

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, ESPORULAÇÃO E TOXICIDADE DE *Bacillus sphaericus*

ALVES, Fernanda Germano¹; RODRIGUES, Amanda Ávila¹; SANTOS, Diego Gil de
Ios^{1,3}; CROCHEMORE, Ane Gerber¹; PREICHARDT, Leidi Daina²; KLAIC, Paula
Abentroth²; LEITE, Fábio Pereira Leivas^{1*}

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia

²Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

³ Instituto Federal Sul-Rio-Grandense

*fabio_leite@ufpel.edu.br

1 Introdução

Os *Bacillus* ssp são bastonetes Gram positivos com 0,5-2,5µm de largura por 1,2-10µm de comprimento, arrançadas aos pares ou em cadeias, sendo encontrados em um grande número de habitats. Apresentam extremidades arredondadas ou em ângulo reto e flagelos que lhes conferem mobilidade. Poucas espécies são patogênicas para vertebrados ou invertebrados. Espécies do gênero *Bacillus* esporulam quando as condições não são favoráveis, gerando um esporo por célula vegetativa. Este fenômeno não é inibido pelo oxigênio [2].

Bacillus sphaericus é uma bactéria que não necessita de condições especiais para se desenvolver, sendo de simples manuseio. Apresenta um crescimento aeróbico que não necessita de um sistema de aeração especial, alcançando bons resultados a partir de uma fonte de ar comum [8]. Além disso, a imensa variedade de recursos naturais possibilita a formulação de meios de cultivo bacteriano a um baixo custo e alta produtividade mantendo-se a qualidade.

Bacillus sphaericus são bactérias de grande importância e amplamente utilizadas no controle biológico de insetos. Durante o processo de esporulação desta bactéria, são formadas inclusões protéicas cristalinas, que contém proteínas 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 de larvas [1].

Os mosquitos da família *Culicidae* são responsáveis por uma série de prejuízos diretos e indiretos à saúde pública, principalmente por atuarem como vetores de agentes patogênicos. *Bacillus sphaericus* tem se mostrado eficaz no controle de insetos das ordens Díptera, Lepidóptera e Coleoptera, atuando somente sobre a fase larval [5]. Seu efeito larvicida é produzido principalmente a partir de duas toxinas, a BIN 1 e a BIN 2, que atuam em sinergia; com característica de persistir no ambiente por até 60 semanas, se reciclando no tecido de larvas mortas [3]. Seus produtos apresentam a vantagem de ser ambientalmente seguros, sem efeito cumulativo na cadeia trófica, bastante específicos e inócuos ao homem [6].

Afim de prover informações que incrementem o sistema de produção de *B. sphaericus*, o objetivo deste trabalho foi comparar a produção de *Bacillus sphaericus*: em dois meios de cultivo, NYSM e BHI; em balões com e sem aletas para avaliar a influência da presença de oxigênio dissolvido no meio de cultura; em balões fechados com bucha ou gaze; e avaliar a atividade toxicológica do *B. sphaericus* em larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo e Meios de Cultura

Bacillus sphaericus pertencente ao laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UFPel foi utilizado nos experimentos. Os meios de cultura utilizados foram o NYSM [7] e BHI comercial (Acumedia®).

2.2 Teste de endosporos

Cultura de 24h de crescimento foi suspendida em 10mL de solução salina estéril e submetida a choque térmico em banho-maria a 80°C por 15min. No material resultante, efetuou-se coloração de esporos com verde malaquita 5% e safranina e de Gram.

2.3 Produção de *Bacillus sphaericus*

O pré-inóculo e o inóculo de uma cultura de *B. sphaericus* em meio NYSM, foram incubados em agitador orbital a 28°C, 150rpm por 24h, sendo o pré-inóculo submetido a choque térmico e o inóculo cultivado em balões de 250mL, contendo 45mL de meio e adicionado de 5mL de pré-inóculo.

O cultivo de *B. sphaericus* foi realizado em um meio BHI e NYSM. Dois tipos de frascos (balão aletado e não aletado) e dois tipos de fechamento dos balões (bucha de algodão e gaze) foram utilizados nos diferentes meios, conforme Tabela 1. Empregram-se balões de 500mL, contendo 20% de volume. Os cultivos foram realizados em agitador orbital a 28°C, 150rpm. Amostras foram coletadas a cada 4h até as 20h de cultivo. A densidade óptica (DO) foi medida a 600nm..

Tabela 1 – Condições estudadas na produção de *Bacillus sphaericus*

Meio de cultura	Bucha (B) ou Gaze (G)	Aletado (A) ou Não aletado (NA)
NYSM	B	A NA
	G	A NA
BHI	B	A NA
	G	A

2.4 Teste de potência do *B. sphaericus*

Realizou-se o teste de potência em larvas de *Culex quinquefasciatus* entre o segundo e terceiro estágio de desenvolvimento. Dos cultivos produzidos em meio NYSM, em balões aletado e não aletado, foram feitas 4 repetições com diluições de 10^{-1} a 10^{-6} em placas de poliestireno de cultivo celular com 5 larvas em cada cavidade e submetidas a 25°C. Como controle negativo, foram utilizadas quatro cavidades contendo o mesmo número de larvas e água destilada. Após 24 e 48h foi realizada a leitura do número de larvas sobreviventes e mortas e realizado o cálculo da dose letal 50% (DL₅₀).

3 Resultados e discussão

Os cultivos de *B. sphaericus* nas condições em meio BHI tiveram o crescimento celular maior, quando comparados aos cultivos no meio menos nutritivo, NYSM (Figura 1). As aletas dos balões geraram maior aeração no meio o que proporcionou ao cultivo em BHI no tempo de 4h, uma relação da DO 1,5 vezes e 2,2 vezes maior à obtida no balão não aletado, e nos cultivos em NYSM, respectivamente. No NYSM a aeração nos balões aletados não alterou o início da fase estacionária nem a concentração celular ao longo do tempo. Não houve diferença na relação DO dos cultivos em bucha ou gaze (dados não mostrados).

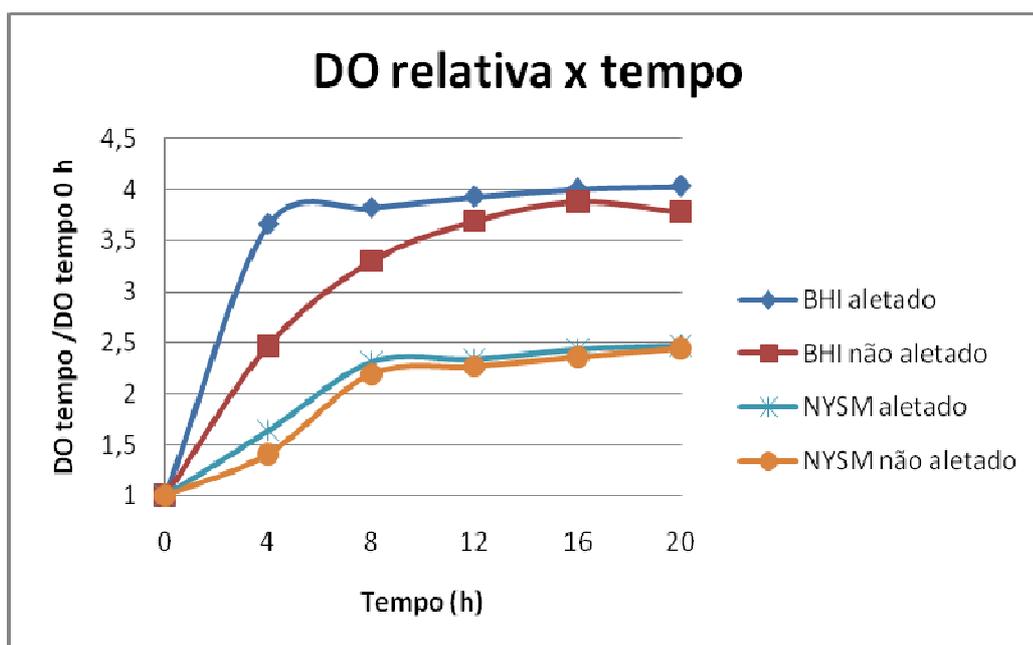


Figura 1: Densidade óptica do cultivo de *B. sphaericus* em diferentes condições.

As DL_{50} para o cultivo de *B. sphaericus* com meio NYSM em balão aletado e não aletado após 24h de exposição, balão aletado e não aletado após 48h de exposição são $1.10^{-4,57}$, $1.10^{-4,41}$, $1.10^{-4,56}$ e $1.10^{-4,59}$, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Os valores de DL_{50} foram semelhantes independente do tipo de balão e do tempo de exposição. Melo [4] obteve 54% de mortalidade usando uma concentração de 1.10^{-6} no cultivo de *B. sphaericus* em farelo branco de soja.

Tabela 2: Atividade larvicida de *B. sphaericus* cultivado em balão aletado (A) e não aletado (NA) com 24h de exposição.

Concentração	Mortos		Vivos		Somatório Mortes		Somatório Vivos		% Mortalidade	
	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA
0,1	20	20	0	0	82	78	0	0	100	100
0,01	20	20	0	0	62	58	0	0	100	100
0,001	20	20	0	0	42	38	0	0	100	100
0,0001	18	14	2	6	22	18	2	6	91,67	75
0,00001	4	4	16	16	4	4	18	22	18,18	15,38
0,000001	0	0	20	20	0	0	38	42	0	0

Aletado: $DL_{50} 1.10^{-4,57}$; Não aletado: $DL_{50} 1.10^{-4,41}$

Tabela 3: Atividade larvicida de *B. sphaericus* cultivado em balão aletado (A) e não aletado (NA) com 48h de exposição.

Concentração	Mortos		Vivos		Somatório Mortes		Somatório Vivos		% Mortalidade	
	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA
0,1	20	20	0	0	82	83	0	0	100	100
0,01	20	20	0	0	62	63	0	0	100	100
0,001	20	20	0	0	42	43	0	0	100	100
0,0001	17	16	3	4	22	23	3	4	88	85,18
0,00001	5	4	15	16	5	7	18	20	21,74	25,93
0,000001	0	3	20	17	0	3	38	37	0	7,5

Aletado: DL50 $1.10^{-4,56}$; Não aletado: DL50 $1.10^{-4,59}$

4 Conclusões

No cultivo de *B. sphaericus* o emprego de balões aletados e o meio BHI favoreceram o aumento da concentração celular. O tipo de vedação usada não influenciou os cultivos. A DL₅₀ da atividade larvicida de *B. sphaericus* foi de 1.10^{-4} independente tipo de balão e do tempo de exposição.

5 Referências Bibliográficas

- [1] ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.Y.; DUNN, P. *Bacillus* and related insect pathogens. **Microbiology Review**. Vol. 50, p. 1-24, 1986.
- [2] *Bacillus*. Disponível em <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/bacillus_2008-2.pdf>. Acessado em Maio de 2009.
- [3] GANUSHKINA, L.A. et al. The duration of the larvicidal effects of sporocrySTALLINE mass of the bacteria *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the laboratory setting. **Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni**. N. 4, p. 25-29, 2000.
- [4] MELO, A.I.A. **Elaboração e otimização de bioprocessos para a produção de *Bacillus sphaericus* meyer e neide (1904) visando o controle biológico de *Culex quinquefasciatus* say (1823)**. Dissertação (Mestrado em microbiologia, parasitologia e patologia) da Universidade Federal do Paraná, (2006).
- [5] RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C.F.C.; LIMA, M.M. Dos *Bacillus* entomopatogênicos, o que se espera? **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**. Vol. 6, p. 40-41, 1998.
- [6] WHO (World Health Organization). Report of Informal consultation of the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BVC/*Sphaericus*/85.3 S.I., 23pp
- [7] YOSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 315-343, 1984.

[8] YOUSTEN, A. A., WALLIS, D. A.; SINGER, S. Effect of oxygen on growth, sporulation and mosquito larval toxic formation by *Bacillus sphaericus*. **Development Industrial Microbiology**. v. 25, 757-762, 1984.