

Isolamento, Identificação e Caracterização Entomopatogênica de Bacilos de Diferentes Regiões do Brasil

Silvânia Ferreira da Silva¹

José Manuel Cabral de Sousa Dias²

Rose Gomes Monnerat³

Introdução

Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos são poucas aquelas que podem ser utilizadas no controle biológico de pragas da agricultura e de vetores de doenças tropicais. Dentre estas podemos destacar *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis*.

B. sphaericus é uma bactéria gram-positiva, com células vegetativas em forma de bastonete que tem como uma das principais características a presença de esporos esféricos que deformam o esporângio, dando-lhe forma de raquete. Essa espécie é de ampla distribuição, podendo ser isolada a partir de amostras de solo, água e larvas de insetos mortos. Esta bactéria tem se mostrado efetiva, tanto em bioensaios de laboratório, como em aplicações em campo, contra larvas de *Anopheles* spp. (vetor do protozoário causador da malária) e de *Culex* spp. (mosquito urbano), mas pouco ou nada eficientes contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (transmissor da dengue) e de simúlideos (transmissores da oncocercose). Desde a descoberta (Neide, 1904) muitas estirpes de *B. sphaericus* têm sido isoladas e armazenadas (Monnerat et al., 2001a).

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, cujos esporos são entre elípticos e cilíndricos, em posição central com um esporângio distendido. Durante o processo de esporulação forma cristais protéicos intracelulares, que permitem diferenciar essa espécie de *Bacillus cereus*. Estirpes desta bactéria de *B. thuringiensis* têm apresentado patogenicidade contra larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros (Monnerat & Bravo, 2000).

As citadas espécies bacilares apresentam alta variabilidade genética e estão amplamente distribuídas na natureza, tendo sido isoladas a partir de amostras coletadas em quase todos os ambientes onde foi procurada. No entanto, a distribuição ecológica e relações taxonômicas permanecem ainda em discussão (Vilas Bôas, 2002).

Com a finalidade de conhecer um pouco melhor a distribuição espacial dessas bactérias foi realizado um trabalho de isolamento, identificação e caracterização de bacilos entomopatogênicos processando-se amostras de solos coletadas em todas as regiões do Brasil.

¹ Bióloga, MSc UCB, estagiária Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF).

² Eng. químico, Dr., Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF).

³ Bióloga, Dra., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). E-mail: rose@cenargen.embrapa.br

Materiais e Métodos

Isolamento: O método utilizado foi o descrito pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1985), que consiste basicamente em submeter as amostras a choque térmico (80°C por 12 minutos/ gelo por 5 minutos) e em seguida ao plaqueamento. Após 48 horas à temperatura de 30°C, as colônias são visualizadas.

Identificação: a identificação inicial dos isolados foi realizada através do crescimento diferencial em meio ágar nutritivo com penicilina (100 mg/l) ou estreptomicina (25 mg/l) e de microscopia a fresco em contraste de fases. Os isolados que cresceram em meio com penicilina foram identificados como *B. thuringiensis* ou *B. cereus*. Os isolados que cresceram nas placas com estreptomicina foram classificados como *B. sphaericus*. A análise realizada em microscopia de contraste de fases permitiu a observação da presença de inclusões cristalinas em alguns isolados que foram assim identificados como *B. thuringiensis* (Silva-Werneck & Monnerat, 2001; Monnerat et al., 2001a)

Testes de patogenicidade: Todas as estirpes de *B. sphaericus* foram testadas contra dípteros das espécies *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). As estirpes de *B. thuringiensis* foram testadas contra os dípteros *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*, os lepidópteros *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e coleóptero *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Para realização dos ensaios de patogenicidade os bacilos foram cultivados em meio NYSM (Kalfon et al., 1983), por 48 horas em agitador rotativo a 200 rpm e temperatura de aproximadamente 30°C.

Bioensaios com dípteros: Os bioensaios foram realizados seguindo a metodologia descrita por Monnerat et al., (2001a). Colocou-se 01 ml do cultivo final da cultura de cada estirpe de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*, com larvas de segundo estágio de *C. quinquefasciatus* ou *A. aegypti* em copos descartáveis de 200 ml contendo 100 ml de água destilada e 25 larvas dos referidos insetos. Foram feitas duas repetições por estirpe e um copo foi deixado sem adição bactéria, como testemunha. Após 48 horas foi realizada a leitura dos resultados.

Bioensaios com lepidópteros: nos bioensaios com lepidópteros seguiu-se a metodologia descrita por Silva-Werneck & Monnerat (2001).

A. gemmatalis: Os bioensaios foram realizados espalhando-se 150 ml de cada cultura completamente

esporulada de *B. thuringiensis* na dieta (sem anticontaminantes) previamente distribuída em copos descartáveis de 50 ml. A cultura bacteriana foi absorvida pela dieta e em seguida 10 larvas de segundo estágio foram colocadas em cada copo. Um copo sem a bactéria foi deixado como controle. Foram feitas duas repetições para cada isolado. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as larvas vivas foram transferidas para novos copos contendo dieta de criação sem a bactéria. No quinto dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura.

S. frugiperda: Os bioensaios foram realizados espalhando-se 30 ml da cultura completamente esporulada de *B. thuringiensis* na dieta previamente distribuída em placas de cultura de células com 24 poços. A cultura bacteriana foi absorvida pela dieta e em seguida 1 larva de segundo estágio foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a bactéria, como controle. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, quando então as larvas vivas foram transferidas para copos descartáveis de 50 ml contendo dieta de criação sem a bactéria. No quinto dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura.

Bioensaios com coleóptero: Os bioensaios contra *T. molitor* foram realizados através da mesma metodologia empregada para *A. gemmatalis* (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

Armazenamento de bacilos: Todos os isolados foram armazenados e catalogados no Banco de *Bacillus* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Monnerat et al. 2001b).

Resultados e Discussão

Foram processadas 23 amostras de solos da região Centro-Oeste, 35 da região Norte, 68 da região Nordeste, 9 da região Sul e 9 da região Sudeste do Brasil (Tabela 1). Foram obtidos 846 isolados, sendo 160 oriundos da região Centro-Oeste, 212 da região Norte, 284 da região Nordeste, 83 da região Sudeste e 108 da região Sul (Tabela 1). O número de isolados por amostra variou entre as regiões, sendo que na região Sul observou-se o maior número de estirpes por amostras (12,0). Em ordem decrescente, vieram as regiões Sudeste (9,2), Centro-oeste (6,9), Norte (6,0) e Nordeste (4,1) (tabela 1).

Após o crescimento diferencial em antibióticos e observação microscópica, foram identificadas 77 estirpes de *B. thuringiensis* (9,1% do total de estirpes obtidas) e 43 estirpes de *B. sphaericus* (5,1%) oriundas de todas as regiões (tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de amostras coletadas, de estirpes obtidas, proporção de estirpes por amostra, quantidade e porcentagem de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* isoladas oriundas de diferentes regiões geográficas do Brasil.

Regiões	No. de amostras processadas	No. de estirpes obtidas	Proporção de estirpes / amostra	No. de <i>B. sphaericus</i>	% de <i>B. sphaericus</i>	No. de <i>B. thuringiensis</i>	% de <i>B. thuringiensis</i>
Norte	35	212	6,0	12	5,6	14	6,6
Nordeste	68	284	4,1	7	2,4	48	16,9
Centro-Oeste	23	160	6,9	6	3,7	4	2,5
Sudeste	9	83	9,2	7	8,4	6	7,2
Sul	9	108	12,0	11	10,1	5	4,6
Total	144	847	5,8	43	5,1	77	9,1

A porcentagem de estirpes de *B. sphaericus* em relação ao total de estirpes obtidas foi maior na região Sul (10,0%), seguido das regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Nordeste, apresentando porcentagens respectivas de 8,4, 5,6, 3,7 e 2,4% (tabela 1). De 43 estirpes obtidas, 7 foram patogênicas ao mosquito *C. quinquefasciatus* e nenhuma ao mosquito *A. aegypti* (tabela 2). Esses dados são coerentes com a informação anteriormente publicada, que relata a baixa porcentagem de estirpes de *B. sphaericus* tóxicas a insetos (Nicolas, 1987) e a pouca ou baixa susceptibilidade de *A. aegypti* a esta espécie de bacilo (World Health Organization, 1985).

Tabela 2. Quantidade de estirpes de *B. sphaericus* tóxicas contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* oriundas de diferentes regiões.

Regiões	<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>A. aegypti</i>
Norte	1	-
Nordeste	1	-
Centro-oeste	5	-
Sudeste	-	-
Sul	-	-
Total	7	-

A maior porcentagem de *B. thuringiensis* foi obtida a partir de amostras oriundas do Nordeste (16,9%), seguida das regiões Sudeste (7,2%), Norte (6,6%), Sul (4,6%) e Centro-oeste (2,5%) (tabela 1). Das 77 estirpes isoladas 39 (50,6%) apresentaram toxicidade a algum dos insetos testados, sendo que 32 (41,5%) foram patogênicas a

Tabela 3. Quantidade e porcentagem de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas contra *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti*, *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *T. molitor*. oriundas de diferentes regiões

Regiões	<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>A. aegypti</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>T. molitor</i>
Norte	-	-	4	2	-
Nordeste	-	4	22	-	-
Centro-oeste	2	-	2	-	-
Sudeste	1	2	1	-	-
Sul	-	1	3	2	1
Total	3 (3,8%)	7 (9,0%)	32 (41,5%)	4 (5,1%)	1 (1,2%)

A. gemmatalis, 4 (5,1%) a *S. frugiperda*, 7 (9,0%) a *A. aegypti*, 3 (3,8%) a *C. quinquefasciatus* e apenas 1 (1,2%) ao coleóptero *T. molitor* (tabela 3). Esses dados são compatíveis com os publicados por Bravo et al. (1998), Ben-Dov et al. (1997) e Chak et al. (1994) que demonstraram que os genes codificadores de proteínas tóxicas a lepidópteros são os mais abundantes em outras coleções de *B. thuringiensis*. Bravo et al. (1998) também encontraram que 21,5% das estirpes analisadas continham genes codificadores de proteínas tóxicas a coleópteros e 7,9% a dípteros, que diferem dos dados obtidos neste trabalho e nos de Ben-Dov et al. (1997) e Chak et al. (1994). Ambos autores encontraram estirpes com genes codificadores de proteínas Cry4 (tóxico a dípteros) e não encontraram genes codificadores de proteínas Cry3, efetivas a coleópteros.

É importante assinalar que devido à grande diversidade ecológica entre as regiões brasileiras e mesmo dentro delas, é necessário promover atividades sistemáticas de coleta e caracterização de bacilos entomopatogênicos em busca de estirpes com novos genes ou novas características de patogenicidade. Finalmente, cumpre ressaltar que as estirpes depositadas no Banco de Germoplasma de Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia poderão ser cedidas para fins de pesquisa e experimentação mediante assinatura de Termo de Transferência de Materiais (TTM), segundo a legislação em vigor.

Referências Bibliográficas

- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, A. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, 1997.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.
- CHAK, K.-F.; CHOW, C.-D.; TSENG, M.-Y.; KAO, S.-S.; TUAN, S.-J.; FENG, T.-Y. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 2415-2420, 1994.
- KALFON, A.; LARGET-THIERY, I.; CHARLES, J.F.; DE BARJAC, H. 1983. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 168-173, 1983.
- MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.): **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.163-200.
- MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; WERNECK, J. O. S., DIAS, J. M. C. de S. **Métodos de coleta, isolamento, caracterização e armazenamento de estirpes de *Bacillus sphaericus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001a. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 9).
- MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001b. 65 p.
- NEIDE, E. **Botanische Beschreibung einiger sporenbildenden Bacterien**. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt., v. 12, p. 1, 1904**
- NICOLAS, L. *Bacillus sphaericus*, larvicide anti-moustiques: persistence et recyclage des spores, role des proteases dans la specificité et le mecanisme d'action de la toxine. **1987. 191 p. Tese (Doutorado) - Université de Compiègne, França.**
- SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 10).
- VILAS BÔAS, G. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus***. 2002. 102 p. **Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.**
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Geneva: UNDP: World Bank: WHO, 1985. 24p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

Comunicado Técnico, 70

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) - Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Miraci de Arruda Câmara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Priscila Rocha Silveira

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva