

Instituto Brasileiro de Pesquisas Agropecuárias - IBRAPA
Instituto do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e
Biotecnologia - CENARGEN
Brasília - Parque Rural - Fincas 1-5 Norte
70770-900 - Brasília, DF

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 15, maio/93, p.1-6

TÉCNICAS SOROLÓGICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E *Bacillus sphaericus*

Simoni Campos Dias¹
Joseilde Oliveira Silva-Werneck²
Rose Gomes Monnerat Schenkel²
Josélia Batista Lopes¹
José Manuel Cabral de Sousa Dias²

INTRODUÇÃO

O Brasil tem sérios problemas com insetos pragas na agropecuária e com vetores de doenças na saúde pública. Quantidades cada vez maiores de inseticidas químicos vêm sendo usadas para controlá-los, causando graves prejuízos ao meio ambiente e à saúde das populações urbanas e rurais e induzindo, com o passar do tempo, resistência, nos insetos, aos princípios ativos utilizados.

O emprego de agentes microbianos de controle biológico tais como bactérias, fungos e vírus constitui-se numa alternativa promissora sob o ponto de vista técnico, econômico e ambiental, a partir do momento em que a ação destes agentes restringe-se tão somente aos insetos alvos não causando efeitos danosos ao ecossistema nem às populações não-alvo e auxilia a produzir alimentos menos contaminados.

¹ Bióloga, Fitopatologista, MS-Bolsista do CNPq

² Enga.-Agra., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Caixa Postal 0.2372, CEP 70849-970, Brasília, DF.

² Bióloga, EMBRAPA/CENARGEN

¹ Bióloga, Bolsista do CNPq

² Dr. em Eng. Química/EMBRAPA-CENARGEN



Desde o começo deste século, sabia-se que *Bacillus thuringiensis* matava lepidópteros. Na década de 1970, foi descoberta uma estirpe dessa bactéria que ataca dípteros e mais recentemente, na década de 1980, também foram encontradas estirpes efetivas contra coleópteros, principalmente crisomelídeos (Dias, 1992).

Na década de 1960, outra bactéria, *Bacillus sphaericus*, teve sua ação entomopatogênica comprovada, mostrando-se letal contra mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. (Dias, 1992).

A taxonomia das bactérias entomopatogênicas principalmente *Bacillus thuringiensis* tem sido alvo de muitos estudos. Foram feitas várias tentativas de classificação, começando pela elaboração de uma listagem de espécies das bactérias, relacionando-as a insetos suscetíveis, passando pelo perfil enzimático, pela morfologia e por reações aos corantes (Steinhaus 1946). Até 1960, essas metodologias mostravam-se pouco apropriadas para uma classificação segura das estirpes isoladas em diversas regiões do globo. Nessa época, de Barjac & Bonnefoi (1962), baseados em substâncias existentes nos flagelos de *Bacillus* entomopatogênicos, introduziram o conceito dos "antígenos H" como elemento diferenciador de estirpes distintas. Este sistema de classificação permitiu grande avanço na sistemática dos bacilos, inicialmente para as subespécies de *Bacillus thuringiensis* e posteriormente para *Bacillus sphaericus* (de Barjac et al, 1980). Atualmente estão descritos para *B. thuringiensis* 31 grupos antigênicos divididos em 37 serovares. Para *B. sphaericus* não são observados grupos antigênicos, sendo relatados 46 serovares para esta espécie (de Barjac et al 1985, de Barjac & Frachon, 1990).

Dentre os trabalhos de maior importância no Laboratório de Bacteriologia, da Área de Controle Biológico do CENARGEN estão o isolamento, a caracterização e a conservação de amostras de *Bacillus* entomopatogênicos. Estes trabalhos, além de preservar os recursos genéticos, buscam novas estirpes melhor adaptadas às condições onde posteriormente poderão ser utilizadas contra pragas da agricultura e insetos urbanos.

No citado laboratório, foram experimentadas várias metodologias para caracterização bioquímica dos isolados bacilares. (Martin & Travers 1989, Travers et al 1987, Guaycurus, 1991). Todavia, devido à variabilidade genética dentro do grupo *Bacillus* estes testes se mostraram inconclusivos. Por outro lado, a sorologia flagelar, que emprega anti-soros produzidos contra antígenos H para a caracterização dos isolados, mostra-se precisa, segura e confiável, sendo amplamente empregada (De Barjac & Frachon, 1990).

As metodologias descritas a seguir resultam de adaptações da metodologia original (de Barjac & Bonnefoi, 1962) e vem sendo utilizadas no Laboratório de Bioquímica e Imunologia da Universidade Autônoma de Nuevo Leon (Monterey, México) para caracterização de sorotipos de *Bacillus thuringiensis*.

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS FLAGELARES

Em um erlenmeyer de 50ml, com 10ml de meio caldo nutritivo (8g/1), inocula-se 2ml do bacilo que se quer caracterizar e que foi crescido em caldo nutritivo por 24 horas. Deixa-se por 8 horas no agitador rotativo (30°C/200 rpm) e passa-se uma alçada deste material para um tubo de Craiger. Este é um tubo de 14 x 1,5cm com tampa, tendo em seu interior outro tubo de vidro vazado de 4 x 0,5cm, que fica com 3/4 do seu comprimento mergulhado em um meio específico para Craiger (Caldo nutritivo 13g/1 e agar 2g/1). Uma alçada é inoculada no centro do tubo vazado, para que as bactérias possam desenvolver seus flagelos, migrem do tubo pequeno e fiquem entre a parede do tubo pequeno e do tubo grande. No primeiro Craiger o material fica entre 15 a 18 horas (30°C) sem agitação quando se pode observar o crescimento bacteriano entre os 2 tubos.

Cuidadosamente retira-se uma alçada do material crescido entre os dois tubos e passa-se para uma outro craiger, sempre inoculando no interior do tubo vazado, deixando a 30°C por mais 12 a 14 horas, até que se observe, como no primeiro, o crescimento bacteriano entre os 2 tubos. Recomenda-se neste estágio fazer uma observação microscópica do material, corando-se com nitrato de prata (Benden & Goldberg, 1965) para observar a presença de flagelos. Caso haja poucos flagelos, passa-se por mais 2 craigers, até que a produção de flagelos seja satisfatória. É importante salientar que todo este procedimento deve ser feito assepticamente em fluxo laminar, com todo o material e meios previamente esterilizados.

Após passar pelos craigers, retira-se do último, massa bacteriana suficiente para inocular 2 erlenmeyers de 500ml com 100ml de meio Caldo Nutritivo em cada, que são incubados por 5 a 8 horas em incubador rotativo (30°C/250 rpm). Findo este tempo, já se observa uma boa turvação do meio. Os conteúdos dos dois frascos são homogeneizados em um único erlenmyer e acrescidos 140ml de salina formalizada (Formol 37% : 6,0ml e NaCl 8,5g por 1 litro).

Deixa-se na geladeira por 12 horas e centrifuga-se a 5000 rpm por 15 minutos. Após descartar o sobrenadante, suspende-se o pellet em salina formalizada, e centrifuga-se novamente nas mesmas condições; descarta-se a salina no qual o material foi centrifugado e ressuspende-se o pellet em 10ml de salina formalizada para armazenamento em tubos de ensaio com tampa de rosca.

Seguindo a metodologia descrita, os antígenos flagelares são produzidos em aproximadamente uma semana, podendo ser estocados a 4°C por até 5 anos e utilizados em mais de 100 reações antígeno/anti-soro.

PRODUÇÃO DE ANTI-SOROS FLAGELARES

Os antígenos produzidos são diluídos em salina formalizada até a escala 3 de Mac Farland (aproximadamente 300×10^9 cel/ml) e inoculados na

veia marginal de dois coelhos brancos (3 a 6 meses de idade) previamente identificados. O primeiro inóculo é de 0,5ml e após 9 dias inocula-se novamente 1ml com a mesma suspensão de antígenos diluídos. O terceiro inóculo de 2ml é feito 6 dias após o segundo e o quarto e último é de 3ml, 3 dias após o terceiro.

A sangria da veia mediana da orelha ou intra-cardíaca, é realizada 1 semana após o último inóculo. Retirado o soro é feita titulação do mesmo em 11 diluições finais que vão de 100 a 25.600 vezes e adiciona-se azida sódica (0,3% na concentração final). As diluições são divididas em alíquotas de 1 ml e liofilizadas. Nestas condições o soro poderá ser armazenado por até 5 anos, com pequena perda de título.

REAÇÕES ANTÍGENOS/ANTI-SOROS

Os antígenos flagelares são diluídos em salina formalizada até à escala 3 de MacFarland. Simultaneamente, os anti-soros são diluídos a 1:10; 1:20 e 1:40 e coloca-se 0,1ml de cada uma dessas diluições em tubos de ensaio, adicionando-se, em seguida, 0,9ml da suspensão de antígeno a ser testado.

Após 2 horas de incubação a 37°C, em estufa ou banho-maria, faz-se a leitura dos resultados. A reação é considerada positiva quando a suspensão está límpida, com um sedimento floculento e granular no fundo do tubo. Para confirmação, o resultado deve ser comparado com a reação de aglutinação do antígeno com seu anti-soro homólogo, este já conhecido.

São utilizados, ainda, 2 tubos para controles negativos: um para antígeno, outro para anti-soro. No primeiro coloca-se 0,9ml do antígeno diluído e 0,1ml de solução salina e havendo aglutinação, esta metodologia não pode ser aplicada, pois trata-se de uma estirpe auto-aglutinante. No segundo tubo coloca-se 0,1ml do anti-soro que se está experimentando, diluído a 1:10, e 0,9ml de solução salina; caso haja aglutinação, o anti-soro deve ser descartado.

RESULTADOS INICIAIS

Este trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia da Área de Controle Biológico é pioneiro na América do Sul. Em um período de 6 meses já foram produzidos antígenos e anti-soros das seguintes subespécies de *B. thuringiensis*: *thuringiensis* (H1), *endomocidus* (H6), *morrisoni* (H8a8b), *kenyae* (H4a4c), *tolworti* (H9), *israelensis* (H14).

Foram caracterizados por esta técnica 5 estirpes de bacilos isolados de diversas regiões do Brasil, pertencentes aos seguintes sorogrupos: *kenyae* (2 isolados), *kurstaki*, *entomocidus*, *tolworti*.

Alguns antígenos preparados com isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* não reagiram com nenhum dos 37 anti-soros padrão recebidos do

Instituto Pasteur (Paris, França). Estes antígenos serão, provavelmente, enviados a esse Instituto para caracterização, podendo tratar-se de novos sorogrupos de *B. thuringiensis*.

Usando metodologias semelhantes às descritas para *B. thuringiensis* foram também caracterizados sorologicamente 31 isolados brasileiros de *Bacillus sphaericus* tóxicos contra o mosquito urbano (*Culex quinquefasciatus*), sendo que todos pertencem ao sorotipo H5 (Schenkel et al, 1991).

RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista que a sorologia flagelar é hoje mundialmente utilizada para a classificação de bacilos entomopatogênicos, recomenda-se que as metodologias aqui descritas para a produção de antígenos e anti-soros e para a realização das provas imunológicas sejam adotadas pelos diversos laboratórios brasileiros que conduzem pesquisas em isolamento, identificação e classificação de tais bactérias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Drs. Huguet de Barjac e Luc Nicolas do Instituto Pasteur e Luiz Galan-Wong, Cristina Rodriguez Padilla e Eugenio Roman Calderon pelos treinamentos concedidos e ao Instituto de Saúde do Distrito Federal, na pessoa do seu Diretor, Dr. Belchior Carlos de Godoy, pela cessão dos coelhos para produção de anti-soros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDEN, D.C.; GOLDBERG, H.S. Silver impregnation stain for leptospira and flagella. Journal of Bacteriology, v.89, n.3, p.899-900, 1965.
- de BARKAC. H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sorologique de *Bacillus* de type *B. thuringiensis*. Entomophaga, v.23, n.1, p.233-229, 1962.
- de BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga, v.35, n.2, p.233-240, 1990.
- de BARJAC, H.; THIERY, I.; DUMANOUR, V.; RIPOTEAU, H. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity to mosquito larvae. Applied Microbiology and Biotechnology, v.21, p.85-90, 1985.
- de BARJAC, H.; VERON, M.; DUMANOIR, V.C. Characterization biochimique et sorologique de souches de *Bacillus sphaericus* pathogènes ou non pour les moustiques. Annales de Microbiologia, B, v.131, p.191-201, 1980.

- DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.27, p.59-76, 1992. Número Especial.
- GUAYCURUS, T.V. Caracterização de isolados brasileiros de Bacillus thuringiensis e clonagem molecular do gene cry do Bacillus thuringiensis israelensis. Brasília: Universidade de Brasília, 1991, 169p. Dissertação de Mestrado.
- MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R.S. Worldwide abundance and distribution of Bacillus thuringiensis isolates. Applied and Environmental Microbiology, v.55, n.10, p.2437-2442, 1989.
- SCHENKEL, R.G.M.; DIAS, S.C.; LOPES, J.B. Sorologia de Bacillus sphaericus. Revista de Microbiologia, v.22, n.3, p.187, 1991.
- STEINHAUS, E.A. An orientation with respect to members of genus Bacillus pathogenic for insects. Bacteriological Reviews, v.10, p.51-61, 1946.
- TRAVERS, R.S.; MARTIN, P.A.; REICHELDELFER, C.T. Selective process for efficient isolation of soil Bacillus. Applied and Environmental Microbiology, v.53, n.6, p.1263-1266, 1987.