

RECOLHA DE AMOSTRAS DE SOLO NAS ILHAS DO PICO E FAIAL PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E NEMÁTODES ENTOMOPATOGÉNICOS

RAFAEL MONTIEL, GISELA NASCIMENTO & RICARDO FERREIRA *

*Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Rua da Mãe de Deus, 13-A
PT - 9500-801 Ponta Delgada, Portugal*

* Participaram no isolamento e caracterização dos microrganismos a Técnica Helena Resendes e os Profs. Doutores Carla Mendes Cabral e Nelson Simões

RESUMO

Durante a Expedição Científica PICO 2005 recolheram-se oitenta e sete amostras de solo na Ilha do Pico e dezassete no Faial a diferentes altitudes e com diversos cobertos vegetais que foram transportadas para o laboratório de Entomopatologia para isolamento de bactérias e nemátodes entomopatogénicos. Todas as amostras já foram analisadas pelo método da *Galleria* trap para nemátodes não se tendo identificado nenhuma positiva. Para bactérias entomopatogénicas analisámos 55 amostras de onde obtivemos 108 isolados puros, 16 deles pertencentes ao Grupo I de *Bacillus*. Estes isolados estão neste momento a ser identificados a nível da espécie por métodos bioquímicos e moleculares. Todos os isolados estão depositados no BEA/CIRN.

ABSTRACT

During the Scientific Expedition to PICO Island 2005 we performed eighty seven soil samples in Pico and seventeen in Faial at different altitudes and with diverse vegetation. Samples were analysed in the laboratory of Entomopathology to isolate entomopathogenic bacteria and nematodes. Soil samples had been tested for the presence of nematodes by the *Galleria* trap. No entomopathogenic nematodes were isolated. For the presence of bacteria we have now tested 55 samples from which we obtained 108 isolates with 16 identified as belonging to Group I of *Bacillus*. These isolates are being now analysed for species through biochemical and molecular methods. All the isolates were deposited in BEA/CIRN.

INTRODUÇÃO

As bactérias e os nemátodes entomopatogénicos são produzidos e comercializados para o controlo de insectos pragas no mundo inteiro. Em anteriores expedições científicas do Departamento de Biologia recolhemos amostras de solo nas diversas Ilhas dos Açores e na Madeira e Porto Santo, de onde se isolaram nemátodes entomopatogénicos, que depois de identificados têm sido usados no controlo de diversas pragas agrícolas com resultados muito positivos (Rosa, *et al.*, 2004).

O isolamento de *Bacillus* entomopatogénicos foi experimentado por nós em solos da Graciosa e em algumas amostras de S. Miguel. Também estes isolados mostraram ser activos contra insectos que presentemente são importantes pragas no Arquipélago (Leite, *et al.*, 2004), (Dias, *et al.*, 2005).

Por outro lado, estes patógenos estão a ser modelos de investigação no nosso laboratório quer na investigação de diversidade genética nas ilhas quer na pesquisa de mecanismos de patogenicidade com identificação, purificação e caracterização das moléculas bioactivas, muitas delas com potencial interesse em saúde. De um isolado de um nemátode entomopatogénico caracterizámos e expressámos uma serino-protease que tem actividade fibrinolítica e que está em testes para avaliar a sua viabilidade no tratamento de coágulos no sangue, que estão na origem da maioria das doenças cardiovasculares (Lucena, *et al.*, 2004). Também a bactéria entomopatogénica *B. thuringiensis* para além de ser patogénica para um grande número de insectos, produz citotoxinas que têm actividade contra células cancerígenas (Okumura, *et al.*, 2004) (Ito *et al.*, 2004) e por isso há interesse em procurar novos isolados produtores de citotoxinas que tenham as propriedades desejadas.

Com a recolha de amostras de solo no Pico e no Faial pretendemos isolar *Bacillus* e nemátodes entomopatogénicos que vão ser usados como agentes de controlo biológico e analisados para a produção de citotoxinas e de enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem. Fizeram-se recolhas de solo em locais seleccionados ao acaso nas ilhas do Pico e do Faial (Fig. 1, Fig. 2). Em cada local recolheu-se 10 sub-amostras de solo de cerca de 100 g, obtido até uma profundidade de cerca de 15 cm. As sub-amostras foram homogeneizadas num saco plástico, etiquetadas e transportadas para o laboratório. Registou-se o local de amostragem, a altitude e coberto vegetal.

Pesquisa de nemátodes entomopatogénicos. Usou-se o método da “*Galleria trap*” para pesquisar nemátodes entomopatogénicos. No laboratório cada amostra de solo foi passada por um tamis de malha grossa (2x2 mm) para eliminar as partículas grosseiras e transferido para um vaso de 1000 ml. Sobre o solo colocaram-se 10 larvas de *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera). Os vasos foram colocados numa câmara com temperatura controlada (25/2 °C). Diariamente os vasos foram invertidos para que os insectos fossem sucessivamente expostos a diferentes camadas de solo. Ao fim de sete dias, o solo foi de novo peneirado para retirar os insectos, que foram passados por água estéril e transferidos para caixas de Petri estéreis e incubados a 25 °C. Passados 10 dias todos os insectos foram dissecados para pesquisa de nemátodes parasitas.

Pesquisa de *Bacillus*. De cada amostra de solo homogeneizada retirou-se 4 g que foram suspensos em 10 ml de água peptonada. Esta suspensão foi tratada a 80 °C durante 10 minutos para eliminar formas vegetativas bacterianas. Fizeram-se diluições decimais seriadas até 10⁻³. Espalharam-se 0,1 ml das diluições 10⁻² e 10⁻³ em caixa de Petri com UG agarizado. Incubou-se a 30 °C durante 24 horas. Isolaram-se as colónias até obter culturas puras. A caracterização dos isolados puros fez-se por análise morfológica, enzimática e molecular por métodos já anteriormente usados (Leite, *et al.*, 2004), (Santiago-Alvarez, *et al.*, 1998).

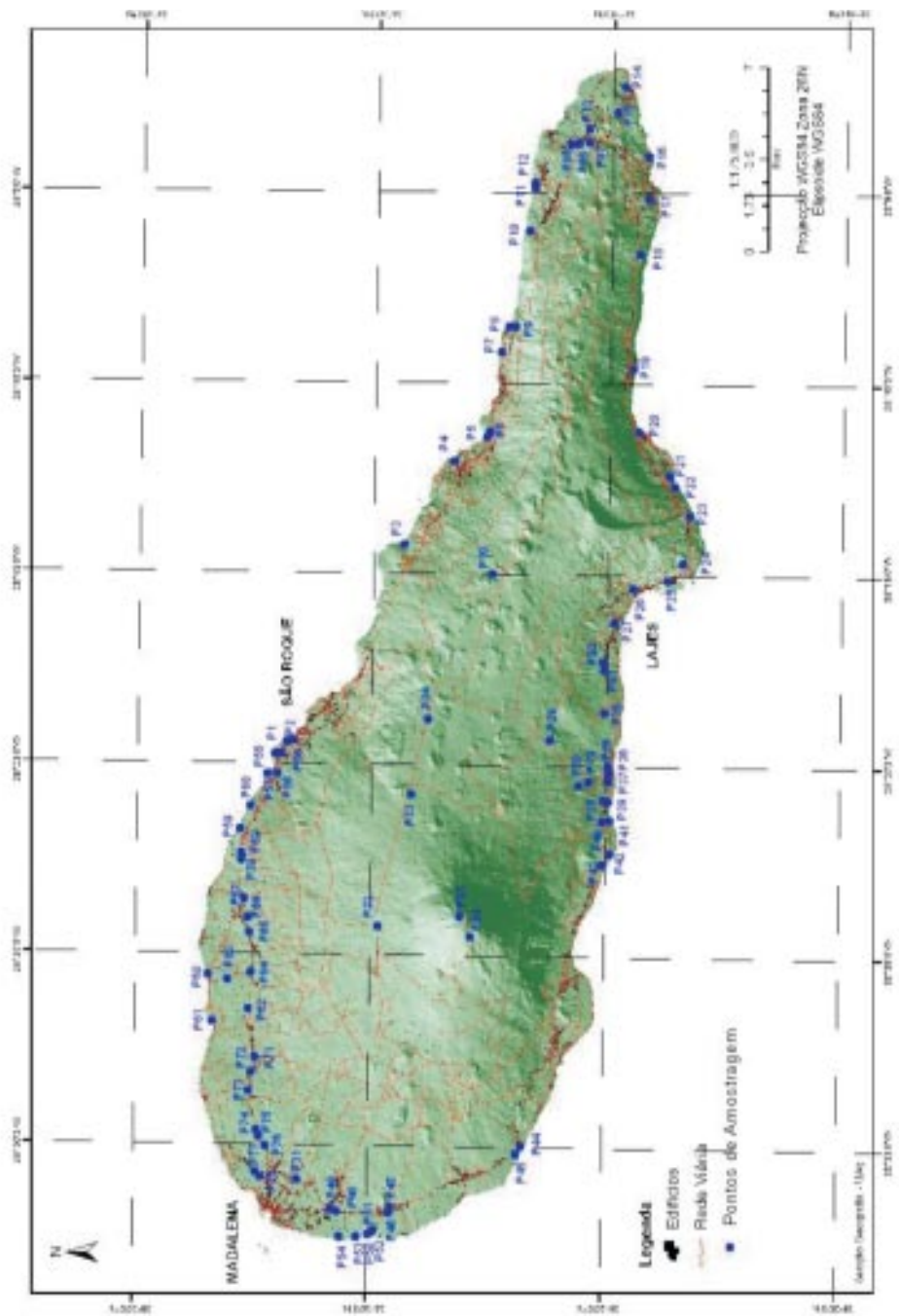


Figura 1 - Localizao das amostras recolhidas na ilha do Pico.



Figura 2 - Localiza o das amostras recolhidas na Ilha do Faial.

Conservação dos isolados. Das culturas puras de cada um dos isolados retiraram-se alíquotas que foram conservadas em meio UG suplementado com glicerol a 15% e guardadas a -80 °C no Banco de BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÉNICAS DOS AÇORES do CIRN (BEA/CIRN). Para cada isolado foi aberta uma folha de registo na respectiva base de dados (Fig. 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a expedição recolheram-se 87 amostras no Pico, a maioria delas abaixo dos 100 m onde habitualmente existe a maior densidade de insectos e no Faial fizeram-se 17 amostragens a maior parte delas também abaixo dos 100 (Quadro 1). Recolheram-se amostras em sítios com diferentes coberturas vegetais de modo a obter uma amostragem representativa (Quadro 2).

As amostras de solo recolhidas foram sujeitas no laboratório a tratamento para isolamento de nemátodes entomopatogénicos pelo método de *Galleria* trap. Por este método não obtivemos amostras positivas pelo que iremos utilizar outros métodos de extracção ainda a decidir (Quadro 3). Numa anterior amostragem feita no Pico tínhamos recolhido duas amostras positivas e cinco no Faial (7).

Quadro 1 - Número de amostras recolhidas nas ilhas do Pico e do Faial por classes de altitude.

| Altitude (m) | Pico | Faial |
|--------------|------|-------|
| 0-50 | 43 | 7 |
| 51-100 | 21 | 6 |
| 101-200 | 14 | 3 |
| 201-300 | 2 | - |
| 301-400 | 2 | 1 |
| 701-800 | 4 | - |
| Mais de 801 | 1 | - |

Até à presente data tratámos 55 amostras de terra do Pico para a presença de *Bacillus* (Quadro 3), tendo sido positivas todas as amostras (Fig. 4). Destas 55 amostras obtiveram-se 108 isolados puros dos quais baseados em caracteres morfológicos das colónias e em testes enzimáticos se identificaram 16 como pertencentes ao Grupo I de *Bacillus*. Dez destes isolados já foram sujeitos a análise molecular por RAPDs, não se tendo revelado nenhuma diferença significativa com os *primers* usados. Numa amostragem de solo da Graciosa obtiveram-se 3 novos *serovares* de *B. thuringiensis*, o que sugere que há isolados com características específicas nos Açores (Santiago-Alvarez, *et al.*, 1998), (IEBC).

Todos os isolados puros obtidos durante a Expedição Científica PICO 2005, fazem parte do BEA/CIRN e aí estão registados (Fig. 3).

AGRADECIMENTOS

As cartas digitais do Pico e do Faial foram cedidas pela Secção de Geografia e tratadas pela Dra. Susana Lacerda, a quem agradecemos.

CIRN - Bactérias Entomopatogénicas dos Açores

CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOMEDICINA DA UNIVERSIDADE DA TERCEIRA

New Delete Find

Isolado: Az 0110
Local do Isolamento: Lajes
Ilha: Pico
Coberto Vegetal: Fava
Altitude: 20 m
Método de Isolamento: Thiery & Frachon (1997)

Forma da Colónia:



Análise Molecular:



Figura 3 - Folha de registo da base de dados “Bactérias Entomopatogénicas dos Açores” do CIRN.



Figura 4 - Isolados *Bacillus* de amostras da Ilha do Pico em caixas de Petri com meio UG agarizado.

Quadro 2 - Número de amostras recolhidas em cada coberto vegetal nas ilhas do Pico e do Faial.

| Cobertura Vegetal | Pico | Faial |
|-----------------------|------|-------|
| Vinha | 27 | 4 |
| Pastagem | 9 | 4 |
| Batata | 10 | 3 |
| Cebola | 2 | 1 |
| Feto | - | 1 |
| Alface | | 1 |
| Diversos cultivares | 1 | 1 |
| Batata-doce | 1 | 1 |
| Milho | 9 | 1 |
| Inhame | 3 | - |
| Couve | 6 | - |
| Mato, flores, urze | 5 | - |
| Agrião | 3 | - |
| Fava | 6 | - |
| Nabo | 2 | - |
| Terreno não cultivado | 2 | - |

Quadro 3 - Pesquisa de entomopatógenos

| | Nemátodes | | <i>Bacillus</i> | |
|--------------------|-----------|-------|-----------------|-------|
| | Pico | Faial | Pico | Faial |
| Amostras tratadas | 87 | 17 | 55 | 0 |
| Amostras positivas | 0 | 0 | 55 | 0 |

REFERÊNCIAS

- DIAS, C., P. GARCIA, N. SIMÕES & L. OLIVEIRA. 2005. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* against *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Phyllocnistidae). *J. Econ. Entomol.* 98: 1880-1883.
- International Entomopathogenic Bacillus Centre (IEBC) INSTITUTE PASTEUR, Paris, França. [www.pasteur.fr/applications].
- ITO, A., Y.SASAGURI, S.KITADA, K. KUSAKA, K. KUWANO, K. MASUTOMI, E. MIZUKI, T. AKKAO & M. OHBA, 2004. A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279 (20): 21282-21286.
- LEITE, F., 2004. Pesquisa de *Bacillus thuringiensis* e de nemátodes entomopatogénicos em S. Miguel. Relatório de estágio final da Licenciatura em Biologia. Universidade dos Açores. 101 pp.
- LUCENA, M.A., R. MONTIEL, D. TOUBARRO & N. SIMÕES, 2004. Molecular cloning and characterization of two nematode cDNAs encoding serine proteases with potential fibrinolytic activity. XIV Congresso Nacional de Bioquímica. 2-4 Dezembro de 2004. Vilamoura, Portugal.
- OKUMURA, S., T. AKKAO, K. HIGUCI, H. SAITOH, E. MIZUKI, M. OHBA & K. INOUE, 2004. *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology* 39 (1): 89.

- ROSA, J.S., E. BONIFASSI, J.J. AMARAL, L.A. LACEY, N. SIMÕES & C. LAUMOND, 2000. Natural Occurrence of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: *Steinernema*, *Heterorhabditis*) in the Azores. *J. Nematol.* 32 (2): 215-222.
- ROSA, J.S. & N. SIMÕES, 2004. Evaluation of twenty-eight strains of *Heterorhabditis* bacteriophora isolated in Azores for biocontrol of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 29: 409-417.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C., C.E. BULLEJOS, J.S. ROSA, N. SIMÕES & H. K. ALDEBIS, 1998. Presence of *Bacillus thuringiensis* on Graciosa Island (Açores, Portugal). *III Simpósio Fauna e Flora das Ilhas Atlânticas*. 21-25 Setembro de 1998, Ponta Delgada.