

## Produção de *Bacillus thuringiensis* através de meio de cultivo alternativo<sup>1</sup>

Nívea A. M. Evangelista<sup>2\*</sup>; Jean Marcel Rodrigues Pinho<sup>3</sup>; Fernando Hercos Valicente<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq. <sup>2</sup> Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. <sup>3</sup> Analista de Laboratório da Embrapa Milho e Sorgo. <sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

### INTRODUÇÃO

O Brasil tem mostrado um panorama de expansão de áreas cultivadas e uma exploração agrícola cada vez mais intensa. Nesse contexto, tem-se notado ao longo dos anos um aumento significativo no número de pragas (Silva; Brito, 2015). A estimativa apresentada em janeiro de 2019 para a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou cerca 230,7 milhões de toneladas, 1,9% superior à obtida em 2018 (226,5 milhões de toneladas), aumento de 4,2 milhões de toneladas (IBGE, 2019).

Com isso é crescente a preocupação sobre os insetos considerados praga, em razão da elevada perda econômica que estes indivíduos causam dentro das lavouras, acarretando contínua utilização do controle químico, baseado apenas na aplicação de inseticidas, o que pode desencadear desequilíbrios populacionais de inimigos naturais e seleção de resistência da praga aos inseticidas utilizados, além de danos ao meio ambiente e à saúde do ser humano. Uma das alternativas para amenizar tais problemas, visando à redução do número de aplicações, é a utilização de manejos preconizando o controle biológico de pragas (Oliveira et al., 2018).

Um das alternativas muito utilizadas no controle biológico é o uso de organismos microbianos, sendo considerado um método seguro aos seres humanos e ao meio ambiente, em que se destaca a bactéria *Bacillus thuringiensis*. A elaboração de meios alternativos para a produção de *B. thuringiensis* é uma estratégia para minimizar os custos, viabilizando a produção em larga escala. De acordo com Mourão (2017), é necessário para o processo fermentativo que o meio de cultura contenha nutrientes com fontes de nitrogênio, carbono e alguns sais minerais, os quais são necessários para a esporulação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar meios de cultura alternativos para a obtenção de biopesticidas à base de *B. thuringiensis*, buscando também um baixo custo de produção, em relação aos meios comerciais já utilizados.

**Palavras-chave:** Fermentação, biopesticida, formulação.

## MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de controle biológico, há diversas cepas de Bt que ficam armazenadas no Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, sendo conservados em glicerol para uma melhor viabilidade. As lagartas utilizadas nos experimentos de campo e laboratório são provenientes do laboratório de criação.

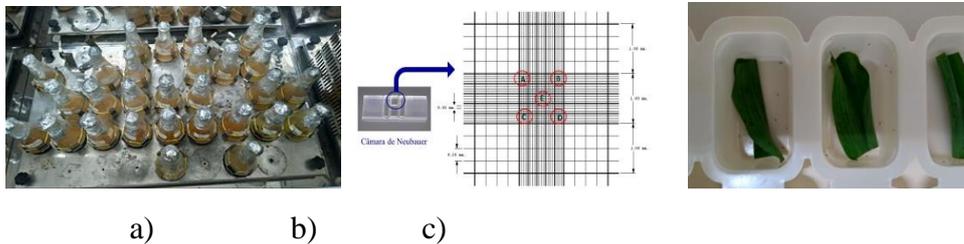
A fim de reduzir custos e comparar a eficiência dos meios de culturas, foram preparados meios alternativos para obtenção de biopesticidas à base de *B. thuringiensis* (Bt) e comparados com meios comerciais já utilizados no dia-a-dia em laboratório.

No processo de preparação foram cultivados seis meios alternativos, e os fermentados foram avaliados quanto à eficácia inseticida, à produção de esporos, à massa celular e ao custo de produção, comparando com o fermentado de Bt produzido no meio Luria Bertani (LB).

Os meios alternativos de cultivo, feitos em triplicata, foram elaborados a partir de fontes orgânicas (N1 e N2) e inorgânica (N3) de nitrogênio acrescido de uma fonte de carbono (C1), conforme Tabela 1. O meio LB foi utilizado na concentração indicada pelo fabricante (2%).

**Tabela 1.** Composição dos meios alternativos para crescimento de Bt (% P/V)

Meios de Cultivo	Milhocina	Proteína de Soja	Sulfato de Amônio	Glicose
M1	1,0	X	X	0,75
M2	1,0	X	X	1,0
M3	1,0	X	X	1,25
M4	0,4	0,4	0,2	0,75
M5	0,4	0,4	0,2	1,0
M6	0,4	0,4	0,2	1,25



**Figura 1. a)** Crescimento de Bt nos meios de cultivo testados **b)** Contagem de esporos/ml em câmara de Neubauer. **c)** Avaliação da mortalidade de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*.

Foi preparado previamente um pré-inóculo contendo 50 ml de cultura de Bt da cepa 1641, crescido em meio LB 2% pH 7,3 por 24 horas a 30 °

C e 250 rpm.

Os meios de culturas testados foram preparados em triplicatas, dissolvendo os reagentes em 50 ml de água destilada e homogeneizada com ajuda de agitadores. Os meios de cultura tiveram o pH calibrado para 7,3 e foram distribuídos em frascos erlenmeyer de 250 ml. Após isto os erlenmeyers foram tampados e autoclavados por 25 minutos na temperatura de 120 °C. Após este processo, os meios de cultura foram inoculados com 1 ml do pré-inóculo, colocados no agitador por um período de 72 horas com agitação de 250 rpm e 29,5 °C.

Para realizar os bioensaios com Bt são utilizadas as folhas de milho, principalmente as da região da bainha, sendo as folhas lavadas em água corrente, e em seguida colocadas em contato com o fermentado Bt. São adicionadas algumas gotas de Tween, que funciona como espalhante e adesivo. Para a testemunha, as folhas são imersas em água deionizada também com adição de Tween. Após secas as folhas de milho, são colocadas 25 lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* com 1 dia de vida.

A avaliação da mortalidade foi feita após 72 horas do contato das lagartas com as folhas contaminadas com Bt, contando as lagartas vivas e mortas com sintomas da infecção, comparando com a testemunha sem Bt, obtendo assim ao final a taxa de mortalidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental no laboratório de controle biológico, onde se produziram os meios alternativos de Bt, foram avaliadas a capacidade esporulante dos meios, a produção de massa celular e a eficácia inseticida do agente biológico nos fermentados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Quantidade de esporos totais (ml), massa celular (mg) e percentual de mortalidade (eficácia) de Bt, crescido em diferentes meios de cultivo.

Meios de Cultivo	Esporos totais/ml	Massa celular (mg)	Eficácia inseticida (%) <sup>1</sup>
M1	1,1 x 10 <sup>9</sup> (b) <sup>2</sup>	2,4 (b)	98,3 (a)
M2	8,6 x 10 <sup>8</sup> (a)	2,7 (b)	98,3 (a)
M3	8,7 x 10 <sup>8</sup> (a)	2,6 (b)	99,0 (a)
M4	8,3 x 10 <sup>8</sup> (a)	3,4 (c)	96,3 (a)
M5	1,2 x 10 <sup>9</sup> (b)	3,3 (c)	97,0 (a)
M6	1,1 x 10 <sup>9</sup> (b)	4,3 (d)	99,7 (a)
LB	5,6 x 10 <sup>8</sup> (a)	1,6 (a)	97,0 (a)

<sup>1</sup>Porcentagem de mortalidade de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho infectadas com o biopesticida.

<sup>2</sup>Médias com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott (p = 0,05).

Para obter a massa celular foram retiradas amostras de 1 ml que foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi descartado, e o pellet de células foi liofilizado. O peso seco foi calculado e expresso em mg por ml.

Em relação à esporulação, os meios apresentaram esporulação na faixa de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> esporos totais /ml, sendo os maiores níveis alcançados no cultivo em M1, M5 e M6. O aumento da concentração de fonte de carbono nos meios M5 e M6, em relação ao meio M4, contribuiu para maior esporulação. Esse efeito não ocorreu no meio M2 e M3, em relação a M1.

Todos os meios alternativos produziram mais massa celular comparando com LB. Este parâmetro foi maior nos fermentados que incluíam as diferentes fontes de nitrogênio associadas, com destaque para M6, evidenciado pela maior concentração de fonte de carbono.

Quanto ao potencial biopesticida de Bt, não houve diferença estatística entre os fermentados, que apresentaram índices de mortalidade acima de 96%, entretanto, ao considerar o custo de produção, os meios alternativos propiciaram uma redução de 92,6% (M6) a 96,5% (M1) em relação ao meio LB (Tabela 3). Vale ressaltar que houve redução de mais de 50% do custo entre os meios avaliados, mostrando potencial viabilidade econômica do meio 1 para multiplicação em larga escala do Bt.

**Tabela 3.** Custo de produção dos meios de cultivo (R\$ / Litros)

Meios de Cultivo	Milhocina	Proteína de Soja	Sulfato de Amônio	Glicose	LB	Valor Total
M1	0,015	X	X	0,26	X	0,28
M2	0,015	X	X	0,34	X	0,37
M3	0,015	X	X	0,43	X	0,45
M4	0,006	0,104	0,062	0,26	X	0,43
M5	0,006	0,104	0,062	0,34	X	0,51
M6	0,006	0,104	0,062	0,43	X	0,60
LB	X	X	X	X	8,16	8,16

## CONCLUSÃO

Com este trabalho, pôde-se observar que os meios de cultivo testados são alternativas bastante lucrativas para o cultivo de *B. thuringiensis* em larga escala, produzindo um biopesticida de alta eficácia e com custo de produção significativamente menor em relação ao meio comercial LB.

## REFERÊNCIAS

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2019\\_jan.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_jan.pdf)>. Acesso em: 23 maio 2019.

MOURÃO, A. H. C. **Influência e custos de diferentes meios de cultura para produção de *Bacillus thuringiensis* visando o controle de pragas.** 2017. 31 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

OLIVEIRA, F. Q. de; JACOBSEN, H. G.; ROCHA, D. C. D. da; NEVES, L. de O. Importância da criação de predadores em laboratório para o avanço do conhecimento e da aplicação do controle biológico em sistema de produção agroecológico. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2018.



SILVA, A. B. da; BRITO J. M. de. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.