

RECOLHA DE AMOSTRAS DE SOLO NAS ILHAS DAS FLORES E CORVO PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÉNICAS*

ANA DUARTE, BRUNO CORREIA,
NATESAN BALASUBRAMANIAN & YOU JIN HAO

*CIRN & Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Rua da Mãe de Deus, 13-A
Apartado 1422, 9501-801 Ponta Delgada*

* Participaram na análise do solo no laboratório Ana Duarte e Bruno Correia

RESUMO

Durante a XIII Expedição Científica do Departamento de Biologia às ilhas das Flores e Corvo em 2007 recolheram-se amostras de solo e água a diferentes altitudes e com diversos cobertos vegetais, (78 na Ilha das Flores e 25 na Ilha do Corvo), as quais foram transportadas para o laboratório de Entomopatologia para isolamento de bactérias entomopatogénicas. Destas 103 amostras obtivemos 509 isolados puros, 275 destes pertencentes ao Grupo *Bacillus cereus*, onde se enquadra o *Bacillus thuringiensis*. Estes isolados estão a ser identificados a nível da espécie por métodos bioquímicos e moleculares. No entanto, até à presente data, obtiveram-se apenas 7 isolados de *Bacillus thuringiensis* provenientes do Corvo. Todos os isolados estão depositados no Banco de Bactérias Entomopatogénicas dos Açores / Centro de Investigação do Recursos Naturais (BEA/CIRN).

INTRODUÇÃO

As bactérias entomopatogénicas são produzidas e comercializadas para o controlo biológico de insectos pragas no mundo inteiro. Em anteriores expedições científicas do Departamento de Biologia, recolhemos amostras de solo da Graciosa e algumas amostras de S. Miguel. Estes isolados mostraram actividade contra insectos que presentemente são importantes pragas agrícolas no Arquipélago (Leite, 2004 e Dias *et al.*, 2005).

B. thuringiensis para além de ser patogénica para um grande número de insectos, produz citotoxinas que têm actividade contra células cancerígenas (Ito *et al.*, 2004 e Okumura *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 nas Flores e no Corvo pretendemos isolar *Bacillus thuringiensis* que poderão ser depois usados como agentes de controlo biológico mas, também analisados para a produção de citotoxinas e de enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Fizeram-se recolhas de amostras de solo em locais seleccionados aleatoriamente nas ilhas das Flores e do Corvo (Figuras 1 e 2). Em cada local recolheram-se 10

sub-amostras de solo de cerca de 100 g, obtido até uma profundidade de cerca de 10 cm, sempre que possível, até ter sido recolhido um volume total de amostra de 500 cm³. 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. Entre as amostragens dos diferentes locais o material de recolha foi devidamente limpo.

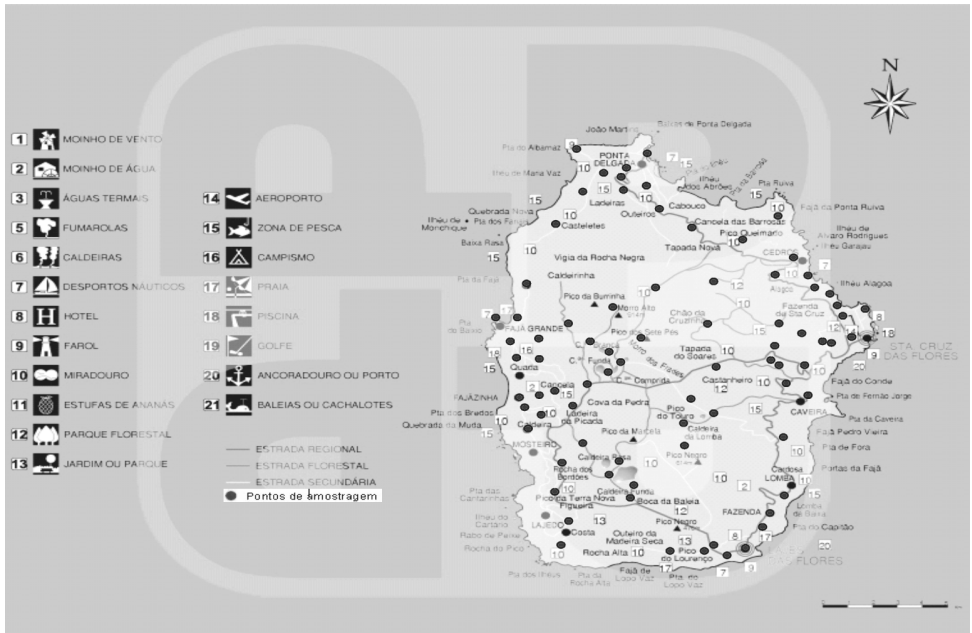


Figura 1 - Distribuição das 78 amostras recolhidas na Ilha das Flores.

Não existe nenhum meio selectivo para *Bacillus* sp. . Geralmente, submetem-se as amostras a um tratamento de altas temperaturas e, depois, a crescimento aeróbio. Os esporos que estas bactérias produzem em condições adversas são resistentes a estas temperaturas (Lacey, 1997 e Alberola *et al.*, 1999).

Assim, de cada amostra de solo homogeneizada, retiraram-se 4 g, que foram posteriormente suspendidos em 9 ml de Soro Fisiológico estéril. Esta suspensão foi vortexada para homogeneizar, e tratada a 80 °C durante 10 minutos para eliminar células vegetativas. Fizeram-se diluições decimais seriadas até à 10⁻³ com soro estéril. Espalharam-se 0.1 ml das diluições 10⁻² e 10⁻³ em caixa de Petri com Meio UG agarizado. Incubou-se a 28 °C durante 24 horas. Após este tempo de incubação, retiraram-se diferentes colónias das placas e efectuou-se uma selecção de acordo com a forma da colónia, textura e cor e isolaram-se as colónias até serem obtidas culturas puras.

Após este isolamento inoculou-se isoladamente cada colónia em 10 ml de meio líquido UG contendo glucose 1,5 %, que foi incubada a 30 °C, num agitador a 100 rpm, durante 48 horas.



Figura 2 - Distribuição das 25 amostras recolhidas na Ilha do Corvo.

Caracterização Bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada através dos testes AMC, Carbohidratos e anaerobiose, com base no trabalho de Lacey, 1997. Os isolados cujos resultados dos testes foram positivos para o AMC, negativos para os carbohidratos e anaeróbicos facultativos, pertenciam ao grupo dos *Bacillus cereus*.

Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica dos isolados pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* efectuou-se ao microscópio de contraste de fase, sob a objectiva de 100x (ampliação total de 1000 vezes), e registou-se a forma, a dimensão, a mobilidade das células, o esporo e o corpo paraesporal (se presente) e a respectiva forma, posição e a forma do cristal (característica única de *Bacillus thuringiensis*).

Na identificação de *B. thuringiensis*, utilizou-se como base de referência duas variedades de *B. thuringiensis* conhecidos – *B. thuringiensis* var. *israelensis* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, gentilmente cedidos pelas Doutoradas Carla Cabral e Luísa Oliveira, respectivamente.

Os isolados anexos foram caracterizados por análise morfológica, enzimática e molecular através dos métodos já anteriormente utilizados (Santiago-Alvarez *et al.*, 1998 e Leite, 2004).

Conservação dos isolados

Das culturas puras de cada um dos isolados, retiraram-se alíquotas que foram conservadas em meio UG suplementado com glicerol a 20 %, e guardadas a -80 °C no BEA/CIRN. Para cada isolado foi aberta uma folha de registo na base de dados (Figura 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento de *Bacillus* sp. nas ilhas das Flores e Corvo revelou a presença destas bactérias em todos os locais de colheita (Tabela 2).

Durante a expedição, recolheram-se 78 amostras nas Flores, a maioria delas abaixo dos 400 m altitude, onde habitualmente existe a maior densidade de insectos, e, no Corvo, realizaram-se 25 amostragens, a maior parte delas também abaixo dos 400 m (Tabela 2). Recolheram-se amostras em locais com diferentes coberturas vegetais, de modo a obter uma amostragem representativa (Tabela 3).

Até à presente data, tratámos 25 amostras de terra do Corvo para a presença de *Bacillus* (Tabela 1). Destas 25 amostras, obtiveram-se 125 isolados puros dos quais, baseados em caracteres morfológicos das colónias e em testes enzimáticos, se identificaram 95 como pertencentes ao Grupo dos *Bacillus cereus*.

Das 78 amostras de terra recolhidas nas Flores para a presença de *Bacillus* (Tabela 1), obtiveram-se 384 isolados puros dos quais, baseados em caracteres morfológicos das colónias e em testes enzimáticos, se identificaram 180 como pertencentes ao Grupo dos *Bacillus cereus*. Sete destes isolados já foram identificados, através da visualização ao microscópio, como *Bacillus thuringiensis*, devido à presença de cristal característico desta espécie (Figura 3). A caracterização morfológica deve continuar de modo a identificar mais isolados desta espécie para posterior análise de citotoxinas e enzimas.

Numa amostragem de solo da Graciosa obtiveram-se 3 novos *serovares* de *B. thuringiensis* (Santiago-Alvarez *et al.*, 1998), o que sugere a existência de isolados dos Açores com características potencialmente interessantes.

Todos os isolados puros obtidos durante a Expedição Científica do Departamento de Biologia às ilhas Flores e Corvo em 2007, fazem parte do BEA/CIRN, onde estão registados (Figura 3).

Tabela 1 - Resultados obtidos das amostras recolhidas nas ilhas das Flores e Corvo.

Ilha	Amostras	Isolados c/espores	Grupo <i>B. cereus</i>	Isolados c/cristal (<i>Bt</i>)
Corvo	25	125	95	7
Flores	78	384	180	0
Total	103	509	275	7

Tabela 2 - Número de amostras recolhidas nas ilhas das Flores e do Corvo por classes de altitude.

Altitude (m)	Flores	Corvo
0-50	6	1
51-100	5	3
101-200	10	5
201-300	19	7
301-400	11	3
401-500	7	4
501-600	12	2
601-700	8	0
+ de 701	2	0

Tabela 3 - Número de amostras recolhidas em cada coberto vegetal nas ilhas das Flores e do Corvo.

Cobertura Vegetal	Flores	Corvo
Terra cultivada	5	7
Mato	49	1
Erva	22	14
Água	2	3

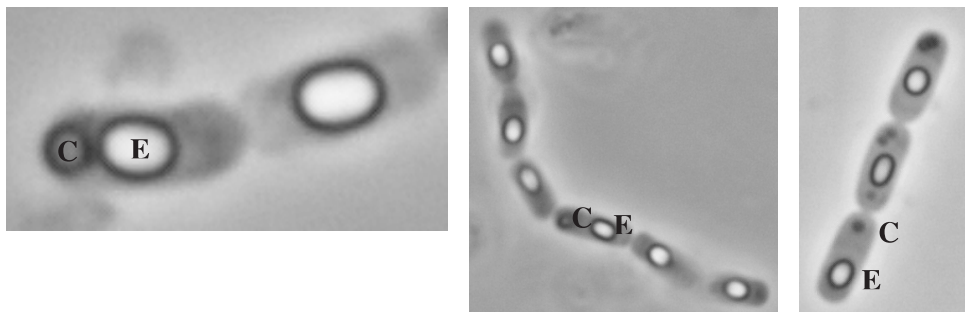


Figura 3 - Imagens de isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidas em microscópio de contraste de fase
E- Esporo, C- Cristal.

REFERÊNCIAS

- ALBEROLA, T., S. APTOSOGLOU, M. ARSENAKIS, Y. BEL, G. DELRIO, D.J. ELLAR, J. FERRÉ, F. GRANERO, D.M. GUTTMANN, S. KOLIAIS, M.J. MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, R. PROTA, S. RUBINO, A. SATTÀ, G. SCARPELLINI, A. SIVROPOULOU & E. VASARA, 1999. Insecticidal Activity of Strains of *Bacillus thuringiensis* on Larvae and Adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). *J. Invertebrate Pathology*, 74: 127-136.

- DIAS, C., P. GARCIA, N. SIMÕES & L. OLIVEIRA, 2005. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* against *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Phyllocnistidae). *J. Econ. Entomol.*, 98: 1880-1883.
- ITO, S.Y., S. KITADA, Y. KUSAKA, K. KUWANO, K. MASUTOMI, E. MIZUKI, T. AKAO & M. OHBA, 2004. A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. *J. Biol. Chem.*, 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.
- LACEY, L. (ed.), 1997. Manual of techniques in insect pathology. San Diego, Academic Press, inc., 409 pp.
- OKUMURA, A. T, K. HIGUCHI, H. SAITOH, E. MIZUKI, M. OHBA & K. INOUE, 2004. *Bacillus thuringiensis* serovar shandongensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 1 (89).
- SANTIAGO-ALVAREZ, C., C. BULLEJOS, J. ROSA, N. SIMÕES & H. ALDEBIS, 1998. Presence of *Bacillus thuringiensis* on Graciosa Island (Açores, Portugal). *III Simpósio Fauna e Flora das Ilhas Atlânticas*. 21-25 de Setembro de 1998, Ponta Delgada.