

# RECOLHA DE AMOSTRAS DE SOLO NA ILHA DE SANTA MARIA PARA ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÉNICAS

MÁRIO TEIXEIRA, TÂNIA TEIXEIRA, ALEXANDRA FARRICA,  
NELSON SIMÕES & LUÍSA OLIVEIRA

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

## RESUMO

Durante a XIV Expedição Científica do Departamento de Biologia à Ilha de Santa Maria em 2009 recolheram-se 50 amostras de solo e água a diferentes altitudes e com diversos cobertos vegetais, as quais foram transportadas para o laboratório de Entomopatologia para isolamento de bactérias entomopatogénicas. Destas 50 amostras obtivemos 250 isolados puros. Estes isolados aguardam identificação a nível do Grupo *Bacillus cereus*, onde se enquadra o *Bacillus thuringiensis*. Serão usados métodos bioquímicos e moleculares. Todos os isolados estão depositados no Banco de Bactérias de *Bacillus* dos Açores | Centro de Investigação do Recursos Naturais (CIRN).

## INTRODUÇÃO

As bactérias entomopatogénicas 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 do Corvo, Faial, Pico, Flores e São Miguel. Estes isolados mostraram actividade contra insectos que presentemente são importantes pragas agrícolas no Arquipélago (Leite, 2004; Dias *et al.*, 2005).

*Bacillus thuringiensis* para além de ser patogénica para um grande número de insectos, produz citotoxinas (parasporinas) que têm actividade contra células cancerígenas (Jung, Mizuki *et al.*, 2007; Ohba, Mizuki *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 Santa Maria pretendemos isolar *Bacillus thuringiensis* que poderão ser depois usados como agentes de controlo biológico bem como analisar a sua capacidade de produção de citotoxinas e de enzimas.

## MATERIALE MÉTODOS

### AMOSTRAGEM

Fizeram-se recolhas de amostras de solo em locais seleccionados aleatoriamente na ilha de Santa Maria (Figuras 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 cm<sup>3</sup>. 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.

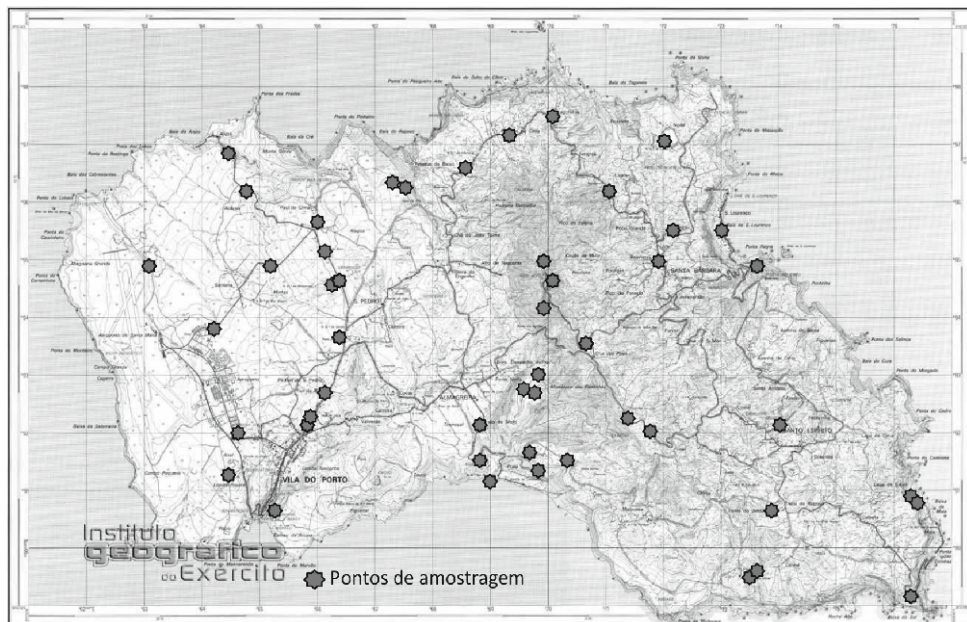


Figura 1 - Distribuição das 50 amostras recolhidas na Ilha de Santa Maria.

## ISOLAMENTO

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; Alberola *et al.*, 1999).

Assim, de cada amostra de solo homogeneizada, retiraram-se 4 g, que foram posteriormente suspensos em 9 ml de Soro Fisiológico estéril. Esta suspensão foi ao vortex para homogeneizar, e aquecida a 80 °C durante 10 minutos para eliminar células vegetativas.

Fizeram-se diluições decimais seriadas até à 10<sup>-3</sup> com soro estéril. Espalharam-se 0.1 ml das diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> em caixa de Petri com Meio T3 agarizado. Incubou-se a 28 °C durante 24 horas. Após este tempo de incubação, retiraram-se 5 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.

## CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A caracterização bioquímica foi realizada através dos testes AMC, Carbohidratos e anaerobiose, com base no trabalho de Lacey (1997). Seleccionaram-se os isolados cujo resultado do teste for positivo para o AMC, negativos para os carbohidratos e anaeróbicos facultativos, por pertencerem ao grupo dos *Bacillus cereus*.

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

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

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a expedição, recolheram-se 50 amostras em Santa Maria, a maioria delas abaixo dos 400 m altitude, onde habitualmente existe a maior densidade de insectos (Tabela 1).

Recolheram-se amostras em locais com diferentes coberturas vegetais, de modo a obter uma amostragem representativa (Tabela 2).

Até à presente data, tratámos 50 amostras de terra de Santa Maria para a presença de *Bacillus* (Tabela 2). Destas 50 amostras, obtiveram-se 250 isolados puros, que aguardam identificação de presença do corpo parasporal.

Todos os isolados puros obtidos durante a Expedição Científica do Departamento de Biologia a Santa Maria, fazem parte do Banco de Bactérias de *Bacillus* dos Açores, onde estão registados.

Tabela 1 - Distribuição de amostras recolhidas na ilha de Santa Maria por classes de altitude.

| Altitude (m) | Santa Maria |
|--------------|-------------|
| 0-50         | 6           |
| 51-100       | 4           |
| 101-200      | 14          |
| 201-300      | 19          |
| 301-400      | 2           |
| 401-500      | 2           |
| 501-600      | 3           |

Tabela 2 - Distribuição de amostras recolhidas em cada coberto vegetal na ilha de Santa Maria.

| Cobertura Vegetal | Santa Maria |
|-------------------|-------------|
| Terra Cultivada   | 12          |
| Mato              | 19          |
| Erva              | 13          |
| Água              | 6           |

## BIBLIOGRAFIA

- 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. SATTA, 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. (ed.), 1997. "Manual of techniques in insect pathology". San Diego, Academic Press, inc., 409 pp.
- 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.
- JUNG, Y. C., E. MIZUKI, T. AKAO & J.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(1): 65-79.
- OHBA, M., E. MIZUKI & A. VEMORI, 2009. "Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*." *Anticancer Res.*, 29(1): 427-433.