

## ISOLAMENTO DE MUTANTES ASPOROGÊNICOS DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*

Laurival Antonio Vilas-Bôas \*

Veridiana Torrezan. P. Braz\*\*

Gislayne Fernandes. L. T. Vilas-Bôas \*\*\*

Olivia Marcia. N. Arantes\*\*\*\*

### RESUMO:

Foram isolados 13 mutantes asporogênicos cristalíferos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407 após tratamento com o agente mutagênico etil-metano-sulfonado e quatro mutantes pela irradiação com luz Ultra-Violeta. Todos os mutantes obtidos foram considerados como verdadeiros asporogênicos, pois suas células não resistiram ao tratamento de calor. Os cristais de todos os mutantes foram analisados por microscopia óptica e apresentaram forma típica daqueles formados pela linhagem selvagem. Dois dos 17 mutantes foram considerados relativamente estáveis e, portanto, o uso destes mutantes asporogênicos para a produção de um bioinseticida sem esporos é sugerido.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esporulação, mutagênese, cristalíferos, asporogênico.

### ABSTRACT:

Thirteen asporogenic crystalliferous mutant strains of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 407 were isolated after treatment with the mutagen ethyl-methane-sulfonate agent and four mutants were isolate after treatment with UV light irradiation. All the mutants thus obtained were considered true asporogenic mutants, for their cells did not resist the heat treatment. The crystals of all the mutants were analyzed by optical microscopy and presented the typical shape of those crystals formed from the wild strain. Two of the seventeen mutants were considered relatively stable and so the use of these asporogenic mutants for the production of a bio-insecticide is recommended.

**KEY WORDS:** Sporulation, mutagenesis, crystalliferous, asporogenic.

## INTRODUÇÃO

O controle de insetos utilizando-se de inseticidas químicos sintéticos tem levado a inúmeros problemas incluindo desenvolvimento de resistência a estes produtos, aumento de pragas secundárias normalmente controladas por inimigos naturais, riscos de contaminação de seres humanos, animais domésticos e águas subterrâneas, diminuição da biodiversidade nas áreas tratadas, além de outros custos ambientais (CAPALBO et al, 2005). Estes são alguns dos problemas que tem estimulado o aumento de interesse em programas de controle integrado de insetos. A agricultura sustentável do século XXI é baseada em intervenções alternativas para o controle e manejo de insetos que sejam ambientalmente seguras e que reduzam o contato humano com os pesticidas químicos sintéticos.

\*Doutor em genética e melhoramento, Professor do Departamento de Biologia Geral – Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia

\*\*Bióloga pela Universidade Estadual de Londrina.

\*\*\*Doutora em Microbiologia,

\*\*\*\* Doutora em genética, docentes do Departamento de Biologia Geral (CCB), Universidade Estadual de Londrina (UEL). Autor Correspondente: O.M.N. ARANTES, Departamento de Biologia Geral (CCB), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Campus Universitário, Caixa Postal 6001, CEP: 86051-990, Londrina, PR. Fone: (43) 3371-4417. Fax: (43) 3371-4191. E-mail: orantes@uel.br

Microrganismos entomopatogênicos utilizados para o controle biológico incluem bactérias, vírus, fungos e protozoários (CAPALBO et al, 2005). A comparação dos produtos à base destes organismos com os inseticidas químicos convencionais é usualmente feita somente sob a perspectiva de suas eficácias e custos. No entanto, quando benefícios ambientais são incluídos suas vantagens são numerosas, como por exemplo, a segurança para seres humanos e outros organismos não alvo, a redução de resíduos nos alimentos, o aumento da atividade de outros inimigos naturais e o aumento da biodiversidade nos ecossistemas tratados.

Inseticidas comerciais baseados em *Bacillus thuringiensis* representam atualmente cerca de 1,5% do mercado mundial de controle de insetos (van FRANKENHYZEN, 1993, CRICKMORE, 2006) e aproximadamente 90% dos produtos de controle biológico. A atividade entomopatogênica desta bactéria é devida a formação de inclusões protéicas na forma de cristais paraesporais que podem ser facilmente visualizadas dentro da célula em esporulação ao microscópio óptico de contraste de fase. Estes cristais são formados por polipeptídios denominados de endotoxinas, comumente conhecidos como proteínas Cry (CRICKMORE et al, 1998), as quais são formadas e cristalizadas em concomitância com o processo de esporulação.

O espectro de atividade destas proteínas inclui larvas de insetos das Ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga bem como outros grupos tais como nematóides, protozoários e ácaros (SCHNEPF et al, 1998, CAPALBO et al, 2005).

Os primeiros produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* começaram a ser usados a partir de 1938 e têm se demonstrado ambientalmente seguros (ARANTES et al, 2002), sendo compostos em sua maioria por uma mistura de esporos e cristais. A obtenção de formulações livres de esporos, ou seja, a partir de linhagens que tenham perdido a capacidade de formar esporos, mas que mantenham a capacidade de produção do cristal entomopatogênico é mais uma opção na busca de produtos que provoquem distúrbios ambientais tão menores quanto possível (VILAS-BOAS et al, 2000; CRICKMORE, 2006).

Desta forma, este trabalho descreve o isolamento e a caracterização de mutantes asporogênicos (Spo<sup>-</sup> Cry<sup>+</sup>) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407, que apresenta toxicidade frente a duas pragas agrícolas de relevante importância mundial, as lagartas *Spodoptera littoralis* e *Plutella xylostella*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Linhagem e condições de cultura

*B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407 foi cultivada em meio Bacto-peptona (BP) (LECADET et al, 1980) líquido a 30°C com agitação até completa esporulação, monitorada em microscópio óptico comum. Os esporos e cristais foram então lavados e ressuspensos em água destilada esterilizada.

## Procedimentos de mutagênese

*Irradiação com Luz Ultra-violeta:* Um tratamento indutor de mutagênese foi realizado através da irradiação de uma suspensão de esporos com raios Ultra Violeta (UV), os quais foram gerados por uma lâmpada germicida de 4 Watts (254 nm). Para tanto, uma suspensão de 7 mL de esporos ( $3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) foi adicionada a uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, a qual foi mantida a 20 cm de distância da lâmpada durante 20 minutos em constante agitação. Após a irradiação, a suspensão de esporos foi semeada em placas de Petri contendo meio BP, as quais foram incubadas a 30°C por 5 dias.

*Tratamento com Etil-Metano-Sulfonado (EMS):* Para indução de mutação foi empregado o método descrito em Vilas-Boas et al (2005). Para tanto, foi utilizada uma suspensão de 4,5 mL de esporos ( $3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) em água destilada esterilizada. Esta suspensão foi incubada a 37°C por 40 minutos na presença de 0,5 mL de EMS, resultando em uma concentração final de 10% v/v. Após incubação, os esporos foram lavados 3 vezes em água destilada esterilizada e ressuspendidos em um volume final de 5 mL de água. A suspensão obtida foi utilizada para inóculo em placas de Petri contendo meio BP as quais foram incubadas a 30°C por 5 dias.

## Seleção de mutantes asporogênicos

Decorrido o tempo suficiente para a esporulação, a presença de esporos bem como de cristais nas colônias obtidas nas placas, após os tratamentos mutagênicos, foi monitorada através de análises ao microscópio óptico de contraste de fase.

## Tratamento de calor

Após microscopia óptica, cada colônia que não apresentou a formação de esporos foi inoculada em 10 mL de meio BP líquido e incubada a 30°C por 72 horas com agitação. A cultura obtida foi então aquecida a 80°C por 10 minutos. Após resfriamento, cada cultura foi diluída em série e semeada em placas contendo meio BP, as quais foram incubadas a 30°C por uma noite. A taxa de sobrevivência de cada mutante foi calculada a partir de quatro experimentos independentes como a razão do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) após tratamento de calor pelo número de UFC antes do tratamento de calor.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dose para a indução de mutação usada, tanto para a irradiação com luz Ultra-Violeta quanto para o tratamento com EMS foi a que permitiu aproximadamente 95% de sobrevivência dos esporos de *B. thuringiensis*. As colônias obtidas após ambos os tratamentos foram analisadas quanto aos aspectos morfológicos e ao microscópio óptico de contraste de fase para a verificação da formação de esporos e cristais. Entre todas as colônias obtidas, foi detectada a presença de algumas com morfologia alterada, tendo sido observadas colônias com tamanho redu-

zido ou com alterações de coloração, com aparência translúcida ou com setores menos pigmentados, além de colônias translúcidas com setores de coloração semelhante à linhagem selvagem, como mostra a Figura 1.

Diversos autores apontam a existência de uma associação freqüente entre mutantes asporogênicos e colônias com alterações morfológicas, principalmente quanto à consistência, apresentando-se translúcidas (KIM et al, 1994; YOUSTEN, 1978). Desta forma, nas análises ao microscópio óptico de contraste de fase, inicialmente foram analisadas colônias com alteração morfológica total ou com setores diferenciados partindo-se num segundo momento para a análise também daquelas com morfologia semelhante à linhagem selvagem. Para cada um dos experimentos de indução de mutação seja por irradiação com luz Ultra-Violeta, seja por exposição ao EMS, foram analisadas 3500 colônias. Do tratamento com luz Ultra-Violeta, foram obtidos quatro mutantes asporogênicos cristalíferos ( $Spo^- Cry^+$ ) e do tratamento com EMS outros treze mutantes com o mesmo fenótipo, ( $Spo^- Cry^+$ ).

Todos estes mutantes foram re-isolados em placas contendo meio BP e tiveram suas colônias analisadas quanto à morfologia, apresentando aspecto semelhante às colônias formadas pela linhagem selvagem. Este mesmo resultado também foi encontrado por Wakisaka et al (1982), que citam o isolamento de mutantes asporogênicos cristalíferos ( $Spo^- Cry^+$ ), formadores de colônias sem alterações morfológicas, com aspecto semelhante à linhagem selvagem ( $Spo^+ Cry^+$ ) e correlacionam a formação de colônias translúcidas com mutantes asporogênicos acristalíferos ( $Spo^- Cry^-$ ).

110

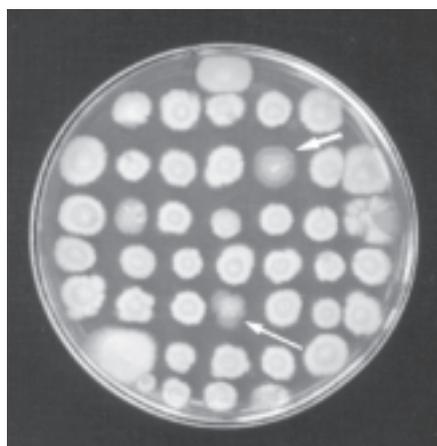


Figura 1 – Morfologia de colônias de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407 após tratamento com EMS, evidenciando colônias com aspecto semelhante à linhagem selvagem e colônias com alterações morfológicas (setas).

O isolamento de mutantes de esporulação oligoasporogênicos, ou seja, que apresentam a formação de uma baixa porcentagem de esporos, é uma característica bastante comum em relatos na literatura (JOHNSON et al, 1980). Por esta razão, cada um dos mutantes selecionados foi submetido a um tratamento de calor a 80°C para cálculo da freqüência de esporulação. Na análise de todos os 17 mutantes isolados, nenhum esporo foi verificado, sendo os mesmos considerados como asporogênicos verdadeiros.

R  
E  
V  
I  
S  
T  
A

Num passo seguinte, cada um dos mutantes obtidos foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em glicerol 25%, da mesma forma que são armazenadas bactérias não produtoras de esporos. Depois de estocados, cada um dos mutantes obtidos foi analisado quanto a estabilidade da manutenção da condição asporogênica através de passagens sucessivas em meio LB sólido. Os quatro mutantes asporogênicos induzidos por irradiação por luz UV reverteram à condição selvagem de produção de esporos após algumas repicagens, enquanto que no caso da mutagênese por EMS a reversão se deu para 11 dos 13 mutantes isolados, restando apenas dois mutantes que mantiveram estável a característica asporogênica após os repiques sucessivos.

A utilização de EMS (BHATTACHARYA, 2000; WAKISAKA et al, 1982; LECADDET et al, 1974) e luz Ultra-Violeta (KIM e LEE, 1984; MILLET e RYTER, 1972) como agentes mutagênicos no isolamento de mutantes asporogênicos de *B. thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus sphaericus* tem sido bastante descrita. Comparações dos resultados obtidos pelos diversos autores e neste trabalho demonstram a maior eficiência do EMS como agente mutagênico, tanto no que diz respeito ao isolamento de mutantes asporogênicos para estas bactérias, quanto à estabilidade dos mutantes isolados pelo tratamento com EMS, que com maior frequência, permanecem estáveis mesmo após múltiplas repicagens.

O isolamento de mutantes asporogênicos formadores de mais de um cristal protéico por célula é frequentemente relatado (KIM et al, 1994; LECADDET et al, 1980). Por esta razão, cada um dos 17 mutantes isolados foi examinado ao microscópio óptico de contraste de fase, visando-se verificar a formação de cristais protéicos. Em todos os mutantes, foi detectada a formação de um único cristal protéico por célula vegetativa, com aparência refringente e forma semelhante aos cristais formados por colônias selvagens.

Como demonstrado por Sanchis et al, (1999), Vilas-Boas et al, 2000 e Crickmore (2006), bioinseticidas à base de linhagens asporogênicas de *B. thuringiensis* apresentam vantagens, como por exemplo, ser livre de esporos, sendo ambientalmente mais seguros e manter encapsulados os cristais nas células vegetativas da linhagem mutante, os quais ficam protegidos da luz solar e, com isso, mantêm por mais tempo a atividade tóxica no campo. Por ter sido detectada a manutenção da formação do cristal protéico, o qual confere à bactéria a atividade entomopatogênica, os dois mutantes isolados que não reverteram a característica asporogênica, deverão, num segundo momento, ser analisados quanto à manutenção da atividade tóxica frente a larvas *S. littoralis* e *P. xylostella*, submetidos a ensaios de fermentação e formulação para verificação da viabilidade de utilização de algum destes mutantes para produção de um bioinseticida.

## REFERÊNCIAS

ARANTES, O.M.N.; VILAS-BÔAS, L.A.; VILAS-BÔAS, G.F.L.T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no Controle Biológico. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (orgs.). *Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria*. Vol.2. Caxias do Sul : EDUCS, p. 269-293, 2002.

BHATTACHARYA, P.R. Hyper-production of insecticidal crystal protein (delta-endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is not related to sporulation-specific biochemical functions. *Curr. Microbiol.*, v. 41, p. 187-191, 2000.

CAPALBO, D. M. F. ; VILAS-BOAS, G. F. L. T. ; ARANTES, Olivia M N ; SUZUKI, Marise .  
Bacillus thuringiensis: formulações e plantas transgênicas. *Biotecnologia ciência & desenvolvimento*, Brasília/DF, v. 34, p. 76-83, 2005.

CRICKMORE N. Beyond the spore - past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *Journal of Applied Microbiology*, 2006 *In press*

Crickmore, N.; Zeigler, D. R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. REVISION OF THE NOMENCLATURE FOR THE *BACILLUS THURINGIENSIS* PESTICIDAL CRYSTAL PROTEINS. *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, V. 62, P. 807-813, 1998.

van FRANKENHYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (coords.). *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester : J. Wiley & Sons, p. 1-35, 1993.

JOHNSON, D.E.; NIEZGODSKI, D.M.; TWADDLE, G.M. Parasporal crystals produced by oligosporous mutants of *Bacillus thuringiensis* (Sp<sup>-</sup> Cr<sup>+</sup>). *Can. J. Microbiol.*, v. 29, p. 486-491, 1980.

KIM, H.-S.; CÔTÉ, J.-C.; FRÉCHETTE, S.; CHUNG, Y.S. Isolation and characterization of mutants of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 76, p. 234-239, 1994.

112 KIM, Y.-H.; LEE, H.-H. Isolation of sporeless temperature-sensitive mutants of *Bacillus sphaericus*. *HG J. Gen. Eng.* v. 1, p. 15-21, 1984.

LECADET, M.-M.; BLONDEL, M.O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP54. *J. Gen. Microbiol.*, v. 121, p. 203-212, 1980.

LECADET, M.-M.; KLIER, A.F.; RIBIER, J. Isolation and characterization of two asporogenous rifampicin resistant mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Biochimie*, v. 56, p. 1471-1479, 1974.

MILLET, J.; RYTER, A. Mutants de *Bacillus subtilis* Marburg bloqués tardivement dans leur sporulation. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, v. 122, p. 395-406, 1972.

SANCHIS, V.; GOHAR, M.; CHAUFAX, J.; ARANTES, O.M.N.; MEIER, A.; AGAISSE, H.; CAYLAÉY, J.; LERECLUS, D. Development and field performance of a broad spectrum non viable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with improved potency and increased UV resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 4032-4039, 1999.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 775-806, 1998.

VILAS-BOAS, G. F. L. T. ; VILAS-BOAS, L. A. ; SARIDAKIS, H. O. ; BRAZ, V. T. P. ; SANTOS, C. A. ; ARANTES, O. M. N. Isolation and partial characterization of a mutant of *Bacillus thuringiensis* producing melanin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 271-274, 2005.

VILAS-BOAS, L. A ; VILAS-BOAS, G. F. L. T. ; SARIDAKIS, H. O. ; LEMOS, M. V. F ; LERECLUS, D ; ARANTES, Olivia M N . Survival and Conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *Fems Microbiology Ecology*, v. 31, p. 255-259, 2000.

WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; KOIZUMI, K.; NISHIMOTO, Y.; ENDO, Y.; NISHIMURA, M.S.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. Asporogenous *Bacillus thuringiensis* mutant producing high yields of delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 43, p. 1498-1500, 1982.

YOUSTEN, A.A. A method for the isolation of asporogenic mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.*, v. 24, p. 492-494, 1978.