

Meios de cultura alternativos para a produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*, para o controle da *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*.¹

Jéssica Batista Torres de Araújo², Fernando Hercos Valicente³

¹Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

² Estudante do Curso de Agronomia da Univ. Fed. de São João del-Rei, Bolsista PIBIC (ou BIC JR) do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Introdução

O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola de importância no Brasil. Isto porque é utilizado tanto para a alimentação humana quanto animal, sendo cultivado em todo o território nacional. De acordo com a Conab (2017), o Brasil é o terceiro maior produtor do grão no mundo, com uma produção estimada para safra de 2016/17 de 87,4 milhões de toneladas. Apesar da alta produtividade, esta cultura tem sofrido severas perdas, desde o plantio até próximo à colheita em razão do ataque de insetos, entre os quais se destacam algumas espécies como *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera* da ordem Lepidoptera. Por causa desses problemas, é de suma importância a utilização de medidas de controle alternativas, que proporcionem menor impacto ambiental através do uso de agentes de controle biológico, e o uso do controle biológico com microrganismos entomopatogênicos é viável (VALICENTE; MORÃO, 2008).

Entre os microrganismos entomopatogênicos mais utilizados encontra-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), caracterizada por produzir cristais proteicos que apresentam efeito inseticida, durante a fase de esporulação (MONTIEL et al., 2001). Alguns biopesticidas baseados em Bt têm sido comercializados por apresentarem alta especificidade, menores riscos ambientais e à saúde humana e menor frequência de resistência dos insetos-alvo. Apesar das grandes vantagens, a aplicação destes produtos tem sido limitada pelo alto custo de produção com meio de cultura no processo fermentativo (MONTIEL et al., 2001). *B. thuringiensis* desenvolve-se em meio de cultura contendo nutrientes com fontes de nitrogênio, carbono e alguns sais minerais, os quais são necessários para a esporulação (VALICENTE; MORÃO, 2008). Portanto, a

escolha da matéria-prima para meio de cultura merece atenção especial, já que compreende cerca de 30 a 40% do custo total da produção, e esta escolha deve proporcionar alta produção com menor custo possível (MONTIEL et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar meios de cultura alternativos para a obtenção de biopesticidas à base de *B. thuringiensis*, que apresentem elevada toxicidade para as lagartas *S. frugiperda* e *H. armigera* com baixo custo de produção.

Palavras-chave: patógenos, controle biológico, controle microbiano

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa de *Bacillus thuringiensis*

A cepa de Bt 1641, armazenada em glicerol no banco de Bt da Embrapa Milho e Sorgo, apresenta elevada toxicidade para *S. frugiperda* (estudo prévio). A cepa foi crescida através de semeadura de estrias simples, em placa de Petri contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani) comercial (Lennox) sólido por 72 horas a 30 °C para garantir a esporulação das células de Bt. Após os três dias de incubação, toda massa bacteriana proveniente do crescimento foi inoculada nos meios de cultura para iniciar o processo fermentativo.

Meios de cultura

Neste experimento foram avaliados quatro diferentes meios de cultura para a produção do isolado 1641 de *B. thuringiensis*: 1. LB (Luria Bertani) comercial (20g/L). 2. LB (Luria Bertani) comercial + sais (S) (0,002g de FeSO₄, 0,02g de ZnSO₄, 0,02g de MnSO₄, 0,3g de MgSO₄) (LB + S). 3. Alternativo (20g/L de açúcar cristal + 10g/L de extrato de levedura) sugerido neste trabalho (A). 4. Alternativo mais o acréscimo dos sais (A +S).

Para o preparo dos meios de cultura, os reagentes foram pesados e transferidos para um Becker contendo 1 litro de água destilada e homogeneizados com a ajuda do agitador magnético. Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 7,5, logo após foram acondicionados em Erlenmeyer de 2L e autoclavados por 25 minutos em temperatura de 120 °C. Posteriormente, as placas de Petri contendo a massa bacteriana provenientes do crescimento de 72 horas foram inoculadas nos meios de cultura em capela de fluxo contínuo, previamente esterilizada, sendo quatro placas para cada meio de cultura. Os Erlenmeyers foram acondicionados no agitador e submetidos a uma

rotação de 250 rpm a 30 °C por 72 horas, conforme as instruções do protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo.

Fermentação

Para determinação dos parâmetros físicos como pH, concentração de esporos e massa celular durante o processo de crescimento, foram retiradas amostras de 35 mL dos respectivos meios de cultura nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os testes de toxicidades para *S. frugiperda* e *H. armigera*, foram realizados com as massas celulares dos meios de cultura fermentados por 72 horas.

Bioensaio

O teste de toxicidade baseou-se na metodologia usada por Valicente et al., (2010), modificado. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas parte da bainha das folhas do milho lavadas em água corrente, e em seguida colocadas em contato com as respectivas amostras dos meios de cultura inoculados com a cepa de Bt fermentados e adicionados de Tween-20. Para a testemunha, as folhas foram imersas em água deionizada, sem Tween-20. Passados 5 minutos, as folhas foram retiradas e colocadas em caixas plásticas Gerbox transparente de 11 x 11 x 3,5 cm, sendo quatro repetições para cada tratamento. Após a secagem completa das folhas, foram adicionadas 25 lagartas neonatas de *S. frugiperda* em cada caixa, totalizando 20 caixas. A avaliação da mortalidade foi realizada com 24, 48 e 72 horas após o contanto das lagartas com as folhas contaminadas com o Bt, com contagem das lagartas vivas e mortas, obtendo assim, a taxa de mortalidade. A mesma metodologia foi utilizada para o teste de toxicidade das lagartas neonatas de *H. armigera*.

RESULTADOS

Medição do pH

Os meios iniciaram com pH alcalino igual a 7,5. Após 24 horas de fermentação, os meios de cultura A e A + S apresentaram redução nos valores de pH para valores ácidos, sendo que estes mantiveram-se ácidos até no final do processo de fermentação. Já os meios LB comercial tiveram uma queda nos valores de pH após as 24 horas de fermentação, apresentando valores ácidos, mas com 72 horas de fermentação alcançaram valores básicos (Figura 1).

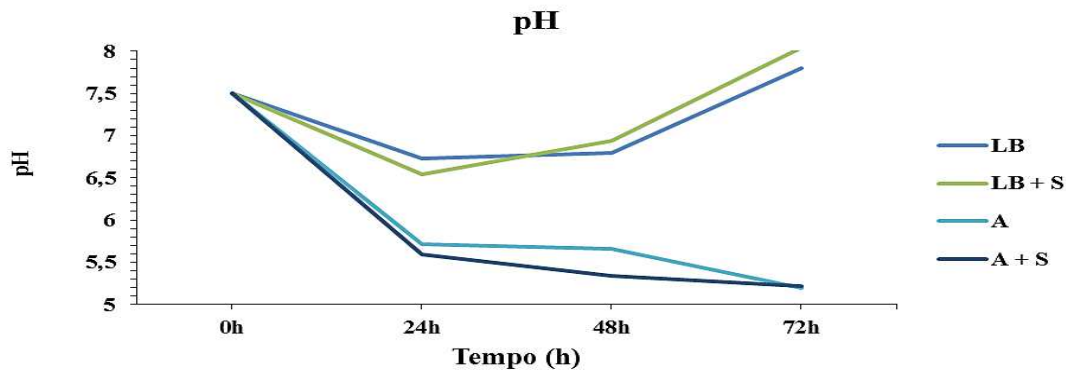


Figura 1: Valores do pH aferidos durante o processo fermentativo.

Contagem de esporos

Os meios de cultura LB + S e A + S alcançaram maior produção de esporos quando comparados aos demais meios de cultura sem adição dos sais (Tabela 1).

Tabela1: Concentração de esporos/mL dos meios fermentados em diferentes tempos de fermentação.

Meios	24hs	48hs	72hs
LB	$5,45 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$	$1,05 \times 10^8$
LB + S	$6,50 \times 10^7$	$1,07 \times 10^8$	$6,25 \times 10^8$
A	$5,05 \times 10^7$	$7,34 \times 10^7$	$1,175 \times 10^8$
A + S	$7,5 \times 10^7$	$1,02 \times 10^8$	$5,07 \times 10^8$

Massa celular

O maior peso de massa celular produzida (g) foi constatado nos meios de cultura com o acréscimo dos sais em todas as etapas da fermentação (Figura 4).

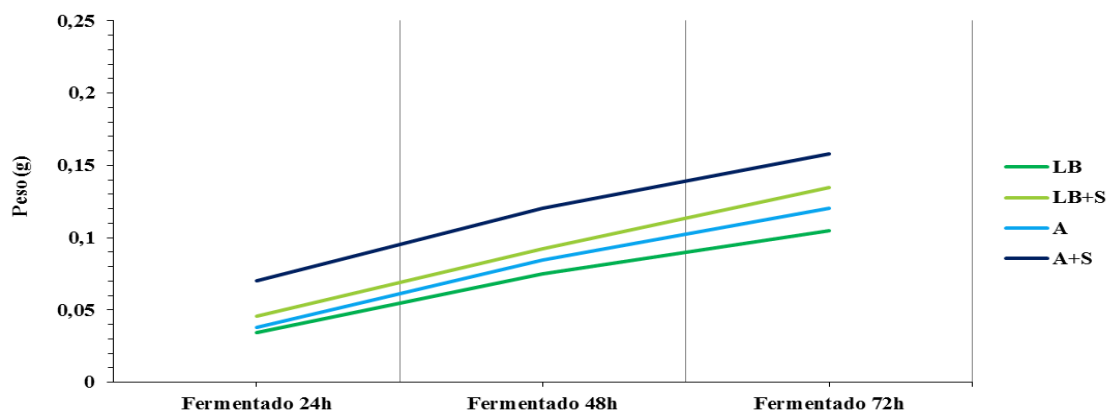


Figura 2: Massa celular produzida para os diferentes meios de cultura durante o processo fermentativo.

Mortalidade em *Spodoptera frugiperda*

A taxa de mortalidade do meio A fermentado por 72 horas* apresentou maior destaque em todo tempo de avaliação, alcançando mortalidade de 84% com 24h e 99% no segundo dia (48h) de avaliação (Figura 3).

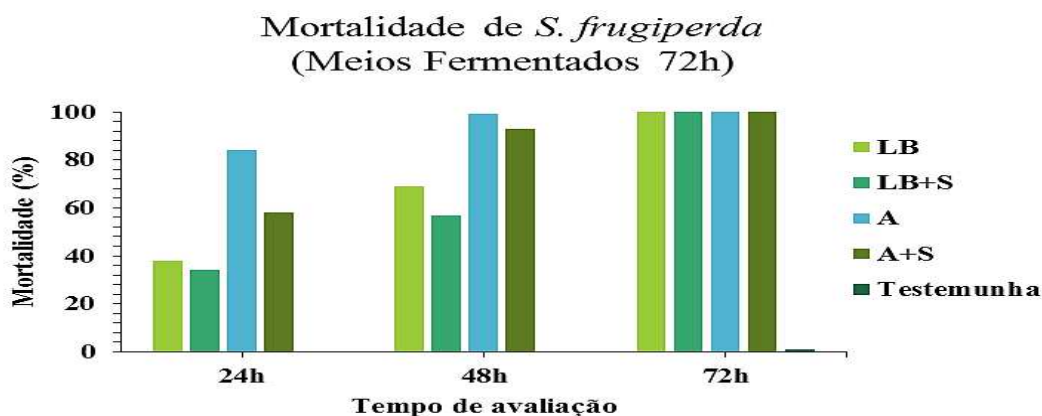


Figura 3: Mortalidade das lagartas neonatas de *S. frugiperda* alimentadas com as folhas de milho contaminadas com os meios inoculados com a cepa 1641 de *B. thuringiensis* e fermentados por 72h* com diferentes tempos de avaliações.

Mortalidade em *Helicoverpa armigera*

O meio A fermentado por 72 horas* se destacou por apresentar mortalidade de 95% no primeiro dia de avaliação e 100% com 48 horas de avaliação (Figura 4).

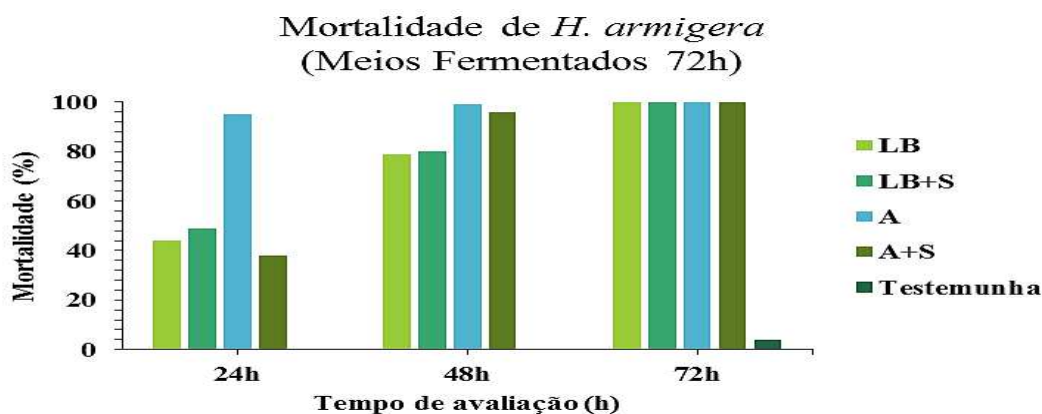


Figura 4: Mortalidade das lagartas neonatas de *H. armigera* alimentadas com as folhas de milho contaminadas com os meios inoculados com a cepa 1641 de *B. thuringiensis* e fermentados por 72h* com diferentes tempos de avaliações.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o pH dos meios de cultura variou durante o processo fermentativo, sendo que em todos os meios houve uma queda nos valores de pH com 24 horas e 48 horas, em relação ao pH inicial de 7,5. Montiel et al. (2001) afirmam que esta variação é devida ao consumo dos carboidratos antes de iniciar a fase de esporulação. Os meios A e A + S permaneceram com valores de pH ácidos mesmo após 48h de fermentação. Dingman e Stahly (1983) relatam que este fato pode estar relacionado ao acúmulo de ácido que resulta no catabolismo da glicose, mantendo valores baixos de pH. Os meios de cultura com acréscimos dos sais atingiram maior concentração de esporos/mL quando comparados aos demais meios de cultura sem adição dos sais. De acordo com İçgen et al. (2002), os sais minerais atuam com estimulantes do crescimento e da esporulação das células de Bt no meio de cultura. As massas celulares produzidas aumentaram durante todo o processo de fermentação para todos os tratamentos.

Os melhores resultados de toxicidade nas lagartas neonatas de *S. frugiperda* e *H. armigera*, dos diferentes meios de cultura, foram encontrados no terceiro dia de avaliação (72 horas), quando todos os tratamentos apresentaram 100% de mortalidade, nas duas espécies testadas. De acordo com as taxas de mortalidades obtidas, o meio 3 contendo somente açúcar apresentou maior toxicidade para as lagartas neonatas de *S. frugiperda* e *H. armigera*, quando comparado aos meios LB, LB + S e A + S até a avaliação de 48 horas. Talvez os sais presentes na própria água possam contribuir para a formação do cristal, já que o Bt necessita de traços de sais minerais. Os meios com acréscimos dos sais apresentaram maior concentração e maior produção de biomassa, entretanto não obtiveram os melhores resultados nos testes de toxicidade. Segundo Montiel et al. (2001), a quantidade de esporos nem sempre está ligada à entomotoxicidade da cepa, pois, durante a esporulação, cada célula de *B. thuringiensis* produz um esporo e um cristal. É importante ressaltar que os meios de cultura representam parte do custo total da produção de biopesticidas à base de *B. thuringiensis*. Portanto, são essenciais estudos para avaliar meios alternativos e mais baratos economicamente viáveis a fim de minimizar os custos de produção dos biopesticidas.

CONCLUSÃO

Os meios de cultura alternativos compostos por açúcar cristal + extrato de levedura, inoculados com a cepa 1641 de Bt, apresentaram alta toxicidade para as lagartas neonatas de *S. frugiperda* e *H. armigera* alcançando 100% de mortalidade no terceiro dia de avaliação (72h), resultados semelhante aos observados dos meios de cultura LB e LB + sais. Este é um resultado interessante, pois os subprodutos utilizados apresentam um menor custo quando comparado ao meio LB comercial, sendo uma alternativa para reduzir os custos durante o processo fermentativo para obtenção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*, apresentando uma economia de 54%, considerando o preço do açúcar e outros ingredientes.

REFRÊNCIAS

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: nono levantamento.** Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_gaos_junho_2017.pdf > Acesso em: 2 maio 2017.

DINGMAN, D. W.; STAHLY, D. P. Medium promoting sporulation of *Bacillus* larvae and metabolism of medium components. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 860-869, 1983.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, n. 9, p. 599-604, 2002.

MONTIEL, M. I. T.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Water Research**, New York, v. 35, p. 3807-3816, 2001.

VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. H. C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 6, p. 702-708, 2008.

VALICENTE, F. H.; PICOLI, E. A. de T.; VASCONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, San Diego, v. 53, n. 3, p. 360-366, 2010.