



Avaliação inseticida do isolado de solo *Lysinibacillus sphaericus* – MSF4 sobre *Spodoptera cosmioides*

Bruna Kanno Tominaga¹, Amanda Leite Moreira², Stéphaney Campos Venâncio², Paula Sayuri Taguti², Emanuele Julio Galvão², Viviane Sandra Alves²

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Rod. BR 369, km 54, Vila Maria, CP 261, CEP 86300-000, Bandeirantes, Paraná (Brunakannotominaga@gmail.com)

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Humanas e da Educação, PR 160, km 0. CEP 86300-000, Cornélio Procópio, Paraná.

RESUMO –O presente trabalho avaliou o potencial inseticida do isolado bacteriano *Lysinibacillus sphaericus* (MSF4), oriundo de solo, sobre a lagarta *Spodoptera cosmioides*, uma praga agrícola significativa. Foram testados quatro tratamentos com o isolado MSF4, incluindo aplicação direta e imersão de dieta. Os insetos tratados foram mantidos em condições controladas, e a mortalidade foi monitorada ao longo de 96 horas. Não foi observada ação inseticida nos tratamentos, sugerindo que o tempo de cultivo utilizado pode não ter sido suficiente para a produção de toxinas efetivas. Outros métodos de cultivo e condições de indução de esporulação são recomendados para futuras investigações.

Palavras-chave: *Lysinibacillus sphaericus*, controle biológico, *Spodoptera cosmioides*, Toxinas entomopatogênicas.

INTRODUÇÃO

O *Lysinibacillus* é um gênero de bactérias que tem sido estudado como agente de controle biológico, especialmente no combate de mosquitos e pragas agrícolas. É uma bactéria Gram-positiva, aeróbica e formadora de esporos, com ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em solos e ambientes aquáticos (Davidson, 1984). Durante o processo de esporulação, essa bactéria produz cristais proteicos que contêm toxinas letais para larvas de algumas espécies de mosquitos, sendo, por isso, classificada como um entomopatógeno (Mittal, 2003).

O uso de *Lysinibacillus* no controle biológico é interessante porque, ao contrário de pesticidas químicos, ele pode ser uma alternativa mais sustentável e menos agressiva ao meio ambiente. As toxinas produzidas por esse gênero bacteriano agem de forma bastante específica, atacando principalmente pragas-alvo, com baixo risco para outros organismos, incluindo humanos, animais domésticos e plantas. Essa especificidade é um dos grandes atrativos de sua utilização em práticas agrícolas e de saúde pública (Berry, 2012).

Em termos de aplicação, a espécie *Lysinibacillus sphaericus* é amplamente utilizada no controle de mosquitos, incluindo espécies do gênero *Culex* e *Anopheles*, que são vetores de doenças como a malária. A bactéria é aplicada em reservatórios de água ou em áreas de reprodução dos mosquitos, onde libera toxinas que atacam as larvas (Lozano, 2013). Além do controle de vetores, estudos estão em andamento para expandir o uso de *Lysinibacillus* contra outras pragas agrícolas.

Diante da eficácia demonstrada pela bactéria no controle de diferentes pragas, este estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial de *Lysinibacillus* como agente de controle biológico específico para *Spodoptera cosmioides*.



MATERIAL E MÉTODOS

O isolado MSF4, proveniente de solo, recentemente identificado como (*Lysinibacillus sphaericus* – MSF4), foi cultivado em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) por 72 h a 35 °C, estático. Para a avaliação inseticida da suspensão bacteriana no *Spodoptera cosmioides*, a suspensão obtida foi utilizada em 4 tipos de tratamentos: 1. Aplicação de 1 mL da suspensão pura diretamente nos insetos; 2. Imersão da dieta na suspensão pura por 2 segundos; 3. Centrifugação a 10000 rpm por 5 min da suspensão bacteriana, seguida pela esterilização por filtração em membranas de nylon de 0,22 µm de poro (Filtrilo) e aplicação de 1 mL diretamente nos insetos; 4. Imersão da dieta no material esterilizado por 2 segundos. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 5 insetos por placa de 90 cm, previamente esterilizadas contendo papel filtro no fundo e um pedaço de 2cm² de dieta adaptada por Parra e Mihsfeldt (1992) com 6 repetições para cada tratamento. Também foram feitos controles do meio TSB e da água. As placas com os insetos submetidos aos tratamentos foram mantidas em câmara climática com fotoperíodo 12h/12h escuro/claro a 25 °C e 50 % de umidade, com avaliação de insetos vivos e mortos após 12h, 24h, 48h, 72h e 96h. A avaliação da mortalidade das lagartas foi realizada visualmente, por meio de inspeção direta, observando-se sinais evidentes de ausência de movimento ou resposta a estímulos. Cada lagarta foi cuidadosamente manuseada utilizando uma pinça esterilizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos períodos analisados não foi observada a ação inseticida dos tratamentos realizados com o isolado MSF4 (Figura 1). Os resultados apresentados representam parte de uma triagem de metodologias e isolados bacterianos com potencial inseticida. Possivelmente o tempo de cultivo de 72 h nas condições descritas não foi suficiente para a produção de toxinas de ação inseticidas, já identificadas em *L. sphaericus*, as quais podem ser produzidas em diferentes fases do desenvolvimento da bactéria (vegetativa ou de esporulação) e por diferentes cepas (Berry, 2012). Na esporulação, toxinas como a binária e a Cry são produzidas, seus cristais proteicos contêm protoxinas, cujo mecanismo de ação ocorre através de ligação a receptores específicos localizados no epitélio intestinal de insetos, semelhante ao *Bacillus thuringiensis* (Bravo et al., 2011), possivelmente a esporulação das células no cultivo realizado não ocorreu. Estratégias como choque térmico, maiores tempos de cultivo podem estimular mais eficientemente a esporulação do isolado utilizado (Lecadet; Blondel; Ribier, 1980).

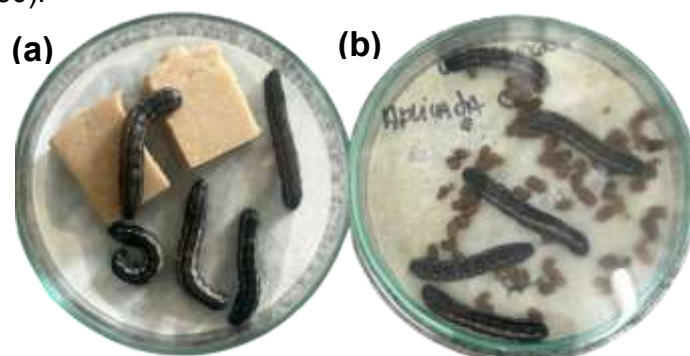


Figura 1. *Spodoptera cosmioides* antes do tratamento (a) e após o tratamento (b).

Além disso, a avaliação de metabólitos livre de células foi realizada pela possibilidade da existência de toxinas como Mtx e Sphaericolisina produzidas durante a fase vegetativa do crescimento, sendo a Sphaericolisina, citolisina dependente de colesterol, identificada por Nishiwaki et al. (2007) por matar baratas e lagartas-cortadeiras *Spodoptera litura*.



Esses tipos de toxinas, principalmente a Mtx podem sofrer degradação por proteases durante o crescimento no meio de cultura para esporulação, subsequente à fase vegetativa de crescimento, fazendo com que elas sejam instáveis e tenham baixa atividade tóxica. O que indica que para a ação dessa toxina requer estratégias como acrescentar inibidores de proteases no cultivo, o que não foi realizado neste estudo, evidenciando que mesmo não observando ação inseticida nos insetos utilizados ainda a cepa isolada de solo apresenta potencial para maiores explorações entomopatogênicas (Wei; Cai; Yuan, 2006; Wirth et al., 2007).

CONCLUSÕES

Não foi observada ação inseticida dos tratamentos realizados com o isolado MSF4. No entanto, outras metodologias de produção da bactéria devem ser avaliadas, na tentativa de induzir a produção de toxinas pela cepa de *L. sphaericus* isolado MSF4.

AGRADECIMENTOS

A UENP pelo espaço e equipamentos para realização do experimento, a Capes pela concessão de bolsa e Fundação Araucária pelo apoio a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v. 109, p. 1–10, 2012.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Amsterdam, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.
- DAVIDSON, E. W. Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: biological aspects which are important to field use. *Mosquito News*, Albany, v. 44, n. 2, p. 147–152 1984.
- LECADET, M. M.; BLONDEL, M. O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. berliner using Bacteriophage CP-54Ber. *Journal of General Microbiology*, London, v. 121, p. 203–212, 1980.
- LOZANO, Lucía C.; DUSSÁN, Jenny. Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 1383-1389, 2013.
- MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: Challenges and prospects. *Journal of Vector Borne Diseases*, Delhi, v. 40, p. 20–32, 2003.
- NISHIWAKI, H. et al. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 73, n. 10, p. 3404–3411, 2007.
- WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than Binary Toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726–730, 2006.
- WIRTH, M. C. et al. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066–6071, 2007.