10º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 28 de novembro a 3 de dezembro de 2016

PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA À BASE DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* EM UBERABA/MG.

Bruno Pereira Santos [1]; Profa. Dra. Ana Maria Guidelli Thuler [2]
[1, 2] Universidade de Uberaba
bruno pereira santos[1] , bpereiira955@gmail.com

Resumo
Dentre os microrganismos empregados no controle biológico de mosquitos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se destaca por apresentar atividade tóxica contra insetos da ordem Díptera (culicídeos e simulídeos), além de possuir vantagens devido à especificidade em relação ao inseto-alvo, por não poluir o ambiente, não ser nociva a fauna e a flora, e não apresentar toxicidade ao homem. Frente a estes benefícios, torna-se inquestionável a viabilidade da produção de um biolarvicida para redução e controle de infestações na cidade de Uberaba. Este trabalho tem como objetivo a produção de um bioinseticida (larvicida) a base da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti* na cidade de Uberaba/MG. A produção foi conduzida nas dependências da Universidade de Uberaba – UNIUBE, em que foi utilizada a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 (*díptero-específica*). O produto fermentado foi utilizado nos bioensaios em uma diluição de 1 L do fermentado em 80 L de água. Os ensaios de mortalidade do mosquito *A. aegypti* foram monitorados e realizados em larvas de 3º e 4º instar. Foi obtida mortalidade de 90% das larvas em 90 minutos, e 100% de mortalidade em 120 minutos. No decorrer do bioensaio, algumas mudanças foram observadas em relação ao comportamento das larvas tais como: redução gradativa dos movimentos e a perda da capacidade de flutuação, quando comparadas à testemunha.

Palavras-chave: Díptera. Biolarvicida. Bioensaio.

1 Introdução

A dengue é uma doença re-emergente que se tornou um grave problema de saúde pública, sendo responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade no Brasil, assim como em outras localidades do mundo. No entanto, a constante transmissão da doença aumentou a preocupação da opinião pública e das autoridades nos diferentes níveis de governo (TAUIL, 2002).

Trata-se de uma arbovirose causada pelo vírus do gênero *Flavivírus*, do qual são conhecidos quatro sorotipos.

A transmissão do agente etiológico ao homem suscetível se dá pela picada do mosquito da espécie *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (Diptera: Culicidae) infectado pelo vírus, sendo esse o principal vetor. É um mosquito de hábitos doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para deposição dos ovos (BRASIL, 2001).

O controle de mosquitos e vetores de endemias é realizado na grande maioria das vezes, pela utilização de inseticidas sintéticos altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, que resulta em consequências graves ao ser humano e ao ambiente, além de possibilitar a seleção de populações de insetos resistentes (VILARINHOS et al., 1998).

Tal fato indica a necessidade de se reduzir o consumo destes produtos, o que pode ocorrer por meio da utilização de alternativas de controle mais eficazes e seguras como o controle biológico utilizando *Bacillus thuringiensis.*

Dentro desse contexto este trabalho tem como objetivo a produção de um bioinseticida (larvicida) a base da bactéria *B. thuringiensis*

var. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti* na cidade de Uberaba/MG.

2 Material e Métodos

A estrutura dos laboratórios de Biopatologia e Microbiologia foram adaptadas para a cultura da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 (*díptero-específica*). Este isolado bacteriano foi cedido pelo Prof. Dr. Manoel Vicor Franco Lemos, do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), UNESP, Jaboticabal-SP.

O isolado *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 recebido foi inoculado em placas, contendo meio de cultura Nutriente Ágar (NA), e incubados em estufa a 30ºC, por cinco dias, até completa esporulação. Após este tempo, foram feitas lâminas para análises do isolado em microscópio óptico para confirmação da presença e do formato dos cristais proteicos, bem como para verificação da presença de possíveis contaminantes. Este procedimento foi constantemente efetuado para assegurar a cultura pura do isolado de *B. thuringiensis.*

Colônias do isolado completamente esporulados foram coletadas e ressuspendidas em 1 ml de água esterilizada. Em seguida, tiras de papéis filtro esterilizadas foram umedecidas nesta suspensão de células e mantidas em fluxo laminar até completa secagem. Após secagem, os papéis de filtro impregnados com esporos do isolado foram estocados em tubos com tampas esterilizados (cinco tiras de papel por tubo), devidamente etiquetados e mantidos em estufa tipo B.O.D a 10 ºC. As fitas de papel contendo esporos da linhagem da bactéria *B. thuringiensis* variedade SPS1 foram imersas em água estéril milli-Q com 24 h de antecedência ao cultivo. Foi retirada uma alíquota da solução de esporos, que foi semeada com alça bacteriológica de platina em placas de Petrintendo meio de cultura NA por 48 h, a 29°C, em câmara incubadora, para o desenvolvimento de colônias isoladas.

A colônia que apresentou desenvolvimento sem contaminantes com células esporuladas, foi transferida do meio sólido para a inoculação do pré-cultivo líquido em 20mL do meio CCY contendo tampão Fosfato 20X, nutriente Stock, sais CCY (500: 100: 10).

O pré-cultivo foi incubado em agitador por um período de 48h a 29°C para um maior desenvolvimento celular. Transcorrido este tempo, 1 ml do pré-inóculo foi transferido para 500 ml do meio CCY e mantido em agitador durante 7 dias para total esporulação da bactéria.

3 Resultados e Discussão

As principais etapas para a produção de *B. thuringiensis* são: seleção da linhagem, estocagem, processo fermentativo, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto e análise da qualidade (MORAES; CAPALBO; F; ARRUDA, 2001; COUCH, 2000).

No caso dos bioinseticidas, a formulação tem três objetivos principais: conferir estabilidade ao produto durante a estocagem e aplicação, facilitar a aplicação do produto e proteger o microrganismo e os cristais das condições adversas do ambiente (BRAR et al., 2006; COUCH, 2000).

Os entomopatógenos microbianos podem ser aplicados puros, isto é, em preparações sem nenhum aditivo, ou podem passar por um processo de formulação visando a sua estabilidade, dispersão, cobertura homogênea e desempenho no campo (BATISTA FILHO *et al.,* 1998).

O meio de produção utilizado ocorre de forma parecida com a fermentação industrial, que utilizam os seguintes passos: pré- inoculo, geralmente feito em frascos pequenos, pré-fermentador, comumente com 1/5 do volume da fermentação e o fermentador final. O pré-inoculo é feito a fim de diminuir o tempo da fase lag, ou seja, o período de adaptação do microrganismo às condições de cultivo, possuindo os mesmos ingredientes.

É importante limitar o número de passos no processo de produção a fim de evitar contaminações e mudanças indesejáveis no comportamento da bactéria (COUCH, 2000; MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 2001).

Do pré-inoculo é retirado 1(um) ml e transferido para o inoculo de 500 (quinhentos) ml. Após 7 dias no agitador o fermentado adquire um aspecto turvo devido a esporulação da bactéria (Figura 1). Durante este processo Foram retiradas amostras para determinar o estado do cultivo. Nestas, observou-se a presença de esporos e cristais. Estes resultados corroboram com Lemos & Sena (2002) (Patente PI0200228-0), no qual relataram que a quantidade de esporos/cristais obtida para o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 foi maior que a da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, obtidas em iguais condições de cultivo e análise.



Figura1- Fermentado no agitador (esquerda). Bioinseticida após 7 dias no agitador, aspecto turvo, esporulação da bactéria (direita).

Segundo Habib & Andrade (1998), a morte das larvas aquáticas de Díptera (culicídeos e simulídeos), ocorre rapidamente (vinte minutos a três horas) quando ingerem a bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14, fenômeno este diferente do observado em larvas da ordem Lepidoptera quando infectadas por *B. thuringiensis* H-3a:3b, cuja morte ocorre dois a três dias após a infecção.

Os ensaios de mortalidade do mosquito *A. aegypti* foram monitorados e realizados em larvas de 3º e 4º instar (Figura 2), sendo a primeira verificação da mortalidade realizada após 60 minutos da aplicação do bioinseticida, 90 minutos e 120 minutos. Foi obtida mortalidade de 90% das larvas em 90 minutos, e 100% de mortalidade em 120 minutos. No decorrer do bioensaio, algumas mudanças foram observadas em relação ao comportamento das larvas tais como: redução gradativa dos movimentos e a perda da capacidade de flutuação, quando comparadas à testemunha.

Quando uma toxina afeta o sistema nervoso e o muscular destas larvas, as incapacita de permanecerem junto à superfície da água com o sifão projetado para fora, onde estas larvas irão afundar e morrer por falta de O_2 e excesso de CO_2 e ácido carbônico nos tecidos (HABIB, 1982 e 1983).



Figura 2- Bioensaio com larvas de 3º e 4º ínstar de Aedes aegypti submetidas aos tratamentos com linhagens e isolado *de Bacillus thuringiensis.*

4 Conclusão

Os bioensaios com larvas de *A. aegypti* revelaram alta eficiência do bioinseticida produzido. Os resultados obtidos neste bioensaio revelam que a utilização de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 no controle

de larvas de vetores importantes em saúde pública é muito promissora, por não provocar impactos ambientais nos locais onde são empregados.

5 Referências

BATRA, C. P.; MITTAL, P. K.; ADAK, T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 16, n. 4, p. 321-323, 2000.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J. F. DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria:** from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 383-398.

BECKER, V.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis,* an environmental biopesticide:** theory and practice. Londres: John Wiley & Sons, 1993. p. 147-169.

BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 163-169, 2007.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B.; SOARES, S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

ROSSI, J. R. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: **Caracterização da região promotora de genes *cry* e efeito em larvas de *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 447-480.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Dengue haemorrhagic fever:** diagnosis, treatment, prevention and control. 2. ed. Geneva, 1997. 84 p. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>. Acesso em: 02 agosto 2007.

ANGELO, E.A.; VILA-BÔAS, G.T.; CASTRO-GÓMES, R.J.H.. ***Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação**. Semana: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, out./dez. 2010.