporos, expressos em esporos/mL, na câmara de Newbauer.

O bioensaio para a verificação da patogenicidade de cada meio foi realizado após o período de 96 horas de incubação dos meios de cultura. Foram inoculados 170 μL das concentrações (10^6 , 10^7 e 10^8 esporos/mL) de cada meio em aproximadamente 1,7g de dieta artificial e fornecidos à lagartas sadias de 1° ínstar. No grupo controle, as dietas artificiais foram molhadas com 170 μL de água destilada esterelizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do pH medido nos intervalos regulares determinados (08:00, 11:00 e 15:00) do meio 1 demonstrou uma tendência à basicidade (Tabela 1). A partir do tempo de 24 horas de incubação, obteve-se valores do pH do meio 1 acima de 8.0.

Tabela 1: Medição do pH do Meio 1 (LB , sais e glicose) durante os intervalos regulares (08:00,11:00,15:00), a cada 24 horas.

Tempo	Intervalos		
	08:00	11:00	15:00
Ø	7.52	8.65	6.44
24 Horas	8.74	7.78	8.97
48 Horas	8.18	9.09	9.48
72 Horas	8.65	8.68	8.43
96 Horas	8.23	8.30	8.36

Os valores do pH do meio 2 demonstrou que este meio, ao contrário do observado no meio 1, apresentou uma tendência à acidificação (Tabela 2). A partir do intervalo de 15:00 do tempo de 24 horas de incubação, obteve-se valores do pH do meio 1 abaixo de 5.0.

Tabela 2: Medição do pH do Meio 2 (glicose, farelo de soja e sais) durante os intervalos regulares (08:00,11:00,15:00), a cada 24 horas.

Tempo	Intervalos		
	08:00	11:00	15:00
Ø	6.68	6.73	7.43
24 Horas	5.54	6.78	4.31
48 Horas	4.16	4.06	4.20
72 Horas	4.30	4.11	4.20
96 Horas	3.86	3.95	4.11

Assim como o meio 1, o meio 3 apresentou uma tendência à basicidade durante a medição do pH nos primeiros intervalos regulares determinados (Tabela 3). Entretanto, apresentou uma tendência a acidificação após o período de 48 horas de incubação.

Tabela 3: Medição do pH do Meio 3 (Chorume 4% e glicose) durante os intervalos regulares (08:00,11:00,15:00), a cada 24 horas.

Tempo	Intervalos		
	08:00	11:00	15:00
Ø	9.80	9.28	8.78
24 Horas	9.20	8.78	8.74
48 Horas	4.49	3.52	3.26
72 Horas	3.18	3.07	2.97
96 Horas	3.30	3.40	3.20

O meio 1 apresentou o maior número de esporos viáveis, $9,3 \times 10^6$ c.f.u./mL, com 96 horas de incubação. Porém, o meio 2 e 3 apresentaram concentrações semelhantes na concentração 10^5 esporos/mL (Tabela 4).

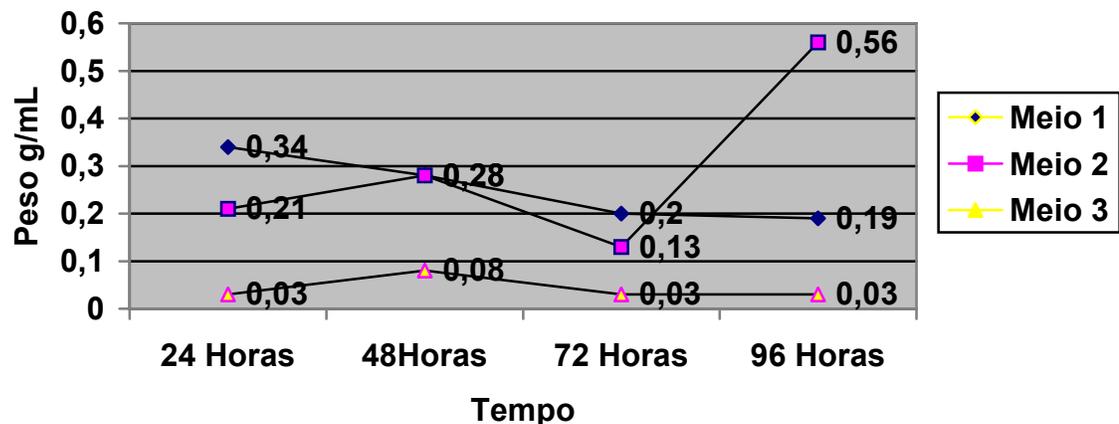
Tabela 4: Contagem de esporos viáveis dos meios 1 (LB, glicose e sais), 2 (glicose, farelo de soja e sais) e 3 (chorume 4% e glicose), expressos em c.f.u./mL, após o período de 96 horas de incubação sob agitação constante a 200rpm, a 30 °C.

Meios de cultura Líquidos	10^3 eporos/mL	10^4 esporos/mL	10^5 esporos/mL
Meio 1 (LB, glicose e sais)	$1,04 \times 10^5$	$9,7 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$
Meio 2(glicose, farelo de soja e sais)	$6,4 \times 10^4$	$8,3 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$
Meio 3(Chorume 4% e glicose)	$2,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$5,3 \times 10^6$

O número de esporos/mL de cada meio aumentou a cada 24 horas de incubação. Demonstrando que o crescimento da bactéria *Bacillus thuringiensis* necessita de aeração e uma temperatura adequada de 30°C. O meio 1 apresentou um total de $1,7 \times 10^9$ esporos/mL e no meio 2 observou-se $2,4 \times 10^8$ esporos/mL. Entretanto, o meio 3 apresentou apenas um total de $5,2 \times 10^7$ esporos/mL.

A massa celular total produzida pelo meio 2 foi de 1,18g/mL, sendo que o meio 1 apresentou um total de 1,01g/mL. O meio 3 apresentou apenas uma massa celular total de 0,17g/mL (Figura 1).

Figura 1: Massa celular produzida pelos meios 1 (LB, glicose e sais), 2 (glicose, farelo de soja e sais) e 3 (chorume 4% e glicose), ao longo das 96 horas de incubação.



No teste de patogenicidade contra larvas do 1º ínstar da lagarta do cartucho do milho, pôde-se observar que em todos os meios de produção para o *Bt* a mortalidade foi cerca de 95% para as altas concentrações (10^8 e/ou 10^9 esporos/mL).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pela medição de pH demonstraram que os 3 meios apresentam uma variação durante o período em ficam sob agitação constante. Sendo que esta aeração gerada pela agitação e a temperatura de 30°C possibilitam o crescimento de *Bt*.

O meio 1 apresentou o maior número de esporos viáveis, $9,3 \times 10^6$ c.f.u/mL, com 96 horas de incubação, entretanto o meio 2 mostrou o maior número de massa celular produzida, 1.8g/mL.

Apesar de apresentarem variações da produção da massa celular e dos números de esporos viáveis, todos apresentaram uma mortalidade contra lagartas do 1º ínstar da lagarta do cartucho do milho cerca de 95% para as altas concentrações (10^8 e/ou 10^9 esporos/mL).

LITERATURA CITADA

Carvalho, R.P.L. 1970. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1970. 170p. Tese de Doutorado.

Lambert, B. & M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*. 42: 112-122.

Hofte, Herman & Whiteley H. R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *American Society for Microbiology*.53:242-255.

Lambert, Bart & Peferoen M. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*. 42:112-122.

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* 32 (4): 639-644.