

## AVALIAÇÃO DE NOVOS ISOLADOS *Bacillus sphaericus* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Clodoaldo dos Santos RIBEIRO<sup>1</sup>  
Wanderli Pedro TADEI<sup>2</sup>  
Iléa Brandão RODRIGUES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Colaborador CSAS/INPA; <sup>3</sup>Orientadora CSAS/INPA

### INTRODUÇÃO

As doenças veiculadas por insetos como a malária, a dengue e a filariose são um dos mais sérios problemas de saúde pública, gerando, por consequência, graves problemas sociais (WHO 2008), tornando-se importante a busca de eficientes estratégias de controle.

Estima-se em todo o mundo, que 15 milhões de pessoas sofram de linfedema. A OMS (2013) estima que um bilhão de pessoas residam em áreas de risco de transmissão da filariose e que 120 milhões estejam infectadas. Estima-se que 50 milhões de infectados no mundo apresentam algum tipo de incapacidade física. Atualmente, mais de 1,4 bilhão de pessoas em 73 países estão em risco de doença.

No Brasil, a filariose foi identificada pela primeira vez em 1866 por Otto Wucherer em Salvador. Os primeiros registros da filariose no Recife datam de 1952, quando foram identificados casos positivos no bairro de Afogados. Entre 1954 e 1955, 23.065 pessoas residindo em 6.048 domicílios foram examinadas na cidade, estimando-se existir cerca de 80 mil infectados. Em 1997, durante a 5ª Assembleia Mundial de Saúde, a OMS lançou um Plano de Eliminação Global da Filariose, cujos objetivos eram deter a expansão da doença no mundo mediante tratamento em massa e controle de vetores nas comunidades endêmicas, além de prestar atendimento à população.

Com a recente imigração de haitianos para o Brasil, mais precisamente para o Amazonas, estudos mostraram que de 4.000 haitianos que migraram 200 estavam com filaria por exame de busca ativa (Martins *et al.* 2012). Importância do Estudo com novas estirpes de *Bacillus sphaericus*. Os Programas de controle desses vetores estão sendo realizados de forma integrada, com o emprego de métodos alternativos aos produtos químicos convencionais. Vem ganhando destaque, principalmente o controle biológico, pois se trata de uma estratégia que prioriza minimizar os impactos causados ao meio ambiente e desenvolvimento de resistência dos vetores (Dias 1992; Tadei 2002). No combate de vetores, a atividade concentrou-se em interromper a transmissão da doença com um mínimo de efeitos adversos ao meio ambiente (Lacey e Orr 1994). Novas estirpes de *B. sphaericus* vem sendo extraídas de solos brasileiros com a maior atividade larvicida do que a estirpe padrão da OMS (Vilarinhos 1992; Litaiff 2006; Oliveira *et al.* 2005). Alguns desses isolados encontram em diferentes centros de referência no país, ressaltando-se aqui a parceria estabelecida com CENARGEN/EMBRAPA-Brasília e o Laboratório de Malária e Dengue do INPA. O presente projeto enfoca a descoberta de novos isolados de *Bacillus sphaericus* com potencial para controle de *Culex* sp.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes utilizados nos bioensaios foram oriundos da colônia existente no Laboratório de Malária e Dengue e criadouros no campo. As Larvas foram coletadas na periferia de Manaus (Zona Leste Puraquequara) com auxílio de concha, pipeta plástica e tubos Falcon, para armazenamento das mesmas. Após as coletas os espécimes foram transferidos para o insetário do Laboratório de Malária e Dengue do INPA, onde foram mantidas em temperatura ambiente constantes de 26 ± 2°C e umidade relativa superior a 80%. Posteriormente, foi feita a identificação com auxílio da chave taxonômicas de Gorhan *et al.* (1967). Os espécimes adultos foram capturados com aspirador elétrico e transportados para o insetário, onde eram colocados em gaiolas, para serem identificados. Separada a espécie alvo o *Culex quinquefasciatus* machos e fêmeas receberam alimentação açucarada e repasto sanguíneo (hamsters anestesiados com Xilasia 8mg/Kg e Quetamina 50mg/Kg). Este projeto tem autorização do Comitê de Ética no Uso de Animal – CEUA sob o n. 069/2012. A manutenção das larvas foi feita conforme Santos *et al.* (1981) e Scarpassa e Tadei (1990), até as larvas atingirem o terceiro estágio de desenvolvimento, sendo então utilizadas nos bioensaios.

Neste trabalho foram testadas quatro estirpes de *B. sphaericus* (S<sub>3</sub>, S<sub>12</sub>, S<sub>24</sub> e S<sub>42</sub>), extraídas de solos brasileiros. Os isolados são originários de Vitória - ES (S<sub>3</sub>) e Corumbá - MS (S<sub>12</sub>, S<sub>24</sub> e S<sub>42</sub>), amostras que estão armazenadas e foram cedidas para os testes do Banco de Germoplasma Microbiano do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN / EMBRAPA (Brasília).

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue, em condições de temperatura ambiente de 26 ± 2°C e umidade superior a 80%. Inicialmente, a obtenção da suspensão bacilar (solução mãe) foi feita pela mistura de 50 mg do bacilo liofilizado em 10 mL de água. A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas para obtenção das

seguintes doses (em ppm): 1 ; 0,5 ; 0,25; 0,12 e 0,06. A validação dos bioensaios ocorreu conforme os critérios estabelecidos de Dulmage *et al.* (1990). As análises foram feitas no programa POLO-PC para determinação da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) e a obtenção das retas de regressão linear.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes espectros de ação inseticida são descritos na literatura considerando novos isolados de bactérias entomopatogênicas. Dentre os patógenos mais efetivos nos programas de malária, citam-se espécies de bactérias do gênero *Bacillus* – *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* (Habib 1989; Barjac 1990; Regis 2000). Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) são mais susceptíveis a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, enquanto espécies de *Culex* e de *Anopheles* são mais sensíveis a *B. sphaericus*. Esta sensibilidade varia de acordo com a espécie alvo, o estágio de desenvolvimento, o ambiente e a zona de alimentação da larva (Bhumiratana 1990).

As concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) estão apresentadas na tabela 1 e pode ser observado para a estirpe S<sub>24</sub> menor valor de CL<sub>50</sub>=0,69ppm, enquanto o maior valor foi observado para a estirpe S<sub>3</sub> com CL<sub>50</sub>=9,12ppm (P<0,05).

Tabela 1. Dose/resposta de estirpes *Bacillus sphaericus* com *Culex quinquefasciatus* em laboratório.

Estirpes (B.s.)	Equação de regressão	CL <sub>50</sub> (mg/mL) IC <sub>0,05</sub>	n	X <sup>2</sup>	g.l	Heterogeneidade
S <sub>3</sub>	Y=4,701+4,896*logx	9,125 (6,902-24,963)	100	2,947	3	0,98
S <sub>12</sub>	Y=0,456+1,617*logx	1,916(1,075-2,804)	100	10,702	3	3,56
S <sub>24</sub>	Y=0,226+1,435*logx	0,695(0,443-1,648)	100	5,151.	3	1,71
S <sub>42</sub>	Y=1,281+(1,046)*logx	5,096	100	5,122n.s.	3	1,70

n.s.= não significativo

As retas de regressão linear confirmam estatisticamente, valores de próbite menores encontrados para a estirpe S<sub>3</sub>= 3,73 e maiores valores foram encontrados utilizando a estirpe S<sub>12</sub>= 5,26, na dose de 1ppm em 24 horas (Figuras 1, 2 e 3).

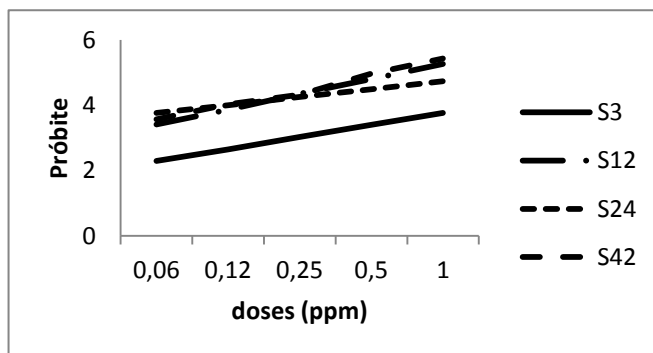


Figura 1. Valores de Próbite observado com estirpes de *Bacillus sphaericus* com *Culex quinquefasciatus* em 24 horas.

Na leitura de 72 horas observam-se no gráfico 3 na maior dose testada (1ppm) maiores valores de próbite.

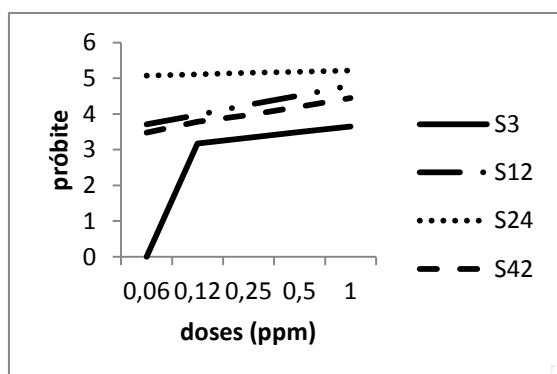


Figura 2. Valores de Próbite observado com estirpes de *Bacillus sphaericus* com *Culex quinquefasciatus* em 48 horas.

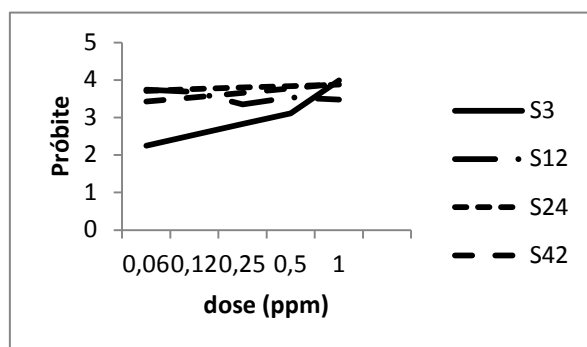


Figura 3. Valores de Próbite observado com estirpes de *Bacillus sphaericus* com *Culex quinquefasciatus* em 72 horas.

Estirpes isoladas de diferentes localidades do país, também pelo CENARGEN, foram utilizadas por Schenkel *et al.* (1992) e Vilarinhos (1991), em bioensaios com espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles*. Sendo testadas pelos primeiros autores as estirpes S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>5</sub> e L2 (provenientes de Brasília, DF) contra larvas de *Culex pipiens* e *A. stephensi*, tomando como padrão a mortalidade observada com *B. sphaericus* 2362. Verificaram que apenas a L2 não mostrou atividade larvicida similar ao isolado 2362, contra estas espécies de mosquito.

## CONCLUSÃO

As estirpes de *Bacillus sphaericus* com maior toxicidade para larvas de *Culex quinquefasciatus* foram a S<sub>24</sub> e S<sub>12</sub>. A maior mortalidade observada para a estirpe S<sub>24</sub> ocorreu em 48 horas, enquanto a estirpe S<sub>12</sub> em 24 horas. A estirpe de *Bacillus sphaericus* menos susceptível a larvas de *Culex quinquefasciatus* foi a S<sub>3</sub>. As estirpes de *Bacillus* mais promissoras a produção de novo inseticidas para o controle de *Culex quinquefasciatus* foram S<sub>24</sub> e S<sub>12</sub>.

## REFERENCIAS

- Dias, J.M.C.S. 1992. Produção e utilização de biolarvicida bacteriano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27: 59 – 76.
- Dulmage, H.T.; Yousten, A.A.; Singer, S. Lacey, L.A. 1990. *Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus*. UNDP / World Bank / WHO, Steering Committee to Biological Control of Vetores, Geneva. 59 p.
- Gorhan, R.J.; Stojanovich, C.J.; Scott, H.G. 1967. *Clave ilustrada para los anofelinos de Sudamerica Oriental*. Communicable Disease Center, United States Public Health Service, Atlanta, 64p.
- Habib, M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84(3): 31-34.
- Martins, A. Oliveira, Safe, I.; Beltrão, R.; Martins, M.; Guerra, M.V.F.; Albuquerque, B.C.; Arcanjo, A.R.L.; Alecrim, M.C.G.; Lacerda, M.V.G. 2012. *Wuchereria bancrofti* asymptomatic infection in male Haitian immigrants in Manaus, Amazonas, Brasil. Resumo XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine. 682p.
- Oliveira, C.D. *et al.* 2005. Observação da sintomatologia em larvas de *Anopheles albitalis* (Lynch- Arribalzaga, 1878), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), em contato com *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904). 1º Congresso Internacional do Piatam: Ambiente, Homem, Gás e Petróleo, EDUA, Manaus, AM. p. 275.
- Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos 1 - Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus / Boa Vista. *Revista Acta Amazonica*, 11(4): 789 - 797.
- Scarpassa, V.M.; Tadei, W.P. 1990. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari*. *Revista Acta Amazonica*, 20: 95-118.
- Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B. 2002. O controle biológico para anofelinos na Amazônia. Anais do 19º. Congresso Brasileiro de Entomologia (CD-ROM). Manaus – AM, 1.
- WHO – World Health Organization. World Malaria Report 2008. WHO Library Cataloguing-in-Plucation Data. Pág: VII; 9-15; 45-47; 154.