

**EFEITO DE QUATRO LINHAGENS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* var
KURSTAKI EM OVOS E LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*¹**

**EFFECT OF FOUR STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* var
KURSTAKI ON EGGS AND LARVAE OF *HAEMONCHUS CONTORTUS***

**Terezinha Padilha Charles² Clóvis de Paula Santos³ Joseilde Oliveira Silva-Werneck⁴
José Manoel Cabral de Sousa Dias⁵ Leon Rabinovitch⁶ Tania Guaycurus⁷**

RESUMO

Os efeitos ovicida e larvicida de quatro linhagens de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* foram estudados em bioensaio onde fezes de ovinos contendo ovos de *Haemonchus contortus* foram incubadas com cultivo em caldo nutritivo constituído por mais de 90% de esporos da bactéria. A cultura foi adicionada a fezes frescas e fezes incubadas por 24 e 48 horas. Após adição da cultura, as fezes eram homogeneizadas e incubadas a 27°C por sete dias. Após este período as larvas eram retiradas através da baermanização e preservadas em formalina para se-

rem quantificadas posteriormente. Duas cepas ocasionaram reduções significativas quando o caldo foi adicionado a fezes frescas ou a fezes incubadas por 24 horas, enquanto uma delas reduziu significativamente o número de larvas recolhidas dos cultivos quando o caldo foi adicionado a fezes incubadas por 24 ou 48 horas. Uma das cepas ocasionou redução significativa apenas quando o caldo foi adicionado em fezes cultivadas por 48 horas.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, controle biológico, *Haemonchus contortus*, Nematódeos gastrintestinais, ruminantes.

¹Parte de projeto com o apoio do CNPq.

²Médico Veterinário, PhD, Pesquisadora da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), Rodovia MG 133, Km 42, 36155-000 Coronel Pacheco, MG, autor para correspondência.

³Biólogo, Bolsista do CNPq, EMBRAPA-CNPGL.

⁴Engenheiro Químico, Dr., Pesquisador da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), SAIN Parque Rural, 70602-000 Brasília DF.

⁵Engenheiro Agrônomo, Pesquisadora da EMBRAPA-CENARGEN.

⁶Farmacêutico Químico, Livre Docente, Pesquisador Titular do Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz (DB-IOC) Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 20930-041 Rio de Janeiro RJ.

⁷Biólogo, MS., Pesquisadora do DB-IOC.

SUMMARY

Ovicidal and larvicidal effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on free living stages of trichostrongylid nematodes is being surveyed using a bioassay in which 48-72 hours culture broth (>90% of spores) of the bacteria is added to fresh feces or feces incubated previously for 24 or 48 hours. Treated feces were incubated at 27°C for seven days after which the larvae were recovered through baermanization and formalized for a later counting. Ovicidal effect was observed in two strains and larvicidal effect in four strains.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*, biological control, *Haemonchus contortus*, gastrointestinal nematodes, ruminants.

INTRODUÇÃO

Os agentes microbianos que promovem redução nas formas de vida livre dos nematódeos poderão contribuir para o controle integrado das verminoses dos ruminantes (WALLER, 1993). Entre as bactérias, *Bacillus thuringiensis* são as mais estudadas. Observações iniciais de CIORDIA & BIZZELL (1961) demonstraram que um menor número de larvas infectantes foram recolhidos de fezes tratadas com *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. BOTTJER et al. (1985) testaram o efeito de trinta variedades de *B. thuringiensis*, demonstrando que todas foram tóxicas para ovos de *Trichostrongylus colubriformis*. Mais recentemente BRADFISH et al. (1991) relataram a identificação de diversas variedades de *B. thuringiensis* tóxicas para *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Ostertagia*, e BONE (1992) solicitou patente para *Bacillus laterosporus*, uma bactéria capaz de inibir a eclosão dos ovos e/ou o desenvolvimento das larvas de nematódeos de ruminantes. Este trabalho relata o efeito de quatro linhagens de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em estágios de vida livre de *Haemonchus contortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatro linhagens de *Bacillus thuringiensis*, sendo três procedentes do Banco de Germoplasma Microbiano do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA - CENARGEN) e uma da Coleção

de Culturas do Gênero *Bacillus* do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz. Dentre as primeiras, duas foram isoladas de solos brasileiros pela metodologia recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Uma delas, a S076, foi isolada em amostra coletada em Padre Bernardo, Estado de Goiás, e a outra, S093, foi isolada de amostra coletada em Uberlândia, Estado de Minas Gerais. A terceira, S128, era originalmente do Instituto Pasteur (Paris, França), assim como a quarta IP/THA-1a/475, depositada na Coleção do Instituto Oswaldo Cruz. Todas as linhagens pertencem a subespécie *kurstaki*, que corresponde ao sorotipo H3a3b (de BARJAC & FRACHON, 1990; DIAS et al. 1993).

As linhagens foram inoculadas em caldo nutritivo e incubadas em banho-maria a 28°C sob agitação contínua. Quando mais de 90% da cultura era constituída por esporos, o caldo foi homogeneizado e distribuído em amostras de fezes de ovinos. As fezes, contendo mais de 1000 ovos de *H. contortus* em cada grama (determinado pela técnica de McMaster, de acordo com UENO & GUTIERREZ, 1983), foram obtidas em ovinos infectados experimentalmente com uma cepa local e mantidos no Campo Experimental de Coronel Pacheco da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, como doadores de ovos. Dez amostras de quatro gramas de fezes frescas, dez amostras incubadas por 24 horas e dez incubadas por 48 horas foram tratadas com a cultura de cada linhagem (3ml de caldo) e dez amostras foram deixadas sem tratamento. As fezes tratadas e não tratadas foram incubadas por um total de sete dias em estufa a 27°C. Após esse período, as larvas foram retiradas através da técnica de Baerman modificada (UENO & GUTIERREZ, 1983). O número de larvas recolhido nos cultivos tratados foi comparado com o número recolhido nos cultivos não tratados, através da análise da variância, após a transformação pela expressão \sqrt{x} , onde x era o número de larvas recolhido. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett, usando o nível de significância de 5% (STEEL & TORRIE, 1960). Para apresentação dos resultados, as médias dos cultivos tratados foram apresentadas como percentual de redução em relação à média dos cultivos não tratados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças de atividade ovicida e larvicida entre as linhagens estudadas. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que apenas duas das linhagens testadas (S128 e IP/THA-1a/475) têm efeito ovicida e que todas as linhagens

apresentam efeito larvicida. A amostra IP/THA-1a/475 causou uma redução de 60% no número de larvas, quando a bactéria foi aplicada sobre fezes frescas, e 58,3%, quando aplicada sobre fezes com 24 horas de incubação. Na pastagem existem estágios de vida livre em diferentes estágios de desenvolvimento (ovos, larvas de primeiro estágio, larvas de segundo estágio e larvas de terceiro estágio). Logo, estirpes bacterianas com ação nos vários estágios são desejáveis.

Tabela 1 - Percentual de redução do número de larvas de *Haemonchus contortus* contidas em fezes frescas ou cultivadas por 24 ou 48 horas, recolhidas em cultivos tratados com quatro linhagens de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

LINHAGENS		REDUÇÃO (%)
S076	fezes frescas	0,0
	fezes cultivadas por 24h	0,0
	fezes cultivadas por 48h	28,9*
S93	fezes frescas	0,0
	fezes cultivadas por 24h	26,5
	fezes cultivadas por 48h	33,2*
S128	fezes frescas	36,2*
	fezes cultivadas por 24h	36,0*
	fezes cultivadas por 48h	15,8
IP/THA-1a/475	fezes frescas	60,0*
	fezes cultivadas por 24h	58,3*
	fezes cultivadas por 48h	0,0

*Redução significativa ($P < 0,05\%$)

A atividades ovicida e larvicida de cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contra *T. colubriformis* foram observadas em experimentos conduzidos em outros laboratórios (BOTTJER et al. 1985; MEADOWS et al. 1989). Existe evidência de que *B. thuringiensis* causam alteração na permeabilidade dos ovos de *T. colubriformis*, degeneração das células intestinais e liberação dos lipídios de reserva das formas larvares (BONE et al. 1985; BONE et al. 1986; BONE et al. 1987; BOTTJER & BONE, 1987). O mecanismo de ação das estirpes testadas neste trabalho não é ainda conhecido. Estudos adicionais serão implementados com o propósito de caracterizar esse mecanismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONE, L.W. Patent Abstract 5045315 - Control of parasitic nematode ova/larvae with a *Bacillus laterosporus*. *Biotechnology Advances*, Elmsford, v. 10, n. 1, p. 138, 1992.

BONE, L.W., BOTTJER, W.K.P., GILL, S.S. *Trichostrongylus colubriformis*: Egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 60, p. 314-322, 1985.

BONE, L.W., BOTTJER, W.K.P., GILL, S.S. *Trichostrongylus colubriformis*: Isolation and characterization of ovicidal activity from *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 62, p. 247-253, 1986.

BONE, L.W., BOTTJER, W.K.P., GILL, S.S. Alteration of *Trichostrongylus colubriformis* egg permeability by *Bacillus thuringiensis* toxin. *Journal of Parasitology*, Lincoln, v. 73, p. 295-299, 1987.

BOTTJER, K.P., BONE, L.W., GILL, S.S. Nematoda: Susceptibility of the egg to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 60, p. 239-244, 1985.

BOTTJER, K.P., BONE, L.W. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of Nematology*, Lake Alfred, v. 19, n. 3, p. 282-286, 1987.

BRADIFISH, G.A., HICKLE, L.A., FLORES, R., et al. Nematicidal *Bacillus thuringiensis* toxins: Opportunities in animal health and plant protection. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *BACILLUS THURINGIENSIS*, 1991, Oxford. Oxford: 1991.

CIORDIA, H., BIZZELL, W.E. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on the development of the free-living stages of some cattle nematodes. *Journal of Parasitology*, Lincoln, v. 47, p. 41 (Abstract), 1961.

deBARJAC, H., FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, v. 35, n. 2, p. 233-240, 1990.

DIAS, S.C., SILVA-WERNECK, J.O., SCHENKEL, R.G.M., et al. Técnicas sorológicas para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1993. 6 p. (EMBRAPA-CENARGEN, Comunicado Técnico, 15).

MEADOWS, J., GILL, S.S., BONE, L.W. Factors influencing lethality of *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxin for eggs and larvae of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *Journal of Parasitology*, Lincoln, v. 75, n. 2, p. 191-194, 1989.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences*. New York: McGraw-Hill, 1960. 481 p.

UENO, H., GUTIERREZ, V.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1983, 176p.

WALLER, P. Towards sustainable nematode parasite control of livestock. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p. 295-309, 1993.