

RECOLHA DE AMOSTRAS DE SOLO NA ILHA DE SÃO JORGE PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÉNICAS

MÁRIO TEIXEIRA, TÂNIA TEIXEIRA, ALEXANDRA FARRICA,
CARLA CABRAL, NELSON SIMÕES & LUISA OLIVEIRA

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

RESUMO

Durante a XV Expedição Científica do Departamento de Biologia à Ilha de São Jorge em 2011 recolheram-se 80 amostras de solo e água a diferentes altitudes e com diversos cobertos vegetais. Estas amostras foram transportadas para o laboratório de Entomopatologia para isolamento de bactérias entomopatogénicas. Obtivemos 400 isolados puros que foram identificados até ao grupo de *Bacillus cereus*, no qual se enquadra a espécie *B. thuringiensis*. Estes isolados estão depositados na Colecção de Entomopatógenos dos Açores (CEA) na Universidade dos Açores/Centro de Investigação do Recursos Naturais (CIRN).

PALAVRAS-CHAVE: Isolamento de bactérias, *Bacillus thuringiensis*, Bactérias entomopatogénicas, Controlo biológico.

ABSTRACT

During the XV Scientific Expedition of the Biology Department to the island of São Jorge in 2011 we collected 80 soil samples and water at different altitudes and with different covering plants. These samples were transported to the laboratory of Entomopathology for the isolation of entomopathogenic bacteria. We obtained 400 pure isolates that were identified as belonging to the Group of *Bacillus cereus*, in which fits the species *B. thuringiensis*. These strains are deposited in the collection of Entomopathogens of Azores (CEA) at the University of the Azores/Natural Resources Research Centre (CIRN).

KEYWORDS: Bacteria isolation, *Bacillus thuringiensis*, Entomopathogenic bacteria, Biological control.

INTRODUÇÃO

As bactérias entomopatogénicas *B. thuringiensis* são produzidas e comercializadas para o controlo biológico de pragas no mundo inteiro. Em anteriores expedições científicas do Departamento de Biologia, recolheram-se amostras de solo na ilha do Corvo, Faial, Pico, Flores, Santa Maria e São Miguel das quais se extraíram cerca de 250 isolados de *B. thuringiensis*. Estes isolados mostraram actividade contra insectos que presentemente são importantes pragas agrícolas no Arquipélago (Leite *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2005).

B. thuringiensis para além de ser patogénica para um grande número de insectos, produz citotoxinas (parasporinas) que têm actividade contra células cancerígenas (Jung *et al.*, 2007; Ohba *et al.*, 2009) e por isso há interesse em procurar novos isolados produtores de citotoxinas que tenham as propriedades desejadas.

Com a recolha de amostras de solo de São Jorge pretendemos isolar *B. thuringiensis* que poderão ser usados como agentes de controlo biológico bem como analisar a sua capacidade de produção de citotoxinas e enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Fizeram-se recolhas de amostras de solo em locais seleccionados aleatoriamente na ilha de São Jorge (Figura 1). 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. Recolheram-se amostras em locais com diferentes altitudes e coberturas vegetais, de modo a obter uma amostragem representativa.

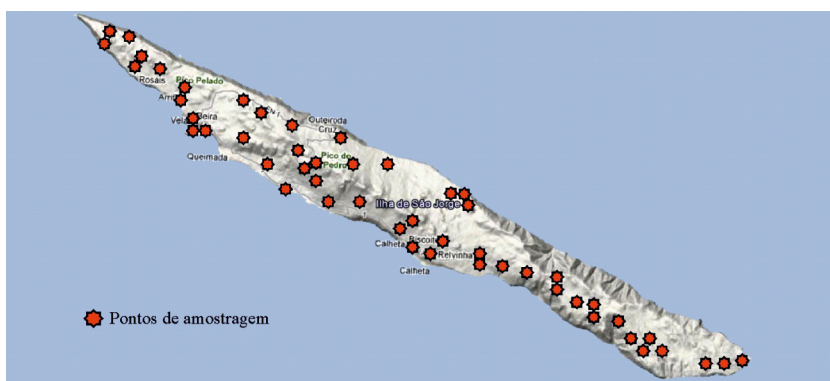


Figura 1: Distribuição dos locais de recolha das 80 amostras recolhidas na Ilha de São Jorge

Isolamento

Não existe nenhum meio selectivo para *Bacillus* sp. Geralmente, submetem-se as amostras a um tratamento de altas temperaturas. Os esporos que estas bactérias produzem em condições adversas são resistentes a estas temperaturas (Lacey, 1997; Alberola *et al.*, 1999). Seguidamente fazem-se germinar os esporos em cultura aeróbica. Assim, de cada amostra de solo homogeneizada, retirou-se 4 g, que foram posteriormente suspensos em 9 ml de soro fisiológico esterilizado. Esta suspensão foi ao vortex para homogeneizar, e aquecida a 80 °C durante 10 minutos para eliminar células vegetativas.

Efetou-se diluições decimais seriadas até à 10⁻³ com soro esterilizado. Espalhou-se 0.1 ml das diluições 10⁻² e 10⁻³ em caixa de Petri com meio T3 agar. Incubou-se a 28 °C durante 24 horas. Após este tempo de incubação, 5 colónias foram seleccionadas de acordo com a forma da colónia, textura e cor e isolou-se as colónias até serem obtidas culturas puras.

Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica dos isolados pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* foi feita ao microscópio de contraste de fase, sob a objectiva de 100x (ampliação total de 1000 vezes). Registou-se a forma, a dimensão, a mobilidade das células, a existência do esporo e do corpo parasporal quando presente e a respectiva forma e posição. A presença do cristal é uma característica única de *B. thuringiensis*.

Na identificação de *B. thuringiensis*, utilizou-se como base de referência duas estirpes de *B. thuringiensis* conhecidos: *B. thuringiensis* var. *israelensis* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Figura 2)

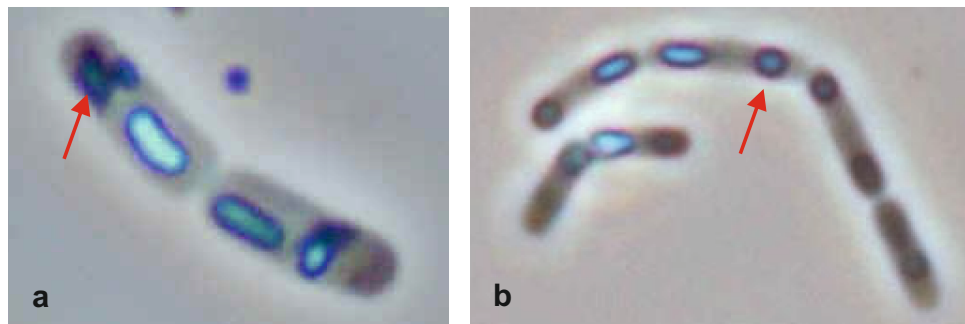


Figura 2: Cristais bipiramidais da bactéria *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (a); e dos cristais esféricos da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* (b),

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostragem

Durante a expedição, recolheram-se 80 amostras cobrindo a totalidade da Ilha de S. Jorge. Embora tenhamos recolhido amostras até aos 1000 m de altitude, a maioria das amostras foi recolhida abaixo dos 600 m, onde habitualmente existe a maior densidade de insetos (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição de amostras recolhidas na ilha de São Jorge por classes de altitude.

Altitude (m)	Número
0-300	31
301-600	16
601-1000	33

No que respeita à distribuição por cobertos vegetais recolheu-se amostras em terrenos cultivados, em mato e em pastagens. Também se efectuaram amostras de água estagnada que muitas vezes é um bom reservatório de esporos bacterianos (Quadro 2).

Quadro 2: Distribuição de amostras recolhidas em cada coberto vegetal na ilha de São Jorge.

Cobertura Vegetal	Número
Terra Cultivada	16
Pasto	22
Erva	37
Água	5

Isolamento

Até à presente data, tratámos as amostras recolhidas em São Jorge para a presença de *Bacillus*. Das 80 amostras (Figura 1) foi possível isolar 400 isolados puros. Estes isolados fazem parte do Banco de Bactérias de *Bacillus* dos Açores, e constam do respectivo registo. Actualmente estes isolados estão a ser analisados para a presença do corpo parasporal, que os identificará como *B. thuringiensis*.

BIBLIOGRAFIA

- ALBEROLA, T., S. APTOSOGLOU, M. ARSENAKIS, Y. BEL, DELRIO, D.J. GELLAR, J. FERRÉ, F.D. GRANERO, 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.
- LACEY, L. (1997). "Manual of techniques in insect pathology" San Diego, *Academic Press*, 409 pp.
- JUNG, Y., C. MIZUKI, E. AKAO & T.C. COTE (2007). "Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells." *J. Appl. Microbiol.*, 103: 65-79
- 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.
- OHBA, M., E. MIZUKI & A. UEMORI (2009). "Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*." *Anticancer Res.*, 29: 427-433.