

Pesquisa e Desenvolvimento de Formulações para Proteção de Protoxinas de *Bacillus* e Outras Bactérias Esporuladas Entomopatogênicas

Searching and Developing Formulations to Protect *Bacillus* Protoxins and Other Entomopathogenic Sporulated Bacteria

DOI: 10.46919/archv1n5-017

Recebimento dos originais: 10/07/2020

Aceitação para publicação: 30/08/2020

Vera Cristina Pessoa de Lima

Bióloga pela Universidade Celso Lisboa

Instituição: Laboratório de Fisiologia Bacteriana- LFB/Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Endereço: Av. Brasil nº 4360, CEP: 21040-900 salas: 300;308;310;312 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil)

E-mail: vera@ioc.fiocruz.br

Adriana Marcos Vivoni

Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Instituição: Laboratório de Fisiologia Bacteriana- LFB/Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Endereço: Av. Brasil nº 4360, CEP: 21040-900 salas: 300;308;310;312 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil)

E-mail: avivoni@ioc.fiocruz.br

Leon Rabinovitch

Doutor em Enzimologia e Tecnologia das Fermentações pela Universidade Federal Fluminense - UFF

Instituição: Laboratório de Fisiologia Bacteriana- LFB/Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Endereço: Av. Brasil nº 4360, CEP: 21040-900 salas: 300;308;310;312 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil)

E-mail: leon@ioc.fiocruz.br

Maria Alice Varjal de Melo Santos

Doutora em Saúde Pública pelo Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-CPqAM

Instituição: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-CPqAM/Fiocruz

Endereço: Av. Professor Moraes Rego s/n, CEP: 50.740-465 Campus da UFPE, Recife/PE - Brasil.

E-mail: mavarjal@cpqam.fiocruz.br

Ricardo Tadeu Lopes

Doutor em Engenharia Nuclear pela Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Instituição: Programa de Engenharia Nuclear - COPPE-UFRJ

Endereço: Av. Pedro Calmon 550- Cep: 21941972 - Cidade Universitária UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: rlopes@coppe.ufrj.br

RESUMO

Bacillus e Gêneros correlatos apresentam espécies que são larvicidas, de mosquitos vetores de doenças tropicais. Alguns sorovares produzem protoxinas as quais os insetos sensíveis transformam em estruturas químicas altamente tóxicas para si. Com base nesse conhecimento, alguns sorovares de *Bacillus thuringiensis* e de *Lysinibacillus sphaericus* são usados em preparações inseticidas larvicidas. Na maioria desses inseticidas os esporos bacterianos estão presentes juntamente com as toxinas, por serem inócuos aos homens e à maioria dos animais, bem como são apresentados em diferentes formulações contendo ácidos orgânicos, espessantes, conservantes, emulsionantes, desintegradores e água. No entanto, alguns usuários de produtos comerciais preferem larvicidas bacterianos isentos de esporos viáveis, para aplicação ambiental em larga escala. Este trabalho elaborado com formulação especial e experimentado com esporos viáveis de *L. sphaericus* 2362, ativos contra *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles darlingi*, cultivado em NYSM gerador de biomassa altamente esporogênica e tóxicogênica evidencia que, para a formulação empregada, o desenvolvimento de um concentrado emulsionável, os esporos presentes tratados com Co-60 (4.86h-1; fator 1.13) podem tender para 0 com aplicação de 20 kGy independente da conservação de alta atividade larvicida preservada contra *C. quinquefasciatus*. Alguns parâmetros importantes do processo de fermentação, de atividade e dosagem biológica serão mostrados neste trabalho.

Palavras-Chaves: Sorovares de *Bacillus*, esporos e Co-60

ABSTRACT

Bacillus and related genera present larvicides species to mosquitoes that are vectors of tropical diseases. Some serovars produce protoxins which sensitive insects transform into chemical structures highly toxic to themselves. Based on this knowledge, some *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* serovars are used in larvicidal insecticidal preparations. In most of these insecticides, bacterial spores are present together with toxins, as they are harmless to men and most animals, as well as being presented in different formulations containing organic acids, thickeners, preservatives, emulsifiers, disintegrators and water. However, some users of commercial products prefer viable spore-free bacterial larvicides for large-scale environmental application. In the present work elaborated with a special formulation that was assayed against viable spores of *L. sphaericus* 2362, active against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles darlingi*, cultivated in NYSM highly sporogenic and toxic biomass generator shows that, the formulation employed and development of an emulsifiable concentrate, the viable spores treated with Co-60 (4.86h-1; factor 1.13) may tend to 0 with application of 20 kGy regardless of the conservation of high larvicidal activity preserved against *C. quinquefasciatus*. Some important parameters of the fermentation process that generate biomass toxic activity against mosquito larvae was achieved and shown in this work.

Keywords: *Bacillus* serovars, Spores and Co-60.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus e Gêneros correlatos apresentam espécies que são larvicidas, particularmente de mosquitos vetores de doenças. Alguns sorovares produzem protoxinas as quais os insetos transformam em estruturas químicas altamente tóxicas para si próprios. Com base nesse conhecimento e achado, alguns sorovares de *Bacillus thuringiensis* e de *Lysinibacillus sphaericus* (ex *B. sphaericus*) são usados em preparações inseticidas.

A utilização desses inseticidas tem-se mostrado seguro para o meio ambiente quando comparado com os inseticidas larvicidas convencionais. O desenvolvimento de um concentrado emulsionável de *L. sphaericus*, mostrou que testes realizados com a utilização de Co-60 em diferentes doses (kgy), os esporos presentes são inativados sem prejudicar as toxinas ativas. Tenta-se estabelecer o melhor valor de kgy para esta formulação.

2 OBJETIVO

Desenvolver preparações à base de *L. sphaericus* altamente entomotóxico;

Obter a toxina ativa e isenta de esporos viáveis;

Utilizar radiação ionizante para se alcançar a inativação exclusiva dos esporos.

3 METODOLOGIA

A cepa de *L. sphaericus* 2362 foi semeada em Ágar Nutriente com Metais e incubada a 33°C até 80% de esporulação. Em seguida, o induto bacteriano foi transferido para Erleymeyer contendo 35 mL de NaCl a 0,85% onde ficou sob agitação por 2 h. Desta suspensão, colocou-se 6 mL em 5 tubos para a realização da Termorresistência a 70°C por 15 min. As diluições foram realizadas na proporção de 1:10 e delas plaqueadas 100 µL em placas de Petri contendo Ágar Plate Count (PCA). Da suspensão-mãe, tomou-se 50µL do inóculo e transferiu-se para 4 Erleymeyer contendo 100mL de Caldo NYSM, onde ficou sob agitação a 33°C até 80% de esporulação. Transferiu-se a suspensão para 6 tubos Falcon e centrifugou-se até “pellet” firme, que foi lavado com 1 mL de água destilada e re-centrifugado. Suspendeu-se o “pellet” em 5 mL de salina e distribuiu-se em 12 Eppendorf com 500 µL cada, e novamente centrifugou-se. Este processo se repetiu várias vezes quando se separou 6 Eppendorf para receberem respectivamente as doses em kgy (5,0;7,5;10;12,5;15;17,5 e 20) com Co-60.

4 RESULTADOS

Após a irradiação ficou demonstrado que a dose de 20 kgy apresentou melhor resultado quanto à inativação de esporo com a preservação da toxina. As amostras foram separadas em frascos estéreis em biomassa irradiada e não irradiada, onde foram secas, pesadas e enviadas ao CPqAM-PE para a determinação de potência UTI. Para o ensaio qualitativo do tipo “mata não mata” utilizou-se larvas L3 jovens de *Culex quinquefasciatus*. O mesmo processo foi feito para a biomassa não irradiada. Os resultados mostraram que as preparações com Larvas tiveram 100% de mortalidade, como era esperado.

5 CONCLUSÃO

O sistema empregado permitiu separar toxicidade de esporos viáveis.

REFERÊNCIAS

- 1- Rabinovitch, Leon; VIVONI, ADRIANA MARCOS ; Machado, Vilmar ; Knaak, Neiva ; Berlitz, Diouneia Lisiane ; Polanczyk, Ricardo Antonio ; FIUZA, Lidia Mariana . *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. 1ed.: Springer International Publishing, 2017, v. , p. 1-18.
- 2- **Rabinovitch, Leon**; DEL MASTRO, NÉLIDA L. ; SILVA, CLÁUDIA M.B. ; SANTOS, BERNADETE S. ; RESENDE, MARCELO C. ; VIVONI, ADRIANA MARCOS ; ALVES, REGINA S.A. . Inativação seletiva de esporos mantendo atividade larvicida em *Bt* sorovar *israelensis* irradiada com raios gama. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 9, p. 120-124, 2014.
- 3- **RABINOVITCH, L.**; COUTINHO, C. J. P. A. ; SILVA, C. M. B. E. ; ALVES, R. S. A. ; ALVES, Luis F.A. ; CAVADOS, Clara de Fátima Gomes . Bioprodutos à base de *Bacillus* entomopatogênicos em programas de controle de vetores na América Latina. In: Sérgio Batista Alves; Rogério Biaggioni Lopes. (Org.). Controle Microbiano de Pragas na América Latina - Avanços e Desafios. 1ªed.Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, 2008, v. 14, p. 137-170.
- 4- CARVALHO, L. R. ; ATAIDE, Livia Maria Silva ; SILVA, Cleider Rodrigues ; SANTOS, B. DE S. ; AZEVEDO, Vasco Ariston de Carvalho ; RESENDE, Marcelo Carvalho de ; **RABINOVITCH, L.** . Comparison between highly toxic *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strains against *Lutzomyia longipalpis* LUTZ & NEIVA 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) larvae. *Neotropical Biology And Conservation*, v. 2, p. 80-83, 2007
- 5- CAVADOS, Clara de Fátima Gomes ; FONSECA, Rodrigo N ; CHAVES, Jeane Quintanilha ; COUTINHO, Carlos José Pc Araujo ; **RABINOVITCH, L.** . A new black fly isolate of *Bacillus thuringiensis* autoagglutinating strain highly toxic to *Simulium pertinax* (Kollar) Diptera, Simuliidae) larvae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n.7, p. 795-797, 2005.
- 6- **RABINOVITCH, L.**; SILVA, C. M. B. E. ; ALVES, R. S. A. . Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: Itamar Soares de Mello; João Lúcio de Azevedo. (Org.). Controle Biológico. 1ªed.Brasília: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000, v. 2, p. 17-85
- 7- SILVA, K. R. A. ; **RABINOVITCH, L.** ; SELDIN, L. . Phenotypic and genetic diversity among *Bacillus sphaericus* strains isolated in Brazil, potentially useful as biological agents against mosquito larvae. *Research in Microbiology (Paris)* ^{JCR}, Paris, v. 150, p. 153-160, 1999.
- 8- **RABINOVITCH, L.**. Situação atual e necessidade de pesquisa de controle biológico de vetores d e importância para a Saúde Pública. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Rio de Janeiro, v. 1, p. 42-45, 1997.

9- CONSOLI, R. A. ; SANTOS, Bernadete de Souza ; LAMOUNIER, M. A. ; SECUNDINO, N. F. ; **RABINOVITCH, L.** ; SILVA, C. M. B. E. ; ALVES, R. S. A. ; CARNEIRO, N. F. F. . Efficacy of a new formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online)^{JCR}, v. 92, p. 571-573, 1997

10- CONSOLI, R. A. ; PINTO, C. J. ; OLIVEIRA, M. A. ; SANTOS, Bernadete de Souza ; LAMOUNIER, M. A. ; ALVES, R. S. A. ; SILVA, C. M. B. E. ; **RABINOVITCH, L.** . Some environmental and biological factors influencing the activity of entomopathogenic *Bacillus* on mosquito larvae in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz^{JCR}, Rio de Janeiro, v. 90, n.1, p. 121-124, 1995