

# **Preservação de linhagens de *Bacillus thuringiensis* por ultracongelamento e incorporação ao acervo da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo<sup>1</sup>**

**Angélica Oliveira da Silva<sup>2</sup>, Eliane Aparecida Gomes<sup>3</sup>, Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>3</sup>, Fernando Hercos Valicente<sup>3</sup>, Maycon Campos de Oliveira<sup>4</sup> e Thábata Alvares Fernandes<sup>5</sup>**

1 Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig; 2 Estudante do Curso de Meio Ambiente na Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC (ou BIC JR) do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/FAPED; 3 Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; 4 Analista de Laboratório da Embrapa Milho e Sorgo; 5 Estagiária da Embrapa Milho e Sorgo

## **Introdução**

A conservação de recursos genéticos microbianos, assim como a pesquisa com esses organismos, constitui prática estratégica para o desenvolvimento científico e tecnológico do setor agropecuário. Os microrganismos têm extrema importância na sustentabilidade da agricultura, e as regiões de clima quente são aquelas que possuem a mais rica fonte de novas espécies (FIGUEIREDO et al., 2008). Em razão do grande potencial dos recursos microbianos para geração de novos produtos agrícolas, em 2009, foi criada a Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa (Rede Microbiana), com a intenção de fortalecer a organização e estruturação e promover a integração das coleções de microrganismos das unidades da Embrapa e das instituições parceiras. Outro objetivo da Rede Microbiana foi a criação de um sistema de informação, para gerenciamento e intercâmbio das linhagens de microrganismos, que deu origem ao AleloMicro, disponibilizado em módulos e concluído em 2013. Atualmente, a Embrapa possui 21 coleções de microrganismos distribuídas por todo o Território Nacional em diversas Unidades Decentralizadas (UDs), que preservam microrganismos de funcionalidades diversas. Estas coleções são classificadas dentro do Modelo Corporativo de Gestão em: Centro de Recursos Biológicos (CRB), Coleção Institucional (CI) ou Coleção de Trabalho (CT) (CASTRO et al., 2015; PONTES et al., 2015).

A Embrapa Milho e Sorgo investe na formação de coleções de microrganismos de interesse agrícola desde 1991. Estas coleções são formadas por diferentes grupos de microrganismos, como: bactérias diazotróficas associativas isoladas de milho, sorgo ou milheto, fungos micorrízicos arbusculares, microrganismos fitopatogênicos, bactérias e vírus com potencial no controle biológico de insetos-praga e microrganismos

promotores do crescimento de planta, como os biossolubilizadores de nutrientes (fósforo e potássio). Com a necessidade de implantação de processos gerenciais e operacionais para alcançar níveis de excelência, atender normas de qualidade nacionais e internacionais, assegurar a rastreabilidade da informação das amostras depositadas e a viabilidade em longo prazo das coleções, a Embrapa Milho e Sorgo iniciou, em 2012, a organização e estruturação de um acervo institucional de microrganismos chamado de Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF) (PAIVA et al., 2013). Os microrganismos incorporados ao acervo da CMMF são preservados por ultracongelamento a -80 °C, e alguns preservados também sob óleo mineral e/ou liofilizados. Atualmente o acervo da CMMF conta com 6.568 linhagens de microrganismos, obtidas por isolamento a partir de amostras coletadas em diferentes regiões do Brasil. O acervo da CMMF é constituído por três subcoleções de trabalho da Embrapa Milho e Sorgo: Subcoleção de microrganismos diazotróficos e promotores de crescimento (CMPC), Subcoleção de fitopatógenos de milho e sorgo (CFMS) e subcoleção de bactérias e vírus entomopatogênicos (CBE). Os dados disponíveis referentes a cada linhagem da coleção estão inseridos no sistema de informação da Embrapa (<http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/AleloMicro/index.xjs>).

A subcoleção CBE é composta por cerca de 4.600 linhagens de microrganismos entomopatogênicos, bactérias (*Bacillus thuringiensis*) e vírus (*Baculovirus spodoptera*), isoladas no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo com o objetivo de serem utilizadas no desenvolvimento de novos biopesticidas para o controle de insetos praga. A coleção de *B. thuringiensis* (Bt) foi obtida após isolamento a partir de amostras de solo coletadas em diferentes regiões do Brasil (VALICENTE; BARRETO, 2003). Todas as cepas de Bt inseridas na coleção foram caracterizadas microscopicamente quanto à produção de cristais e, posteriormente, avaliadas quanto a sua toxicidade contra insetos-praga por meio da realização de bioensaios. Na Figura 1 estão representados os resultados destes bioensaios, onde cerca de 3408 cepas de *B. thuringiensis* foram avaliadas quanto a sua toxicidade contra larvas de *Spodoptera frugiperda*.

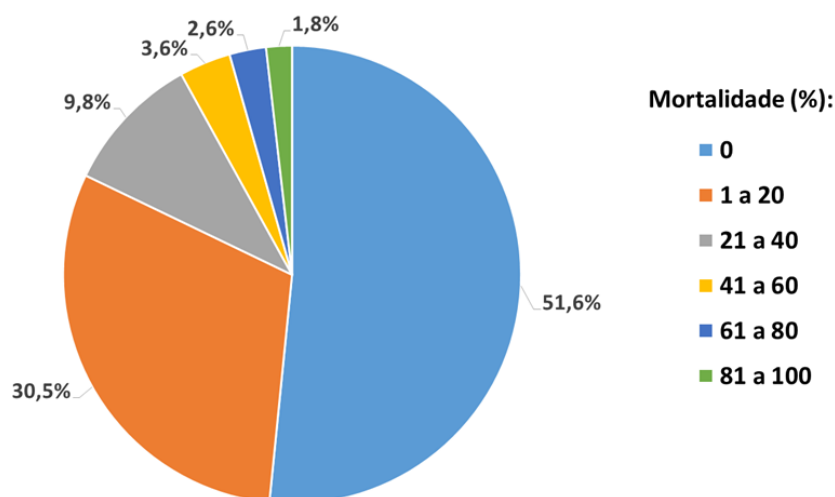


Figura 1 – Avaliação das 3.408 linhagens de *B. thuringiensis* pertencentes à subcoleção CBE com relação à mortalidade de insetos-praga após a realização de bioensaios.

Enquanto a grande maioria das cepas (51,6%) não mostrou efeito patogênico sobre *S. frugiperda* (0% de mortalidade), cerca de 1,8% das cepas de Bt se mostraram bastante efetivas, provocando uma mortalidade de lagartas na faixa de 81 a 100% (VALICENTE; BARRETO, 2003).

A bactéria *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva que ocorre naturalmente no solo, na água, em insetos mortos e resíduos de grãos (LAMBERT; PEFEROEN, 1992). Durante o período estacionário e/ou de esporulação, esta bactéria produz um esporângio que contém um endósporo, com uma ou mais inclusões cristalinas proteicas chamadas de endotoxinas. Essas proteínas são tóxicas para muitos insetos e assim o Bt se torna uma valiosa ferramenta no controle biológico. A endotoxina é restrita ao intestino do inseto, portanto quando as larvas se alimentam de uma quantidade de toxina, sofrem paralisia e morte (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Cerca de 3.408 linhagens de *B. thuringiensis* já estão cadastrados no sistema AleloMicro e estão sendo incorporadas ao acervo da CMMF. Este trabalho teve como objetivo descrever as principais técnicas envolvidas na caracterização e preservação das linhagens de *B. thuringiensis* incorporadas ao acervo central da CMMF.

## Material e Métodos

### 1 – Preparo do meio de cultura

Para o cultivo de *B. thuringiensis* foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani acrescido de sais (LB+sais), composto de 1 g/L de Glicose; 8 g/L de Caldo nutritivo; 5

g/L de Extrato de levedura; 0,3 g/L de Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 10 g/L de Triptona; 0,02 g/L de Sulfato de Ferro II ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 0,02 g/L de Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 0,02 g/L de Sulfato de Manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ); 5 g/L de Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ) e 15 g/L de Ágar (VALICENTE; BARRETO, 2003). Os reagentes foram dissolvidos em água deionizada e o pH da solução foi ajustado para 7,5. O meio de cultura foi distribuído em frascos Erlenmeyers e esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. Após a esterilização, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri e armazenado em geladeira até o momento de uso.

## 2 – Reativação e checagem de pureza das linhagens de *B. thuringiensis*

Uma pequena quantidade de inóculo das amostras originais foi reativada em placa de Petri, contendo meio de cultura LB + sais, utilizando a técnica de semeadura por estrias compostas (Figura 2), a qual possibilita a obtenção de colônias isoladas para a checagem da pureza da cultura. As placas foram incubadas a temperatura de 28-30 °C durante 16-24h, posteriormente, as placas foram analisadas quando presença de colônias com características morfológicas típicas de *B. thuringiensis* e ausência de contaminantes.

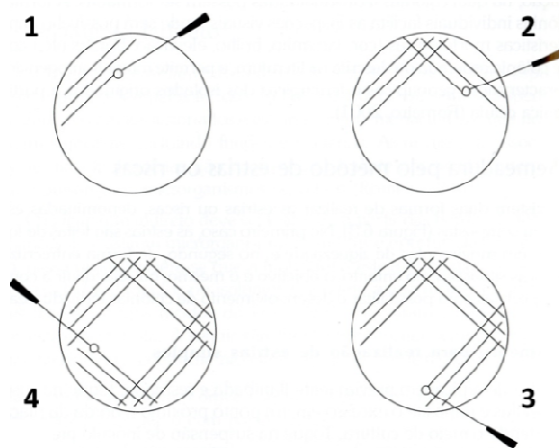


Figura 2 – Técnica de semeadura por estrias compostas. Com uma alça de repicagem coleta-se uma pequena quantidade de inóculo e o espalha sobre uma placa de Petri com ágar da seguinte maneira: são feitas estrias na porção 1 da placa e em seguida flamba-se a alça; após, faz-se uma retirada de bactérias da região 1 e espalha-se sobre a região 2; flamba-se mais uma vez e espalha-se bactérias da região 2 na 3; flamba-se mais uma vez e espalha-se bactérias da região 3 na 4. As colônias presentes na região 4 crescerão isoladas.

## **2.1 – Coloração de Gram**

Para as análises por coloração de Gram foram utilizadas culturas jovens de *B. thuringiensis* crescidas em meio LB+sais por 1-2 dias a 28-30 °C. Uma gota de água deionizada estéril foi colocada no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, em seguida, utilizando uma alça de platina flambada, uma pequena quantidade de amostra proveniente de uma colônia bacteriana foi transferida para a lâmina e solubilizada na gota de água estéril. O esfregaço foi deixado em repouso para secar ao ar e depois fixado passando-se a lâmina sobre a chama de uma lamparina. Com a lâmina resfriada, o esfregaço foi coberto com solução de violeta genciana fenicada e deixado em repouso por 1 min. Posteriormente, o excesso de corante foi escorrido e o esfregaço foi coberto com a solução de iodo de Gram e deixado em repouso por mais 1 min. O excesso de solução de iodo de Gram foi escorrido e a lâmina foi lavada gotejando a solução descorante (álcool-acetona) por 15-30 segundos. A lâmina foi lavada com água deionizada e corada com a solução de fucsina fenicada por 30-60 segundos. Finalmente, a lâmina foi lavada com água deionizada, deixada secar ao ar e observada ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x).

## **2.2 – Microscopia de contraste de fase**

Para as análises por microscopia de contraste de fase foram utilizadas culturas de *B. thuringiensis* em fase estacionária ou de esporulação, crescidas em meio LB+sais por 3-4 dias a 28-30 °C. Uma gota de água deionizada estéril foi colocada no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, em seguida, utilizando uma alça de platina flambada, uma pequena quantidade de amostra proveniente de uma colônia bacteriana foi transferida para a lâmina e solubilizada na gota de água estéril. O esfregaço foi coberto com uma lamínula e observado ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x) com contraste de fase (Ph3).

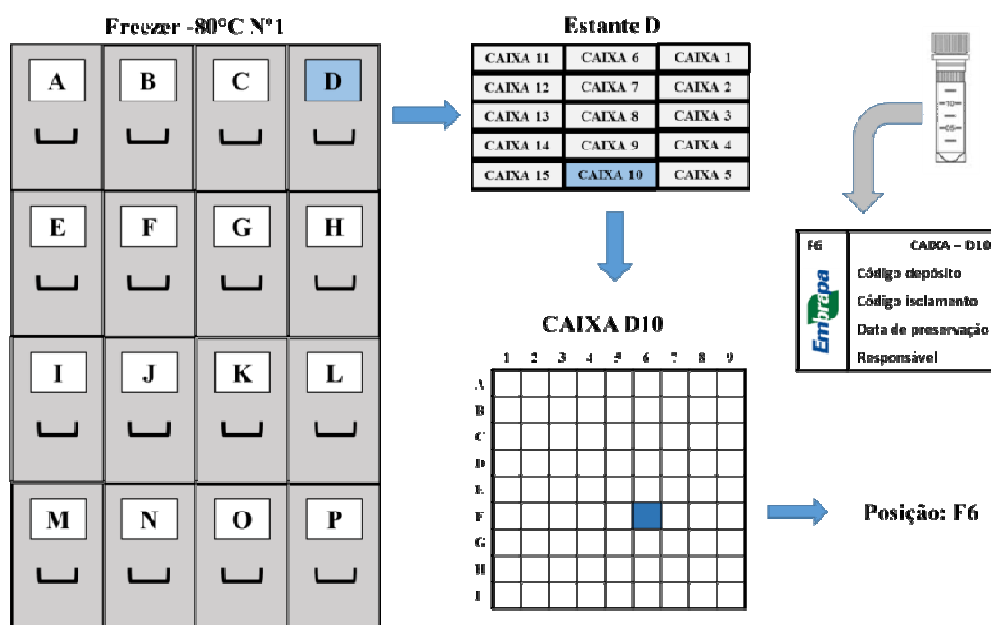
## **3 – Preservação de *B. thuringiensis* por ultracongelamento a -80 °C**

Para cada linhagem preservada, uma colônia isolada, apresentando características morfológicas típicas de *B. thuringiensis*, foi transferida para uma nova placa de Petri contendo meio de cultura LB+sais e espalhada sobre toda a superfície do meio de cultura. Após 72h de crescimento a 28-30 °C as bactérias foram recolhidas da superfície do meio, solubilizadas em uma solução de crioproteção (glicerol 25%) e armazenadas a -80 °C.

#### 4 – Gerenciamento das amostras preservadas no AleloMicro

As amostras de *B. thuringiensis* incorporadas ao acervo da CMMF foram armazenadas em freezer a -80 °C seguindo um mapa de localização (Figura 3). As amostras também receberam uma etiqueta contendo as seguintes informações: identificação da linhagem pelo código de depósito (código BRM ou código da subcoleção CBE), identificação da linhagem pelo código de isolamento, data de realização da preservação, nome do responsável pela preservação e os dados do mapa de localização (identificação da caixa e posição do microtubo dentro da caixa).

Figura 3 – Mapa de localização utilizado na CMMF para a rastreabilidade de amostras armazenadas em freezer.



Mapa de localização de amostras: Freezer -80°C (N°1); Estante A-P; Caixa 1-15; Linha A-I; Coluna 1-9.

As informações sobre o método de preservação utilizado, a data e o local de armazenamento das amostras foram, posteriormente, cadastradas no AleloMicro base de dados, módulo com acesso restrito (<http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/AleloMicro/index.xjs>), o qual permite uma fácil localização e rastreabilidade das amostras.

#### Resultados e Discussão

As linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas pertencem a subcoleção de bactérias e vírus entomopatogênicos (CBE) que se encontra preservada por congelamento a -20 °C no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo. Foram reativadas cerca de 320 linhagens de *B. thuringiensis* a partir das amostras originais da subcoleção CBE.

Inicialmente, foi realizada a checagem de pureza das amostras pela verificação da ausência de colônias bacterianas apresentando características morfológicas diferentes (Figura 4).



Figura 4 – Cultura de *B. thuringiensis* cultivada em meio LB+sais por dois dias a 28°C.

As culturas de *B. thuringiensis* apresentaram características morfológicas típicas (Figura 5).

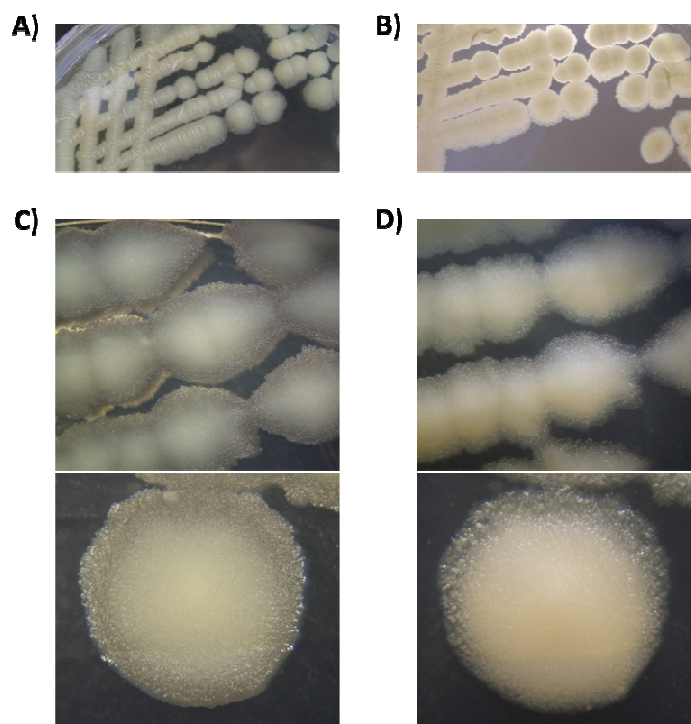


Figura 5 – Características morfológicas das colônias de *B. thuringiensis* em meio LB+sais, após cultivo por dois dias a 28 °C. Aspecto das colônias na placa de Petri: frente (A) e verso (B). Aspecto das colônias visualizadas em microscópio estereoscópio (Leica EZ4) com iluminação lateral (C) e superior (D) com aumento de 8x (C e D, superior) ou 20x (C e D, inferior).

As colônias de *B. thuringiensis* são opacas, sem pigmentação e com estrutura densa, geralmente, apresentam forma circular, bordas onduladas e consistência cremosa. Nos cultivos mais velhos, as colônias apresentam um aspecto seco rugoso (SOSA-GOMES et al., 1998).

Além da análise das características morfológicas da colônia de *B. thuringiensis* em meio de cultura, em alguns casos foram utilizadas técnicas de microscopia para confirmar a pureza das amostras da coleção. *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, que pode ser caracterizada pela sua habilidade de formar cristais proteicos durante a fase estacionária e/ou de esporulação. Na Figura 6 estão ilustradas algumas análises por coloração de Gram realizadas com quatro diferentes linhagens de *B. thuringiensis* pertencentes a subcoleção CBE. A Coloração de Gram é a coloração diferencial mais utilizada em bacteriologia (VERMELHO et al., 2006). Esta coloração separa as bactérias em dois grupos, Gram positiva e Gram negativa, baseado na diferença de composição da parede de diferentes bactérias e na capacidade destas



paredes em reterem os corantes utilizados. As bactérias Gram positivas adquirem cor roxa e as Gram negativas adquirem coloração rosa.

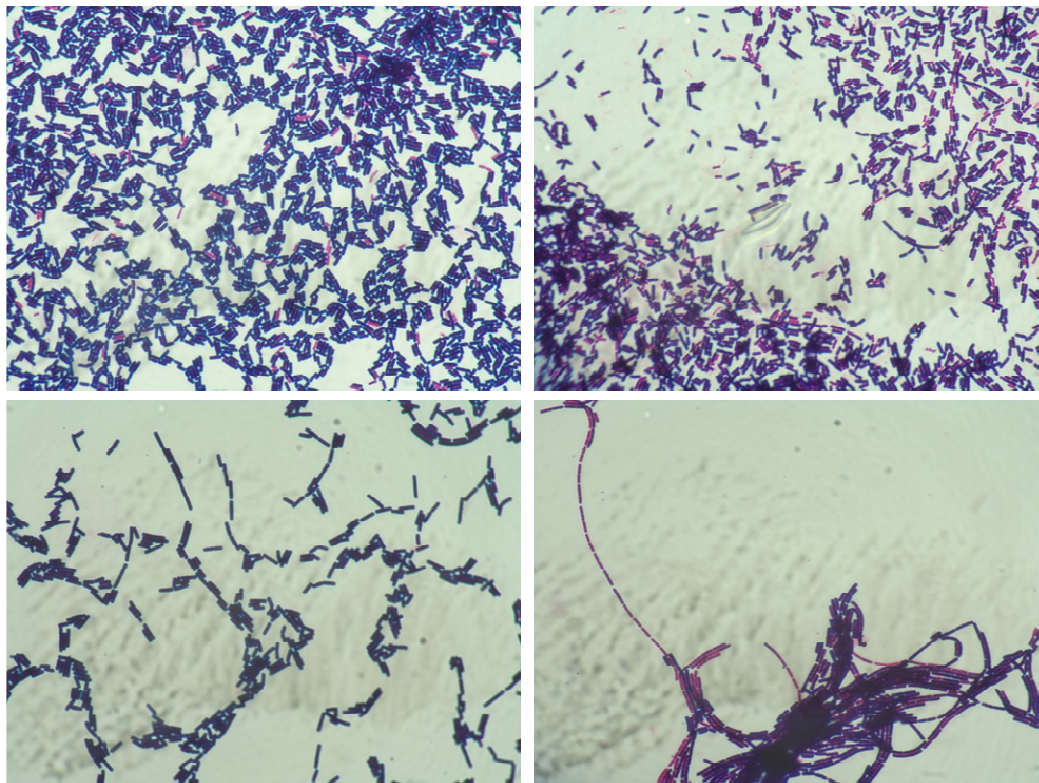


Figura 6 – Coloração de Gram de linhagens de *B. thuringiensis* após cultivo em meio LB + sais por dois dias a 28 °C. As imagens das lâminas de coloração de Gram foram realizadas em um microscópio Zeiss Axiolab utilizando a objetiva de imersão (100x). As bactérias do gênero *Bacillus* são bastonetes Gram positivos com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 x 1,2 µm até 2,5 x 10 µm).

A presença de cristais e esporos também foi checada em algumas linhagens de *B. thuringiensis* pertencentes à subcoleção CBE utilizando microscopia de contraste de fase (Figura 7). A microscopia de contraste de fase permite a observação de células vivas, sem a necessidade de corantes, por meio do uso de microscópios contendo lentes objetivas especiais, condensadores e prismas.

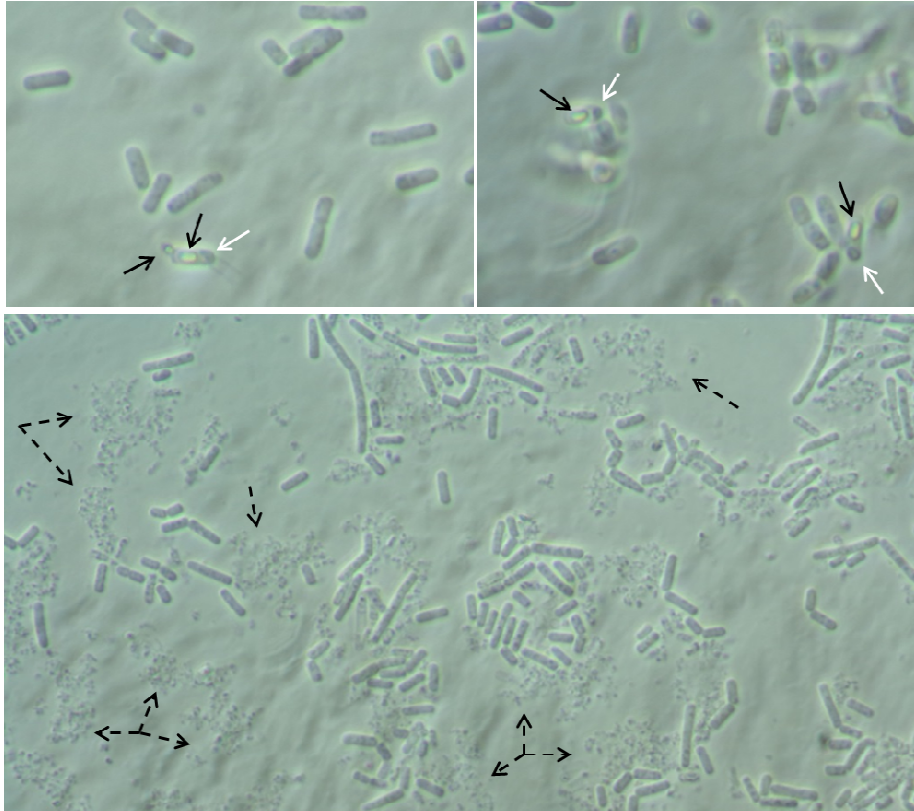


Figura 7 – Análises por microscopia de contraste de fase de linhagens de *B. thuringiensis*, cultivadas em meio LB+ sais por três dias a 28 °C. As imagens das lâminas foram realizadas em um microscópio Zeiss Axiolab utilizando a objetiva de imersão (100x). Nas imagens superiores, as setas indicam a presença de endósporos (setas pretas) ou de cristais (setas brancas) no interior das células vegetativas. Na foto inferior, as setas tracejadas indicam a presença de esporos ou de cristais no meio após rompimento das células vegetativas.

Após a checagem de pureza, as linhagens de *B. thuringiensis* foram preparadas para a preservação e incorporação ao acervo da CMMF. Foi utilizado o método de preservação por ultracongelamento, que consiste na preservação dos microrganismos a temperaturas muito baixas (-80 °C). Baixas temperaturas protegem o DNA e as proteínas contra danos e desnaturação e diminuem o movimento da água celular. Conseqüentemente, as atividades bioquímicas e fisiológicas das células microbianas são essencialmente interrompidas e as células se mantêm protegidas por longos períodos (PRAKASH et al., 2013).

Os microrganismos diferem quanto às condições necessárias para a preservação em longo prazo, o que demanda a utilização de procedimentos diferenciados para assegurar as condições ideais de preservação, viabilidade e pureza. De acordo com as Diretrizes e os Requisitos Corporativos de Qualidade para Coleções de Microrganismos

da Embrapa (CASTRO et al., 2015; PONTES et al., 2015), é recomendável que cada linhagem seja mantida em, pelo menos, dois métodos diferentes de preservação, sendo pelo menos um deles o ultracongelamento ou a liofilização, por serem métodos de preservação a longo prazo.

Os esporos de *B. thuringiensis* dormentes são extremamente resistentes e capazes de sobreviver sob condições desfavoráveis por um longo período (VALICENTE, 2009). Mesmo assim, além da preservação por ultracongelamento, futuramente as linhagens de *B. thuringiensis* também serão preservadas por liofilização, que consiste na dessecação do material congelado, sob vácuo, através da sublimação (MORGAN et al., 2006).

A subcoleção de bactérias e vírus entomopatogênicas (CBE) conta com cerca de 4.600 linhagens de microrganismos entomopatogênicos dentre os quais 3.408 estão cadastrados no sistema AleloMicro e 2.424 subamostras incorporadas ao acervo da CMMF até o momento.

O acervo das coleções microbianas constitui um recurso valioso para detectar potencialidades de uso em processos agroindustriais (insumos), pesquisa, ensino e programas de melhoramento genético. A preservação adequada desses microrganismos é de grande interesse para instituições de pesquisa, para o agronegócio, a indústria e o meio ambiente.

## Conclusão

Foi possível caracterizar a macromorfologia das cepas de Bt, confirmando sua pureza e espécie pela presença de cristais. Incorporaram-se 320 linhagens de *B. thuringiensis* ao acervo da CMMF, preservadas por ultracongelamento a -80 °C.

## Referências

CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V.; SILVA, F. A. da; SILVA, G. A. da; LIMA, L. H. C.; BRITO, M. A. V. de P. e; HUNGRIA, M.; AVIDOS, M. F. D.; BURLE, M. L.; AQUINO, M. de; LOPES, R. B.; PONTES, R. G. M. S. de; COSTA, S. de P. P.; CASTRO, C. S. P. de **Diretrizes de gestão para coleções de microrganismos da Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 23 p. GESTCOL-Gestão de Coleções Microbiana.

FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. (Ed.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. 566 p.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis**: biology, ecology and safety. New York: John Wiley & Sons, 2000. 350 p.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **Bioscience**, Washington, v. 42, p. 112-122, 1992.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying: a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.

PAIVA, C. A. O. OLIVEIRA, M. C.; MARRIEL, I. E.; SOUZA, F. A. de; VALICENTE, F. H.; COTA, L. V. **Manual de gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 47 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 153).

PONTES, R. G. M. S. de; CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V.; LIMA, L. H. C. **Requisitos corporativos de qualidade para coleções de microrganismos da Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 15 p.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y. S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 1-9, 2013.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; TIGANO, M. S.; ALVES, S. B. Caracterização de entomopatógenos In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 731-764.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 48-55, jul./ago. 2009.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M.R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 639-644, Oct./Dec. 2003.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S. **Práticas de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 239 p.

### **Literatura recomendada**

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 382 p.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Willkins, 1986. v. 2, 1599 p.