

ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Bacillus sphaericus* PRODUZIDAS EM *Escherichia coli* E AVALIAÇÃO DE ATRATIVOS PARA OVIPOSIÇÃO DE *Culex quinquefasciatus*

GONÇALES, Relber A.^{1*}, KNABAH, Paula. F.¹, BRUM, Fernanda. A.², ZIMMER, Cristine R.³, PINTO, Luciano da S.⁴
Universidade Federal de Pelotas

LEITE, Fabio P. L.,⁵
Universidade Federal de Pelotas

- 1*. Acadêmico de Ciências Biológicas BIC FAPERGS. E-mail: relberg.ib@ufpel.edu.br
1. Acadêmica de Ciências Biológicas. E-mail: paulinhah_2016@hotmail.com
2. Mestranda PPG – Parasitologia. E-mail: fernanda.-brum@hotmail.com
3. Bolsista PRODOC PPG- Parasitologia. E-mail: crzimmerbio@yahoo.com.br
4. Centro de Biotecnologia, Prof. assistente. E-mail: ls_pinto@hotmail.com
5. Deptº de Microbiologia e Parasitologia, Prof. adjunto E-mail: fabio_leite@ufpel.tche.br

1 INTRODUÇÃO

As três principais espécies de mosquitos que veiculam a maioria dos patógenos humanos pertencem aos gêneros: *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*. A seleção do local de oviposição pelas fêmeas de mosquitos é influenciada por fatores físicos, químicos e biológicos, como luz, temperatura, presença de vegetais e/ou de seus produtos (DU & MILLAR, 1999), presença de microrganismos e seus produtos (McCALL & EATON, 2001), salinidade (ROBERTS, 1996) e presença de formas imaturas (ALLAN & KLINE, 1998 e SOMAN, 1970). O controle satisfatório das populações desses dípteros é impedido pela sua enorme habilidade reprodutiva e flexibilidade genética, o que se manifesta através do desenvolvimento de resistência a inseticidas, levando a constante procura por novos produtos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

O *Bacillus sphaericus* (*Bs*) é uma bactéria patogênica para as larvas de mosquitos e a atividade se dá devido à síntese de uma toxina binária associada à esporulação a partir de genes reunidos em um operon, que consiste de dois componentes com pesos moleculares de aproximadamente 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB) que é tóxica somente quando ambos os peptídeos estão atuando juntos (BROADWELL et al., 1990).

As bactérias entomopatogênicas são utilizadas em escala mundial, com algumas limitações, tais como, a sedimentação rápida do complexo esporo/cristal fora da zona de alimentação larval (KARCH & CHARLES 1987), inativação da toxicidade por luz UV (LACEY & SMITTLE 1985) e resistência do mosquito (RAO et al., 1995). Outro problema de grande importância na utilização desses bacilos é a instabilidade dos plasmídeos nativos onde estão os genes que codificam para as entomotoxinas. Em escala industrial, o número de plasmídeos é reduzido gradativamente e a capacidade tóxica torna-se inviável (GONÇALES et al., 2009).

Assim, a utilização de outros organismos para a expressão das proteínas mosquitocidas de *Bs* que superem as dificuldades mencionadas é uma alternativa no controle biológico de mosquitos. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a estabilidade das proteínas recombinantes produzidas em *Escherichia coli* e a preferência de oviposição a diferentes atrativos (apneumônios) das fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A população de mosquitos foi obtida da coleção do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.

Os esporos de *Bs* 2362 foram semeados em meio NYSM (MYERS & YOUSTEN, 1978) contendo ágar e cultivados por 12h à 30°C. A partir das colônias, fez-se um pré-inóculo em 5 mL de meio NYSM e cultivou-se em shaker a 300 rpm por 72h à 30°C. Posteriormente, as culturas foram inoculadas em frascos de 50 mL com meio NYSM em shaker a 300 rpm, 30°C, deixando-se por aproximadamente 72h até sua completa esporulação. Em seguida, centrifugou-se a cultura a 3000 x g por 10 min.

Para a construção do vetor de expressão em *E.coli*, os genes das proteínas mosquitocidas de *Bs* foram amplificados com oligonucleotídeos iniciadores específicos, clonados e fusionados em vetor de expressão em *E.coli* (pAE-*binAB*). A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com IPTG 0,5M por 12h a 30°C junto à cepa controle não transformada.

Ensaio da estabilidade das proteínas inseticidas

A estabilidade das proteínas foi analisada durante 5 meses armazenadas a duas temperaturas. Culturas da cepa de *E.coli* recombinante foram estocadas a 4°C e 25°C. O teste de atividade larvicida foi realizado durante um intervalo de 15 dias, utilizando larvas de segundo ínstar de *C. quinquefasciatus*. O ensaio foi realizado com 1 mL de *E. coli* (10^8 células suspensas em água destilada estéril) em placas de microtitulação com 48 cavidades (11,3 mm de diâmetro), contendo 10 larvas por cavidade mais 200 µL de *E.coli* recombinante. A mortalidade foi avaliada após 24h de incubação.

Avaliação dos atrativos de oviposição para *Culex quinquefasciatus*

A preferência dos substratos para oviposição das fêmeas de *C. quinquefasciatus*, foi comparada usando atrativos de *E.coli* recombinante e *Bs*. A bactéria foi semeada em ágar nutriente a 37°C para *E.coli* e 30°C para *Bs* por 16h. Uma colônia de cada bactéria, escolhida aleatoriamente, foi utilizada para uma subcultura de 10 mL em meio Luria Bertani (SAMBROOK, 1989) a 37°C por 16h. Então, as culturas foram suspensas em água destilada estéril na concentração de 3×10^8 UFC/mL. Para a avaliação dos atrativos, uma colônia de 60 casais de *C. quinquefasciatus* recentemente emergidos (5 a 7 dias de idade) foram mantidos em uma gaiola sob condições de 25°C ($\pm 2^\circ$ C), fotoperíodo de 12h e umidade relativa $\geq 80\%$. A alimentação diária foi fornecida por uma solução de mel a 10%. O repasto sanguíneo foi feito mediante a exposição de uma codorna mantida na gaiola por um período de 12 horas. Cinco dias após a hematofagia, os substratos para oviposição foram expostos à colônia por três dias consecutivos. Os ovos foram coletados todos os dias no mesmo horário. O experimento foi realizado em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A cultura de *E.coli* recombinante foi estocada a 4°C e 25°C para testar a estabilidade durante 5 meses. As culturas de bactérias transformadas foram eficientes em matar as larvas após esse período, porém as culturas armazenadas a 4°C apresentaram maior toxicidade do que as estocadas a 25°C. Os resultados têm sido promissores em comparação com as culturas de *Bs* estocados sob as mesmas condições durante o mesmo período. Após 5 meses, as culturas de *E.coli*, expressando as (Bin) proteínas, mantiveram a atividade inseticida (Figura 1).

Os resultados de inativação por tempo de exposição a diferentes temperaturas não causou danos as proteínas.

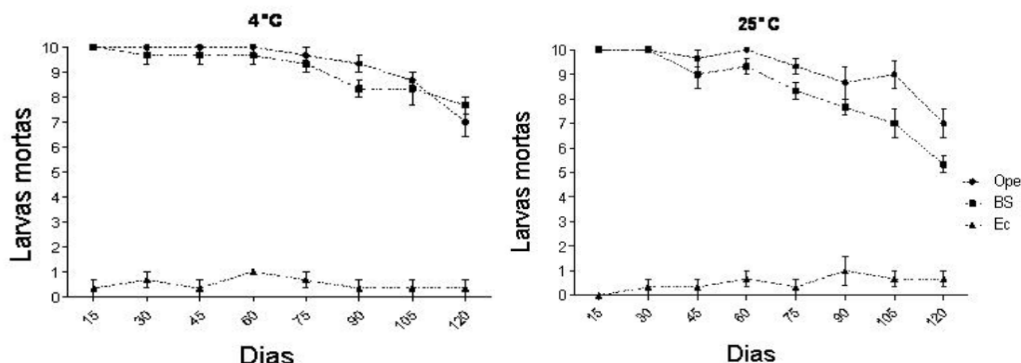


Figura 1. Ensaio de estabilidade das proteínas de *E. coli* recombinante estocadas a 4°C e 25°C durante 5 meses. Ope é a *E. coli* transformada com o vetor pAE-binAB, Bs é o *Bacillus sphaericus* e Ec é a *E. coli*

Tem sido mostrado que não se faz necessário a presença de bactérias no material utilizado como atrativo (POONAM, PAILY, BALARAMAN, 2003), sendo necessárias apenas às soluções de cultivo previamente filtradas. Deve-se lembrar também que as bactérias utilizadas nesses experimentos são cepas não patogênicas, facilitando assim sua utilização. Além disso, a estabilidade das proteínas recombinantes permite o armazenamento por longos períodos para a utilização no controle de mosquitos. Segundo GEETHA et al., (2003) e POONAM, PAILY, BALARAMAN, (2003) microrganismos, especialmente bactérias, têm sido encontradas associadas a larvas de mosquitos. Dessa forma, sugere-se que bactérias podem servir de atrativo para oviposição das fêmeas de mosquitos.

Os dados sobre a porcentagem de ovos postos pelas fêmeas de *C. quinquefasciatus* na cultura de *Bs* comparada com a de *E.coli* são mostradas na (figura 2). Os resultados indicam que a cultura de *E. coli* teve atração maior de oviposição (49,1 %), seguido do *Bs* (35,1%), as porcentagens de ovos nessas duas culturas também foram maiores do que na água (15,8%).

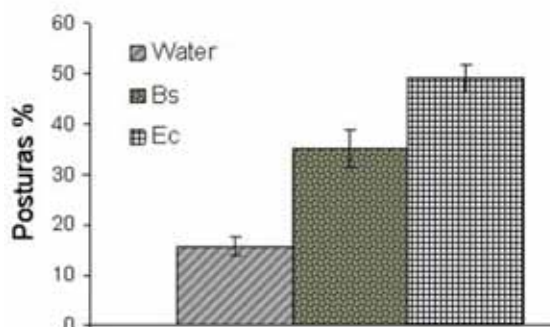


Figura 2. Ovos por jangadas previstos (%) de *C. quinquefasciatus* na cultura de bactérias. Bs: *B. sphaericus*; Ec: *E. coli* recombinante.

A diferença no total de posturas entre os tratamentos de oviposição, sugeriu que a *E. coli* recombinante é útil como atrativo e como um estímulo a oviposição.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade da utilização de *E. coli* recombinante como um produto da biotecnologia. Sugere-se que é possível a utilização de soluções contendo as bactérias recombinantes para controle de mosquitos em áreas endêmicas. Assim, o produto funciona como uma armadilha para larvas recém nascidas que entram em contato com a solução contendo

proteínas da bactéria inativada para controlar os mosquitos. APOIO: CAPES, FAPERGS

6 REFERÊNCIAS

- ALLAN, S. A.; KLINE, D. L. Larval rearing water and preexisting eggs influence oviposition by *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** v.35, n.6, p.943-947, 1998.
- BROADWELL AH, Baumann L, Baumann, P. Larvicidal properties of the 42 and 51 Kilodalton *Bacillus sphaericus* proteins expressed in different bacterial hosts: evidence for a binary toxin. **J. Bacteriol.** 172: 2217-2223. 1990.
- CONSOLI, R.A.G.B.; Oliveira, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** 2.ed.Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998, 228p.
- DU, Y.; MILLAR, J. G. Electroantennogram and oviposition bioassay responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to chemicals in odors from bermuda grass infusions. **J. Med. Entomol.** v.36, n.2, p.158-166, 1999.
- GEETHA, I.; PAILY, K. P.; PADMANBAN, V.; BALARAMAN, K. Oviposition response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to the secondary metabolites(s) of the fungus, *Trichoderma viride*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.2, p.223-226, 2003.
- GONÇALES, Relber Aguiar et. al., Produção de bioinseticida utilizando *Pichia pastoris* recombinante com ação mosquitocida às larvas de *Culex quinquefasciatus* a partir do gene que codifica para a proteína BinAB. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica, XI Encontro de Pós-Graduação e I Mostra Científica.** Pelotas – RS, 2009,1-5
- KARCH, S. & CHARLES, J. F., Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore crystal complex used in field. **Annals of Institute Pasteur/Microbiology**, 138: 485-492. 1987.
- LACEY, L. A. and B. Smittle . The effects of gamma radiation on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Bull Soc Vect Ecol**; 10: 98–101. 1985.
- McCALL, P. J.; EATON, G. Olfactory memory in a mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Med. Vet. Entomology.** n.14, p.197-203, 2001.
- MYERS, P.; Yousten, A.A. 1978. Toxic activity of *Bacillus sphaericus* SSII-I for mosquito larvae. **Infect Immun**, 19: 1047-1053.
- POONAM, S.; PAILY, K. P.; BALARAMAN, K. Oviposition Attractancy of bacterial culture filtrates – response of *Culex quinquefasciatus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.3, p.359-362, 2002.
- RAO, D. R. , T. R. Mani , R. Rajendran , A. S J. Joseph , and A. Gajanana . Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **J. Am. Mosq. Control Assoc**, 11:1–5. 1995.
- ROBERTS, D. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) breeding in brackish water: female ovipositional preferences or larval survival? **J. Med. Entomol.** v.33, n.4, p.525-530, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. - **Molecular cloning - A laboratory Manual.** 2nd ed New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SOMAN, R. S.; REUBEN, R. Studies on the preference shown by ovipositing females of *Aedes aegypti* for water containing immature stages of the same species. **J. Med Entomol**, v.7, p.485-489, 1970.