

TRANSFORMAÇÃO DE *Bacillus circulans* COM GFP COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DO CONTROLE BIOLÓGICO

SINOTT, Marina Cunha¹; De SOUZA Marlene Teixeira²; LOTT, Diogo²; DIAS De CASTRO, Luciana Laitano¹; LEITE, Fábio Pereira Leivas¹

¹Universidade Federal de Pelotas

²Universidade Nacional de Brasília

1. INTRODUÇÃO

A bioluminescência é o processo de emissão de luz fria e visível por organismos vivos com função de comunicação biológica.

A proteína fluorescente verde (GFP) é uma macromolécula que, mediante irradiação com luz azul, produz uma intensa fluorescência verde. Devido as suas propriedades fluorescentes, o gene da GFP tornou-se um importante marcador de expressão gênica em células (procarióticas e eucarióticas) e tecidos. Com o auxílio desta proteína pode-se investigar o comportamento de células e marcar tecidos, embriões e células tronco, o que a tornou o gene repórter mais utilizado em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas.

Várias espécies de *Bacillus* sp. têm sido utilizadas como bioinseticidas como alternativa ao controle de pragas urbanas e agrícolas (RODRIGUES et al., 1988). têm sido demonstrado que suspensões de bactéria, esporo/toxinas ou toxinas isoladas possuem ação larvicida. Recentemente nosso grupo demonstrou poder nematicida do *Bacillus circulans* sobre larvas de *Haemonchus* sp. e larvas de terceiro instar de *Culex quinquefasciatus* (SINOTT et al., 2008). Entretanto se faz necessário um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogenicidade do *B. circulans* nos seus hospedeiros alvos.

O objetivo do presente estudo foi a inserção do plasmídeo contendo o gene da GFP sobre o controle de promotor induzível do cloranfenicol em *B. circulans* para obter uma ferramenta para melhor conhecimento da sua ação, tais como: localização na larva, número, isolamento, quantificação nas fezes, etc.

2. METODOLOGIA

2.1 Células Competentes

Com o crescimento obtido através da semeadura por isolamento, selecionou-se uma colônia aleatoriamente, para o preparo das células competentes. A partir dessa colônia foi realizado um inóculo, por diluição, em três vezes. Esse cultivo foi incubado no agitador orbital a 28°C e a 200 rpm, durante 12 horas. Após as 12 horas de crescimento, esse foi diluído em água 1:100 e determinado sua densidade óptica em espectrofotômetro com o comprimento de onda em A₆₀₀. A amostra utilizada foi aquela que apresentou D.O. mais próxima a 1,5 que é a desejada para a realização da eletroporação.

Todo o volume foi centrifugado e lavado por quatro vezes consecutivas. E o pellet formado foi lavado com água milliQ esterilizada e resfriada a 4°C e ressuspenso após a última centrifugação com Polietileno glicol 40%. Uma alíquota foi semeada em BHI agar para observação da viabilidade das células preparadas.

2.2 ELETROPORAÇÃO

Nas cubetas de eletroporação previamente resfriadas a 4°C, foram adicionados 250 µL das células competentes e 15 µL de DNA (plasmídeo GFP), diluído em Tris HCl 10mM pH 8,0 EDTA 10mM pH8,0 (TE). As amostras foram eletroporadas no sistema Bio Rad Gene Pulser modelo II, nas seguintes condições: 25µF, 2,5v, 1000Ω, em apenas um pulso. Após, as amostras foram diluídas em BHI e todo o conteúdo do tubo tipo eppendorf (aproximadamente 1,5mL) foi semeado em meio seletivo (BHI agar com cloranfenicol 10µg/mL). Como controle uma alíquota foi semeada em meio sem antibiótico para certificar-se da viabilidade das células após a eletroporação.

Todas as placas foram incubadas na estufa a 28°C durante o período de 24 a 48h para observar o crescimento das células transformadas.

2.3 REPIQUE DAS COLÔNIAS TRANSFORMADAS

As colônias transformadas (8) foram repicadas em placas de BHI contendo 10 µg de cloranfenicol/mL e incubadas na estufa a 28°C por 48h para confirmar a expressão da GFP através do escaneamento no sistema Typhoon 9210 e visualização das células bacterianas no microscópio de fluorescência. Essas colônias também foram repicadas em meio HCT líquido adicionado de 0,3% de glicose e 10 µg de cloranfenicol/mL e incubados no agitador orbital durante 48 horas para estimular a esporulação

2.4 AÇÃO LARVICIDA DE *Bacillus circulans* TRANSFORMADO

Com amostras fecais de ovinos mono infectados por *Haemonchus contortus* com 1000 ovos por gramas de fezes, contados pela técnica de Gordon & Whitlock (1939), foram montadas coproculturas pela técnica de Robert O'Sullivan (1950) modificada, adicionando a 4 g de fezes, 2mL (7×10^6 UFC) do cultivo da bactéria transformada. Como controle negativo foi utilizado água, e como positivo, *B. circulans* selvagem. Os experimentos foram realizados em triplicata. Essas amostras foram incubadas na B.O.D. a 28°C e UR 60% durante sete dias. Ao final desse período as larvas foram coletadas e contadas. O cálculo do percentual redução do número de larvas dos grupos tratados em relação ao controle negativo, foi obtido através da fórmula $R=100(1-T/C)$, na qual R corresponde a Redução do número de larvas, T equivale às larvas contadas no grupo tratado e C, às larvas contadas no grupo controle. Outros ensaios foram realizados como o anterior, entretanto o período de incubação foi reduzido a 24 horas. Utilizando a técnica de Baermann, obteve-se larvas de *Haemonchus* spp. nos estádios iniciais (L1 e L2) sendo observadas em microscópio de fluorescência.

Foi testada a capacidade inseticida de *B. circulans* transformado, através de ensaios submetendo larvas de *C. quinquefasciatus* à ação de esporos da bactéria, por três dias. Como controle negativo foram utilizadas larvas em solução fisiológica, como controle positivo, larvas em *B. circulans* selvagem. O experimento foi realizado em duplicata e o percentual de redução do número de larvas vivas foi calculado pela fórmula $R=100(1-T/C)$. Após as primeiras 24h as larvas tratadas com o bacilo transformado, foram observadas no microscópio de fluorescência, com o intuito de observar a aplicabilidade da transformação como ferramenta de estudo do controle biológico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle biológico vem sendo utilizado na agricultura há décadas, como coadjuvante ou até mesmo, mais recentemente, como alternativa aos tradicionais defensivos. A inserção do plasmídeo da GFP tem como uma das principais funções marcar e sinalizar, facilitando a visualização dos locais de ação do microrganismo estudado no parasito. Assim, como uma mais fácil identificação do seu local de multiplicação no animal hospedeiro, pela emissão da fluorescência e a multiplicação da bactéria em meio seletivo, contendo 10µg/mL.

3.1 COPROCULTURAS COM *Bacillus circulans* TRANSFORMADO

Através da coprocultura observou-se que *B. circulans* mesmo após a inserção do plasmídeo contendo o gene da GFP não teve suas propriedades nematicidas, frente a larvas de *Haemonchus* sp alteradas, pois não houve diferença entre as médias dos resultados encontrados nas amostras tratadas com a bactéria selvagem e as tratadas com a transformada. Através da aplicação da técnica de Baermann, após 24 horas de exposição à bactéria transformada, verificou-se, por microscopia de fluorescência, o agente no interior das larvas (L1 e L2) de *Haemonchus* sp. Como controle, utilizou-se o tratamento com a bactéria selvagem, conforme Figura 1.



Figura 1: Larva L1 de *H. contortus* tratada com *B. circulans* transformado.

3.2 CAPACIDADE INSETICIDA DE *Bacillus circulans* TRANSFORMADO

Depois de decorridos os três dias de exposição das larvas ao *B. circulans* transformado verificou-se que 70% das larvas tratadas morreram, em relação ao grupo controle. Isso demonstra que a transformação do bacilo com o plasmídeo GFP não interfere na patogenicidade desse sobre as larvas de *C. quinquefasciatus*. Através da exposição das larvas de *C. quinquefasciatus* à bactéria transformada pode-se observar a presença do agente na membrana peritrofica da larva, conforme Figura 2.



Figura 2: Larvas de *C. quinquefasciatus* tratada com *B. circulans* transformado.

4. CONCLUSÕES

A transformação de *B. circulans* com o plasmídeo contendo o gene da GFP se mostra uma importante ferramenta de estudo para um maior conhecimento e aprimoramento das técnicas de controle biológico, através de uma melhor visualização das interações parasito e agente de controle biológico.

5. REFERÊNCIAS

BOTTJER, K. P., BONE, W. L., and GILL, S. S. Nematoda: Susceptibility of the egg to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin. **Experimental Parasitology**, v. 60, p. 239-244, 1985

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. *Science* **1994**, 263, 802.

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.

LINARES, I. H., LOPEZ-ARELLANO M. E., DE GIVES, P. M., Hernandez E. L., and DE LA PARRA A. B. 2008, Lethal Activity of Two *Bacillus thuringiensis* Strains against *Haemonchus contortus* Histotropic Larvae **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1149: 164–166

MORISE, H., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., WINANT, J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. **Biochemistry** 13:2656-2662

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.

SINOTT, M. C., GALLINA, T., LEITE, F. P. L. Efeito nematicida de *Bacillus* spp. em nematóides de ovinos. **XVII Congresso de Iniciação Científica-UFPel**, 2008

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.97 1996.

WANG, S. X., HAZELRIGG, T. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. **Nature** v.369:400-403, 1994.