



EFEITO NEMATICIDA De *Bacillus* spp. EM NEMATÓIDES de OVINOS

SINOTT, Marina Cunha¹; GALLINA, Tiago²; LEITE, Fábio Pereira Leivas³

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, UFPel; ² Médico Veterinário, MC, Doutorando em Veterinária, UFPel; ³ Médico Veterinário, Dr., Prof. Adjunto, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 marinasinott@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A alta prevalência e patogenicidade dos nematóides de ovinos são problemas que limitam o avanço da ovinocultura no Brasil. As parasitoses são combatidas com antihelmínticos e com técnicas de manejo a fim de impedir a reinfecção do rebanho, contudo, muitos parasitos apresentam resistência a esses fármacos, seja pelo uso prolongado de um mesmo princípio ativo ou por administração de subdoses. (Bluthgen e Heeschen, 1997) O prejuízo com a queda na produção, ocasionado pelas helmintoses e as infecções secundárias que essas podem propiciar, torna necessária a busca por alternativas à terapêutica tradicional.

Na agricultura, há algum tempo já vem se utilizando o biocontrole através de diversas espécies de *Bacillus* spp. (Rodrigues et al., 1988), em especial os *Bacillus thuringiensis* vêm desempenhando um papel relevante no cenário agrícola (Schnepf et al., 1998) Entretanto, há poucos estudos sobre o uso dessas bactérias para o tratamento de helmintoses em medicina veterinária. Trabalhos pioneiros nesta área de Ciordia e Bizzel (1961) demonstraram que esporos de *B. thuringiensis* adicionados a fezes de bovinos, diminuem a concentração de larvas de terceiro estágio de tricostrongilídeos. O'Grady et al. (2007) concluíram que esta ação nematicida deve-se ao tempo de exposição que as formas jovens das larvas dos tricostrongilídeos são submetidas à ação das toxinas liberadas pelas bactérias. O efeito nematicida do *B. thuringiensis* inicia-se quando um parasito suscetível ingere os cristais liberados durante a esporulação da bactéria. Esses cristais são pró-toxinas que, depois de ingeridas, são solubilizadas pelo pH alcalino do trato intestinal do parasito. Uma vez ativos, os fragmentos dessas pró-toxinas se ligam em receptores específicos das células epiteliais do intestino médio, resultando na lise intestinal pela formação de poros que ocasionam a morte do parasito (O'Grady et al., 2007).

O presente trabalho está fundamentado no estudo dos efeitos de *Bacillus* spp sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Parasitos

As amostras fecais foram colhidas diretamente da ampola retal de cordeiros de mesma idade, condição corporal e ambiente. Essas amostras foram analisadas pela técnica de Gordon & Whitlock (1939). Foram selecionadas as amostras que continham um número superior a 4000 ovos por grama. Realizou-se ainda, coprocultura de 4g do material selecionado pela Técnica de Roberts e O'Sullivan (1950), constatando-se a prevalência de aproximadamente 95% de larvas *Haemonchus* spp.

Esta e outras coletas serviram para as provas *in vitro*.

2.2. Preparação de *Bacillus* spp.

As bactérias selecionadas foram recuperadas através do repique em meio NYSM (Yousten, 1984) agar, incubadas em estufa à temperatura de 30°C por 24h. Após esse tempo foi realizada a coloração de Gram para certificar-se da pureza do inóculo. O material repicado foi semeado em meio NYSM líquido, dentro de balões haletados com capacidade volumétrica de um litro, contendo 200ml, incubado em agitador orbital à temperatura de 30°C e à velocidade de 150rpm durante 48h a fim de que ocorresse esporulação. Ao término desses dois dias aqueceu-se a 80°C por 15 minutos para eliminação das possíveis células vegetativas. Esse material complementou a montagem dos experimentos *in vitro*.

2.3. Montagem do Experimento *in vitro*

Foram realizadas novas coproculturas com adição de 2ml dos cultivos bacterianos previamente preparados. Os experimentos foram realizados em triplicata e aos grupos controle foi adicionado água na mesma quantidade de que os cultivos, ou meio NYSM sem cultivo.

Foram realizadas coproculturas e as larvas recolhidas e contadas. A fórmula utilizada no cálculo da percentagem de redução foi:

$$R = 100(1-T/C)^*$$

*redução(R); número de larvas no grupo controle(C); número de larvas contadas nos diferentes tratamentos(T).

Com as bactérias que mostraram potencial nematicida, foram montados experimentos com diluições de 10^{-1} e 10^{-2} e com o cultivo puro, tendo também como controle negativo a água e repetição do processo de contagem ao final do sétimo dia. Também foram realizados testes para verificar o crescimento da bactéria em fezes ovinas, adicionando 2ml do cultivo na concentração de 2×10^8 UFC/mL a 4g de fezes estéreis (autoclavadas), e incubando em estufa à temperatura de 30°C. As leituras foram realizadas após sete dias, nas titulações de 10^{-4} até 10^{-6} para permitir a quantificação do possível crescimento bacteriano.

Foi testada a ação nematicida em fezes estéril com a adição de ovos coletados a partir de fezes contaminadas. Os ovos foram coletados e adicionados a fezes a 4 g de fezes estéreis e uma suspensão bacteriana contendo de 2×10^8 UFC/mL foi inoculada. As fezes foram incubadas como no item anterior, porém o tempo de incubação reduzido a fim de obter larvas L1 e/ou L2. Estas larvas foram utilizadas para observar morfologia e isolamento da bactéria. Para morfologia foi utilizado microscópio ótico no aumento 40x. Para o isolamento bacteriano as larvas foram embebidas em solução de álcool e homogeneizadas em gral estéril. Do homogeneizado foram semeadas em meio NYSM agar e mantidas em incubadora bacteriologia a 30 °C por 24 horas.

As amostras testadas foram também desnaturadas e corridas em gel de acrilamida a 12% (SDS PAGE) com o intuito de mensurar o peso de suas proteínas para que a partir dessa informação seja possível identificar as proteínas responsáveis pela capacidade nematicida demonstrada nos testes realizados.

2.4. Montagem do Experimento *in vivo*

Foram selecionados seis cordeiros de mesma idade, sexo, condição corporal, oriundos de um mesmo estabelecimento de criação e contagem média parasitária de 4000 OPG. Desses animais, um foi utilizado como controle, recebendo somente água, e cinco receberam o cultivo do *B. circulans* (2×10^9 UFC). A administração do inóculo (e do controle)

foi por via oral, uma vez ao dia, durante sete dias. As amostras fecais foram coletadas diariamente para realização de coproculturas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento *in vitro*

Todas as bactérias demonstraram efeitos nematicida, com exceção do *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* e do *Bacillus sphaerius*, os quais não apresentaram redução do número de larvas em relação ao grupo controle. A bactéria que se mostrou mais eficiente na redução do número de larvas foi o *B. circulans*, chegando a um percentual de 83,3% de redução larval. As outras bactérias se comportaram da seguinte forma: *B. thuringiensis* var. *israelensis* reduziu 80,6% , *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* reduziu 78,2%, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* reduziu 65,7%, conforme Gráfico 1.

Nos experimentos em que foram testadas as diluições do *B. circulans* a redução das amostras tratadas ficou: em 90% no cultivo puro, 63% na diluição de 10^{-1} e 24% na diluição de 10^{-2} conforme. As outras bactérias se comportaram da seguinte forma: reduziram nas concentrações 1×10^0 , 1×10^{-1} e 1×10^{-2} , respectivamente, *B. thuringiensis* var. *osvaldocruzi* , 82,5%, 64,2% e 19,2% *B. thuringiensis* var. *israelensis* , 80,9%, 64,8% e 19%, conforme Gráfico 2.

Nas coproculturas realizadas a partir de fezes estéreis, houve crescimento do número de UFC/ml, tendo o *B. circulans* dobrado sua concentração.

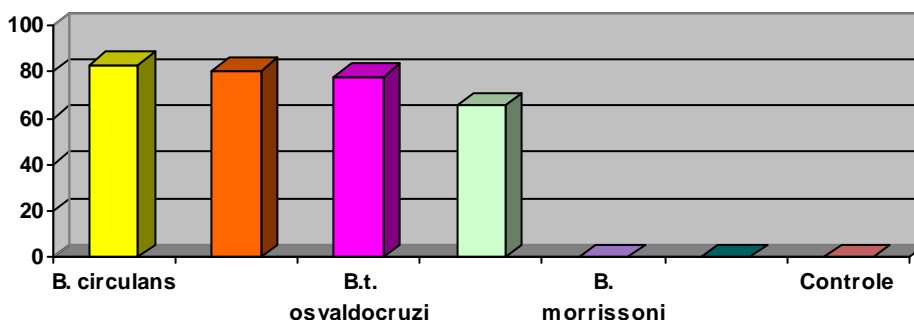


Gráfico 1: Percentual de redução de Larvas em fezes inoculadas com *Bacillus* spp.

Os dados representam a redução média de larvas de *Haemonchus* sp. em fezes de ovinos inoculadas com *Bacillus* spp. avaliados por Roberts e O'Sullivan(1950).

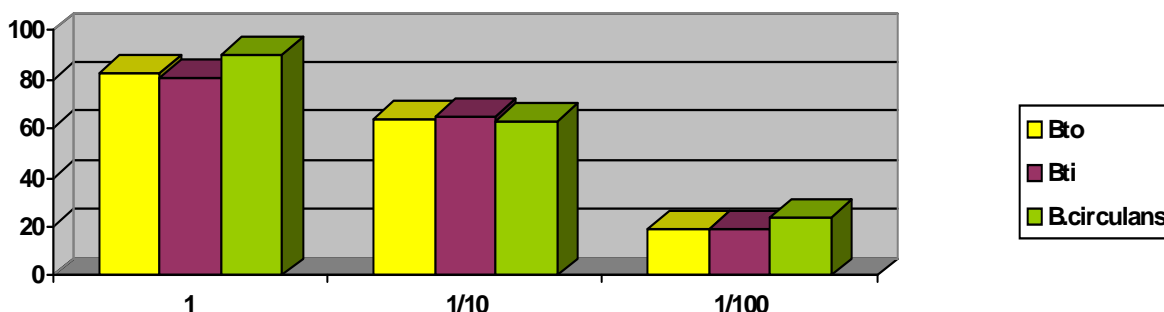


Gráfico 2: Percentual de redução do número de larvas em relação à concentração do cultivo de *Bacillus circulans*.

Os dados representam o percentual de redução obtido nas diferentes concentrações de *Bacillus* testados

A partir do SDS pode-se sugerir que existem fragmentos pesando em um intervalo de 30 a 100K Da, peso esse compreendido pelas seguintes Cry toxinas: 2, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 20 e 22.

Resultados do Experimento *in vivo*

Os resultados mostraram que nas primeiras 24 horas de administração já foi observada redução na contagem de larvas, a qual aumentou gradativamente com o passar dos dias, atingindo o percentual de 77,8% de redução de larvas no sétimo dia de tratamento, conforme Gráfico 3

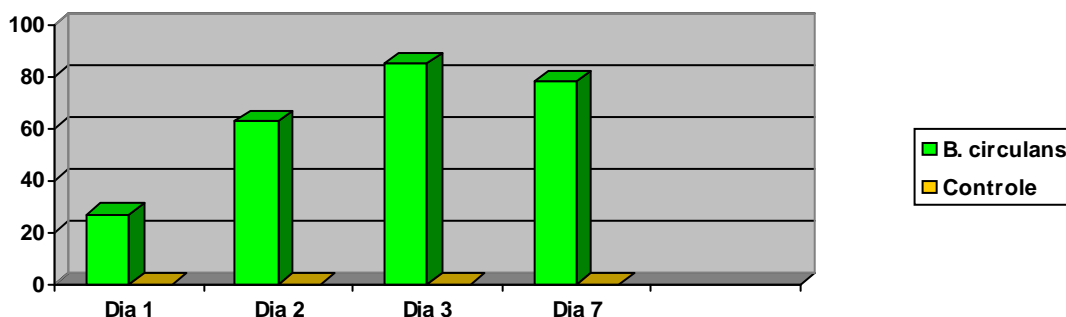


Gráfico 3: Percentual de redução do número de larvas nas coproculturas das fezes de animais tratados nos diferentes dias de tratamento.

O gráfico representa a redução percentual que foi obtida nas coproculturas de fezes de cordeiros tratados diariamente de 2×10^9 UFC de *B. circulans*, por via oral durante sete dias.

Estes resultados indicam que os esporos sobreviveram no trato gastrointestinal e atingiram quantidades significativas nas fezes. Também se pôde observar que larvas obtidas de fezes inoculadas com a bactéria apresentavam lesões no seu trato intestinal e que se obtiveram culturas puras de *B. circulans* a partir de macerado de larvas oriundas de fezes tratadas com o agente.

O controle biológico apresentado no presente estudo objetiva a desinfestação das pastagens, uma vez que as nematotoxinas liberadas na esporulação do agente atuam nas formas jovens das larvas, fazendo com que o ciclo do nematóide não seja completado.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo pode-se inferir que a utilização de *Bacillus circulans* atua sobre os estádios iniciais dos parasitos em questão, contribuindo para a redução na reinfecção dos ovinos com as formas infectantes (L3). Entretanto faz-se necessária uma averiguação do impacto ambiental que a liberação de uma grande quantidade desse agente trará ao ecossistema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUTHGEN, A and HEESCHEN, W. H.. Parasiticides. **International Dairy Feed**, v. 97, p. 35-44,1997.

CIORDIA, H., BIZZEL, W. E. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER on the development of the free-living stages of some cattle nematodes. **Journal of Parasitology**, v.47, (abstract), p. 41. 1961.

O'GRADY, R.J. AKHURST, A.C. KOTZE The requirement for early exposure of *Haemonchus contortus* larvae to *Bacillus thuringiensis* for effective inhibition of larval development **Veterinary Parasitology** (2007)

ROBERTS, F. H. S. and O'SULLIVAN, J. P. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Records**, v.1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, I.B., TADEI, W.P., DIAS, J.M.C.S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 441-444, 1988.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review** , v.62, p. 775-806, 1998.