

Comparação entre três Métodos de Isolamento de Bacilos Entomopatogênicos

Bacillus thuringiensis e *Bacillus sphaericus* são duas bactérias de grande importância em controle biológico de insetos. Ambos são bastonetes gram positivos, da família *Bacillaceae*, que produzem no momento de sua esporulação inclusões protéicas cristalinas. Estas inclusões, também chamadas cristais, contêm proteínas que são produzidas sob a forma de protoxinas, as quais são transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto, pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (Aronson et al., 1986).

Uma das vantagens na utilização desses bacilos é sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986). Produtos à base destas bactérias são comercializados há mais de cinquenta anos. Esses bacilos têm ampla distribuição, podendo ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres.

A variabilidade genética dos *B. thuringiensis* é muito grande. Seu cristal protéico pode ser constituído por uma ou mais delta-endotoxinas diferentes, que podem ser patogênicas a insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (Edwards et al., 1990; Feitelson et al., 1992). Até o momento estão descritos 150 membros da família dessas toxinas, classificados em 40 grupos (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt). No caso do *B. sphaericus* estão descritas duas toxinas que agem em conjunto (toxina binária) (Baumann et al., 1987) e uma terceira toxina de 100 kDa, chamada MTX, cuja atividade mosquitocida não é muito significativa (Thanabulu et al., 1991).

No mundo inteiro pesquisadores buscam novas estirpes de *B. thuringiensis* e de *B. sphaericus*, capazes de produzir novas toxinas, ou que sejam eficazes para o controle de outros organismos (Monnerat et al., 2001b). Estima-se que existam atualmente cerca de 40.000 estirpes conhecidas.

Diferentes metodologias estão descritas para o isolamento de estirpes de *B. thuringiensis* e de *B. sphaericus* (World Health Organization, 1985, Travers et al., 1987). Esse trabalho teve como objetivo selecionar, dentre as metodologias publicadas, uma que possibilitasse uma boa capacidade de recuperação de estirpes de *B. thuringiensis* e de *B. sphaericus*. Para isso, 50 amostras de diferentes regiões do Brasil foram coletadas e três metodologias foram estudadas (métodos A, B e C).

- **Método A ou método da Organização Mundial de Saúde:** Um grama de solo de cada amostra foi colocado em tubos estéreis com 10 ml de solução salina e agitado em vortex por 2 minutos. Em seguida, 1,5 ml foi transferido para eppendorf estéril e submetido a aquecimento por 12 minutos a 80°C e 5 minutos no gelo. As amostras foram então diluídas 1000 vezes em solução salina estéril, semeadas em placas de Petri contendo meio ágar nutritivo e incubadas a 30°C por 48 horas. Após a incubação as colônias isoladas de *Bacillus* spp. foram selecionadas (World Health Organization, 1985).
- **Método B ou da filtração em algodão:** Um grama de solo de cada amostra foi colocado em tubos estéreis com 10 ml de solução salina e agitado em vortex por 2 minutos. Esta suspensão foi submetida a filtração em algodão-gaze estéril. Em seguida, 1,5 ml foi transferido para eppendorf estéril e submetido a aquecimento por 12 minutos a 80°C e 5 minutos no gelo. As amostras foram então diluídas 1000 vezes em solução salina estéril, semeadas em placas de Petri contendo meio ágar nutritivo e incubadas a 30°C

Brasília, DF
Novembro, 2002

Autores

Silvânia Ferreira da Silva

Bióloga, M.Sc. UCB,
estagiária Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia (Brasília-DF)

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Eng. Químico, PhD,
Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia
(Brasília-DF)

Rose Gomes Monnerat

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

por 48 horas. Após a incubação as colônias isoladas de *Bacillus* spp. foram selecionadas (World Health Organization, 1985, modificado).

- **Método C ou do acetato:** Um grama de solo de cada amostra foi colocado em meio 2L (Luria Bertani) com tampão acetato de sódio 0,5M (pH 6,8) e agitado por 12-15 horas. Em seguida, 1,5 ml da suspensão foi transferido para eppendorf estéril e submetido a aquecimento por 12 minutos a 80°C e 5 minutos no gelo. Essa suspensão foi então inoculada em meio L e agitada por 24 horas. As amostras foram diluídas 1000 vezes em solução salina (0,85%), semeadas em placas de Petri contendo meio L-ágar e incubadas a 30°C por 48 horas. Após a incubação as colônias isoladas de *Bacillus* spp. foram selecionadas (Travers et al., 1987).

Identificação de Bacilos: Efetuou-se a identificação inicial dos isolados através do crescimento diferencial em meio NYSM (Kalfon et al., 1983) 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* e os isolados que cresceram nas placas contendo estreptomicina foram classificados como *B. sphaericus* (Monnerat et al., 2001a). A diferenciação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* foi efetuada através da presença de cristais protéicos visualizados em microscopia de contraste de fases (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

O número de estirpes obtidas em cada método utilizado foi bastante diferente, sendo que o método A recuperou mais colônias que os métodos B e C (tabela 1). Para o isolamento de estirpes de *B. thuringiensis*, o método A foi o melhor, recuperando 28 estirpes, seguido pelos métodos B, com 16 isolados e C, com 8 isolados. Esse resultado chama atenção, pois segundo Travers et al. (1989) o método C recupera *Bacillus thuringiensis* com grande eficiência.

Os *B. sphaericus*, entretanto, foram isolados em maior número, quando o método C foi empregado, tendo sido obtidos 52 isolados. É interessante observar que a porcentagem de colônias obtidas dos dois bacilos variou

entre 6,4 e 10,3% nos três métodos, com exceção da porcentagem de *B. sphaericus* obtido pelo método C (41,9%) (tabela 1). Massie et al. (1985) demonstraram que muitas estirpes de *B. sphaericus* desenvolveram-se bem em meios de cultura com acetato como única fonte de carbono. Esta pode ser uma explicação para o elevado número de estirpes obtidas através deste método.

A diferença de resultados obtidos no método B em relação ao A pode ter sido devido à retenção de esporos pela gaze utilizada para filtração no método B.

A comparação dos resultados permitiu concluir que deve-se direcionar o método de isolamento em função da espécie que se deseja obter, ou seja, para o isolamento de *B. thuringiensis* deve-se empregar o método A (método da Organização Mundial de Saúde) e para o isolamento de *B. sphaericus* o método C (método do acetato).

Referências Bibliográficas

- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W. Y.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24, 1986.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; BOWDITCH, L.; BROADWELL, A. H. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *B. sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 163, p. 738-747, 1987.
- EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. **Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes**. U.S. Patent 4,948,734. 1990.
- FEILTELSON J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.
- KALFON, A.; LARGET-THIERY, I.; CHARLES, J. F.; DE BARJAC, H. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotecnology**, v. 18, p. 168-173, 1983.

Tabela 1. Distribuição regional das amostras processadas na comparação de métodos de isolamento.

Microrganismos	Método A		Método B		Método C	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
<i>B. thuringiensis</i>	28	10,3	16	8,8	8	6,5
<i>B. sphaericus</i>	28	10,3	16	8,8	52	41,9
Outros bacilos	217	79,4	149	82,4	64	51,6
Total	273	100	181	100	124	100

MASSIE, J.; ROBERTS, G.; WHITE, P. J. Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from oil by use of acetate as the only major source of carbon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, Washington, DC, p. 1478-1481, 1985.

MONNERAT, R.; SILVA, S.; SILVA-WERNECK, J.; DIAS, J. M. C. 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. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001b. 65p (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos 60)..**

SILVA-WERNECK, J; MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001a. 4p (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 10).**

TRAVERS, R. S; MARTIN, P. A.W.; REICHELDERFER, C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 53, p. 1263-1266. 1987.

THANABULU, T.; HINDLEY, J.; JACKSON-YAP, J.; BERRY, C. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, p. 2276-2285, 1991.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, CA, v. 40, p. 549-576, 1986.

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).

Circular Técnica, 14

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

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva