

Metodologia de Separação por Ludox e Purificação de Esporos e Cristais de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki

Fernando M. L. Souza; Ubiraci G. P. Lana; Kees van Frankenhuyzen; Fernando H. Valicente

Embrapa Milho e Sorgo

Compreender o papel do esporo de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) é fundamental para os estudos do seu modo de ação. O objetivo deste trabalho foi adaptar o método Ludox de separação dos esporos e cristais do Bt. A cepa Bt var. kurstaki (HD1) foi crescida em LB sólido por 72 h, transferida para frascos com 200 mL de solução (0,1 mol/L Tris base, 1 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0,02 % NaN₃, 0,01 % Triton, pH 7,2) e agitados por 15 min. iormente, centrifugados por 15 min a 15000 rpm e descartado o sobrenadante. Isso foi repetido até a massa celular ficar esbranquiçada. Foram adicionados 100 mL de água, 1 g de lisozima e 1 mL de 1 % Triton, assim obtendo o crude. Em tubos de 17 mL foi adicionado 8 mL de Ludox HS-40 (Sigma®; pH ajustado para 8) diluído em 55 % e abaixo 4 mL 65 %, formando dois gradientes. Foi acrescentado 4 mL do crude sobre o Ludox e centrifugados a 8000 xg por 30 min a 24 °C (Hitachi: Himac CP80β, SW 28) formando 5 camadas, sendo a 3^a camada os esporos e a 5^a camada (pellet) os cristais. Para obter 100 % de pureza os esporos foram centrifugados por 15 min a 10000 rpm, o pellet ressuscitado em 10 mL de 0,05 % NaOH (pH 12) e incubados por 1 h, iormente, centrifugados e ressuscitados em 20 mL de água. A concentração foi de $2,7 \times 10^8$ esp/mL, determinada por Câmara de Neubauer. Os cristais foram centrifugados a 10000 rpm por 10 min. Os pellets foram ressuscitados em 15 mL de 0,2 M CAPS (pH 10,5) e incubados a 175 rpm por 24 h. Após, foram centrifugados por 5 min a 8000 rpm e o sobrenadante filtrado utilizando 0,2 μm acrodisco. Através do Método de Bradford e SDS Page foi identificado o perfil de proteínas dos cristais solubilizados e confirmação da purificação dos esporos. A concentração de proteínas Cry foi determinada pelo software Quantity One da Bio-Rad (versão 4.4) resultando em 400 ng/μL. Estes resultados sugerem que a adaptação da metodologia foi satisfatória possibilitando estudos mais aprofundados do modo de ação do Bt.

Palavras-Chave: controle biológico; Cry; modo de ação

Apoio Institucional: Capes; Embrapa Milho e Sorgo