



Fernando H. VALICENTE¹ e ISABEL R. P. DE SOUZA¹

¹ Pesquisador(a) Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970. E-mail: valicent@cnpms.embrapa.br

Palavras-chaves: *Bt*, MEV, meio LB modificado, condições de crescimento.

INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram positiva que ocorre naturalmente no solo, água, insetos mortos e ambientes onde se armazenam grãos (Lambert & Peferoen, 1992). Durante a fase estacionária e/ou de esporulação o *B. thuringiensis* (*Bt*) produz um esporângio que contém um endosporo e uma ou mais inclusões protéicas e cristalinas (δ endotoxinas) que são tóxicas para um grande número de insetos e, o que faz o *Bt* uma fonte valiosa dentro do manejo de pragas. Os genes *cry* ocorrem na maioria das vezes nos plasmídeos e em algumas subespécies nos cromossomos. As proteínas que formam estes cristais somam entre 20 a 30% da proteína total da bactéria na fase de esporulação. Os cristais são geralmente bipiramidais em forma e são principalmente ativos contra os lepidópteros. Os cristais também podem ser triangulares, cubóides, chatos, em forma de barra e sem forma em muitas subespécies. Mais de 170 genes diferentes codificando para δ endotoxinas já foram identificados, sendo a maioria ativa contra organismos de poucas ordens de inseto e, cada uma das quais podem ser expressas em um ou vários dos 82 sorotipos já caracterizados (Glare & O'Callaghan, 2000). A atividades das δ endotoxinas é restrita ao trato digestivo dos insetos. O consumo de alimento tratado com endotoxinas geralmente resulta na parada da alimentação de larvas de lepidópteros e, a paralisação do intestino que retarda a passagem de material vegetal ingerido e permite que os esporos germinem e passem a crescer vegetativamente. Quando as larvas se alimentam com altas doses da toxina sofrem uma paralisia geral seguida de morte, devido à lise do epitélio do intestino médio. Com doses mais baixas ou em insetos menos susceptíveis, dano às células do intestino é suficiente para parar a secreção normal do intestino, o qual abaixa o pH do lúmen e permite os esporos germinarem. O objetivo deste trabalho foi adequar o meio e o tempo de cultivo das colônias de *Bt*, de forma a apresentarem consistência e estágio de crescimento desejado, que permitissem o preparo de amostras para a microscopia eletrônica de varredura, sem dissolução do meio de cultivo e perda das bactérias, esporos e cristais.

Material e Métodos

1 - Preparo do meio e crescimento da cepa de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

A cepa de *Bt* usada neste trabalho foi a de registro número 344, encontrada em Foz do Iguaçu, Paraná e muito eficiente no controle da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. O meio de cultura usado para o cultivo do *Bt* foi o meio LB (Luria Bertani) mais sais ($MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$) e pH final de 7,5 (Cerón et al., 1995). Ao meio foram adicionados 30 gramas de ágar por litro (o dobro do recomendado), sendo as colônias crescidas por 4 dias a 30°C. Depois deste período, as placas de petri contendo as colônias foram colocadas na geladeira, invertidas e sem o uso de parafilme nas bordas das placas. Deste modo, após 30 dias, o meio de cultura estava mais consistente, um pouco ressecado porém mais firme por causa do resfriamento, mas sem a contaminação das colônias. A espécime foi obtida cortando-se o ágar contendo o bacillus, nas dimensões 0,5 x 0,5 cm e submetida ao preparo para análise ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). O preparo envolveu as etapas de: fixação, contrastação, desidratação, ponto crítico e metalização, como descrito a seguir.

É imprescindível a utilização de capela para a realização dos processos de fixação, contrastação e desidratação. No preparo de soluções, para todos os produtos, deve-se ler o Material Safety Data Sheets (MSDS) referente a cada um, para que as devidas precauções devam ser tomadas durante o manuseio destes.

2. Fixação

Utilizou-se glutaraldeído em tampão fosfato Millionig 0,1 M, pH 7,2 e as espécimes permaneceram nesta solução por uma noite e em geladeira.

2.1 - Preparo do Fixador

Solução A - Tampão fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) a 2,26%, preparada em água destilada

Solução B – Hidróxido de sódio (NaOH) a 2,52%, preparada em água destilada

Solução C - Glicose ($C_6H_{12}O_6$) a 5,40%, preparada em água destilada

Solução D - 41,5ml Solução A + 8,5ml Solução B

Solução E – 5 ml da Solução C + 45 ml Solução D

Solução F – Glutaraldeído a 2,5 %, preparada em água destilada

Solução Final: 45 ml da solução E + 5 ml da Solução F

3. Contratação

Substitua o fixador das espécimes por solução de ósmio a 2% e deixe nesta solução por uma hora.

4. Desidratação

4.1 - Substitua a solução de ósmio 2% da amostra por etanol 25% e deixe nesta solução por 20 min.;

4.2 - Substitua a solução de etanol 25% por etanol 50% e deixe nesta solução por 20 min.;

4.3 - Substitua a solução de etanol 50% por etanol 75% e deixe nesta solução por 20 min.;

4.4 - Substitua a solução de etanol 75% por etanol 90% e deixe nesta solução por 20 min.;

4.5 - Substitua a solução de etanol 90% por etanol 100% e deixe nesta solução por 20 min. Repita esta etapa mais duas vezes;

4.6 – Substitua a solução de etanol 100% por acetona e deixe nesta solução por 20 min. Repita esta etapa mais duas vezes.

5. Ponto Crítico

Utilizou-se o equipamento EMITECH K850 (Ashfort, Kent, UK).

Após o ponto crítico as amostras foram cortadas ao meio e coladas em posições diferentes sobre o filme de carbono previamente aderido sobre os *stubs*. Tinta de prata condutora (*RS components, Northants, UK*) foi passada sobre o filme de carbono e nas laterais deste, entretanto, sem atingir a amostra.

6. Metalização

As amostras foram metalizadas com ouro (*Gold Target 60 mm x 0,1 mm*) empregando-se o metalizador EMITECH K550 (*Ashfort, Kent, UK*).

Resultados e Discussão

O meio de cultura empregado para o cultivo do *B. thuringiensis*, LB (Luria Bertani) modificado com a adição de 30 gramas de ágar por litro, associado às condições adotadas para o crescimento das colônias, conforme descrito acima, permitiram a obtenção de amostras de *Bt* contendo esporos e cristais, suficientemente aderidas ao ágar. Este meio de cultura modificado, apresentou consistência adequada para submissão ao processo de preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura, sem solubilização do mesmo e dispersão das bactérias, esporos e cristais. A figura 1 mostra fotos de microscopia de varredura tiradas de colônias de *Bt* obtidas com o processo modificado e descrito com detalhes no item material e métodos. As figuras 2 e 3 também mostram fotos de microscopia de varredura tiradas de *Bt* após a esporulação e formação do cristal bipiramidal, o qual está sendo indicado pelas setas.

Literatura Citada

Cerón, J., Ortíz, A., Quintero, R., Guerca, L. and Bravo, A. (1995). Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *App. Environ. Entomol.* 61:3826-3831.

Glare, T. R. and Callaghan, M. O'. (2000). *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley & Sons, LTD. UK. 350p.

Millonig, G (1964). Study on the factors which influence preservation of fine structure. In: *Symp. On Electron Microscopy* (P. Buffa, Ed.), p. 347. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

Millonig, G. and Marinozzi, V. (1968). Fixation and embedding in electron microscopy. In: *Advances in Optical And Electron Microscopy*, Vol. 2 (R. Barer, and V. E. Cosslett, Eds.), p. 251. Academic Press, New York.

Hayat, M.A. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1989.



FIGURA 1. Foto de microscopia eletrônica de varredura, magnificação de 10.000 X , mostrando esporângios de *Bacillus thuringiensis*.



FIGURA 2. Foto de microscopia eletrônica de varredura, magnificação de 15.000 X , seta indicando cristal de forma bipolar de *Bacillus thuringiensis*.



FIGURA 3. Foto de microscopia eletrônica de varredura, magnificação de 15.000 X , setas indicando cristais de forma bipolar de *Bacillus thuringiensis*

