

Comunicado 164

Técnico

ISSN 9192-0099
Setembro, 2007
Brasília, DF

ISOLAMENTO DE NOVAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (ISOLATION OF NEW STRAINS OF *Bacillus sphaericus* and *Bacillus sphaericus* to control *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*).

Saraiva, M.¹
Praça, L.B.¹
Falcão, R.¹
Monnerat, R.¹

INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial impôs a necessidade de melhorias em vários setores, em especial na agricultura e saúde pública, a fim de assegurar ao homem uma qualidade de vida satisfatória. Com este fim, surgiram os inseticidas químicos para controle de insetos pragas e vetores de doenças.

No entanto, o uso de microrganismos vem assumindo uma posição de destaque dentro das alternativas que visam o controle de insetos. A disponibilidade de agentes de controle biológico é muito grande, fornecendo ampla variedade de matéria prima para o desenvolvimento de novos produtos com maior patogenicidade e espectro de ação.

Dentre os agentes de controle biológico de ocorrência natural *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* merecem especial destaque. Estas espécies caracterizam-se pela produção de toxinas, causando doenças em larvas de insetos pragas e vetores de doenças como *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (figuras 1 e 2).

Culex quinquefasciatus é o principal vetor da filariose bancroftiana. Esta doença afeta milhares de pessoas em vários países. Já *A. aegypti* é o vetor da dengue e da febre-amarela e é muito parecido com um pernilongo comum. As larvas destes insetos podem ser



Figura 1 – Larva de *C.quinquefasciatus*

OBJETIVOS

Isolar novas estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*, avaliar a patogenicidade das novas estirpes isoladas contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* e caracterizar as estirpes selecionadas através de métodos moleculares, bioquímicos e ultra-estrutural.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento

Foram coletadas várias amostras de solo de diferentes regiões. Uma alíquota de cada uma das amostras foi diluída em solução salina, submetida a choque térmico (80°C por 12 minutos/gelo por 5 minutos) e plaqueada em meio seletivo NYSM com uma concentração final de 100 mg de penicilina/litro de meio de cultura e 25 mg de estreptomicina/litro de meio de cultura e

encontradas em água limpa e/ou águas poluídas, logo a melhor solução para se controlar estes insetos é a utilização de agentes biológicos, que não afetem o ecossistema e que não sejam prejudiciais aos vertebrados e invertebrados.



Figura 2 – Larva de *A. aegypti*

incubadas em BOD a 30 °C. Após crescimento, as colônias selecionadas foram crescidas em meio líquido NYSM por 48 a 72 h a 28 °C e 200 rpm e visualizadas em microscópio de contraste de fases para observação de esporos e cristais, confirmando assim se a estirpe isolada era *B. thuringiensis* ou *B. sphaericus*.

Teste de patogenicidade

As estirpes isoladas foram testadas contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. O procedimento para a realização do bioensaio seletivo consistiu em colocar 100 mL de água destilada em copos de plástico de 300 mL juntamente com 25 larvas de segundo estágio das duas espécies de mosquitos. Em seguida, foram colocados 1 mL de bactéria crescida. Foram feitas duas repetições de cada estirpe e mais duas para controle negativo. Após 24 e 48h procedeu-se à leitura do bioensaio,

contando o número de sobreviventes e calculando-se o percentual de mortalidade. A partir disso, foram selecionadas as estirpes que apresentaram mortalidade superior a 70 % para a continuidade dos trabalhos.

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

As estirpes que se mostraram tóxicas aos insetos testados foram crescidas em meio NYSM líquido por 72 horas em incubador rotativo a 28 °C e 200 rpm e, em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com Schenkel *et al.* (1992) e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O gel foi corado em solução de Comassie blue para a visualização dos perfis protéicos das estirpes. *B. sphaericus* 2362 foi utilizado como padrão.

PCR

O DNA total das estirpes selecionadas foi extraído segundo metodologia descrita por Otsuki *et al.* (1997). Para a realização da PCR, 15 µL de DNA 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 10x e 0,5 µL de Taq DNA polimerase a 5U/µL para uma reação com volume total de 50 µL. Foram usados “primers” descritos por Otsuki *et al.* (1997) para identificação de genes que codificam a toxina binária e a MTX de *B. sphaericus*.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As estirpes selecionadas foram crescidas em meio NYSM por 72 horas em placas de Petri a 30 °C e processadas de acordo com metodologia descrita por Thomas e Ellar (1983), cobertas com ouro e visualizadas no microscópio eletrônico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do isolamento de amostras de solo, obteve-se um total de 49 novas estirpes, sendo 18 de *B. sphaericus* e 31 de *B. thuringiensis*. As estirpes de *B. sphaericus* S2226, S2227 e S2229 apresentaram dupla atividade contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*. As estirpes S2224, S2225, S2228, S2230, S2231, S2257 e S2261 apresentaram mortalidade apenas contra *C. quinquefasciatus* (Tabela 1). Com relação ao *B. thuringiensis* foram obtidos resultados positivos apenas contra *C. quinquefasciatus* com as estirpes: S2245, S2247 e S2250 (Tabela 2). Para a continuidade dos trabalhos focou-se nas estirpes de *B. sphaericus* que apresentaram mortalidade de 100% contra a espécie *C. quinquefasciatus*.

Tabela 1 - Porcentagem de Mortalidade de estirpes de *B. sphaericus* contra larvas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* em bioensaios seletivos.

Estirpes	Procedências	<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
S2224	Corumbá – GO	56%	100%
S2225	Corumbá – GO	52%	100%
S2226	Corumbá – GO	98%	100%
S2227	Corumbá – GO	92%	100%
S2228	Corumbá – GO	0%	100%
S2229	Corumbá – GO	85%	100%
S2230	Corumbá – GO	0%	100%
S2231	Corumbá – GO	0%	100%
S2257	Taquara – DF	0%	100%
S2261	Taquara – DF	0%	100%

Tabela 2 - Porcentagem de Mortalidade de estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* em bioensaios seletivos.

Isolado	Procedências	<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
S2245	Taquara – DF	0%	100%
S2247	Taquara – DF	0%	100%
S2250	Taquara – DF	0%	100%

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da mistura de esporos e cristais das estirpes S2224, S2228, S2229, S2231 e S2257 apresentou polipeptídeos principais de 51,4 e 41,9 kDa, a estirpe S2261 o polipeptídeo de 51,4 kDa e as estirpes S2225, S2226, S2227, S2230 apresentaram polipeptídeos de 51,4, 41,9 e 100 kDa (Tabela 3), que correspondem ao perfil do padrão de *B. sphaericus* – 2362, característico das estirpes de *B. sphaericus* efetivas contra insetos da ordem Diptera. Com relação a microscopia eletrônica, as estirpes de *B. sphaericus* apresentaram cristais semelhantes ao padrão *B. sphaericus* 2362 (Figura 3).

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da mistura de

esporos e cristais das estirpes S2224, S2228, S2229, S2231 e S2257 apresentou polipeptídeos principais de 51,4 e 41,9 kDa, a estirpe S2261 o polipeptídeo de 51,4 kDa e as estirpes S2225, S2226, S2227, S2230 apresentaram polipeptídeos de 51,4, 41,9 e 100 kDa (Tabela 3), que correspondem ao perfil do padrão de *B. sphaericus* – 2362, característico das estirpes efetivas contra insetos da ordem Diptera.

Tabela 3 – Perfis protéicos e genes das estirpes de *B. sphaericus* efetivas contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*

Estirpe	Perfil proteico (kDa)	Genes (pb)
2224	51,4 e 41,9	1053, 720, 523 e 478
2225	51,4 , 41,9 e 100	1053, 720, 523, 478 e 700
2226	51,4 , 41,9 e 100	1053, 720, 523, 478 e 700
2227	51,4 , 41,9 e 100	1053, 720, 523, 478 e 700
2228	51,4 e 41,9	523 e 478
2229	51,4 e 41,9	523 e 478
2230	51,4 , 41,9 e 100	1053, 720, 523, 478 e 700
2231	51,4 e 41,9	1053, 720, 523 e 478
2257	51,4 e 41,9	523 e 478
2261	51,4	523

Com relação a microscopia eletrônica, as estirpes de *B. sphaericus* apresentaram cristais de forma esférica semelhantes ao padrão *B. sphaericus* 2362 (Figura 3).

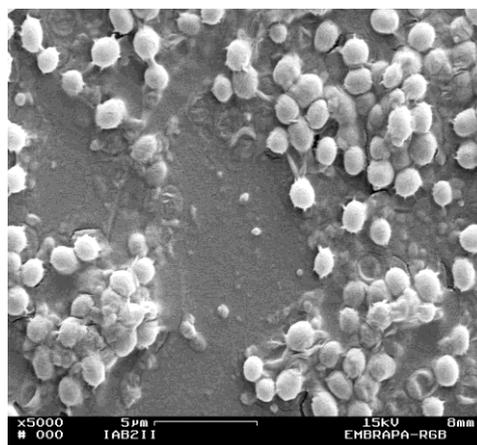


Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe S2227

Em uma segunda etapa do trabalho, serão realizados bioensaios de dose das estirpes que apresentaram 100% de mortalidade, com

o objetivo de selecionar a melhor estirpe a ser utilizada na produção de um novo bioinseticida contra larvas de *C. quinquefasciatus*.

REFERÊNCIAS

Otsuki, K.; Guaycurus, T.V.; Vicente, A.C.P., 1997. *Bacillus sphaericus* entomocidal potential determined by polymerase chain reaction. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, 92: 107-108.

Schenkel, R.G.M.; Nicolas, L.; Frachon, E.; Hamon, S., 1992: Characterization and toxicity

to Mosquito Larvae of Four *Bacillus sphaericus* Strains Isolated from Brazilian Soils. Journal Invertebrate Pathology, 60: 10-14.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. Journal of Cell

**Comunicado
Técnico, 164**

**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 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007):

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



**Comitê de
Publicações**

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Expediente

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

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Edição eletrônica: *Daniele Alves Loiola*