

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Instituto de Biologia



Dissertação

**Capacidade Nematicida de *Bacillus* spp. sobre
Larvas de *Haemonchus contortus***

Marina Cunha Sinott

Pelotas, 2012

MARINA CUNHA SINOTT

**Capacidade Nematicida de *Bacillus* spp. sobre
Larvas de *Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia (área do conhecimento: Parasitologia e Microbiologia).

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S617c

Sinott, Marina Cunha

Capacidade nematicida de *Bacillus* spp. sobre larvas de *Haemonchus* spp / Marina Cunha Sinott. – 61f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Pelotas, 2012. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite.

1.Parasitologia. 2.Biocontrole. 3.Verminose ovina.
4.*Haemonchus contortus*. I.Leite, Fábio Pereira Leivas.
II.Título.

CDD: 636.3

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia e a CAPES pela oportunidade de realizar o mestrado, pela qualidade do ensino e pesquisa e pela bolsa de mestrado;

Ao professor Fábio Pereira Leivas Leite pela dedicação na orientação e pela amizade incondicional;

À minha família pelo apoio, suporte, carinho e amor. Aqui incluo o Lucas, fundamental neste período da minha vida;

Aos demais professores, amigos e colegas do laboratório, nomino a querida Luciana pela amizade e apoio imprescindíveis para a conclusão dessa etapa.

Muito obrigada a todos!

Banca examinadora:

Dra. Daniela Isabel Pereira Brayer - Universidade Federal de Pelotas

Dr. Leandro Quintana Nizoli - Universidade Federal de Pelotas

Dra. Maria Elisabeth Aires Berne - Universidade Federal de Pelotas

“Well begun is half-done”
Mary Poppins

Resumo

SINOTT, Marina Cunha. **Capacidade nematicida de *Bacillus* spp. sobre larvas de *Haemonchus contortus***. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As parasitoses que acometem ovinos são a maior fonte de prejuízos na pecuária. Devido aos tratamentos inadequados dessa enfermidade, os parasitos não se mostram mais suscetíveis aos princípios ativos químicos atuais. Para que ocorram progressos na pecuária ovina, há a necessidade de buscar alternativas que visem reduzir a dependência do sucesso da atividade ao surgimento de uma molécula que apresente carência reduzida, toxicidade seletiva com alto grau de eficácia no combate à infestação parasitária. O presente estudo avaliou a toxicidade de cepas de *Bacillus* spp. para ovos e formas jovens de larvas do tricostrongilídeo *Haemonchus contortus*. Através de testes *in vitro* utilizando uma suspensão esporo-toxina contendo 2×10^8 UFC/mL foi possível verificar que os *Bacillus thuringiensis* var *osvaldocruzi*, *Bacillus circulans*, *B. thuringiensis* var *israelensis*, *B. thuringiensis* var *kurstaki* demonstraram ação larvicida com uma redução de 81; 80; 79 e 76% respectivamente no número de larvas. Nos testes *in vivo*, realizados com *B. circulans* em ovinos, observou-se atividade larvicida similar (80%) ao *in vitro* e esta atividade permaneceu por até sete dias após sua administração. Estes resultados sugerem que os *Bacillus* estudados são uma alternativa promissora no controle de helmintos em ovinos.

Palavras chave: Biocontrole, verminose ovina, *Haemonchus contortus*

Abstract

SINOTT, Marina Cunha. **Capacidade nematicida de *Bacillus* spp. sobre larvas *Haemonchus contortus*** 2012. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Parasitic infections are the major cause of losses in livestock, particularly those involving sheep. Multidrug resistance makes the problem even more worrying because in addition to pathogens, parasites do not appear more susceptible to the active principles. Currently, for the progress to occur in sheep farming, there must be a need to seek alternatives that reduce the dependence on the success of the activity to the emergence of a molecule that makes a lack reduced, selective toxicity, and high degree of effectiveness in combating infestation. This context has led to studies in order to investigate the behavior of strains *Bacillus*spp, when in contact with eggs and young larvae of the forms *tricostrongilídeo Haemonchuscontortus*, which is undoubtedly the most pathogenic for sheep that are raised in the field. It was verified through *in vitro* tests, which *B. circulans* showed an 80.9% reduction in the number of larvae when compared to control groups. This reduction was also observed in the tests made *in vivo*, as well as the residual capacity of the agent through tests performed with *Bacillus* transformed and expressing the GFP gene.

Keywords: Biocontrol, ovinehaemonchosis, *Haemonchus contortus*

Lista de Abreviaturas

μF: microFaraday

μg: micrograma

μg/mL: micrograma/mililitro

μL: microlitro

B.O.D.: demanda biológica de oxigênio

BHI: Brian Heart Infusion/ Infusão de Cérebro e Coração

Bt: *Bacillus thuringiensis*

CFU/mL: Colony Forming Unit/mililitre **UFC/mL:** Unidades Formadoras de Colônias/ mililitro

D.O.: Densidade óptica

DNA: Acido desoxirribonucléico

EDTA: Ethylenediaminetetra acetic acid

EPG: Eggs Per Gram/OPG: Ovos Por Grama

Fig.: Figure/ figura

g: grama

g: gravidade

GFP: Green Fluorescet Protein/ Proteína Verde Fluorescente

h: hora

HCl: ácido clorídrico

IB: Instituto de Biologia

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KDa: KiloDalton

L: Litro

L1: Estádio larval 1

L2: Estádio larval 2

L3: Estádio larval 3

M: Molar

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Min: minuto

mL: mililitro

mM: miliMol Millimolar

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: phenylmethanesulfonylfluoride

PPM: Pesquisa da Pecuária Municipal

rpm: rotações por minuto

SDS: sodium dodecyl sulfate

Sindan: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal

TE: EDTA+Tris

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia/mililitro

UV: ultravioleta

v: volt

var.: variedade

WAAVP: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

Ω: ohm

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 Artigos	15
3.1 Artigo 1	15
Abstract	17
2 Materials and methods	19
2.1 Parasites	19
2.2 <i>Bacillus</i> spp.	19
2.3 Larvicidal and Ovicidal activity assay	20
2.4 Bacteria Larval isolation and feces culture	20
2.4.1 Bacteria Larval isolation	20
2.4.2 Feces culture	21
2.5 SDS-PAGE	21
2.6 Statistical analysis	21
3 Results	21
3.1 Larvicidal effect	21
3.2 Bacteria larval isolation	22
3.3 Feces culture	23
3.4 Bacteria larvicidal phase	23
3.5 SDS-PAGE and profile analyses	23
4 Discussion	23
5 Conclusion	26
6 References	26
7 Article Pictures	29
3.2 Artigo 2	32
Resumo	34
1 Introdução	34
2 Materiais e Métodos	35
2.1 Eletrotransformação de <i>Bacillus circulans</i>	35
2.1.1 Células Competentes	36
2.1.2 Eletroporação	36
2.2 Confirmação da expressão de GFP	36
2.3 Cultivo para esporulação de <i>B. circulans</i> GFP	37
2.4 Avaliação nematocida de <i>Bacillus circulans</i> GFP	37
2.5 Visualização de <i>B. circulans</i> GFP em larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	37
3 Resultados	37
3.1 Eletrotransformação	37
3.3 Presença de <i>B. circulans</i> GFP em larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	38
4 Discussão	38
5 Conclusão	39
6 Referências	39
7 Figuras do Artigo	41

3.3 Artigo 3.....	43
Resumo	45
1 Introdução.....	45
2 Materiais e Métodos	46
2.1. <i>Bacillus circulans</i>	46
2.1.1 Produção de <i>B. circulans</i>	46
2.2 <i>B. circulans</i> GFP.....	47
2.3 Animais	47
2.4 Biocinética de <i>B. circulans</i>	47
2.5 <i>B. circulans</i> GFP em larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	48
2.6 Ação Nematicida	48
3 Resultados	48
3.1 Biocinética de <i>B. circulans</i>	48
3.2 Presença de <i>B. circulans</i> GFP em larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	49
3.3 Ação Nematicida	49
4 Discussão	49
5 Conclusão	51
6 Referências.....	51
7 Figuras do Artigo	53
5 Conclusão	55
6 Referências	56
Anexo	59

1 Introdução

O rebanho de ovinos do Brasil ocupa o 18º lugar em nível mundial e continua a aumentar, o salto maior aconteceu entre 2009 e 2010. De acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) 2011 do IBGE, a população de ovinos cresceu 3,4%, passando de 16,81 milhões para 17,38 milhões de cabeças. Os estados do Rio Grande do Sul e da Bahia lideram a produção brasileira cada um respectivamente com 3.979.258 e 3.125.766 cabeças. A Região Nordeste conta com mais da metade do rebanho brasileiro (9,85 milhões de cabeças), seguido do Sul (4,88 milhões) e Centro-Oeste (1,26 milhão). A ovinocultura tem maior representatividade nos estados da Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. A produção anual alcança 11 milhões de toneladas de lã, principalmente no Rio Grande do Sul, com uma cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários. Ainda, a ovinocultura leiteira no País apresenta potencial para a produção de queijos finos, muito valorizados no mercado (MAPA, 2011).

Para concretizar projeções e tendências na cadeia produtiva ovina são necessários investimentos em sanidade. Este apuro tecnológico se faz necessário neste momento de expansão da atividade. As exigências feitas pelo mercado internacional, que impõem cada vez mais rigor aos produtos de origem animal mostram essa vertente. Como a carne de cordeiro criado em manejo extensivo é uma das mais saudáveis, principalmente quanto à quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e redução de gordura saturada tem conquistado mais adeptos (MAPA, 2011). Desta forma, estratégias de conquistas de novos mercados poderão impulsionar o consumo mundial desse tipo de carne.

As parasitoses ocupam um lugar de destaque dentre os fatores que interferem no desenvolvimento da pecuária (VÁZQUEZ, 2004). Os prejuízos causados por estas enfermidades estão relacionados tanto ao retardo na produção, custos com tratamentos e em casos extremos com a morte dos animais (PERRY & RANDOLPH, 1999). Dos parasitas causadores de prejuízos econômicos na ovinocultura, os nematódeos gastrintestinais são os que se destacam como de maior importância (BUENO et al., 2002). Entre as principais espécies podemos citar as seguintes: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides* spp.

Cooperia curticei e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 1997; AMARANTE et al., 2004). Destas espécies, *H. contortus* é a principal causadora de prejuízos, pois além de sua elevada prevalência nos rebanhos ovinos, apresenta alta patogenicidade (VÁZQUEZ, 2004). Sendo um parasito hematófago, animais portadores de carga parasitária elevada podem apresentar anemia severa que se manifesta por palidez de mucosa e edema frequentemente observado na região submandibular (SANTA ROSA, 1996). Uma fêmea é capaz de ingerir diariamente 0,05mL de sangue do seu hospedeiro, o que numa infecção considerada moderada (2000 adultos), 5 a 7% do volume sanguíneo do ovino é consumido diariamente (ANDERSON, 1982). *T. colubriformis*, *C. curticei* e *Strongyloides* spp. são parasitas do intestino delgado, e em infecções maciças causam enterite severa (HOLMES, 1985). Como as infestações destes nematódeos são em geral mistas, ocorre um somatório dos efeitos patogênicos de cada uma das espécies que parasitam os animais. De acordo com o Sindan (2009), os gastos com antiparasitários atingiram R\$ 960.983.211,00 e com antimicrobianos (muitas vezes utilizados para debelar infecções secundárias às parasitárias) foi de R\$ 633.417.717,00.

Os programas de controle parasitários eficientes estão baseados em informações sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos e uso de anti-helmínticos (VIEIRA; CALVALCANTE, 1997, STROMBERG; AVERBECK, 1999). Entretanto, na grande maioria dos estabelecimentos rurais, o controle de nematódeos gastrintestinais de ruminantes se faz exclusivamente por utilização de anti-helmínticos, os quais conduzem a problemas, tais como: elevação do custo de produção, desenvolvimento de resistência, resíduos na carne para consumo humano e poluição ambiental (BLUTHGEN; HEESCHEN, 1997). Uma possível alternativa a essa série de problemas que o tratamento convencional de nematódeos gastrintestinais traz é a utilização de controle biológico por bactérias nematopatogênicas.

Várias espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas como bioinseticidas em alternativa ao controle de pragas urbanas e agrícolas (RODRIGUES et al., 1988, BRAVO et al., 2011). *Bacillus thuringiensis* têm sido amplamente utilizados comercialmente como alternativa a substâncias químicas no controle de nematódeos de importância agrícola (SCHNEPF et al., 1998). A ação destas bactérias se deve a

presença de estruturas glicoprotéicas sólidas denominadas de cristais δ -endotoxina, cristais de toxina ou pró-toxinas que são sintetizadas durante a esporulação e de localizadas ao longo do esporo ou dentro do esporângio (REGIS et al., 2001). Entretanto, existe pouca informação sobre a ação nematicida das toxinas produzidas por estes *Bacillus* em nematódeos de importância veterinária. Trabalhos pioneiros nesta área de Ciordia e Bizzel (1961) demonstraram que esporos de *Bacillus thuringiensis* adicionados a fezes de bovinos, diminuía a concentração de larvas de terceiro estágio de *Cooperia punctata*, *Cooperia oncophora*, e *Ostertagia ostertagi*. Bottjer et al., (1985) bem como Bone (1986, 1988) demonstraram que ovos e larvas de zooparasitas (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus colubriformis*) e nematódeos de vida livre (*Caenorhabditis briggsae*) eram suscetíveis à ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Dados promissores preliminares, com relação ao controle de *Haemonchus contortus* em ovinos, foram reportados pelo nosso grupo de pesquisa (SINOTT et al., 2008), fazendo necessário buscar maior esclarecimento a cerca do uso de *Bacillus* spp. frente à formas jovens de tricostrongilídeos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito nematicida de bactérias do gênero *Bacillus* no controle biológico de *Haemonchus contortus*.

2.2 Objetivos específicos

- a) selecionar amostras de *Bacillus* spp. com potencial nematicida;
- b) avaliar *in vitro* a ação nematicida das cepas de *Bacillus* spp.;
- c) avaliar *in vivo* a ação nematicida das cepas que apresentaram resultados positivos nos testes *in vitro*, tendo como modelo experimental ovinos;
- d) transformar *Bacillus circulans*, com o plasmídeo contendo o gene da *gfp*.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

***Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae
in sheep fecal cultures**

Lista de Figuras

Figura 1A – Larvicidal activity.....	29
Figura 1B – Larvicidal activity of feces inoculated with the following different concentrations of bacteria.....	29
Figura 2A – Effect of <i>Bacillus</i> growth on larvicidal activity of feces inoculated with and without antibiotic.....	30
Figura 2B – Bacterial growth in sterile feces at zero, twenty-four hours and seven days after inoculation.....	30
Figura 3 – SDS-PAGE.....	31

***Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae
in sheep fecal cultures**

Marina Cunha Sinott, Nilton Azevedo Cunha Filho, Luciana Laitano Dias de Castro, Lucas Bigolin Lorenzon, Natália Berne Pinto, Gabriela de Almeida Capella, Fábio Pereira Leivas Leite

Submetido à revista Experimental Parasitology

Abstract

The gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* is a major productivity constraint in sheep. In this study, the nematicidal effects of *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bt.* var. *osvaldocruzi*, *Bt.* var. *morrisoni*, and *Bt.* var. *kurstaki* were assessed in free-living larval stages of *Haemonchus contortus*. A spore-crystal suspension containing approximately 2×10^8 UFC/mL of each strain was added to sheep feces that were naturally infected with *Haemonchus contortus* eggs, and the presence of larvae was then evaluated. We observed a significant ($p > 0.05$) reduction in larval development when using *B. circulans*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *Bt.* var. *osvaldocruzi* and *Bt.* var. *kurstaki*, and these effects were proportional with the amount of bacteria added to the feces. However, no effect was observed when *Bt.* var. *morrisoni* or *B. cereus* was added. These observations suggest that these bacteria might be effective as nematicides and may allow for the development of integrated biological control of zooparasitic nematodes.

Keywords: Biocontrol, nematodes, *Haemonchus contortus*, *Bacillus* spp.

1 Introduction

Parasites are one of the most important factors that can interfere with animal production. The economic impact of parasitic infection is the result of the cost of veterinary services, delays in animal growth and even death (BUENO et al., 2002). Among all parasites, helminthes represent the most important cause of economic loss in the sheep industry, and the nematode *Haemonchus contortus* is mainly responsible for this event (BUENO et al., 2002). Over the years, sheep nematode parasites were effectively controlled by the use of antihelmintics, but frequent and indiscriminate use has led to the development of resistant worm populations (CHANDRAWATHANI et al., 1999; RANGEL et al., 2005). Antihelmintic resistance has now reached a high level such that virtually all available on the market, threatening the endurance of the sheep industry worldwide (VERÍSSIMO et al., 2002; TAYLOR et al., 2002). This situation has given rise to the urgent need for the investigation of alternative methods of worm control. Studies have utilized pasture management systems (CHANDRAWATHANI, 1997), introduced breeds that are more resistant to helminthes (Ibrahim, 1996), and most recently, investigated the use of biological control agents such as *Bacillus* spp. (SAGÜÉS et al., 2011; HERNANDEZ-LINARES et al., 2008).

There is very little information about the microbial control of zooparasitic nematodes; however, Ciordia and Bizzell (1961), and more recently Kotze et al. (2005) and O`Grady et al. (2007), have reported the effect of *Bacillus* preparation on nematodes, suggesting that some species might have nematicidal activity. *Bacillus* species produces a large variety of toxic proteins that are active against different parasites. This lethal activity results mainly from the production of delta endotoxins, which are synthesized during sporulation; however, a series of toxins that are produced during vegetative growth also show lethal activity (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 1997). The production of other factors that might contribute to the toxic effects observed have been described, such as proteases, chitinases, exotoxins, and lipases (LÖVGREN et al., 1990; ESTRUCH et al., 1996). Some bacilli can produce all types of these factors, whereas others produce only the delta or vegetative toxin, or neither. The present study aimed to address the potential use of *Bacillus* species as a biocontrol agent for the ruminant nematode *H. contortus*.

2 Materials and methods

2.1 Parasites

Feces from *H. contortus*-infected male lambs (Corriedale, approximately ~15 months) were collected directly from the rectum. The number of *H. contortum* eggs (EPG) was determined using the Gordon and Whitlock (1939) technique, and only samples that contained more than 1000 EPG were used. It was estimated that 80-90% of eggs incubated under favorable conditions would hatch, resulting in the generation of approximately 850 larvae from the original 1000 EPG; this number was confirmed during the experiments. To obtain larvae, coproculture was performed using the Roberts and O'Sullivan (1950) technique with 4 grams of fecal samples. Collection of eggs from donor sheep was conducted according to World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines (COLES et al., 1992). Fresh eggs were washed with distilled water and were then mixed with sterile feces (autoclaved for 30 min). The Baermann (CORT et al., 1922) technique was used to obtain *H. contortus* L2 larvae. Ethical approval for the use of sheep to provide feces for *in vitro* experiments was obtained from the Federal University of Pelotas Animal Ethic Committee.

2.2 *Bacillus* spp.

Bacteria were provided by the Federal University of Pelotas Department of Microbiology and Parasitology collection. The following strains were used: *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *osvaldocruzi*, *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni*, and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Bacteria were cultured in 1L Erlenmeyer containing 200 mL NYSM (YOUSEN, 1984) medium and were grown at 30° C with rotary shaking at 150 rpm for 72 h. After this period, the purity, sporulation and colony forming units (CFU)/mL for the cultures were checked. Then, the cultures were centrifuged at 8,500 g for 20 min at 4° C. The pellets were washed two times in saline to remove cell debris and secretory products and were then suspended in 20 mL saline (pH 7.0) and kept at 4° C until use. The supernatants from the centrifuged cultures were kept at 4° C and were tested for larvicidal activities.

2.3 Larvicidal and Ovicidal activity assay

Containers with 4 grams of feces were inoculated with 2 mL of a spore-crystal suspension (2×10^8 CFU/mL) for each *Bacillus* in study, and the control group was treated with saline. The containers were incubated for 7 days at 28° C (80% humidity). Four containers for each treatment were used, and the experiment was repeated 3 times. Larvae (L3) were harvested on the 7th day and counted under a microscope at 40 x magnification (Olympus, Cx21 model). The L3 larvicidal effect was determined by the following formula: $R = 100(1 - T/C)$, where R is the reduction (larvicidal effect), C is the number of larva in the control group, and T is the number of larva in the bacteria treated group (COLES et al., 1992). Nematicidal bacteria concentration effect was tested by diluting the spore-crystal suspension in saline, then inoculating the feces as described above. For ovicidal experiments, fresh eggs were mixed with autoclaved feces, inoculated with spore-crystal suspension (as mentioned above), and incubated for ~ 30 hours at 28° C (80% humidity). The number of L2 larvae was used to evaluate the ovicidal effect using the same formula described above. To determine which phase (spore or vegetative) or if a secreted toxin was responsible for the observed lethality, we performed the larvicidal assay described above by adding gentamycin (10 µg/gr, previously shown to be effective on all *Bacillus* strains) to inhibit the vegetative stage.

2.4 Bacteria Larval isolation and feces culture

2.4.1 Bacteria Larval isolation

L2 larvae were used in this assay because we are able to obtain larvae with ingested bacteria in 30 hours; when using L3 larvae, the numbers were reduced due to the bacteria larvicidal effect. To isolate bacteria from infected larvae, we performed coproculture as mentioned above for the ovicidal effect. L2 larvae were isolated and washed 3 times with sodium hypochlorite, then were washed 3 times with distilled water and ground. Then, the ground material was spread on NYSM agar plates, incubated at 30° C for 24 hrs, and the plates were then characterized.

2.4.2 Feces culture

Feces assay culture was performed using sterile (autoclaved for 30 min) sheep feces inoculated with a bacteria spore suspension. Four grams of sterile feces were inoculated with a spore suspension at $\sim 1 \times 10^3$ at 30°C for 7 days; following the first 24 hours of culture and at the end of 7 days, samples were taken, and then growth was evaluated by CFU counting on NYSM agar plates.

2.5 SDS–PAGE

The protein content of bacterial suspensions was measured by the Bradford (1976) method using a Bradford protein assay kit (Bioworld). Aliquots of spore-crystal suspension (20 μ L) from each *Bacillus* sample were boiled in buffer for 5 min and then were submitted to electrophoresis using sodium dodecyl sulfate (SDS)–12% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were visualized after staining with Coomassie brilliant blue (Coomassie G-250, Sigma), and band size comparing with standard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #161-0374EDU, Bio-Rad).

2.6 Statistical analysis

The percentage of total larval count reductions was determined by the method described by Coles et al. (1992), which uses the following formula: percentage reduction = $100 \times (1 - T/C)$, where *T* and *C* are the geometric means in the treated and control groups, respectively, on day 7 post-treatment. Then, total larval counts were analyzed by one-way analysis of variance.

3 Results

3.1 Larvicidal effect

All strains tested showed a larvicidal effect ($p < 0.05$) when mixed with feces infected with *H. contortus* eggs, with the exception of *Bacillus thuringiensis* var.

morrisoni and *Bacillus cereus*. The *Bt. var. osvaldocruzi* showed the highest larvicidal effect, reaching a significant mean larvae reduction of 80,53% when compared to the control group; however, this strain was not statistically significantly different from other *Bacillus* strains that demonstrated larvicidal effect. *B. circulans* showed a significant larval reduction of 86.63%, *Bt. var. kurstaki* had a reduction of 79.9%, and *Bt. var. israelensis* had a reduction of 81.55% (Fig. 1A). The average larvae number that we obtained in the control group feces during this experiment was 3450 larvae. Thus, the absolute mean reduction for *Bt. var. osvaldocruzi*, *B. circulans*, *Bt. var. kurstaki*, and *Bt. var. israelensis* was 2797, 2791, 2756, and 2655, respectively.

The larvicidal effect was proportional to the amount of bacteria added to the feces. Using a *B. circulans* suspension with $\sim 2 \times 10^8$ CFU/mL, we observed 86.63% larvicidal effect, and this effect was diminished to 62.8% and 23.9% when the bacterial concentration was reduced to 10^7 CFU and 10^6 CFU/mL, respectively. The larvicidal effects when the suspensions were diluted to obtain 10^8 CFU, 10^7 CFU and 10^6 CFU/mL, respectively, were 81.55%, 64.2%, and 19.2% for feces treated with *Bt. var. israelensis*, 80.53%, 65.2%, and 18.4% for feces treated with *Bt. var. osvaldocruzi*, and 79.9%, 48.5%, and 15.6% for feces treated with *Bt. var. kurstaki* (Fig. 1B). There was no statistically significant difference in the numbers of larvae when incubated with the supernatant cultures from all *Bacillus* strains tested compared with the saline control group (data not shown). Additionally, there was no difference in egg eclosion (by counting the number of larvae) when compared with eggs treated with the *Bacillus* crystal-spore suspension or culture supernatant with the saline control group (data not shown).

3.2 Bacteria larval isolation

We were able to isolate all strains from L2 larvae inoculated with $\sim 2 \times 10^8$ CFU in 4 g of sterile feces containing ~ 1000 *H. contortus* eggs, confirming that the larvae ingested bacterial spores during development (data not shown).

3.3 Feces culture

All *Bacillus* strains were able germinate, grow and sporulate in feces. *B. circulans* increased in number from 1×10^3 to 1.2×10^6 CFU/gr, *Bt. var. israelensis* increased to $6.8 \times 10^{6.0}$, *Bt. var. osvaldocruzi* increased to $4.2 \times 10^{6.0}$ and *Bt. var. kurstaki* increased to $3.2 \times 10^{6.0}$ CFU/gr after 24 hours of culture (Fig. 3). The CFU count at day seven of the same culture for *B. circulans* was $2.1 \times 10^{8.0}$, and *Bt. var. israelensis* increased to $8.4 \times 10^{8.0}$, *Bt. var. osvaldocruzi* increased to $6 \times 10^{8.0}$, and *Bt. var. kurstaki* increased to $3.8 \times 10^{8.0}$ CFU/gr.

3.4 Bacteria larvicidal phase

A reduced larvicidal effect was observed when antibiotic was added to the feces culture with *Bt. var. osvaldocruzi* (47.5%), *Bt. var. kurstaki* (33.2%); this effect was less pronounced in cultures with *B. circulans* (19.9%) and *Bt. var. israelensis* (14.1%), Fig. 2A.

3.5 SDS-PAGE and profile analyses

The SDS-PAGE of spore-crystal suspensions for the studied strains is shown in Fig. 3. Strains *B. thuringiensis var. israelensis*, *var. osvaldocruzi*, *var. kurstaki*, and *B. cereus* had a similar protein profile, with proteins bands from 10 to 90 kDa. In contrast, *B. thuringiensis var. morrisoni* and *B. circulans* did not display the same band profile.

4 Discussion

This study demonstrated the *in vitro* nematicidal effects of *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, *Bacillus thuringiensis var. osvaldocruzi*, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, and *Bacillus circulans* against *Haemonchus contortus* larvae, suggesting their potential use as biocontrols for controlling the larval stages of

parasitic nematodes on pasture. The larvicidal effect was similar among the strains studied, with the exceptions of *Bacillus thuringiensis* var *morrisoni* and *Bacillus cereus*.

It is well known that the anti-nematode actions of *Bacillus* toxins are mediated subsequent to their ingestion and solubilization in the gut, followed by proteolytic processing by midgut proteases, binding to specific receptors, and then insertion into the gut membrane and forming pores (SCHNEPF et al., 1998). Lee et al. (2002) reported the recovery of *Bacillus thuringiensis* from the feces of a number of herbivorous mammals and that the recovered bacteria consisted of spores present in the consumed feed, suggesting that ingested spores-crystals would most likely be delivered intact to the feces of a feeding animal. In this experiment, we observed that the inoculation of feces with a spore-crystal suspension was sufficient to induce a larvicidal effect and that this effect was proportional to the amount of spore-crystal added to the feces (Fig. 1). We did not observe any statistically significant difference in the larvae number in the feces incubated with supernatant, heat spore-crystal suspension, compared with the saline control group.

Given the instability of the toxins under environmental conditions (BETZ et al., 2000; KOTZE et al., 2005; AMMONS et al., 2009), the delivery of spore-crystals associated with the feces may be a more feasible option than the delivery of the toxin itself. Feces can provide a favorable environment for bacterial growth, such as oxygen, nutrients, humidity, and temperature. Spores delivered to feces would have conditions to germinate, progress through a vegetative phase, sporulate and produce toxins. We observed that sheep feces (sterile or not) were able to support spore germination, growth and sporulation of the bacterial strains used in this study (Fig. 2B). After adding gentamycin to the feces to inhibit the ability of geminated spores to go to the vegetated phase, we observed that ingestion of the amount of pre-formed toxin added to the feces as a spore-crystal suspension was sufficient for the larvicidal effect. However, when the bacteria were able to grow in the feces (without antibiotic), the larvicidal effect was enhanced. This growth effect in the feces, from spore to vegetative and toxin production, was similar for *B. circulans* and *Bt. var. israelensis* but was more pronounced for *Bt. var. kurstaki* and *Bt. var. oswaldocruzi*. For *Bt. var. oswaldocruzi*, the growth in the feces was extremely important for its lethal effect (Fig. 2A); this observation was surprising because the lethal effect of this strain of *Bacillus* was reduced in feces treated with antibiotic, and its

supernatant had no larvicidal effect. One may speculate that other toxins, such as VIP, proteases, chitinases, exotoxins, and lipases (LÖVGREN et al., 1990; ESTRUCH et al., 1996; BRAVO, 1997), might be larvicidal or that multiple lethal factors may act in synergy or result in a nematicidal outcome for *haemochus* larva; however, this hypothesis needs to be tested.

The *Bacillus* strains used in this experiment showed similar band patterns when electrophoresed on 12 % SDS-PAGE, where each strain produced predominant bands 10-90 kDa. This band pattern was not observed for *B. cereus* or *Bt. var. morrissoni*, both of which did not show any nematicide effect. Crystal, cytotoxic, chitinase, VIP, and lipases can range from 10 to 90 kDa, making it difficult to understand which compound might be responsible for the lethal effects observed. However, Koetz et al. (2005) reported the presence of Cry 5 A, B and 13A toxins from *B. var. thuringiensis* with nematicidal effects, which had molecular weights between 20 and 90 kDa. Recently, Vázquez-Pineda et al. (2010) reported two toxins with molecular weights of approximately 25 and 70 kDa that had lethal activity for *H. contortus* larvae. Thus, we can speculate that the toxins responsible for the lethal effects observed in our study might be between 10 and 90 kDa.

The *B. circulans* data are intriguing because this *Bacillus* strain is not crystallogenic; however, these data suggest that the spores of this strain need to be ingested by the larvae for its lethal effect. Similar effects were observed by Darriet and Hourgard (2002), who reported that the toxicity of *B. circulans* for mosquito larvae was associated with spores and not with chitinase or exotoxin. Additionally, the supernatant or heated spore-crystal suspension had no larvicidal effect, which is in agreement with the observation that the larvicidal effect is associated with the spore-crystal suspension.

The data obtained in this study suggest that one or more toxins could be exercising the anthelmintic effect. We understand that this is a limitation of our work because we did not identify which toxin or toxins may be responsible for the nematicidal effect on *haemonchus* larvae. However, data collected in this study suggest that these bacteria are promising tools for nematicide and might be used as part of an integrated biological control program for zooparasitic nematodes.

5 Conclusion

The control of nematode parasites is a major constrain to the productivity and an important cause of mortality in sheep herds. The resistance to most anthelmintics on the market has reached such a level that their use is ineffective and is threatening sheep industries worldwide. Thus, the data obtained in this study suggest that biological control using *Bacillus* spp. might be a viable alternative to minimize the damage to sheep herds caused by nematodes.

6 References

1. Ammons, D.R., Reyna A., Granados, J. C., Samlal M. S., Rampersad, J. N. , 2009. An investigation of *Bacillus thuringiensis* in rectal-collected fecal samples of cows. *Curr. Microbiol.* 59, 532-536.
2. Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L., 2000. Safety an Advantage of *Bacillus thuringiensis*-protected plants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32,156-173.
3. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
4. Bravo, A., 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179, 2793-2801.
5. Bueno, M.S., Cunha, E.A., Verissimo, C.J., Santos, L.E., Lara, M.A.C., Oliveira, S.M., Sposito Filha, E., Reboucas, M.M., 2002. Infeccion por nematodos em razas de ovelhas carnicas criadas intensivamente em la region del sudeste del Brasil. *Arch. Zootec.* 15, 273-280.
6. Ciordia, H., Bizzel, W. E., 1961. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER on the development of the free-living stages of some cattle nematodes. *J. Parasitol.* 47, (abstract) 41.
7. Chandrawathani, P., 1997. Control of gastrointestinal helminths in small ruminants - the Malaysian perspective. In: *Biological Control of Gastro-intestinal Nematodes of Ruminants using Predacious Fungi*. FAO Animal Production and Health Paper No. 141, pp. 78–81.

8. Chandrawathani P., Adnan M., Waller P.J., 1999. Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 82, 305–310.
9. Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–43.
10. Cort, W.W., Ackert, J.E., Augustine, D. L., Payne, F. K., 1922. Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. *Am. J. Hyg.* 2, n. 1, p. 1-16.
11. Darriet, F., Hourgard, J-M., 2002. An isolate of *Bacillus circulans* toxic to mosquito larvae. *J. Amer. Mosquito Cont. Ass.* 18, 65-67.
12. Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullinis, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., Koziel, M. G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5389–5394.
13. Hernández-Linares, I. H., López-Arellano, M. E, Mendoza-de-Gives, P., Liébano-Hernández, E., Bravo-de-la-Parra, A., 2008. Lethal Activity of Two *Bacillus thuringiensis* Strains against *Haemonchus contortus* Histotropic Larvae. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149, 164–166.
14. Ibrahim, C.E., 1996. Priority in small ruminant development in Malaysia. In: Le Jambre, L.F., Knox, M.R., Sustainable Parasite Control in Small Ruminants, Proceedings No. 74. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), pp. 86–91.
15. Kotze, A.C., O'Grady, J., Gough, J.M., Pearson, R., Bagnal, N.H., 2005. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.* 35, 1013–1022.
16. Lee, D-H., Machi, J., Ohba, M., 2002. High frequency of *Bacillus thuringiensis* in feces of herbivorous animals maintained in a zoological garden in Japan *Appl. Entomol. Zool.* 37, 509–516.
17. Lövgren, A., Shang M-Y., Engström A., Dalhammar G., Lande'n, R., 1990. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 4, 2137–2146.

18. O'Grady, J., Akhurst, R.J, Kotze A.C., 2007. The requirement for early exposure of *Haemonchus contortus* larvae to *Bacillus thuringiensis* for effective inhibition of larval development. *Vet. Parasitol.* 150, 97-103.
19. Rangel, V. B., Leite, R. C., Oliveira, Santos Jr, P. R., Akzo, E. J., 2005. Resistance of *Cooperia* spp. and *Haemonchus* spp. to avermectins in beef cattle. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, n.2, p.186-190.
20. Sagüés, M. F., Fusé, L. A., Fernández, A. S., Iglesias, L. E., Moreno, F. C., Saumell, C. A., 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* 109, 707–713.
21. Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J. van; Lereclus D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R.; Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
22. Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L., 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 103, p.183-194.
23. Vázquez-Pineda, A.; Yáñez-Pérez, G. N.; López-Arellano, M. E.; Mendoza-de-Gives, P.; Liébano-Hernández, E.; Bravo-de-la-Parra, A., 2010. Biochemical Characterization of Two Purified Proteins of the IB-16 *Bacillus thuringiensis* Strains and Their Toxicity Against the Sheep Nematode *Haemonchus contortus* *In vitro*. *Transboundary Emerging Dis.* 57, 111–114.
24. Veríssimo, C.J., Oliveira S.M., Spósito Filha, E. Eficácia de alguns anti-helmínticos em uma ovinocultura no estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais.* Rio de Janeiro, 2002.
25. Yousten, A. A., 1984. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Process.* 3, 315–343.
26. Yu, C-G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G., Estruch, J.J., 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 532-536.

7 Article Pictures

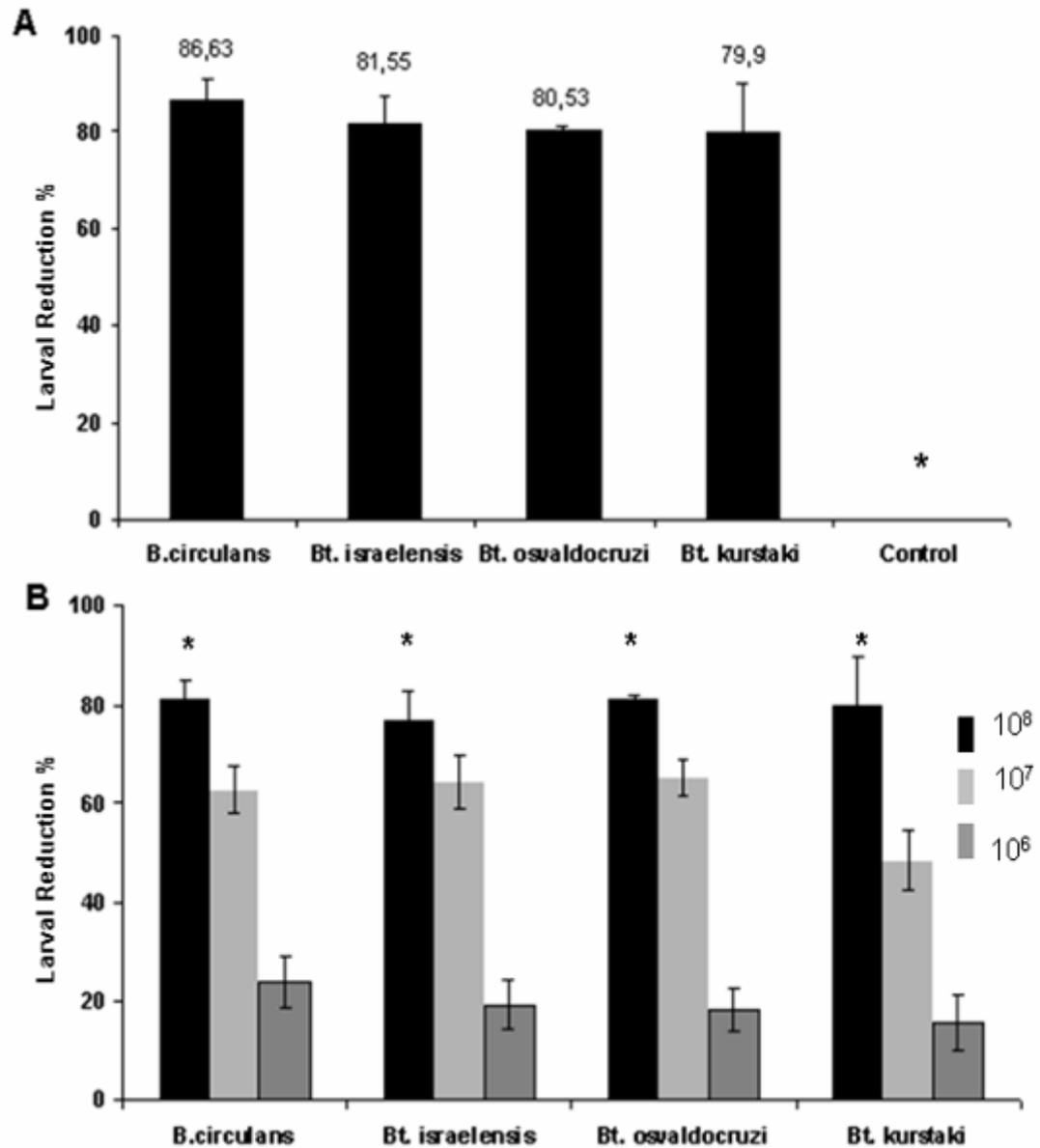


Figura 1 – Larvicidal activity. (A) Data represent the mean (+/-SEM) reduction in larvae (%) present in feces inoculated with the spore-crystal suspension ($\sim 2 \times 10^8$ CFU/mL), (*) means $p < 0.05$ comparing control with the treatments. (B) Larvicidal activity of feces inoculated with the following different concentrations of bacteria: 10^8 , 10^7 , and 10^6 CFU/mL. Data represent the mean (+/-SEM) % larvae reduction, (*) means $p < 0.05$ comparing spore-crystal concentration.

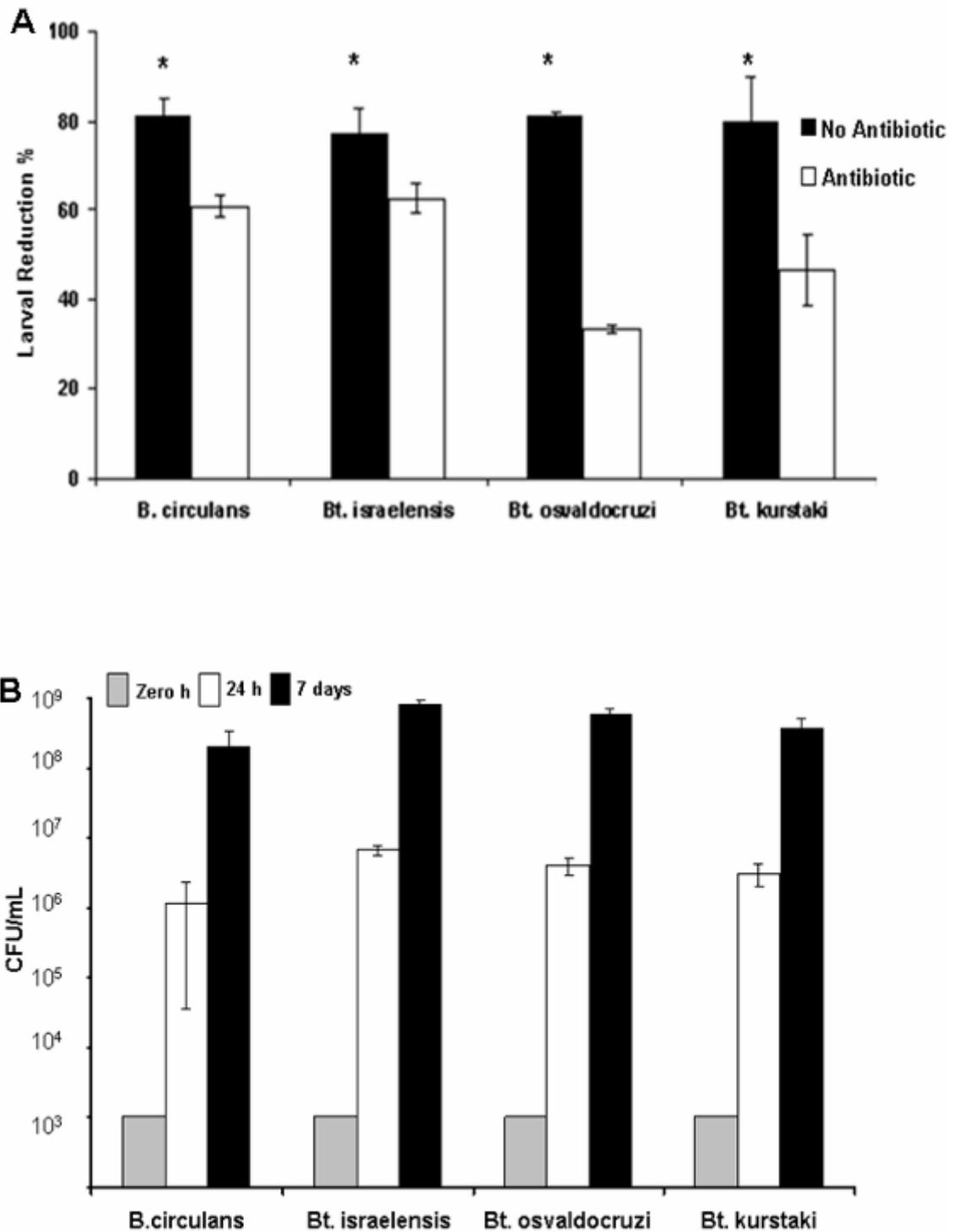


Figure 2 – (A) Effect of *Bacillus* growth on larvicidal activity of feces inoculated with (gentamycin, 10 μ g/mL) and without antibiotic, (*) means $p < 0.05$ comparing the treatments. (B) Data represents the mean (+/-SEM) bacterial growth in sterile feces at zero, twenty-four hours and seven days after inoculation. Data (three independent experiments in triplicate) are expressed as CFU/mL titrated in NYSM agar cultured at 30 $^{\circ}$ C.

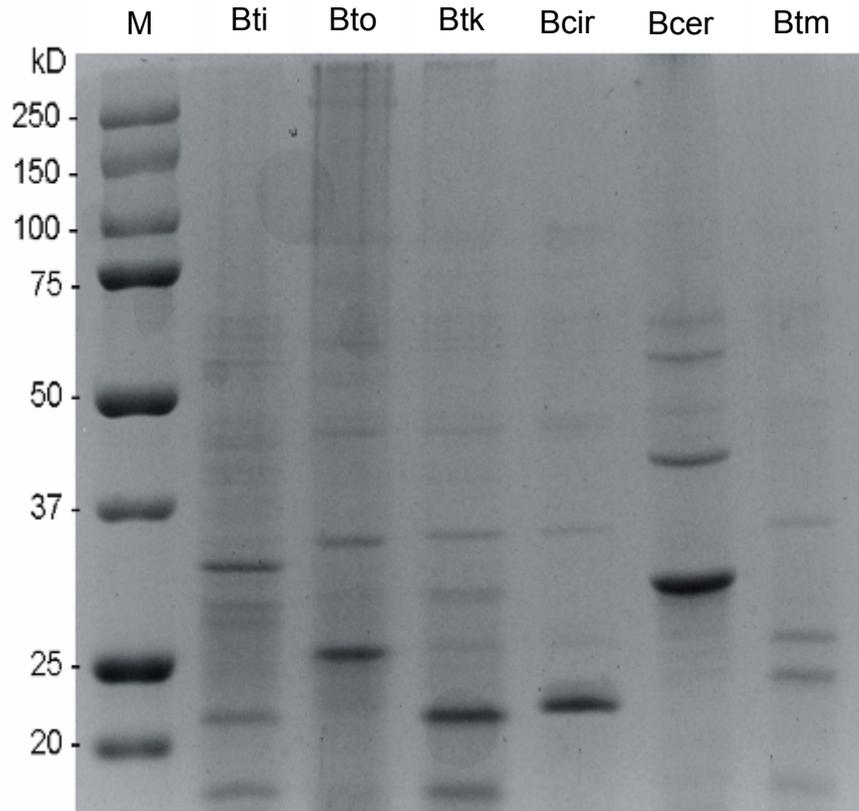


Figure 3 – SDS-PAGE electrophoresis (12%) of spore-crystal proteins from different *Bacillus* strains. Bti (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*), Bto (*Bacillus thuringiensis* var. *osvaldocruzi*), Btk (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), Bcir (*Bacillus circulans*), Bcer (*Bacillus cereus*), Btm (*Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni*).

3.2 Artigo 2

**Transformação de *Bacillus circulans* com GFP:
uma ferramenta para o estudo das interações patógeno-hospedeiro**

Lista de Figuras

Figura 1 – Mapa Físico do plasmídeo portadores do gene <i>gfpmut3a</i>	41
Figura 2 – Percentual de redução do número de larvas <i>Haemonchus</i> spp.....	42
Figura 3A – Larva de <i>Haemonchus</i> spp. contaminada com <i>Bacillus circulans</i>	42
Figura 3B – <i>Bacillus circulans</i> transformado.....	42

**Transformação de *Bacillus circulans* com GFP:
uma ferramenta para o estudo das interações patógeno-hospedeiro**

Marina Cunha Sinott, Marlene Teixeira De-Souza, Diogo Lott, Fábio Pereira Leivas Leite

Artigo a ser submetido à revista Canadian Journal of Microbiology

Resumo

A GFP (*Green Fluorescent Protein*), bem como qualquer outro mecanismo de bioluminescência está presente na natureza com a finalidade de exercer o papel de comunicação entre os organismos que a expressam. Entretanto, o gene produtor dessa proteína torna-se uma ferramenta importante no estudo das interações parasito e agente no controle biológico. O objetivo do estudo foi a transformação por eletroporação de *Bacillus circulans*, com um plasmídeo contendo o gene da *gfp* (*gfpmut3A*). O transformante obtido manteve sua toxicidade frente a nematódeos e permitiu a visualização da bactéria em larvas de *Haemonchus contortus* sob microscopia de fluorescência. *B. circulans* GFP é uma promissora ferramenta para o estudo do comportamento desse agente frente às formas jovens de *Haemonchus contortus*, bem como avaliar a ação da bactéria nos ovinos.

Palavras-chave: GFP, controle biológico, *Bacillus circulans*

1 Introdução

A bioluminescência é o processo de emissão de luz fria e visível por organismos vivos com função de comunicação biológica (HERRING, 1987, RUBY & MCFALL-NGAI, 1992).

A proteína fluorescente verde (GFP) é uma macromolécula que, mediante irradiação com luz azul, produz uma intensa fluorescência verde (SHIMOMURA, 1962). A capacidade de expressão da GFP, tanto em organismos eucariotos como em procariotos foi verificada através de experimentos com células de *Escherichia*

coli (CHALFIE, 1994) e com o díptero *Drosophila melanogaster* (WANG e HAZELRIGG 1994). Devido às suas propriedades fluorescentes, o gene da *gfp* tornou-se um importante marcador de expressão gênica em células e tecidos. Com o auxílio desta proteína pode-se investigar o comportamento de células e marcar tecidos, embriões e células tronco, o que a tornou o gene repórter mais utilizado em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas (PARENTE et al., 2008).

As nematodioses gastrintestinais representam uma das maiores causas dos prejuízos que acometem a criação ovina (BROOKER, 2010). Dentre esses parasitos, o que tem maior importância é o tricostrongilídeo *Haemonchus contortus* que se destaca por ser hematófago, levando a debilidade aos animais com altos índices de morbidade e mortalidade (URQUHART et al., 1996; BROOKER, 2010).

Várias espécies de *Bacillus* spp. têm sido utilizadas como biocontrole em pragas urbanas e agrícolas (RODRIGUES et al., 1988). Diferentes estudos demonstraram atividade tóxica desses micro-organismos sendo capazes de reduzir o número de tricostrongilídeos de ruminantes (LINARES et al., 2008, BONE, 1986, 1988, BOTTJER et al., 1985, CIORDIA e BIZZEL, 1961).

O objetivo do estudo foi a transformação de *Bacillus circulans* com plasmídeo contendo o gene da *gfp* e *cat* para ser utilizado como ferramenta nos estudos de sua atividade nematicida.

2 Materiais e Métodos

2.1 Eletrotransformação de *Bacillus circulans*

A curva de crescimento de *B. circulans* foi estabelecida a partir de uma densidade óptica (D.O.) inicial de 0,01 foram inoculados (com uma alçada de uma colônia isolada de *B. circulans*) três frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de BHI caldo (Brian Heart Infusion, Difco) e incubados em agitador orbital a 28°C e 200rpm por 12 horas. A curva foi acompanhado por espectrofotometria (Ultrospec 1000- Amersham Pharmacia Biothec, com o comprimento de onda em A₆₀₀) através amostras coletadas a cada hora incubação e por semeadura em placas contendo BHA (Brian Heart Infusion Agar, Difco) através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), segundo Parente et al. (2008).

2.1.1 Células Competentes

Na terceira hora de cultivo, quando *Bacillus circulans* se encontra na fase exponencial de crescimento, as células foram recuperadas para a transformação (PARENTE et al., 2008). O cultivo foi centrifugado e lavado por quatro vezes consecutivas com solução de sorbitol (0,5M), manitol (0,5M) e glicerol 10%, recuperado com solução de manitol e sorbitol a 1M, seguindo protocolo descrito por Parente et al., 2008. Uma alíquota dessa amostra foi semeada em BHA para observação da viabilidade e pureza das células preparadas.

2.1.2 Eletroporação

Cubetas (0,4cm) de eletroporação (Bio-Rad, USA) previamente resfriadas a 4°C, foram adicionados 250µL das células competentes (10^6 UFC/mL) recuperadas e quantidade apropriada de DNA (1µg) (plasmídeo pAD43-25gfpmut3a)(Fig.1), diluído em Tris HCl 10mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0 (TE). As amostras foram eletroporadas no sistema BioRad Gene Pulser modelo II, nas seguintes condições: 25µF, 2,5v, 1000Ω, em apenas um pulso. Após, as amostras foram diluídas em BHI e todo o conteúdo do tubo tipo eppendorf (1,5mL) foi semeado em meio seletivo (BHI agar com cloranfenicol 10µg/mL). Como controle uma alíquota foi semeada em meio sem antibiótico para certificar-se da viabilidade e pureza das células após a eletroporação. Em seguida, as placas eram incubadas na estufa a 28°C por 48h.

2.2 Confirmação da expressão de GFP

Das colônias transformadas, oito foram escolhidas aleatoriamente, repicadas em placas de BHI contendo 10µg de cloranfenicol/mL, incubadas na estufa a 28°C por 48h e confirmada a expressão da GFP através do escaneamento no sistema Typhoon (Amershan Biosciences- Molecular Dynamics, Reino Unido) e visualização das células bacterianas em microscópio de fluorescência.

2.3 Cultivo para esporulação de *B. circulans* GFP

As colônias de amostras transformadas foram repicadas em meio próprio para esporulação (ANEXO) líquido, adicionado de 0,3% de glicose e 10µg de cloranfenicol/mL e incubados no agitador orbital durante 48 horas para estimular a esporulação.

2.4 Avaliação nematicida de *Bacillus circulans* GFP

Coproculturas segundo ROBERTS e O'SULLIVAN (1950) em 4g fezes contendo ~1000 OPG foram inoculadas com 2×10^8 UFC/mL de *B. circulans* transformado e esporulado. Como controles foram utilizados água e o *B. circulans* não transformado (2×10^8 UFC/mL). Após sete dias em estufa B.O.D. a 28°C e umidade relativa de 80% foi realizada a contagem das larvas recuperadas. Para estimar a porcentagem de redução no número de larvas usou-se a fórmula $R=100(1-T/C)$ (COLES et al., 1992).

2.5 Visualização de *B. circulans* GFP em larvas de *Haemonchus contortus*

Coproculturas foram realizadas como no ensaio anterior, com o período de incubação reduzido para 24 horas. Utilizando a técnica de Baermann, obteve-se larvas de *Haemonchus contortus*. (tratadas com *B. circulans* GFP) nos estádios iniciais (L1 e L2) sendo preparadas lâminas a fresco e observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E 400) aumento de 100 vezes.

3 Resultados

3.1 Eletrotransformação

Através do escaneamento pelo sistema Typhoon 9210, e dos esfregaços observados no microscópio de fluorescência (Fig. 3b), foi possível confirmar a transformação pela emissão fluorescência das células bacterianas.

3.2 Avaliação nematicida de *B. circulans* GFP em larvas de *Haemonchus contortus*

A ação larvicida por *B. circulans* GFP foi de 81%, enquanto que nos cultivos tratados com *B. circulans* foi de 79%, demonstrando que não houve alteração da sua ação após a transformação (Fig. 2).

3.3 Presença de *B. circulans* GFP em larvas de *Haemonchus contortus*

Através da microscopia de fluorescência, foi possível observar o *Bacillus* GFP no interior das larvas de *Haemonchus contortus* (Fig. 3a).

4 Discussão

A utilização de marcadores que permitem o rastreamento de micro-organismos no ambiente e em diversas condições fisiológicas é uma ferramenta importante no estudo de interações entre patógeno e hospedeiro (PARENTE et al., 2008). O controle biológico vem sendo utilizado na agricultura há décadas, como coadjuvante ou até mesmo, mais recentemente, como alternativa aos tradicionais defensivos agrícolas (BETZ et al., 2000). Entretanto, os estudos do uso desse tipo de ferramenta na pecuária, sobre parasitos gastrintestinais ainda são insipientes (CIORDIA; BIZZEL, 1961; LINARES et al., 2008 ; BRAVO et al., 2011).

O controle biológico utilizando *B. circulans* vem como uma proposta nova na tentativa de combater os parasitos ovinos que estão cada vez mais resistentes aos fármacos tradicionais, por isso há a necessidade de um maior entendimento da ação desse agente. A transformação com o plasmídeo da GFP corrobora para esse entendimento uma vez que com o desenvolvimento das metodologias de expressão da GFP é possível estudar uma série de processos como a divisão celular, replicação, divisão cromossomal e esporulação (PHILLIPS, 2001).

A transformação com plasmídeo com o gene da *gfp* auxiliará no estudo da patogenicidade de *B. circulans* para os parasitos. Esta ferramenta torna-se mais importante neste estudo, pois diferentemente do *B. thuringiensis*, o *B. circulans* não

produz toxinas cristalogênicas (RAYMOND et al., 2010), mas sim outros fatores de virulência que podem estar envolvidos em sua ação tóxica. Portanto, sua localização, quantidade e forma (vegetativa ou esporo) podem ser exploradas com o auxílio da GFP.

A transformação de *B. circulans* com o plasmídeo pAD43-25gfpmut3a, além de expressar a GFP, possui um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, desta forma facilitando o isolamento do *Bacillus* em culturas mistas.

5 Conclusão

Foi possível transformar, através de eletroporação, *B. circulans* com o plasmídeo contendo o gene da *gfp* para um melhor entendimento de sua ação toxigênica e das relações do agente com o nematóide *Haemonchus contortus*.

6 Referências

BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, v.32, p.156-173, 2000.

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

BONE, L. W., and BOTTJER, K. P. Factors Affecting the Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* Toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 102-107, 1988.

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

BRAVO A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S.S, SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 41, p. 423-431, 2011.

BROOKER, S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers – A review. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.1137-1144, 2010.

CHALFIE, M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Trends in Genetics** v. 10, p 151, 1994.

CIORDIA, H., BIZZEL, 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**, v.47, (abstract), p. 41, 1961.

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER, P.J. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v. 44, p.35–43, 1992.

HERRING, P. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**. v.1, p. 147-163, 1987.

LECADET, M. M., BLONDEL, M. O. and RIBIER, J. generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. Berliner 1715, using bacteriophage CP54. **Ber. J. Gen. Microbiology**, v. 121, p. 201-212, 1980.

LINARES, I. H., LOPEZ-ARELLANO M. E., DE GIVES, P. M., Hernandez E. L., and DE LA PARRA A. B. Lethal Activity of Two *Bacillus thuringiensis* Strains against *Haemonchus contortus* Histotropic Larvae. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences** v.1149, p. 164–166, 2008.

PARENTE, A.F. ; SILVA-PEREIRA, I. ; BALDANI, J. I. ; TIBÚRCIO, V. A S.A ; BÁO, S. N ; DE-SOUZA, M. T. Construction of *Bacillus thuringiensis* wild-type S76 and Cry derivatives expressing a green fluorescent protein: two potential marker organisms to study bacteria-plant interactions. **Canadian Journal of Microbiology** (Online) v. 54, p. 786-790, 2008.

PHILLIPS, G. J., Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. **FEMS Microbiology Letters**. v. 204, p. 9-18, 2001.

RAYMOND, B., JOHNSTON, P.R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D., CRICKMORE, N., *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends Microbiology** v. 18, p. 189 -194, 2010.

ROBERTS, F. H. S. and O'SULLIVAN, J. P. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Records**.,v.1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, I.B., TADEI, W.P., DIAS, J.M.C.S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 441-444, 1988.

RUBY, E. G.; MCFALL-NGAI, M. J. A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p. 4865-4870, 1992.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.; SAIGA, Y. Extration, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequoera* **Journal of Cellular and Comparative Physiology**. v. 59, p. 223-239, 1962.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.97, 1996.

WANG, S. X., HAZELRIGG, T. Implications for *bcdmRNA* localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. **Nature** v. 369, p. 400-403, 1994.

7 Figuras do Artigo

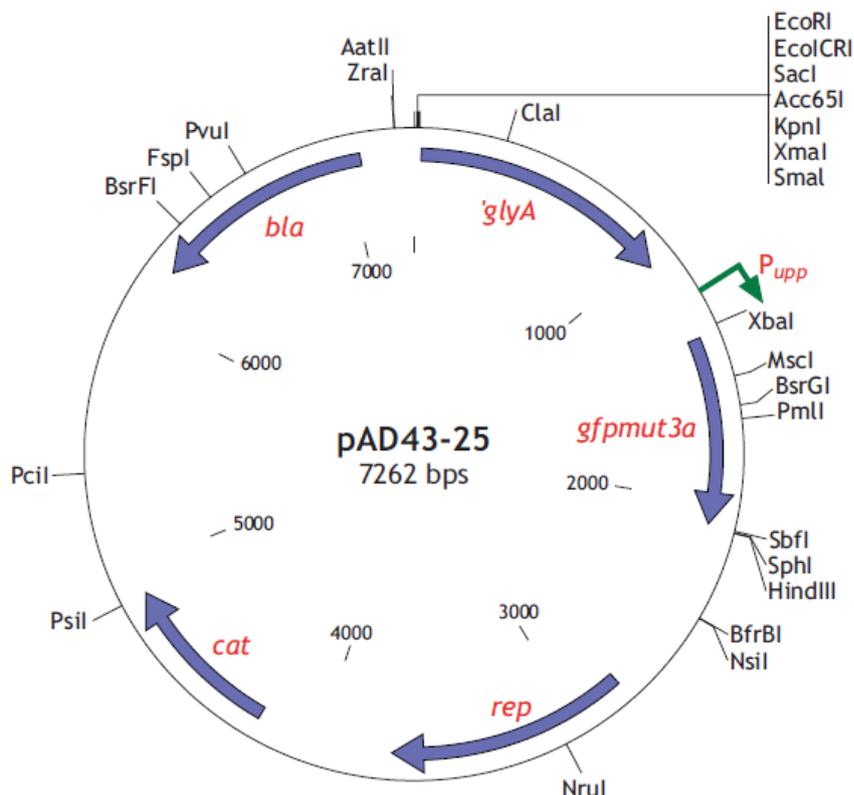


Figura 1 – Mapa Físico do plasmídeo portadores do gene *gfpmut3a*. As setas indicam a direção de expressão dos genes, os sítios únicos de restrição, e mostra a localização dos genes *bla* que confere resistência à ampicilina, *cat* que confere resistência ao cloranfenicol e *gfpmut3a* que codifica a sequência da proteína variante GFP. A seta verde indica a sequência promotora.

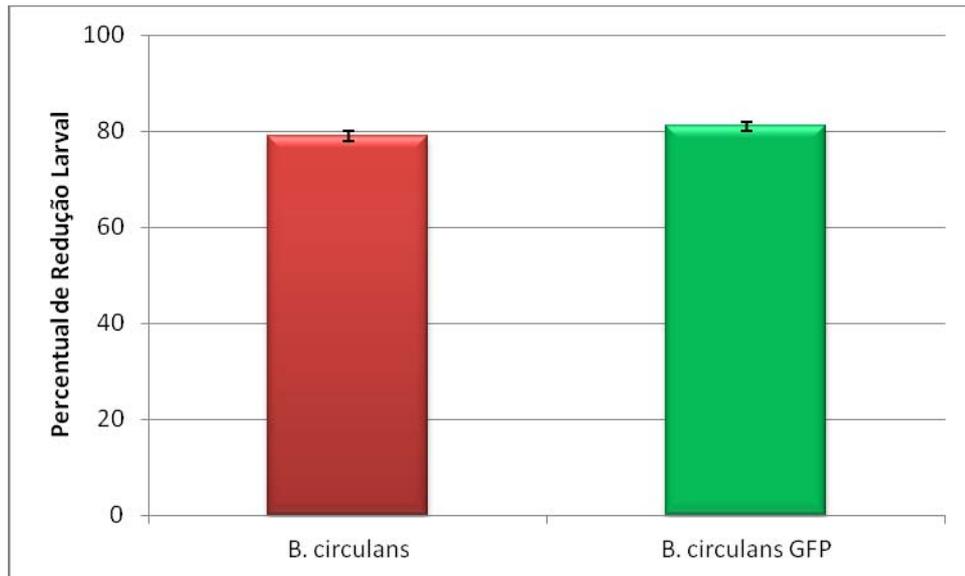


Figura 2 – Percentual de redução do número de larvas. Os dados representam as médias (+/- E.P.M) da redução no número de larvas de *Haemonchus contortus* incubadas com *Bacillus circulans*.

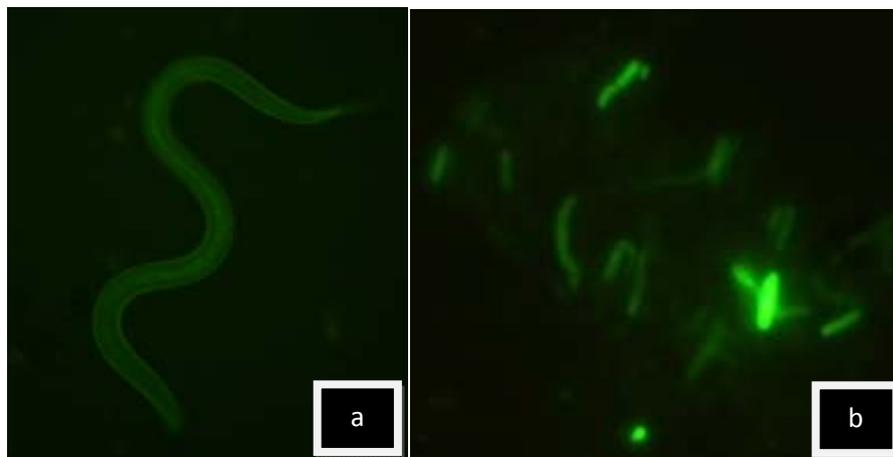


Figura 3 – Microscopia de Fluorescência - (a) Larva (L1/L2) de *Haemonchus contortus* contaminada com *Bacillus circulans* GFP(40x), (b) *Bacillus circulans* transformado, (Nikon Eclipse E 400 1.000 x).

3.3 Artigo 3

Atividade larvicida de *Bacillus circulans* em ovinos infectados naturalmente por *Haemonchus contortus*

Lista de Figuras

Figura 1 – Concentração de <i>B. circulans</i> nas fezes.....	53
Figura 2 – Redução do número de larvas contadas nas coproculturas.....	54
Figura 3 – Larva de <i>Haemonchus</i> spp. após 24h de exposição a <i>Bacillus circulans</i>	54

Atividade larvicida de *Bacillus circulans* em ovinos infectados naturalmente por *Haemonchus contortus*

Marina Cunha Sinott, Luciana Laitano Dias de Castro, Fábio Pereira Leivas Leite

Artigo a ser submetido à Revista Experimental Parasitology

Resumo

Um eficiente controle dos parasitos gastrintestinais ovinos se faz necessário para que os avanços na ovinocultura prossigam. Atualmente, os princípios ativos utilizados nas medicações já não são eficazes. O controle biológico é uma alternativa a esse problema enfrentado na pecuária. No presente trabalho, foi testado o controle biológico utilizando *Bacillus circulans* em ovinos jovens naturalmente parasitados com *H. contortus*. A bactéria foi administrada por via oral (10^9 UFC/dia) por sete dias. Amostras fecais foram colhidas diariamente durante esse período e o número de larvas quantificado. Observou-se uma redução de 87 % de larvas no grupo tratado e o *Bacillus* foi detectado nas fezes até sete dias após a interrupção de sua administração. Estes resultados sugerem que a utilização do *B. circulans* pode ser uma promissora alternativa de controle biológico para esta parasitose.

Palavras-chave: Controle biológico, *Bacillus circulans*, *Haemonchus contortus*.

1 Introdução

A alta prevalência e patogenicidade dos nematódeos que parasitam ovinos são os maiores empecilhos no avanço da ovinocultura (MACRAE, 1993). Hoje as parasitoses são combatidas com técnicas de manejo a fim de impedir a reinfecção do rebanho e com a variação dos princípios ativos dos antihelmínticos (STROMBERG, 1997). Contudo, esses parasitos já apresentam resistência a esses fármacos, seja pelo uso prolongado de um mesmo princípio ativo ou por administração de subdoses (BLUTHGEN e HEESCHEN, 1997). O prejuízo com a queda na produção, ocasionado

pelas helmintoses e as infecções secundárias que essas podem propiciar, torna necessária a busca por alternativas à terapêutica tradicional.

Na agricultura, há algum tempo já vem se utilizando o biocontrole através de diversas espécies de *Bacillus* (RODRIGUES et al., 1988, BOBROWSKI et al., 2001) em especial *Bacillus thuringiensis* vem desempenhando um papel relevante no cenário agrícola (SCHNEPF et al., 1998). Entretanto, há poucos estudos sobre o uso dessas bactérias para o tratamento de helmintoses em medicina veterinária. Trabalhos pioneiros nesta área como o de Ciordia e Bizzel (1961) demonstraram que esporos de *B. thuringiensis* adicionados às fezes de bovinos, diminuía a concentração de larvas de terceiro estágio de tricostrongilídeos. Estudos sobre controle biológico como método alternativo de controle foi evidenciado em parasitos de ovinos, inibindo o desenvolvimento de larvas de nematódeos (SINOTT et al., 2008, PINEDA et al., 2012). O presente estudo teve por objetivo estudar a ação nematicida de *B. circulans* em larvas de *Haemonchus contortus* em animais naturalmente infectados.

2 Materiais e Métodos

2.1. *Bacillus circulans*

Foram utilizadas duas amostras da coleção de micro-organismos do Instituto de Biologia da UFPel. Para os experimentos foram recuperadas amostras de *B. circulans* e *B. circulans* GFP.

2.1.1 Produção de *B. circulans*

Uma amostra de *Bacillus circulans* cedida pelo Laboratório de Microbiologia e Parasitologia-IB foi suspensa em salina estéril e semeada em ágar BHI (Infusão de cérebro e coração, Difco), incubada por 24 horas a 30°C. Após o crescimento, 3-5 colônias foram semeadas em frascos tipo Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 200 mL de meio NYSM (caldo nutriente, extrato de levedura, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂) (Yousten, 1984). Esses foram incubados em agitador orbital (CERTOMAT® BS-T, B. Braun

Biotech International), a 200rpm, 30°C, permanecendo por 72 h. A média de *B. circulans* obtida nestes experimentos foi de $\sim 2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL. O controle de pureza foi realizado em todas as etapas pela técnica de Gram e através de semeadura por esgotamento em ágar sangue.

2.2 *B. circulans* GFP

A amostra de *B. circulans* GFP foi utilizada segundo SINOTT et al.,(2010), repicada em meio NYSM seletivo (cloranfenicol 10µg/mL) e incubadas em agitador orbital (CERTOMAT® BS-T, B. Braun Biotech International), a 200rpm, 30°C, por 72h para que ocorresse a esporulação.

2.3 Animais

Foram selecionados 42 ovinos com seis meses, da raça Corriedale, positivos para *Haemonchus contortus* apresentando em sua fezes o mínimo de 1000 OPG, mantidos em duas propriedades, sob dieta de pastagem nativa e água *ad libitum*.

2.4 Biocinética de *B. circulans*

Para o estudo da cinética da bactéria nos ovinos foram administrados seis cordeiros, por via oral, 20 mL de uma suspensão contendo 10^8 UFC/mL de *Bacillus circulans* transformado com GFP. Fezes (15g) foram coletadas da ampola retal, a cada hora durante as primeiras doze horas e a cada vinte quatro horas por dez dias. As amostras eram diluídas na proporção de 1:10 e semeadas em meio BHA (Infusão de cérebro e coração agar, Difco) contendo 10µg/mL de cloranfenicol, incubadas a 30°C por 24h, após identificadas e quantificadas (UFC/mL por diluições logarítmicas). A caracterização do *B. circulans* foi efetuada por provas bioquímicas seguindo o Manual Bergey, presença de fluorescência e resistência ao cloranfenicol.

2.5 *B. circulans* GFP em larvas de *Haemonchus contortus*

Amostras de fezes (4g) contendo em média 1000 OPG de *Haemonchus contortus* foram inoculadas com uma suspensão de *B. circulans* GFP contendo 2×10^8 UFC/mL. Como controle, amostras de fezes foram inoculadas com a cepa de *B. circulans* não transformada (2×10^8 UFC/mL) e outro grupo, incubado com solução salina. Utilizou-se a técnica de Baermann para recuperar as larvas L1/L2 dos tratamentos, lavadas em salina estéril e fixadas em lâminas para visualização em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse E 400 1.000 x).

2.6 Ação Nematicida

Trinta cordeiros receberam durante sete dias o cultivo do *Bacillus circulans* na quantidade de 20 mL (2×10^9 UFC) por via oral. Seis cordeiros recebiam água na mesma quantidade e pela mesma via durante o mesmo período (controle negativo). Para reduzir a possível variável da irregularidade de oviposição das fêmeas de *Haemonchus contortus*, foi utilizado a contagem das coproculturas do dia zero dos animais tratados e dos controles. Foram colhidas amostras fecais (~15g) durante os sete dias de tratamento e por mais dois dias após a interrupção da administração de *Bacillus circulans*, e realizadas coproculturas pela técnica de Roberts e O'Sullivan(1950). A redução foi calculada em relação ao grupo controle, tratado com água, através da fórmula $R=100(1-T/C)$ segundo Coles et al., (1992), onde R representa o percentual de redução, C representa o número de larvas no grupo controle e T equivale ao número de larvas contadas nos diferentes dias de tratamento.

3 Resultados

3.1 Biocinética de *B. circulans*

A presença de *B. circulans* GFP foi detectada nas fezes a partir das quatro horas, e por até sete dias após a administração (Fig. 1).

3.2 Presença de *B. circulans* GFP em larvas de *Haemonchus contortus*

Nas larvas recuperadas pela técnica de Baermann, pode-se observar a presença de *B. circulans* transformado pela sua visualização através de microscopia de fluorescência (Fig. 3).

3.3 Ação Nematicida

Após 24h da administração de *Bacillus circulans* já foi observada redução de 43,45% no número de larvas em relação ao grupo controle, essa redução foi aumentando gradualmente, atingindo 87,5% no terceiro dia de tratamento. A redução no número de larvas nos animais tratados foi observada até dois dias após o término da administração do *Bacillus* aos ovinos (Fig.2).

4 Discussão

As parasitoses gastrintestinais são as maiores fontes de prejuízos diretos e indiretos na pecuária ovina. Fármacos cada vez mais concentrados estão sendo utilizados na tentativa ineficaz de controlar esses parasitos, que desenvolveram multirresistência às moléculas tradicionais (KAPLAN, 2004; GEARY et al., 2010). Agravando os prejuízos causados pelas parasitoses, os produtos de origem animal possuem níveis elevados de mais rejeição pelo mercado consumidor devido à presença de resíduos deixados por esses fármacos que possuem período de carência e toxicidade extremamente altos, podendo causar efeitos colaterais nos consumidores (DEVINE; FURLONG, 2007). Alternativas têm sido estudadas para contornar o surgimento da resistência, tais como a rotação de pastagens e a consorciação de duas ou mais espécies animais (BARGER, 1999), na tentativa da descontaminação ambiental.

Uma alternativa promissora é o controle integrado de pragas, que na agricultura já vem apresentando resultados positivos contra nematódeos, podendo reduzir as perdas econômicas das parasitoses em veterinária.

No teste de biocinética pode-se observar que a bactéria levou aproximadamente três horas para transcorrer o trato digestivo dos animais, pois até esse período não foi detectada a presença de *Bacillus* GFP nas fezes. A presença da bactéria foi detectada a partir das primeiras 4 horas após sua administração ($\sim 2 \times 10^5$ UFC/mL). A concentração nas fezes foi aumentando gradativamente até as 12 horas atingindo 8×10^6 UFC/mL e mantendo-se constante até as 48 horas (Fig.1). Recentemente nosso grupo demonstrou (Sinott et al., manuscrito submetido) que *B. circulans* era capaz de se multiplicar em fezes estéreis ou não. Também foi observado um aumento na presença de *B. circulans* nas fezes entre as 72 e 144 horas, sugerindo que a bactéria se multiplicou no conteúdo fecal dos animais. Corroborando com esta observação, Lee et al., (2002) observaram presença e crescimento desse gênero bacteriano no trato gastrointestinal e nas fezes de diferentes espécies animais, detectando quantidades semelhantes às encontradas em nosso estudo.

A utilização de *B. circulans* transformado com GFP atuou como uma importante ferramenta neste estudo. Primeiro, com a presença do marcador de seleção de resistência ao cloranfenicol (gene *cat*), tornando a detecção de *B. circulans* nas fezes facilitada, pois sua utilização inibiu o crescimento de outros micro-organismos. Segundo, foi possível observar a bactéria fluorescente em todos os pontos estudados, tanto direto das fezes como dos meios de cultivo (dados não mostrados). Entretanto, a maior contribuição foi a visualização de larvas de *Haemonchus* fluorescentes demonstrando a ingestão do *B. circulans*. Esta observação é de extrema importância para se entender o mecanismo larvicida utilizado por *B. circulans*, sugerindo que o mesmo necessita ser ingerido para efetuar sua toxicidade.

A ação toxigênica mediada pelas toxinas cristalogênicas de *B. thuringiensis*, inicia pela sua ingestão, solubilização e ativação no intestino das larvas, devido à alcalinização do pH (RAYMOND et al., 2010). Entretanto, *B. circulans* não é cristalogênico e os resultados observados sugerem que sua ação toxigênica está associado ao esporo, sendo necessária sua ingestão para exercer sua ação larvicida. A ação toxigênica de *B. circulans* em larvas de mosquito está associada ao esporo (DARRIET and HOURGARD, 2002), sendo semelhante à toxicidade observada para larvas de *Haemonchus* neste experimento.

Nos resultados obtidos no teste nematicida, observamos que já nas primeiras 24 horas após a administração de *B. circulans* houve uma redução de 40% de larvas nas fezes dos animais e esta redução foi aumentando gradativamente até as 78 horas (Fig. 2). A ação larvicida foi constante entre o quarto e sexto dia, e permaneceu até dois dias após a interrupção da administração de *B. circulans*.

Os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle parasitário, que assegurem saúde e segurança dos organismos vivos, por meio de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias, utilização de pastoreio alternado e higienização de pastagens (MOTA et al, 2003). O controle biológico por *B. circulans* busca a desinfestação das pastagens, uma vez que as nematotoxinas atuam nas formas jovens das larvas (ambientais), fazendo com que o ciclo do nematódeo não seja completado. Por esse fato pode-se sugerir que *Bacillus circulans* pode promover a descontaminação evitando a reinfecção dos animais pelas formas infectantes de *Haemonchus contortus*, representando uma ferramenta importante para o controle das parasitoses, pois cerca de 95% dos parasitos estão no ambiente e não parasitando os hospedeiros (BOWMAN et al., 2003).

5 Conclusão

Com dados obtidos nos experimentos *in vivo* pode-se inferir que *Bacillus circulans* mostrou-se um importante agente para ser utilizado no controle biológico das parasitoses gastrintestinais de ovinos.

6 Referências

- BARGER, I. A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p.41-47, 1999.
- BLUTHGEN, A., HEESCHEN, W. H. Parasiticides. **International Dairy Feed**, v. 97, p. 35-44, 1997.

- BOBROWSKI, V. L., PASQUALI, G., ZANETTINI, M. H. B., FIUZA, L. M. Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.105-109, 2001.
- BOWMAN, D. D., LYNN, R. C., EBEHARD, M. L. **Georgi's parasitology for veterinarians**. 8th ed. St. Louis: Saunders, p. 422, 2003.
- CIORDIA, H., BIZZEL, 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**, v.47, (abstract), p. 41, 1961.
- COLES, G. C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F. H., GEERTS, S., KLEI, T. R., TAYLOR, M. A., WALLER, P. J. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology** v. 44, p.35–43, 1992.
- DARRIET, F., HOURGARD, J-M., An isolate of *Bacillus circulans* toxic to mosquito larvae. **J. Amer. Mosquito Control Association**.v.18, p.65-67, 2002
- DEVINE, G. J., FURLONG, M. J. Inseticide use: contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, p. 281-306, 2007.
- GEARY, T. G., WOO, K., MCCARTHY, J. S., MACKENZIE, C. D., HORTON, J., PRICHARD, R. K. Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiases of humans. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.1-13, 2010.
- KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **TRENDS in Parasitology**, v.20, p. 477-481, 2004.
- LEE, D-H., MACHI, J., OHBA, M., 2002. High frequency of *Bacillus thuringiensis* in feces of herbivorous animals maintained in a zoological garden in Japan. **Applied Entomology and Zoology**. 37, 509–516.
- MACRAE J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.52, p.121-130, 1993.
- MOTA, M. A., KANADANI A. C. e JACKSON V. A. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 23, p.93-100, 2003.
- PINEDA A. V., A. BRAVO, P. M. GIVES, E. LIEBANO- HERNANDEZ, I.I H. LIINARES, N. Y. PEREZ, L. A. MARCELINO, G. R. VARGAS, E. H. CASTRO, I. G. SEGURA, M.. E. L. ARELLANO Use of *Bacillus thuringiensis* products as alternative method of control against important veterinary parasitic nematodes. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**. v. 3, p. 77-88, 2012.
- RAYMOND, B., JOHNSTON, P.R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D., CRICKMORE, N., *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends Microbiology** v. 18, p. 189 -194, 2010.

ROBERTS, F. H. S. and O'SULLIVAN, J. P. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Records**. v.1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, I. B., TADEI, W. P., DIAS, J. M. C. S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 441-444, 1988.

SINOTT, M. C., GALLINA, T., LEITE, F. P.L. Efeito nematicida de *Bacillus* spp. em nematódeos de ovinos. **XVII Congresso de Iniciação Científica-UFPel**, 2008.

SINOTT, M. C., LOTT, D., DIAS DE CASTRO L. L., DE-SOUZA, M. T., LEITE, F. P. L. Transformação de *Bacillus circulans* com GFP: uma ferramenta para o estudo das interações patógeno-hospedeiro- **XII Encontro da Pós Graduação- ENPOS**, 2010.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62, p. 775-806, 1998.

STROMBERG B. E. Environmental factors influencing transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 247-264, 1997.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances Biotechnology Process**. v.3, p.315-343, 1984.

7 Figuras do Artigo

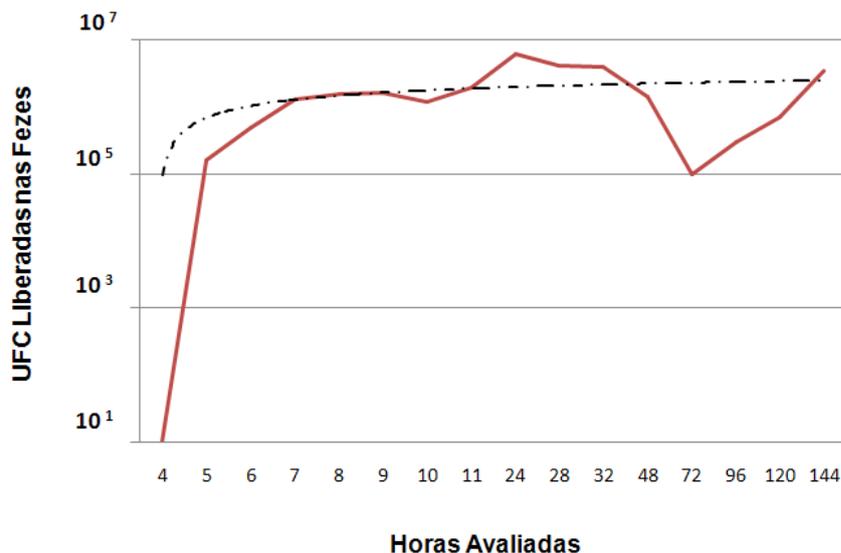


Figura 1 – Concentração de *B. circulans* nas fezes. - Os dados demonstram a quantidade de *B. circulans* GFP (UFC/g) liberadas nas fezes, durante as horas avaliadas, após única administração. O tracejado indica linha de tendência.

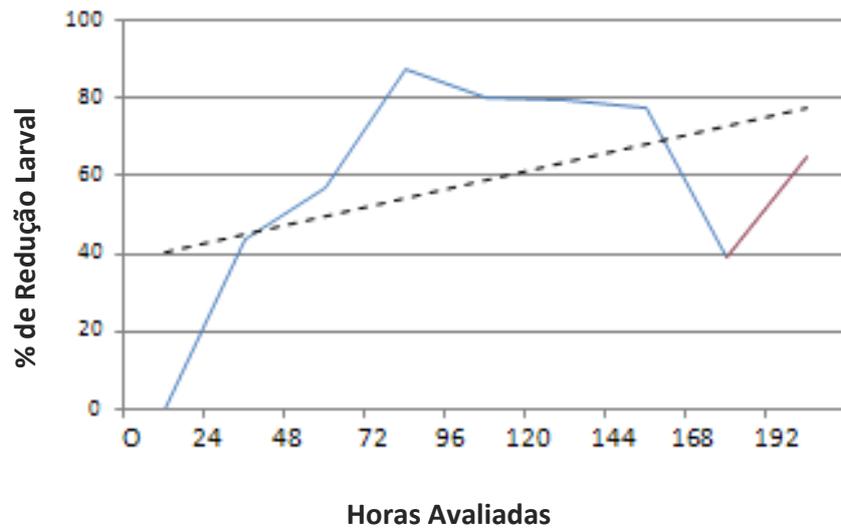


Figura 2 – Redução do número de larvas contadas nas coproculturas. - O gráfico demonstra a redução na contagem de larvas durante os sete dias de tratamento (linha azul), e por mais dois dias que se seguiu com o recolhimento das fezes e coproculturas (linha vermelha).



Figura 3 – Larva de *Haemonchus contortus* após 24h de exposição a *Bacillus circulans* GFP. Observada no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400 40x).

5 Conclusão

- Verificou-se que *Bacillus* spp. tem atividade contra formas jovens de *Haemonchus contortus*;
- *Bacillus circulans* se mostrou eficiente como controle biológico de *Haemonchus contortus* nos testes *in vitro* e *in vivo* ;
- A inserção do plasmídeo contendo o gene da *gfp* e *cat* é uma importante ferramenta para estudos das interações em controle biológico.

6 Referências

AMARANTE, A.F.T., BAGNOLA JR., J., AMARANTE, M.R.V., BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in Sao Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.73, p. 89-104, 1997.

AMARANTE, A. F. T., BRICARELLO, P. A., ROCHA, R. A., GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004.

ANDERSON, N. Internal parasites of sheep and goats. In: COOP, I. E. (Ed.). **Sheep and goat production**. Amsterdam: Elsevier. p. 175-191, 1982.

BLUTHGEN, A., HEESCHEN, W. H. Parasiticides. **International Dairy Feed**, v. 97, p. 35-44, 1997.

BONE, L. W., BOTTJER, K. P. Factors Affecting the Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* Toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 102-107, 1988.

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

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

BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 41, p. 423-431, 2011.

BUENO, M. S., CUNHA, E. A., VERISSIMO, C. J., SANTOS, L. E., LARA, M. A. C., OLIVEIRA, S. M., SPOSITO FILHA, E., REBOUCAS, M. M. Infecção por nematodos em razas de ovelhas carnicas criadas intensivamente em La region del sudeste del Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v.15, p.273-280, 2002.

CIORDIA, H., BIZZEL, 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**, v. 47, (abstract), p. 41. 1961.

HOLMES, P. H. Pathogenesis of trichostrongylosis. **Veterinary Parasitology**, v.18, p.89-101, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1. Acesso em: 20 fev. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>. Acesso em: 01 mar. 2012.

PERRY B. D., RANDOLPH T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p.145-168, 1999.

REGIS, L., SILVA-FILHA, M. H., NIELSEN-LEROUX, C., CHARLES, J. F. Bacteriological larvicides of dipteran diseases vectors. **TRENDS in Parasitology**, v.17, p. 377-380, 2001.

RODRIGUES, I. B., TADEI, W. P., DIAS, J. M. C. S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 441-444, 1988.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R., DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL-SINDAN. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/informacoes/classe.aspx>. Acesso em: 05 jan. 2012.

SINOTT, M. C., GALLINA, T., LEITE, F. P.L. Efeito nematicida de *Bacillus* spp. em nematódeos de ovinos. **XVII Congresso de Iniciação Científica-UFPel**, 2008.

STROMBERG B. E., AVERBECK G. A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. **International Journal of Parasitology** v. 29, p. 33-39, 1999.

V´AZQUEZ, P.V.M., C.J. FLORES, V.C. SANTIAGO, *et al.* Frequency of bovine gastrointestinal nematodes in three tropical areas of Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**. v.42 p. 237–245, 2004

VIEIRA, L, S., CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmintica em rebanhos caprinos no Estado do Ceara. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 6, p. 229, 1997.

Anexo

ANEXO A – Meio de Esporulação HCT

	1000 mL	100mL
Bacto peptone	7,5 g	0,75g
Sol. 0	100 mL	10 mL
Sol.1	10 mL	10 mL
Sol. 2	10 mL	1 mL
Sol. 3	10 mL	1 mL
H ₂ O	870 mL	87 mL

Autoclavar por 30 minutos a 115°C para evitar precipitação.

Solução 0

Fosfato de Potássio monopotássico (KH₂PO₄) 68g

H₂O para 1000mL

pH 7,4

Só dissolve utilizando NaOH

(Guardar em alíquotas, pois contamina)

Solução 1

Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) 12,3 g

Sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) 0,169 g

Sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O) 1,4 g

H₂O para 1000mL

Solução 2

Sulfato férrico Fe₂(SO₄)₃ 2 g

H₂O 105 mL

Ácido sulfúrico 3,0 mL

Completar com H₂O para 1000 mL

Solução 3

Cloreto de cálcio (CaCl₂ . 2H₂O) 14,7 g

H₂O para 1000 mL