

Boletim de Pesquisa 194

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 340

Dezembro,2007

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*
COLETADAS EM SOLOS DO OESTE
BAIANO**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 194

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* COLETADAS EM SOLOS DO OESTE BAIANO

C. T. Morinaga
L. B. Praça
V. M. Melatti
P. T. Medeiros
E. M. Soares
V. F. Dumas
R. Falcão
R. G. Monnerat

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

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 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

- I 85 Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* coletadas em solos do Oeste Baiano / C. T. Morinaga ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
26 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 194).

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Inseticidas. 3. Controle biológico - insetos. I. Morinaga, C. T. II. Série.

632.96 - CDD 21.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* COLETADAS EM SOLOS DO OESTE BAIANO

Morinaga, C. T.¹
Praça, L. B.²
Melatti, V. M.
Medeiros, P. T.
Soares, E. M.
Dumas, V. F.
Falcão, R.³
Monnerat, R. G.⁴

Resumo

A cada dia, mais produtos químicos são utilizados para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas na agricultura mundial. Além de onerar o custo de produção, estes produtos causam também diversos danos ao homem e ao meio ambiente. Para contornar essa situação, o controle biológico surge como uma alternativa viável, e *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se destaca como o principal microrganismo com potencial para controlar insetos de importância agrônômica como *Anthonomus grandis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda*. Neste trabalho foram testadas 21 estirpes isoladas de solos da região oeste da Bahia, para verificar a efetividade no controle dos insetos praga acima citados. Foram realizados bioensaios seletivos para selecionar as estirpes que apresentassem mortalidade igual ou superior a 75% contra os insetos-alvo. As estirpes selecionadas foram submetidas a bioensaios de dose a fim de se obter a CL₅₀. A estirpe S2186 foi eficaz contra três insetos da ordem Lepidoptera, matando 75%, 80% e 100% das larvas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella*, respectivamente. Nenhuma estirpe causou mortalidade acima de 75% contra *A. grandis*. 80% e 100% das larvas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella*, respectivamente. Nenhuma estirpe causou mortalidade acima de 75% contra *A. grandis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, inseticidas, controle biológico, insetos.

¹ Bióloga, M.Sc, doutoranda Universidade Federal do Rio de Janeiro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Analista. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

Each day more chemical insecticides are used for the control of pests, plant illness and weeds in the world agriculture. Besides raising the price of the production cost, these products even cause many damages to the man and to the environment. To go round this situation, the biological control comes out as a viable alternative, and the *Bacillus thuringiensis* (Bt) appear as the main microorganism capable to kill important agronomic insects as *Anthonomus grandis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella* and *Spodoptera frugiperda*. This work had tested 21 strains isolated form soils of west Bahia region to verify if any of them had high pathogenicity to the target insects. It was observed that only one had efficiency against three insects of the Lepidoptera order and none of them caused significant death in boll weevil (Order: Coleoptera). The aim of this work was to isolate and characterized strains of Bt collected in soil of west Bahia.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, insecticides, biological control, insects.

Introdução

O Brasil é um país que possui vocação agrícola natural. Apresenta um clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta. Possui uma área agricultável de 388 milhões de hectares, dos quais 90 milhões ainda não foram explorados. O agronegócio representa 33% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, 42% das exportações totais e 37% dos empregos gerados no país (BRASIL, 2006).

A produção agropecuária brasileira é uma das maiores do mundo. Isso se deve não somente às características edafoclimáticas do país, mas também à utilização de tecnologias avançadas e à modernização da atividade rural.

Porém, mesmo com a alta tecnificação da agricultura, grandes são as perdas devidas ao ataque de pragas, o que leva ao uso indiscriminado de inseticidas químicos. Esse uso abusivo causa diversos problemas tanto ao homem quanto ao meio ambiente, e leva ainda ao aparecimento de populações de insetos resistentes.

Existem alguns insetos que atacam culturas de grande importância no Brasil, que muitas vezes podem inviabilizar o cultivo por serem pragas chaves na agricultura, são eles:

Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae) em algodão, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) na soja, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em brássicas e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) atacando principalmente o milho.

O bicudo do algodoeiro, *A. grandis* chegou ao Brasil em 1983 (GALLO et al., 2002) e seu ataque chegou a inviabilizar o cultivo do algodão em diversas regiões do país, e em especial na região nordeste. A época de maior ataque do bicudo ocorre entre os 50° e o 90° dia após a emergência. O custo de produção do algodão é muito alto, devido à intensa utilização de produtos químicos no controle desta praga. (GONDIM et al., 2001).

Outra praga de grande importância no Brasil é *A. gemmatalis*, principal praga da cultura da soja e é conhecida popularmente como lagarta da soja. Esta praga ataca a cultura durante a fase vegetativa e, em alguns casos, na floração, chegando a ocasionar 100% de destruição foliar (GAZZONI e YORINIORI, 1995).

Pode-se ainda mencionar a traça-das-cruíferas, *P. xylostella*, principal praga que ataca as brássicas e causa sérios danos nos plantios de couve, couve-flor e repolho. Esta praga se alimenta das folhas reduzindo sua área e impedindo um bom desenvolvimento destas plantas. (CASTELO BRANCO, 1999).

No Brasil, *S. frugiperda*, conhecida como lagarta do cartucho do milho, ataca não somente o milho, mas também diversas outras culturas, ocasionando reduções de produtividade superiores a 30% (CRUZ et al., 1999).

O uso indiscriminado de inseticidas químicos para o controle dessas e de outras pragas causa diversos problemas de ordem ambiental e humana. Como alternativa aos inseticidas,

surge o controle biológico como uma importante ferramenta para o controle de insetos-praga, pois além de não poluir o ambiente, não causa danos ao homem e não destrói a fauna benéfica.

Dentre os agentes de controle biológico de ocorrência natural, merecem especial destaque à espécie *Bacillus thuringiensis*, utilizada como princípio ativo para bioinseticidas, já produzido e vendido em todo o mundo para o controle de insetos-praga.

O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar novas estirpes de *B. thuringiensis* provenientes de solo da região Oeste da Bahia contra *Anthonomus grandis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella*, e *Spodoptera frugiperda*, e, em seguida, caracterizá-las através de métodos moleculares, bioquímicos e ultra-estruturais.

Materiais e Métodos

2.1 Coleta das amostras de solo e Isolamento das estirpes

As amostras de solo foram coletadas em duas fazendas de produção de grãos na região de Correntina – Bahia, com o auxílio de uma espátula e armazenadas em tubos tipo eppendorf esterilizados. Todos os solos estavam secos, e retirou-se apenas uma pequena quantidade da camada mais superficial do solo. As áreas foram escolhidas ao acaso, e em locais próximos à sede da fazenda. O isolamento das estirpes foi realizado segundo o método da Organização Mundial da Saúde (WORLD..., 1987).

Primeiramente colocou-se 1 g do solo em um eppendorf e adicionou-se 1 mL solução salina estéril. As soluções foram homogeneizadas e submetidas a choque térmico (80 °C por 12 minutos / gelo por 5 minutos). Em seguida foram plaqueadas em dois meios NYSM com antibiótico (YOUSTEN, 1984) (com modificações na composição dos sais) e incubadas por 24 horas. Um meio acrescido de penicilina numa concentração de 100 mg/mL e o outro acrescido de estreptomicina numa concentração de 25 mg/mL

Após 24 horas, as placas foram levadas ao contador de células para verificar a formação de colônias. As colônias crescidas em penicilina com tamanho médio de aproximadamente de 0,5 cm, cores esbranquiçadas, opacas e bordas irregulares foram identificadas como típicas de *B. thuringiensis* ou *B. cereus* e as que cresceram em estreptomicina, mais arredondadas e amareladas foram identificadas como *B. sphaericus*. Depois de identificadas e selecionadas, foram inoculadas em meio líquido NYSM por 48 a 72 horas em incubador rotativo, a 28°C e 200 rpm.

Após completa esporulação, uma gota da suspensão bacteriana foi colocada em lâmina para a realização de microscopia de contraste de fases para observação da presença de células vegetativas, esporos e cristais. Esse procedimento foi feito principalmente, para

caracterizar e confirmar se as estirpes eram de *Bacillus thuringiensis* ou de *Bacillus sphaericus*.

2.2 Caracterização Entomopatogênica das estirpes

Foram realizados dois tipos de bioensaio: o seletivo para avaliar a patogenicidade da estirpe isolada e o de dose para calcular a CL₅₀, que é a concentração necessária para matar 50% da população testada.

2.2.1 Bioensaios Seletivos

Para os bioensaios seletivos, as estirpes foram crescidas em meio NYSM por 48 a 72 horas, a 200 rpm e 28 °C até a completa esporulação. Antes de cada bioensaio, os caldos crescidos foram visualizados em microscópio de contraste de fases, para confirmar a presença de esporos e cristais.

a) Contra *Anthonomus grandis*

As larvas de *A. grandis* utilizadas nos bioensaios foram criadas a base de dieta artificial composta por levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, pharmamédia (proteína de algodão) e glicose (Tabela 1), em insetário com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 65 ± 5 % e fotoperíodo de 14 horas, como descrito por Monnerat et al. (2000).

Os bioensaios seletivos contra o bicudo foram realizados colocando-se 10 mL da caldo previamente crescido em meio NYSM, em 30 mL de dieta artificial (Tabela 1), à temperatura de aproximadamente 50°C.

Tabela 1 - Dieta artificial de *A. grandis*

Parte autoclavada	Quantidade
Agar	0,8 g
Levedo de cerveja	1,2 g
Proteína da soja	2 g
Gérmen de Trigo	1,2 g
Água Destilada	30 mL
Pharmamédia	0,8 g

Obs.: A dieta foi pesada em béqueres de 100 mL

Parte não autoclavada	Quantidade
Ácido sórbico	0,05 g
Ácido ascórbico	0,4 g
Glicose	1,2 g
Nipagim	0,04 g
Sais minerais	0,2 g
Solução vitamínica	200 μ L

Obs.: A parte não autoclavada da dieta e a solução vitamínica foram adicionadas à dieta somente na hora do bioensaio

As dietas foram pesadas em béqueres de 100 mL, vedados com alumínio e zap, e colocados na autoclave. O restante do material utilizado, com exceção do caldo bacteriano, foi colocado por 20 minutos na UV. Tirou-se a dieta da autoclave e colocou-a em banho-maria a 70 °C.

Dentro da capela, 200 μ L de solução vitamínica foram colocados em cada um dos copos plásticos com a parte não autoclavada da dieta. Em um dos copos, misturou-se 10 mL de água destilada autoclavada e com auxílio de uma espátula passou-se tudo para o bequer com a dieta. Misturou-se bem e em seguida verteu-se na placa já identificada como controle negativo. O mesmo foi feito com as outras dietas, porém ao invés da água, utilizou-se os caldos com as estirpes bacterianas crescidas.

Após a solidificação da dieta, cada placa foi dividida em quatro quadrantes, e foram feitos 15 furos em cada quadrante, utilizando-se uma haste de cobre esterelizada. A haste foi limpa com papel, esterelizada com álcool e flambada toda vez que uma nova estirpe era utilizada. Em cada furo foi colocada uma larva, com a ajuda de um pincel, visualizadas com auxílio de uma lupa.

Ao término, as placas foram acondicionadas em BOD à 27 °C e fotoperíodo de 14 horas. A leitura foi feita sete dias após o início do bioensaio.

b) Contra *Spodoptera frugiperda*

As larvas de *S. frugiperda* foram criadas em laboratório, a base de dieta natural composta por feijão, levedo de cerveja e germe de trigo, sob temperatura de 25 ± 2 °C, 70 ± 10 % de umidade e fotoperíodo de 14 horas.

Primeiramente a dieta foi pesada (Tabela 2) em um béquer de 2000 mL e vedado com papel de alumínio e zap. Em seguida esta foi colocada na autoclave juntamente com uma espátula grande e dois béqueres de 100 mL. Os outros materiais salvo as bactérias, foram deixados na UV por 20 minutos. Em seguida, retirou-se o material da autoclave e, dentro

da capela, acrescentou-se à dieta o ácido ascórbico e misturou-se até completa homogeneização.

Tabela 2 - Dieta Artificial para *S. frugiperda*

Material	Quantidade (para 10 placas)
Feijão	140,4 g
Levedo de Cerveja	42,9 g
Germe de Trigo	67,4 g
Água	1000 mL
Agar	17,0 g
Ácido Ascórbico*	4,3 g

*Adicionar à dieta somente quando tirar da autoclave

Com auxílio de um béquer de 100 mL, a dieta foi vertida em placas de cultivo de células com 24 poços, com quantidade suficiente para cobrir o fundo do poço e deixou-se as placas expostas a UV por cerca de 10 minutos. Para cada estirpe testada foram utilizados 12 poços da placa e aplicados 35 μ L do caldo bacteriano em cada um dos poços. Após a absorção total do caldo pela dieta, uma larva de segundo instar foi colocada em cada poço. Todas as placas foram fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas, e colocadas em salas com temperatura de 27 ± 2 °C, para que a dieta não transpirasse muito e causasse afogamento das larvas.

A primeira leitura foi feita após 48 horas, e as lagartas foram passadas para copinhos plásticos de 50 mL, contendo pedacinhos de dieta livre de bactérias. As larvas foram colocadas uma em cada copo, ou seja, foram mantidas individualizadas devido ao hábito canibal dessa espécie. A segunda leitura ou descarte foi feito no sétimo dia.

c) Contra *Anticarsia gemmatalis*

As larvas de *A. gemmatalis* foram criadas em laboratório, com dieta artificial à base de feijão, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja e caseína, nas mesmas condições descritas para *S. frugiperda*.

Primeiramente pesou-se a dieta (Tabela 3), vedou-se com papel alumínio e zap e em seguida colocou-se a dieta, a espátula e dois béqueres de 100 mL na autoclave. O restante do material, com exceção dos caldos bacterianos, ficou por 20 minutos exposto a UV.

Tabela 3 - Dieta Artificial para *A. gemmatalis*

Material	Quantidade (para 45 copinhos ou cinco placas)
Feijão	31,2 g
Levedo de Cerveja	15,6 g
Germe de Trigo	25,0 g
Agar	10,0 g
Água	450 mL
Proteína de Soja	25,0 g
Caseína	12,5 g
Ácido Ascórbico*	2,2 g
Solução Vitamínica*	2,5 mL

* Adicionar à dieta somente quando tirar da autoclave

Após tirar a dieta da autoclave, adicionou-se a mesma o ácido ascórbico e a solução vitamínica, homogeneizou-se e verteu-se a dieta em copos plásticos de 50 mL já identificados, com uma quantidade suficiente para cobrir o fundo do copo. Em seguida deixou-se, por cerca de 10 minutos, os copinhos expostos a UV.

Espalhou-se 150 μ L do caldo bacteriano crescido sobre a dieta em cada um dos copos.

Após a absorção da solução pela dieta, dez lagartas de segundo estágio de *A. gemmatalis* foram colocadas em cada copo, que foram fechados com tampinhas de acrílico e colocados em bandejas de isopor. O bioensaio foi colocado em sala de bioensaios nas mesmas condições de criação dos insetos. Foram feitas duas repetições por isolado, e dois copos ficaram livres de bactéria para servirem como controle negativo.

A primeira leitura foi feita após 48 horas do início do bioensaio, e as lagartas foram transferidas para outros copos com dieta livre de bactéria. A segunda leitura e descarte foram feitos no quinto dia.

d) Contra *P. xylostella*

As larvas de *P. xylostella* foram criadas em laboratório, em dieta natural com folhas de couve e solução açucarada, sob temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotoperíodo de 14 horas.

Para realização dos bioensaios, folhas de couve foram lavadas, passando-se levemente a esponja sobre elas para tirar a cera superficial. Em seguida foram deixadas de molho em solução de hipoclorito a 5 % por 20 minutos e imersas em água destilada e secas com papel toalha para utilização.

Em seguida essas folhas foram imersas por 10 minutos em uma solução com as estirpes a serem testadas, contendo 10 mL do caldo crescido diluído em 90 mL de água destilada e 30 μ L de espalhante adesivo.

Após esse processo, as folhas foram colocadas para secar em caixas de papelão penduradas em um varal de barbante por cerca de uma hora a temperatura ambiente. Após a secagem completa das folhas, estas foram colocadas em placas de Petri descartáveis (90 x 15 mm), previamente identificadas com o nome da estirpe, e forradas com papel filtro.

Foram colocadas sobre as folhas de couve dez lagartas de terceiro instar.

Para cada estirpe foram feitas duas placas, além de duas placas para o controle negativo, onde foi usado 100 mL de água ao invés de solução bacteriana. A primeira leitura foi feita após 48 horas e a segunda e última leitura ou descarte no quinto dia.

2.2.2 Bioensaios de Dose

Para as estirpes que apresentaram mortalidade igual ou superior a 75% nos insetos testados, foram feitos bioensaios de dose, e para isso o material foi liofilizado.

Primeiramente foi feito pré-inóculo em erlenmeyer de 50 mL com 15 mL de meio. O material ficou no incubador rotativo a 28°C e 200 rpm por 16 horas. Após as 16 horas, esse pré-inóculo foi passado para outro erlenmeyer de 2000 mL com 600 mL de meio de cultura, crescido por 72 horas em incubador rotativo nas mesmas condições do pré-inóculo.

Todo o material necessário foi esterilizado e foi feita microscopia óptica das estirpes para confirmar a esporulação e presença de cristais.

Na capela de fluxo laminar, com todo o material autoclavado, identificou-se os tubos Falcon, e equilibraram-se os tubos cheios de bactéria crescida dois a dois. A pesagem dos tubos foi feita para assegurar o bom funcionamento da centrífuga. Os tubos foram colocados na centrífuga por 30 minutos a 10.000 rpm e 4°C.

Retirou-se com cuidado os tubos da centrífuga para que se algum tubo estivesse estourado, este não molhasse toda a centrífuga. O sobrenadante de cada frasco foi descartado e ressuspendeu-se o "pellet" em aproximadamente 1,5 mL de água destilada autoclavada com o auxílio de uma pipeta pasteur descartável e estéril.

O material ressuspensão foi transferido para um frasco próprio para liofilização, previamente identificado com o número da estirpe e data, vedado com papel alumínio e zap e congelado "over night". No dia seguinte, os frascos foram levados para o Liofilizador (Labconco) por 18 horas. Depois de liofilizado, o material foi armazenado em freezer.

a) Contra *S. frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas no bioensaios de dose tiveram a mesma procedência das lagartas utilizadas no seletivo. O procedimento destes bioensaios foi semelhante ao bioensaio seletivo, porém utilizaram-se bactérias liofilizadas e várias diluições a partir do material liofilizado.

Pesou-se 1 mg da bactéria liofilizada em tubo eppendorf e adicionou-se 1 mL de água destilada estéril. Homogeneizou-se bem o material com a ajuda de um agitador tipo "vortex", e obteve-se a suspensão I. A partir dessa suspensão, obteve-se a suspensão II, pegando-se 571,4 μ L da suspensão I e adicionando-se 428,6 μ L de água, obtendo-se uma concentração final de 571,4 μ g/mL. Em seguida, preparou-se 1 mL de cada uma das diluições conforme descrito da Tabela 4.

Tabela 4 - Diluições e Concentração final para realização de bioensaios contra *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*

Dose	Quantidade de Suspensão II (μ l)	Quantidade de Água (μ L)	Concentração final (ng/cm ²)
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	72	928	720
4	43,2	956,8	432
5	25,9	974,1	259
6	15,5	984,5	155
7	9,3	990,7	93
8	5,6	994,4	56
9	3,4	996,6	34
10	2	998	20

Depois de feitas todas as diluições, prosseguiu-se o bioensaio, espalhando-se 35 μ L de cada diluição em cada um dos 24 poços das placas de cultivo de células. Cada placa representava uma diluição. Assim que a solução bacteriana foi absorvida pela dieta, colocou-se uma lagarta de segunda instar em cada poço. Uma placa foi deixada sem bactéria para servir como controle negativo. Colocaram-se as lagartas e as placas foram fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas, e foram colocadas em salas sob as mesmas condições da criação de insetos.

A primeira leitura foi feita após 48 horas, colocando-se as lagartas vivas em copos de plásticos de 50 mL com dieta sem bactéria. O descarte e a segunda leitura foram feitos no sétimo dia do início do bioensaios.

b) Contra *A. gemmatalis*

O procedimento utilizado foi igual ao descrito para *S. frugiperda*, com exceção da última leitura, que foi feita no quinto dia, e não no sétimo, como o de *Spodoptera*.

c) Contra *P. xylostella*

Para o bioensaio de doses com *P. xylostella*, a lavagem das folhas foi feita da mesma forma do bioensaio seletivo, e as lagartas tiveram a mesma procedência, no entanto, foi utilizado material liofilizado.

Para cada estirpe foram feitas oito diluições com três repetições para cada diluição e três folhas foram utilizadas em cada uma das diluições. A primeira diluição é chamada de Solução Mãe, a 10 % (10^{-1}). Foram pesados 0,3 gramas do isolado liofilizado, posteriormente foi adicionado 3 ml de solução salina. O restante da diluição foi feito de forma seriada, onde se colocou 0,5 ml da solução mãe em 4,5 ml de solução salina, a seqüência foi feita da mesma forma, colocando-se 0,5 ml da solução anterior na próxima diluição.

A diluição foi feita conforme a Figura 1:

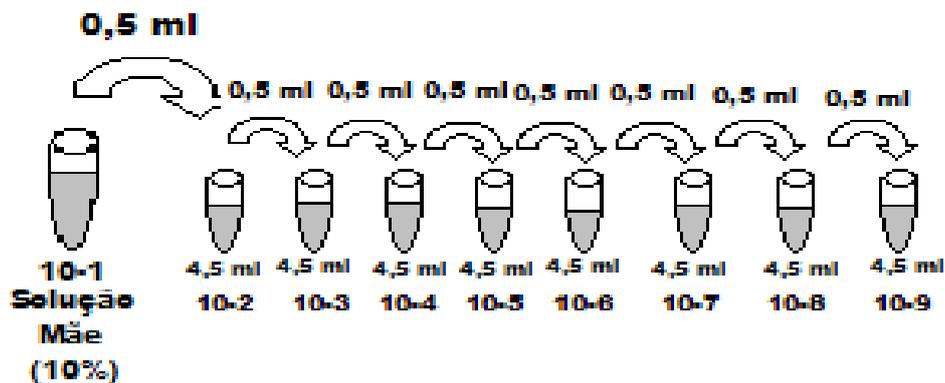


Figura 1: Diluição de doses para bioensaio de *P. xylostella*

Em copos previamente identificados com o número da estirpe, colocou-se 1 mL de diluição, 99 mL de água destilada e 30 μ L de espalhante adesivo.

Três folhas foram imersas em cada um dos copos por cerca de dez minutos. Em seguida as folhas foram colocadas no varal de papelão e barbante até secarem bem. Os outros processos foram feitos da mesma forma que o bioensaio seletivo.

2.3 Microscopia eletrônica das estirpes

As estirpes que causaram mortalidade igual ou superior a 75 % nos bioensaios seletivos foram visualizadas através da microscopia eletrônica, a fim de observar a presença e o formato dos cristais protéicos e outras estruturas.

Para isso, as estirpes foram cultivadas por 72h em meio NYSM a 28°C e 200 rpm, visualizadas em microscopia de contraste de fase para observação dos esporos e cristais e então centrifugadas e liofilizadas. Depois de liofilizadas, as amostras foram depositadas sobre suportes metálicos e cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador Emitech Modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

2.4 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10 %)

Este procedimento foi realizado com as estirpes que causaram mortalidade igual ou superior a 75% em um ou mais dos insetos testados.

2.4.1 Preparação das misturas esporos-cristais

As estirpes foram crescidas em meio NYSM por 72 horas em incubador rotativo a 28°C e 200 rpm e, em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet et. al. (1991). As culturas bacterianas foram transferidas na quantidade de 1,5 mL para tubos Eppendorf de 1,5 mL, previamente autoclavados, e centrifugadas a 14000 rpm, em microcentrífuga Eppendorf, por 15 minutos. Esse passo foi repetido por três vezes. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaCl 0,5 M e centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo eppendorf foram secas com papel filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de uma solução de inibidores de protease (PMSF a 1 mM, EDTA 100 mM e EGTA 40 mM) e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e os sedimentos foram ressuspensionados em 500 µL de PMSF A 1mM. As amostras foram armazenadas a -20°C.

2.4.2 Análise das proteínas em gel de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

As preparações de esporos-cristais das estirpes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 12 %, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Alíquotas de 20 μL das preparações de esporos-cristais foram diluídas em tampão de amostra de proteína 4X (1,5 M Tris-HCl, pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2 %, 2 β -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol) fervidas a 100 °C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 12 %. Foram usados 5 μL de marcador de proteína de alto e baixo peso molecular (Broad Range - Promega). A eletroforese foi realizada em aparelho Hoefer miniVE vertical electroforesis system – Amersham Pharmacia, contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS), a uma voltagem constante de 120 V, por cerca de duas horas. O gel foi corado em solução corante de Comassie Blue (40 % metanol, 10 % de ácido acético e 25 % de Comassie Blue 250-R) por quatorze horas e colocado em solução descorante (40 % metanol, 10 % de ácido acético) por 1-2 horas até a visualização dos perfis protéicos das estirpes. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi utilizado como padrão.

2.5 Caracterização molecular

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi usada para identificação dos genes *cry* presentes no DNA total das estirpes tóxicas aos insetos testados. Todas as reações se processaram em tubos de polipropileno de 0,2 mL, em um termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100™).

O DNA total dos isolados foi extraído segundo metodologia descrita por Bravo et. al. (1998). As estirpes foram cultivadas em meio ágar NYSM a 30 °C por 16 horas. Duas alçadas de células foram transferidas para 300 μL de água destilada estéril. As amostras foram congeladas a -20 °C por uma hora e, em seguida fervidas por 10 minutos para lisar as células. Em seguida, o material foi centrifugado a 14000 rpm por 30 segundos em microcentrífuga Eppendorf. Transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para outro tubo eppendorf, descartando-se o sedimento. Preparou-se então a PCR.

Para a realização das PCR's, 15 μL do sobrenadante da cultura foram transferidos para um tubo contendo 2 μL de cada "primer" a 12,5 μM , 1 μL de dNTP mix a 10 μM , 5 μL de tampão de 10x e 0,5 μL de Taq DNA polimerase (5,0 U/ μL) em um volume total de 50 μL . Foram usados "primers" gerais para a identificação dos genes *cry* 1 (CERON et. al., 1994) e *cry* 2 (BRAVO et. al., 1998).

Uma alíquota de 18 μL de cada produto de PCR foi misturada com tampão de amostra 10X e aplicada em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi processada em tampão TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5M – pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio diluído em água na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ por 20 minutos, e descorado

em água destilada por 15 minutos. O gel foi observado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador modelo Eagle Eye (Stratagene). A estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) foi utilizada como padrão.

Resultados e Discussão

3.1 Coleta das amostras de solo, isolamento e caracterização morfológica dos isolados

A coleta das amostras foi realizada em locais escolhidos ao acaso. Pode-se observar um histórico e resumo das áreas na Tabela 5.

Tabela 5 - Histórico e resumo das áreas de coleta

Amostra	Data da Coleta	Local	Município/UF	Características da área
1	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Quadra 07 da fazenda, onde na safra 2004/2005 foi cultivado soja em sistema de plantio direto.
2	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Pomar de laranjas, dentro da sede.
3	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Campo de futebol, dentro da sede. A cobertura do solo é feita com grama batatais.
4	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Pasto atrás da sede, onde a gramínea cultivada é o Coast cross.
5	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Quadra 09 da fazenda, onde na safra anterior (04/05) foi cultivado algodão no sistema convencional.
6	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Quadra 10 da fazenda, onde na safra anterior foi cultivado algodão em sistema convencional. As soqueiras do algodão tinham acabado de ser arrancadas na ocasião da coleta da amostra.
7	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Campo de cultivo de abóbora e bananeira, em frente à quadra 07. A amostra foi retirada em um

Amostra	Data da Coleta	Local	Município/UF	Características da área
				pedaço de solo descoberto.
8	09/10/05	Faz.Ouro Verde	Correntina/BA	Solos onde existem eucaliptos que servem de quebra vento.
9	15/11/05	Faz. Marina	Correntina/BA	Quadra 06 da fazenda. Na safra anterior foi cultivado milho. Presença de muita palhada, e o solo estava um pouco úmido.

Após o isolamento e plaqueamento das amostras de solo, observou-se o crescimento das colônias e obtiveram-se 21 colônias de Bacilos (Tabela 6). Destas 12 colônias cresceram em estreptomicina, apresentando células arredondadas e amareladas, com aspecto típico de *B. sphaericus* e as outras nove colônias cresceram em penicilina com cores esbranquiçadas, opacas e bordas irregulares, apresentando aspecto típico de *B. thuringiensis* ou *B. cereus*. As colônias foram identificadas conforme tabela abaixo e inoculadas em meio líquido NYSM.

Tabela 6 - Isolados obtidos após plaqueamento em estreptomicina e penicilina, e observação das colônias

Amostra Inicial	Amostra crescida em Estreptomicina	Amostra crescida em Penicilina
1	1A; 1B	1C
2	2A; 2B	2C
3	3A	3B
4	4A	4B
5	5A; 5B	5C
6	6A	6B
7	7A	7B
8	8A	8B
9	9A	9B

Após 48 horas de crescimento ou completa esporulação, pode-se confirmar que os isolados que cresceram em meio com penicilina correspondiam à espécie *B. thuringiensis*, por apresentar esporos alongados com formato elipsoidal e alguns cristais pequenos e às

vezes bipiramidais. Nenhuma colônia foi identificada como típica de *B. cereus*, pois em todos os caldos crescidos foram visualizados cristais e *B. cereus* não possui cristais. Os isolados que cresceram em estreptomicina foram confirmados como sendo da espécie *B. sphaericus* por apresentar esporos e a presença ou não de cristais presos à membrana do esporo. Após a visualização dos esporos e cristais em microscópio de contraste de fase, 21 estirpes foram identificadas, nove *B. thuringiensis* e 12 como *B. sphaericus* (Tabela 7) e armazenadas no Banco de Bacilos para a continuidade dos trabalhos.

Tabela 7 - Caracterização quanto à presença de esporos e cristais, identificação da espécie e número dado à estirpe no Banco de Bacilos

Isolado	Esporo	Cristal	Espécie de Bacilos	Nº da Estirpe no Banco
1A	++	-	Bs	S2178
1B	+	-	Bs	S2191
1C	+++	+	Bt	S2179
2A	+	+	Bs	S2190
2B	+++	+	Bs	S2176
2C	+++	++	Bt	S2172
3A	+++	+	Bs	S2189
3B	+++	+	Bt	S2180
4A	++	+	Bs	S2187
4B	+++	+	Bt	S2186
5A	++	+	Bs	S2177
5B	+++	+	Bs	S2181
5C	++	+	Bt	S2182
6A	++	+	Bs	S2188
6B	++	+	Bt	S2183
7A	++	+	Bs	S2184
7B	++	+	Bt	S2192
8A	+++	+	Bs	S2174
8B	++	+	Bt	S2185
9A	++	+	Bs	S2175
9B	+++	+	Bt	S2173

(-) ausência da estrutura correspondente; (+) presença de poucas estruturas correspondentes; (++) presença de quantidade média de estrutura correspondente; (+++) presença de grande quantidade de estrutura correspondente, *Bs* - *Bacillus sphaericus*; *Bt* - *Bacillus thuringiensis*.

3.3 Caracterização Entomopatogênica das Estirpes

3.3.1 Bioensaio seletivo

Após identificação e armazenamento das estirpes de Bacilos, as da espécie *B. thuringiensis* foram selecionadas para a continuidade dos trabalhos. Foram testadas 12 estirpes, dentre estas, nenhuma delas apresentou mortalidade igual ou superior a 75 % contra *A. grandis*. A estirpe S2183 apresentou mortalidade de 75 % contra larvas de *S. frugiperda* e, a estirpe S2186 apresentou atividade contra as três espécies da ordem Lepidoptera, matando 75 %, 80 % e 100 % das larvas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella*, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de Mortalidade de estirpes de Bt em larvas de *A. grandis*, *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella* após bioensaios seletivos.

Estirpes	Mortalidade (%)			
	<i>A. grandis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>P. xylostella</i>
S2172	55	42	0	0
S2173	68	50	5	0
S2174	40	4	0	5
S2175	30	25	40	0
S2176	32	67	0	25
S2177	20	9	30	5
S2178	25	42	5	15
S2179	55	42	0	15
S2180	48	25	7	15
S2181	45	17	0	5
S2182	40	66	0	10
S2183	66	75	10	0
S2184	35	42	5	0
S2185	50	50	0	0
S2186	48	75	80	100
S2187	38	59	5	20
S2188	33	34	0	5
S2189	35	25	5	5
S2190	42	67	10	15
S2191	42	25	0	30
S2192	68	67	7	0

3.3.2 Bioensaios de Dose

Em relação aos bioensaios de dose, não foi possível calcular a CL₅₀ das estirpes S2183 e S2186 contra larvas de *S. frugiperda*. Considerando a mortalidade de 75 % apresentada

pela estirpe S2186 em bioensaio seletivo contra larvas de *A. gemmatalis*, procedeu-se ao bioensaio de dose, que não apresentou efetividade, devido provavelmente a baixa toxicidade das proteínas presentes nestas estirpes contra algumas espécies da ordem Lepidoptera. Com relação a *P. xylostella*, a estirpe S2186 apresentou uma CL₅₀ de 375 µg/mL (218-645 µg/mL), devido provavelmente a sensibilidade de *P. xylostella* à toxina Cry2 de *B. thuringiensis*, não observada nas outras espécies de lepidópteros testadas. A estirpe S2186 apresentou uma toxicidade inferior ao padrão Btk para *P. xylostella*. Isto pode ser devido à presença das toxinas Cry1 e Cry2 na estirpe padrão que juntas apresentam uma maior toxicidade a larvas de insetos da ordem Lepidoptera que a estirpe S2186.

3.4 Microscopia eletrônica dos isolados

A microscopia eletrônica revelou que a estirpe S2183 não apresentou cristais na forma bipiramidal, e sim redondos (Figura 2) e que a estirpe S2186 apresentou cristais bipiramidais (Figura 3), cuja morfologia está associada a patogenicidade contra insetos da ordem Lepidoptera. Pode-se observar também que as estirpes não apresentaram muitos cristais protéicos, e provavelmente por isso as mortalidades obtidas não foram muito altas, principalmente contra *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

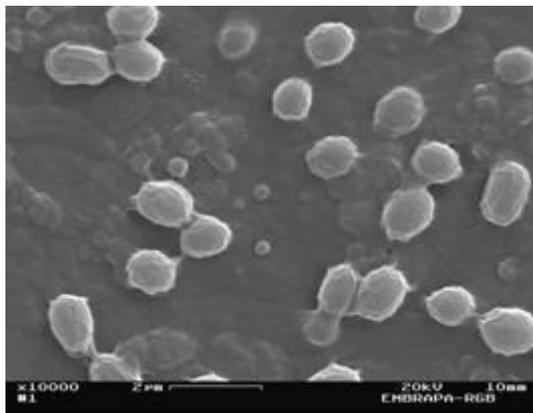


Figura 2: Esporos e cristais da estirpe S2183



Figura 3: Esporos e cristais bipiramidais da estirpe S2186

3.5 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%)

As estirpes S2183 e S2186 apresentaram um padrão eletroforético diferente da estirpe padrão (Btk), com a presença de uma banda de 100 kDa e outra de 70 kDa (Figura 4). Esta segunda banda corresponde ao produto de expansão do gene *cry 2*, porém a banda de 100 kDa não apresenta correspondência gênica com os genes *cry* já descritos. Esta pode ser uma nova toxina ainda não descrita.

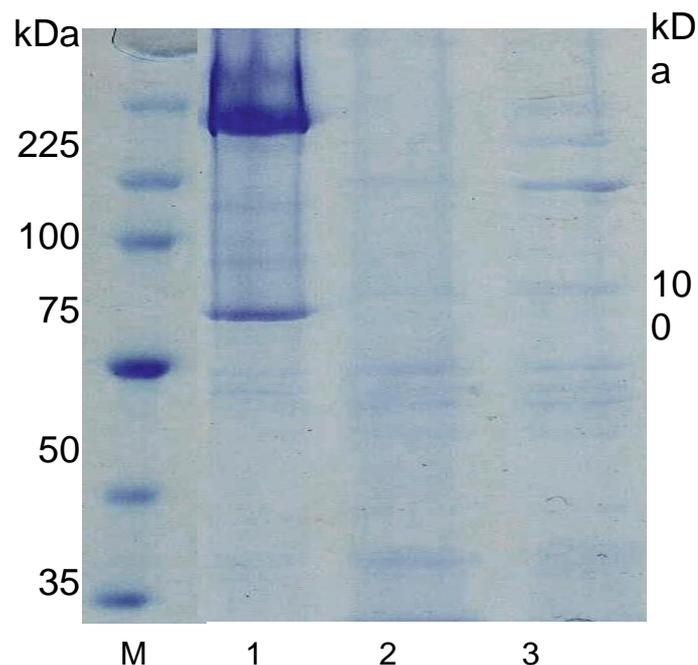


Figura 4 – Análise do perfil proteico das estirpes estudadas. M – marcador de massa molecular (Broad Range – Promega), 1 – Btk, 2 – S2186 (4B), 3 – S2183 (6B).

3.6 Caracterização molecular

A análise molecular revelou que tanto a estirpe S2183, como a S2186 não possuem genes *cry1*, pois não apresentaram fragmentos semelhantes aos destes genes (Figura 5). Porém, a estirpe S2186 apresentou um fragmento de PCR correspondente ao gene *cry2*, indicando ser este o gene responsável pelo produto de expressão de 70 kDa mostrado na Figura 3. A estirpe S2183 não apresentou nenhum produto de amplificação para os genes testados, o que leva a crer que ela pode possuir algum outro gene ainda não descrito.

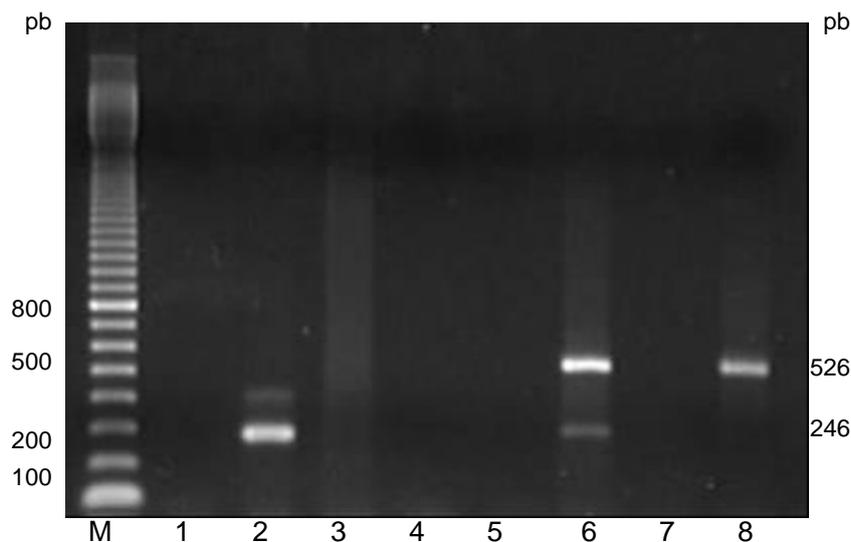


Figura 5 – Análise do perfil molecular das estirpes estudadas. M – marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Amersham), (amostras de 1 a 4 – amplificação para o gene *cry1*): 1 – Controle negativo, 2 – Btk, 3 – S2183, 4 – S2186, (amostras de 5 a 8 – amplificação para o gene *cry2*): 5 – Controle negativo, 6 – Btk, 7 – S2183 e 8 – S2186.

Conclusão

- De todas as estirpes testadas, somente S2186 causou mortalidade acima de 75% em todos os insetos da ordem Lepidoptera testados (*A. gemmatilis*, *S. frugiperda* e *P. xylostella*), mas apresentou mortalidade de 100% apenas em *P. xylostella*.
- A estirpe S2183 causou mortalidade de 75% em insetos de *S. frugiperda*, mas não apresentou características estruturais e moleculares semelhantes à estirpe padrão para insetos da Ordem Lepidoptera.
- Nenhuma estirpe apresentou atividade superior a 70% em larvas de *A. grandis*.
- As estirpes S2183 e S2186 apresentaram uma banda de 70 kDa que se assemelha a uma das bandas presentes no perfil do padrão contra lepidópteros (Btk).
- A estirpe S2186 apresentou um fragmento de PCR correspondente ao gene *cry2*, indicando ser este o gene que codifica a proteína de 70 kDa, se assemelhando à estirpe padrão para o controle de lepidópteros, Btk.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio brasileiro: uma oportunidade de investimentos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 28 fev. 2006.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN,

- M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.
- CASTELO BRANCO, M. Avaliação da eficiência de formulações de *Bacillus thuringiensis* para o controle de traça-das-crucíferas em repolho no Distrito federal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, n. 3, p. 237-240, 1999.
- CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 353-356, 1994.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 40 p. 1999.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge, GB: Cambridge University Press, 1971.
- GAZZONI, D. L.; YORINIORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 128 p.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; DE BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GONDIM, D. M. C.; JEAN-LOUIS, B.; SILVIE, P.; PEITI, N. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. 3. ed. Cascavel: COODETEC; CIRAD-CA, 2001. 120 p. (Boletim técnico, n. 33).
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LECADET, M. M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J. E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 58, p. 840-849, 1991.
- MONNERAT, R.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA-NETO, O. B. de; NOBRE, S. D.; SILVA-WERNECK, J. O.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, n. 46).
- THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal Cell of Science**. London, v. 60, p. 181-197, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors**. [S.l.], 1987. (WHO Mimeograph Document, 87.3).
- YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 315-343, 1984.