

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus*
***thuringiensis*, COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE DIPTERA E**
LEPIDOPTERA

VANEISA GOBATTO

Caxias do Sul

2006

VANEISA GOBATTO

ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*, COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE DIPTERA E LEPIDOPTERA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Specht

Caxias do Sul

2006

VANEISA GOBATTO

ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*, COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE DIPTERA E LEPIDOPTERA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Specht

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19 DE DEZEMBRO DE 2006.

Prof. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados

Prof. Dr. Alexandre Specht

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

DEDICO

Aos meus pais, José e Ilda pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Ilda por acreditarem em mim, pela compreensão em todos os momentos difíceis, pela ajuda e pelo grande AMOR.

A minha orientadora Prof. Dra. Neiva Monteiro de Barros, pela orientação, pelo estímulo, amizade e carinho em todos as etapas deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre Specht pela dedicação e auxílio durante a execução deste trabalho.

A empresa SETA S.A Taninos de Acácia pelo apoio financeiro.

A Dra. Lídia Mariana Fiuza pela oportunidade de estágio em seu laboratório e pelos ensinamentos.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia, em especial: Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna e Dr. Maurício Moura da Silveira, pelos ensinamentos e contribuições na elaboração deste trabalho.

As bolsistas Rafaela Frassini, Stefani Giani e Fabiane Mezzomo pelo auxílio e dedicação na concretização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia/UCS, em especial a Lúcia Bertholdo Vargas, pelo auxílio e amizade.

A colega Marli Camassola pela paciência e pelos ensinamentos durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia/UCS em especial Jucimar Zacaria e Manuela Figueiró pelo auxílio.

Aos professores doutores Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo e Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon pelas contribuições dadas a este trabalho.

Em especial a Deus pela vida.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.Insetos-praga e vetores de doenças.....	4
2.2.Controle de insetos utilizando toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	6
2.3.Modo de ação das proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i> em insetos.....	7
2.4.Mecanismo de resistência a <i>B. thuringiensis</i> em insetos.....	13
2.5.Toxicidade de linhagens de <i>B. thuringiensis</i> a insetos.....	15
2.6.Vantagens da utilização de toxinas produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	22
2.7.Reservatórios naturais para a obtenção de isolados de <i>B. thuringiensis</i>	25
2.8.Caracterização dos isolados de <i>B. thuringiensis</i>	32
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.Isolamento de linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	37
3.2.Identificação e caracterização de <i>B. thuringiensis</i>	39
3.2.1.Seleção de bactérias esporulantes e não-esporulantes.....	39
3.2.2.Identificação dos isolados por microscopia de contraste de fase.....	39

3.2.3.Quantificação das proteínas dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> e análise por SDS-PAGE.....	40
3.2.3.1.Determinação das proteínas pelo método de Bradford.....	40
3.3.Bioensaios para a avaliação da patogenicidade e da virulência.....	41
3.3.1.Criação dos insetos a serem utilizados em bioensaios.....	41
3.3.2.Avaliação da patogenicidade dos isolados.....	42
3.3.3.Avaliação da virulência dos isolados.....	43
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1.Isolamento de linhagens de <i>B. thuringiensis</i> a partir de amostras de solo e de insetos..	44
4.2.Patogenicidade dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> obtidos de solo a <i>C. quinquefasciatus</i> e <i>A gemmatalis</i>	46
4.3.Patogenicidade de isolados de <i>B. thuringiensis</i> oriundos de díptero e lepidópteros.....	53
4.4.Virulência dos isolados de <i>B. thuringiensis</i>	55
4.5.Caracterização das proteínas dos isolados de <i>B. thuringiensis</i>	57
5.CONCLUSÕES.....	61
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela

1. Classe de proteínas Cry e sua massa molecular em kDa (kiloDaltons).....	41
2. Percentual de mortalidade das larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> e lagartas de <i>A. gemmatalis</i> aos isolados de solo da área rural e urbana.....	50
3. Comparação entre os percentuais médios de mortalidade de larvas de Diptera e de Lepidoptera, para cada isolado de <i>Bacillus thuringiensis</i> , proveniente de solo rural, com respectivos erros-padrão. Teste <i>t</i> para duas médias (n=3) presumindo-se variâncias diferentes ao nível de 95% probabilidade.....	51
4. Comparação entre os percentuais médios de mortalidade de larvas de Diptera e de Lepidoptera, para cada isolado de <i>Bacillus thuringiensis</i> , proveniente de solo urbano, com respectivos erros-padrão. Teste <i>t</i> para duas médias (n= 3) presumindo-se variâncias diferentes ao nível de 95% probabilidade.....	52
5. Percentual de mortalidade das larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> e lagartas de <i>A. gemmatalis</i> aos isolados de insetos.....	54

6. Análise de variância do percentual médio de mortalidade de <i>C. quinquefasciatus</i> e <i>A. gemmatalis</i> , induzido por isolados de <i>B. thuringiensis</i> obtidos a partir lepidópteros e díptero.....	55
7. Concentração Letal Mediana (CL ₅₀) de diferentes isolados de <i>B. thuringiensis</i> obtidos de solo e de insetos contra larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	56
8. Concentração Letal Mediana (CL ₅₀) de diferentes isolados de <i>B. thuringiensis</i> obtidos de solo e de insetos, contra <i>Anticarsia gemmatalis</i>	57

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Mapa do Rio Grande do Sul, destacando os municípios onde foram obtidas amostras de solo e de insetos para isolamento de *B. thuringiensis*.....37
2. Fluxograma das principais etapas para a obtenção e seleção dos isolados de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo e de insetos.....45
3. Concentração das proteínas totais da mistura esporo-cristal (método de Bradford) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e da linhagem IPS-82, no período de 52 e 72 horas.....59
4. SDS-PAGE da mistura esporo-cristal (cultivo de 52 horas) dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. 1, marcador de peso molecular (Invitrogen); 2, IPS-82; 3, ID-MD1; 4, SU-BF4; 5, SR-AP5; 6, IL-ANI4; 7, SU-SM1; 8, ID-MD4; 9, IL-AGR3; 10, SR-CR2.....59
5. SDS-PAGE da mistura esporo-cristal (cultivo de 52 horas) dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. 1, marcador de peso molecular (Invitrogen); 2, IPS-82; 3, SU-GBA1; 4, SU-ALF6; 5, SU-FAR3; 6, IL-ANIH; 7, SR-VV1; 8, SR-VV2; 9, SU-SM2; 10, SR-CB2.....60

RESUMO

Entre os insetos que prejudicam o desenvolvimento sócio-econômico na Serra Gaúcha, encontram-se os dípteros da família Simuliidae, que devido a hematofagia, provocam desconforto e alergias, interferindo no turismo rural. Na área agrícola, os lepidópteros da família Noctuidae, são pragas de diversas culturas, sendo economicamente relevantes. Visando reduzir o uso de substâncias químicas que normalmente são empregadas no controle destes insetos, este trabalho objetivou obter isolados de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) para a aplicação em programas regionais de controle de simulídeos e noctuídeos. Utilizando-se amostras de solo da área rural e urbana e de insetos, coletados em municípios da Região, obtiveram-se 721 colônias bacterianas, das quais, 231 (32,03%) foram identificadas como *Bt*. Testes de patogenicidade contra *Culex quinquefasciatus* e *Anticarsia gemmatilis* com 84 isolados de solo e 28 de insetos selecionados por apresentarem elevada taxa de esporulação, indicaram que os recuperados de insetos foram mais específicos, enquanto que maior número dos provenientes de solo foram tóxicos para ambas as espécies, indicando mais amplo espectro entomopatogênico. Apenas um dos 12 isolados apresentou valor de CL_{50} similar àquele obtido com a linhagem padrão IPS-82, em relação a mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus*. O perfil das protoxinas dos isolados foi caracterizado por SDS-PAGE, demonstrando que dois isolados obtidos de díptero, tiveram um perfil semelhante a linhagem IPS-82, enquanto dois isolados de solo, com bandas entre 65 e 130 kDa, foram mais tóxicos para lepidópteros e dois obtidos de solo e três de insetos, apresentaram uma banda de aproximadamente 120 kDa, sendo mais efetivos contra lagartas.

ABSTRACT

Among the insects that harm the socioeconomic development of Serra Gaúcha, exist the dipterous, of the family Simuliidae that, due to its hematofagic process, cause discomfort and allergies to active rural tourists. In the agricultural regions, the lepidopterous, of the family Noctuidae, constitute curses of several cultures, constituting an economical prejudice. Seeking to reduce the use of chemical substances in the control of insects, this work is aimed at isolating the bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) for the application of regional programs of Simulids and Noctuids pest control. Samples of insects and of soil of rural and urban areas were collected in the municipal districts of the specific area. Were obtained 721 bacterial colonies, from which, 231 (32,03%) were identified as *Bt*. Patogenicity tests against *Culex quinquefasciatus* and *Anticarsia gemmatalis* were executed with 84 bacteria isolated from soil and 28 bacteria isolated from insects that had a larger capacity of cellular reproduction. The results indicated that the isolated bacteria recovered from the insects were more specific, considering that a larger number of bacteria coming from the soil were more toxic for both species, showing a wider spectrum of entomopatogenic. Just one of the isolated 12 bacteria presented a similar value of CL_{50} than the one obtained with the lineage pattern IPS-82, in relation of the mortality rate of larvae of *C. quinquefasciatus*. The profile of the protoxins of one of the isolated ones is characterized by SDS-PAGE, demonstrating that two isolated bacteria obtained from the dipteran, had a similar profile as lineage IPS-82, while two others isolated from the soil, with bands between 65 and 130 kDa, were more toxics for lepidopteran and the two

obtained from the soil and three obtained from of insects, and presented one band of approximately 120 kDa, being more effective against caterpillars.

1. INTRODUÇÃO

Existe uma preocupação pública e científica sobre a utilização indiscriminada de substâncias químicas sintéticas para o controle de insetos. O acúmulo dessas substâncias no solo e lençóis d'água pode ter diversos efeitos nocivos sobre o ambiente e ao próprio homem. Além destes danos ao meio ambiente, em razão de não serem específicos para o inseto alvo, existe ainda o problema da resistência desenvolvida pelas espécies às diferentes formulações. Por estas razões intensificaram-se esforços na busca de bioinseticidas, que apresentam a vantagem de serem relativamente específicos e pouco ou nada tóxicos para o homem, animais e outros insetos. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um agente de controle microbiano, cuja principal característica é a produção de cristais inseticidas durante a esporulação. Estes cristais consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, denominados *cry*, os quais conferem ação tóxica de *Bt* a insetos de diversas ordens, principalmente Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hemiptera.

Há grande interesse regional no controle de mosquitos, principalmente *Simulium pertinax* (*Chirostilbia*) Kollar, 1832, conhecidos como borrachudos, cujo hábito hematófago das fêmeas, perturba e limita as atividades cotidianas das pessoas e o desenvolvimento do turismo rural. Reações alérgicas por picadas de borrachudos, têm causado impactos econômicos negativos e desestimulado empreendimentos na área turística; por este motivo têm sido conduzidas diversas pesquisas na busca de novos isolados para utilização em programas de controle regionais destes insetos.

Como estratégia para a obtenção de isolados de *Bacillus thuringiensis*, têm sido utilizados diferentes substratos, como folhas, insetos mortos e poeira de grãos estocados.

Porém, como esta bactéria é naturalmente encontrada no solo, a maioria das pesquisas concentra-se neste substrato. Após o isolamento bacteriano, a microscopia de contraste de fase, permite verificar a presença do cristal paraesporal, uma característica típica desta espécie. Em combinação, utiliza-se a análise de proteínas por SDS-PAGE, que permite correlacionar a massa molecular com atividade inseticida.

As propriedades entomopatogênicas desta bactéria têm impulsionado pesquisas para seleção de isolados de *Bt* com diferentes especificidades a insetos e elevada toxicidade. Sabe-se que este bioinseticida é capaz de reduzir o crescimento populacional tanto de insetos-praga da agricultura, quanto de insetos hematófagos vetores de agentes patogênicos.

O mecanismo de ação deste bioinseticida baseia-se na solubilização das proteínas-cristal (Cry), presentes no esporo, no meio alcalino do intestino dos insetos. As pró-toxinas são convertidas em fragmentos tóxicos pela ação de enzimas digestivas dos insetos suscetíveis e posteriormente, se ligam à superfície das células epiteliais, induzindo lesões que destroem as células e matam o inseto.

Este estudo teve por objetivo geral, caracterizar isolados de *Bacillus thuringiensis*, oriundos de amostras de solo e de insetos infectados naturalmente na Serra Gaúcha, para aplicação em programas regionais de controle de insetos com importância médica e agrícola. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Isolar *Bacillus* spp. a partir de amostras de solo e de insetos infectados naturalmente, da Serra Gaúcha;
- Identificar e caracterizar os isolados de *Bacillus thuringiensis* através de microscopia de contraste de fase e SDS-PAGE;

- Avaliar a toxicidade dos isolados de *Bacillus thuringiensis*, comparando com a linhagem padrão IPS-82, por meio de bioensaios, em laboratório, utilizando larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Anticarsia gemmatalis*;
- Comparar a patogenicidade dos isolados obtidos a partir de amostras de solo provenientes de áreas urbanas e rurais, e insetos infectados naturalmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Insetos-praga e vetores de doenças

Os mosquitos (Diptera: Nematocera: Culicidae) se destacam entre os insetos de importância médico-sanitária por causarem incômodo, serem hematófagos e, principalmente, por veicularem agentes patogênicos de doenças. Relevantes pesquisas têm sido feitas com os representantes mais comuns das famílias Simuliidae e Culicidae, vulgarmente conhecidos como borrachudos e pernilongos, respectivamente.

A família Simuliidae tem uma ampla distribuição, estendendo-se dos trópicos ao círculo polar ártico, compreendendo mais de 1750 espécies conhecidas, muitas das quais são hematófagas (Crosskey & Howard, 1997). Na América do Norte, os simulídeos afetam a saúde animal, causando sua morte por ação direta ou indireta, e também reduzem a produção de leite, em áreas muito infestadas (Anderson & Voskuil, 1963).

Entre os simulídeos mais comuns das Regiões Sul e Sudeste do Brasil encontra-se *Simulium pertinax* Kollar, 1832 (Diptera: Nematocera: Simuliidae). Esta espécie apresenta antropofilia acentuada e suas picadas causam prurido intenso e irritação, podendo desencadear reações imunológicas severas (Shelley *et al.*, 1997). Beckert & Margalit (1993), ressaltaram que a presença destes insetos pode também interferir negativamente no desenvolvimento sócio-econômico de regiões com potencial para exploração do turismo rural. Espécies como *Simulium damnosum* Theobald, 1903 (Diptera: Nematocera: Simuliidae) apresenta cibário inerte, sugerindo capacidade para vetoração do nematódeo *Onchocerca volvulus*, agente etiológico da oncocercose dos rios ou cegueira noturna (Coscaron, 1987; Rabinovitch, 1997; Shelley *et al.*, 1997).

Estima-se que a cada ano, pelo menos 300 milhões de pessoas são afetadas pela malária, transmitida pelos mosquitos do gênero *Anopheles*, com aproximadamente um milhão de mortes; 160 milhões de pessoas são infectadas com parasitas da filariose, transmitida pelos mosquitos do gênero *Culex* e aproximadamente 50 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus do dengue, transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1758 (Diptera: Nematocera: Culicidae) (Armengol *et al*, 2005).

O aumento da produção agrícola brasileira para atender à crescente demanda por alimentos, exportação de grãos e seus subprodutos têm impactos diretos sobre o agroecossistema, pois está ligado ao uso intenso de insumos visando diminuir as perdas. As consequências da perda da biodiversidade no ecossistema, devido ao uso de agroquímicos não-seletivos, mostram que existe relacionamento entre estes dois fatores. Sabe-se que um número mínimo de espécies é necessário para o funcionamento do ecossistema e sua estabilidade em mudanças ambientais (Symstad *et al.*, 2003).

De um total de 156 espécies de lepidópteros-praga, 26 pertencem a família Noctuidae (Lima *et al.*, 1996) os quais dependendo das condições climáticas e estágio de desenvolvimento da cultura, podem afetar significativamente a produção. Um dos mais importantes insetos-praga da soja é a lagarta *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Na fase larval esta espécie causa sérios danos pela extensa redução da área foliar e, conseqüentemente, diminuição da fotossíntese e produtividade (Morales *et al.*, 1995). O controle de *A. gemmatalis*, tradicionalmente emprega inseticidas químicos, que são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, com conseqüências graves ao homem e ao meio ambiente.

2.2. Controle de insetos utilizando toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

O produto à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é Dipel (*Bt kurstaki* HD-1) este produto é altamente eficiente para 170 lepidópteros-praga, sendo pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros (Glare & O'Callaghan, 2000).

Na América do Norte, formulações comerciais de *Bt*, são muito utilizadas para o controle de pragas florestais, principalmente, *Lymantria dispar*, *Choristoneura fumiferana* e *C. occidentalis*. Na Austrália produtos formulados com *Bt* são utilizados para o controle de pragas em algodão, frutíferas, ornamentais, fumo, entre outras culturas (Glare & O'Callaghan, 2000; Van Frankennhuyzen, 2000).

Na América Latina, Cuba e México lideram a utilização de bioinseticidas à base de *Bt*, especialmente para o controle de pragas da cultura do algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho e pastagens. Esses são os únicos países que têm produção própria destes biopesticidas, tornando-os competitivos em relação aos produtos químicos (Glare & O'Callaghan, 2000). No Brasil, foram utilizadas formulações comerciais de *Bt* para o controle de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos foram aplicados é apenas a terça parte do México e semelhante a Cuba, ou seja, cerca de 150.000 hectares. As principais limitações dos produtos à base de *Bt* são o elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores público e privado no desenvolvimento e formulação destes produtos (Polanczyk, 2003).

A partir dos anos 80, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *Bt* na cultura do fumo e do tomate (Dias, 1992). Vários trabalhos demonstram a importância de plantas transgênicas, como milho e algodão expressando genes de *Bt* como instrumento no manejo integrado de pragas (Pilcher *et al.*, 1997; Stodola *et al.*, 2006; Wolfenbarger e Espinosa, 2004).

Formulações à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) têm sido utilizadas desde o final dos anos 70, devido à sua alta especificidade contra insetos-alvo e baixa toxicidade a animais não-alvo existentes no local onde ocorrem os simuliídeos. No Brasil, foram registrados dois programas de controle de simuliídeos com a utilização de formulações de *Bti*, um realizado no Rio Grande do Sul e outro no litoral norte do Estado de São Paulo, ambos com excelentes resultados (Vilarinhos *et al.*, 1998).

2.3. Modo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* em insetos

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada no solo, relacionada proximamente a patógenos de mamíferos como *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis* (Rasko *et al.*, 2005). *Bt* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição *Bt* pode ser diferenciado pela presença de cristais (Luthy & Wolfersberger, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase ou microscopia óptica comum. Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídeos, comparação da sequência 16S rRNA, entre outros, mostram que estas duas espécies são, na verdade, somente uma. Esta semelhança é confirmada experimentalmente pelo comportamento entomopatogênico de *B. cereus* transformados com os plasmídeos codificadores das δ -endotoxinas de *Bt* e pelas

características bioquímicas e morfológicas de isolados de *Bt* curados (sem plasmídeos codificadores de δ -endotoxinas). Portanto, a distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (Hansen & Salamitou, 2000).

A semelhança de outras bactérias, *B. thuringiensis* pode manter-se em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a fase de esporulação estas bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais, em um dos pólos da célula. Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de δ -endotoxinas ou Insecticidal Crystal Proteins (ICPs). Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, por isso pouco tóxicas para a maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos (Herrero *et al.*, 2001; Siegel, 2001). O espectro de atividade destas toxinas é estreito devido ao seu modo de ação. Os sítios de ligação, não somente estão envolvidos na especificidade das toxinas *Bt*, como sua ausência ou alteração, também representam um mecanismo de resistência dos insetos as δ -endotoxinas (Maagd *et al.*, 2001).

A grande atividade inseticida de *Bt* deve-se à ativação das δ -endotoxinas, situadas em corpos paraesporais (cristais). Eles são produzidos no segundo estágio da esporulação, durante a formação dos esporos. Após a ingestão, os cristais são dissolvidos em meio ácido ou alcalino do intestino médio do inseto e as protoxinas são liberadas. As proteases do intestino desdobram as protoxinas e produzem uma proteína ativada de menor tamanho. Esta toxina tem que passar pela membrana peritrófica para ser reconhecida por receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio. Após a ligação com o receptor, a toxina cria poros que interferem no sistema de transporte de íons pela membrana do tecido, este processo causa lise do epitélio do intestino médio e interrompe a secreção normal, reduzindo o pH do lúmen até a neutralidade, favorecendo a germinação dos esporos que acarretará a septicemia e morte do inseto. A inibição da alimentação pode

ocorrer logo após a ingestão do esporo e da toxina de *Bt*, provocando a morte do inseto (Glare & O'Callaghan, 2000).

Num estudo sobre o modo de ação das δ -endotoxinas sobre o intestino médio de larvas de *Simulium pertinax*, usando uma linhagem de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (LFB-FIOCRUZ 584), observou-se que os efeitos citopáticos nas larvas, foram proporcionais a concentração da δ -endotoxina aplicada e inversamente proporcionais ao tempo de exposição. Observações ultraestruturais mostraram que o primeiros danos celulares, devido as endotoxinas de *Bti*, em larvas de *Simulium pertinax*, estavam relacionados a degeneração das microvilosidades intestinais da borda em escova (Cavados *et al.*, 2004).

As δ -endotoxinas específicas para lepidópteros de 130 kDa como a Cry 1, são processadas em toxinas ativas com massa molecular de aproximadamente 60 kDa. Como δ -endotoxinas díptero-específicas estão a Cry 4A e Cry 11A que são derivadas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*; a protoxina de 125 kDa de Cry 4A é processada por tripsina, no intestino médio de *Culex pipiens* formando dois fragmentos de 20 e 45 kDa, pela clivagem intramolecular de um intermediário de 60 kDa (Yamagiwa *et al.*, 1999). A protoxina de 70 kDa de Cry 11A é processada em fragmentos de 30-40 kDa no intestino médio de *Culex quinquefasciatus* ou dois fragmentos de 34-36 kDa e 32 kDa por tripsina no intestino de *Culex pipiens* (Yamagiwa *et al.*, 2002). O processo de ativação *in vitro* e *in vivo* de Cry 39A, uma δ -endotoxina que é altamente tóxica para *Anopheles stephensi*, foi investigada, sua massa molecular de 72 kDa foi processada *in vitro* em fragmentos de 60 kDa pela tripsina do extrato do intestino de larvas de *A. stephensi* (Ito *et al.*, 2006). A maioria dos genes codificadores de δ -endotoxinas estão localizados em plasmídeos. Alguns dos isolados de *Bt* contém mais de um gene de δ -endotoxina (Kronstad *et al.*, 1983). O espectro de ação de diferentes isolados de *Bt* depende da combinação das

δ -endotoxinas individuais presentes no cristal (Estruch *et al.*, 1997). Enquanto o esporo que representa a forma de resistência da bactéria, pode sobreviver durante vários anos, a durabilidade dos cristais é altamente variável, dependendo das condições ambientais (Hofte & Whiteley, 1989).

Os genes *cry* podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (Sanchis *et al.*, 1998). Sua expressão é regulada por dois mecanismos: o primeiro é dependente de fatores de transcrição específicos da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry*, e outro independente do processo de esporulação, como o gene *vip3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Inglis *et al.*, 1998).

Estudos detalhados sobre estas toxinas, sua atividade e modo de ação (Krieg, 1971; Sebesta *et al.*, 1981; Silva-Werneck, 2001; Crickmore *et al.*, 1998) permitiram identificar que, cada uma, apresenta especificidade contra uma determinada ordem de insetos. Desta forma, apesar do *Bti* produzir diversas toxinas, atribui-se as diferenças entre as proporções produzidas por cada linhagem, como determinantes da sua especificidade de hospedeiro. Cristais de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, contém quatro endotoxinas maiores, designadas Cry 4A (125kDa), Cry 4B (134 kDa), Cry11A (67 kDa) e Cyt 1A (27 kDa). Estas proteínas tóxicas são expressadas concomitantemente com a esporulação, sendo específicas para o controle de dípteros. Fatores ambientais têm um papel crítico na modulação e síntese da toxina, assim sua síntese tem limitada tolerância a variações na concentração de metais específicos e fosfato inorgânico, bem como a temperatura, ao pH e níveis de potencial redox, que favorecem o crescimento celular. Da mesma forma, a repressão ou inibição da síntese de δ -endotoxinas pelo catabolismo de fontes de carbono e nitrogênio, especialmente glicose e amônia, foi relatado recentemente por Tokcaer *et al.* (2006).

As proteínas tóxicas para Lepidópteros pertencem ao grupo Cry 1, Cry 9 e Cry 2; as toxinas ativas contra coleópteros são Cry 3, Cry 7 e Cry 8, assim como Cry 1B e Cry 1I, a qual tem dupla atividade. As proteínas Cry 5, Cry 12, Cry 13 e Cry 14 possuem atividade nematocida, e as proteínas Cry 2, Cry 4, Cry 10, Cry 11, Cry 16, Cry 17, Cry 19 e Cyt são tóxicas para dípteros (Crickmore *et al.*, 2005). A caracterização dada pela maioria das coleções descritas, foram baseadas em bioensaios contra diferentes larvas de insetos (Bravo *et al.*, 1998).

Experimentos *in vivo* mostraram que a toxina Cry 11Bb, liga-se preferencialmente nas microvilosidades apicais do intestino posterior e ceco gástrico de larvas de mosquitos, isto deve-se principalmente a alta concentração de moléculas receptoras ou de moléculas com alta afinidade de ligação; desta forma as células epiteliais do intestino poderiam ser consideradas como principal alvo desta toxina. Adicionalmente, a toxina Cry 11Bb foi observada no intestino de larvas de *C. quinquefasciatus*, 15 minutos após o tratamento e 1 hora após a exposição nas microvilosidades apicais e nos Túbulos de Malpighi (Ruiz *et al.*, 2004).

Além das toxinas do cristal, essa bactéria pode produzir outras toxinas como a β -exotoxina, também denominada thuringiensina. Essa toxina é termoestável, sendo produzida por várias linhagens deste patógeno, possuindo atividade inseticida contra uma ampla gama de insetos, porém devido à sua toxicidade para vertebrados, a maioria dos bioinseticidas à base de *Bt* utiliza sorovares ou isolados que não produzem a β -exotoxina (Polanczyk, 2003).

B. thuringiensis pode também matar os insetos por meio de um mecanismo não mediado pelas toxinas Cry. O envolvimento da própria bactéria na morte dos insetos, fornece evidências da existência de fatores de virulência adicionais, permitindo a sobrevivência de *Bt in vivo*, no trato digestivo, permanecendo imune às defesas do

hospedeiro. Esta bactéria é conhecida por produzir diversos fatores determinantes da virulência, incluindo fosfolipase C, enterotoxinas, hemolisinas, proteínas de superfície celular e metaloproteases que podem estar envolvidos no estabelecimento da infecção (Fedhila *et al.*, 2004). Segundo Du e Nickerson (1996) os esporos de *Bt* com frequência contém moléculas de toxinas incorporadas dentro do revestimento do esporo. Não somente esta toxina tem um efeito direto sobre o inseto, mas também aparece para facilitar a germinação dos esporos no intestino dos mesmos.

Patógenos como *B. thuringiensis*, que infectam diretamente o intestino, podem penetrar a barreira rica em quitina da membrana peritrófica. A adição de quitinases aumenta a atividade inseticida de *Bt*, permitindo fácil acesso de toxinas bacterianas no epitélio do intestino, para sua melhor ligação com os receptores intestinais (Sampson e Gooday, 1998). Regev *et al.* (1996) comprovaram que quitinases recombinantes, aumentam sinergisticamente a atividade da δ - endotoxina Cry IC, de um recombinante *B. thuringiensis*, contra larvas de *Spodoptera littoralis*.

Foi sugerido que a ingestão de partículas orgânicas, presentes na água, protege as células epiteliais do intestino de larvas de mosquitos, pela cobertura de sua superfície e assim impede a avaliabilidade da toxina (Ben-Dov *et al.*, 2002).

A solubilização das proteínas Cry depende do pH alcalino, encontrado no intestino de lepidópteros e dípteros; uma menor efetividade destas proteínas em coleópteros pode ser devida ao pH neutro ou ácido do intestino destes insetos, necessitando, então, de uma ativação *in vitro* (Maagd *et al.*, 2001). Diferenças na atividade proteolítica entre os insetos-alvo podem também ser responsáveis pela especificidade das toxinas, por exemplo, a principal protease digestiva de lepidópteros e dípteros é a serino-protease enquanto nos coleópteros ocorre principalmente cisteíno-proteases (Maagd *et al.*, 2001). A proteína cristal de *B. thuringiensis* é composta primariamente por glicoproteínas, as quais

aparentemente podem ser degradadas pelas proteases, inclusive serino-proteases e metaloproteases, para a produção de fragmentos polipeptídicos menores, que não têm atividade tóxica para insetos, dessa forma as condições de cultivo devem ser controladas, para garantir a potência de *Bt* (Yezza *et al.*, 2006).

Segundo Shimada *et al.* (2006) a toxina Cry 1Ab de *Bacillus thuringiensis*, possui a capacidade de ligar-se a actina do citoesqueleto, mas não possui a capacidade de interferir na integridade das células epiteliais do intestino de mamíferos, provavelmente devido a falta de receptores específicos, os quais são necessários para que a toxina exerça a sua atividade tóxica.

2.4. Mecanismo de resistência a *B. thuringiensis* em insetos

O alto custo das formulações de *Bt*, tem limitado seu uso em países em desenvolvimento, onde o risco de doenças é muitas vezes altíssimo. Em certas situações, o uso de produtos mais baratos como os inseticidas sintéticos, é preferido, apesar do aumento dos riscos à saúde humana e ao ambiente (Federici *et al.*, 2003).

Dessa forma, segundo Clark & Rowley (1984) a eficiência do uso de *B. thuringiensis* var. *israelensis* no controle de mosquitos do gênero *Aedes*, tanto nos EUA como no Brasil, poderia ser uma alternativa ao controle químico desta espécie que, no Brasil, emprega preferencialmente inseticidas químicos como o Temephos (ABATE®) e o Malathion (MALATHION®) (Rabinovitch, 1997). Em diversos estados brasileiros como Ceará, Rio de Janeiro e São Paulo, já existe indicação de resistência a organofosforados em populações de *C. quinquefasciatus*, que pode estar ligada a elevação dos níveis de esterases, observadas por meio de marcadores cromossômicos de amplificação de genes (Campos *et al.*, 2003).

Há relato de níveis variáveis de resistência a *Bti* em diferentes espécies de mosquitos. No trabalho de Saleh *et al.* (2002) uma linhagem de *Culex pipiens* adquiriu um considerável nível de resistência a *Bti*, de pelo menos 2,78 vezes, como resultado de 20 gerações sob pressão de seleção.

No trabalho de Jurat-Fuentes & Adang (2006) foi detectado um novo receptor intestinal de Cry 1Ac, de *Bt*, em *Heliothis virescens*, uma fosfatase alcalina que pode estar envolvida no mecanismo de resistência a esta toxina.

Até o momento, três diferentes mecanismos bioquímicos de resistência a *Bt*, têm sido observados: processamento proteolítico da protoxina, melhoria no reparo das células danificadas do intestino médio e modificação do sítio de ligação da proteína Cry. Todavia, somente o mecanismo de redução da ligação teve uma ligação causal, devido a modificação bioquímica e o decréscimo na suscetibilidade (resistência). Esta observação, junto com a variedade de sítios de ligação das proteínas Cry, em insetos, indica que δ -endotoxinas com diferente especificidade de ligação, devem ser consideradas para uso em estratégias de manejo de resistência (Ferré & Van Rie, 2002).

A variação na suscetibilidade com relação a dois inseticidas biológicos: *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e *B. sphaericus*, não foi marcadamente diferente, entre populações de *Culex pipiens* da Califórnia (Wirth *et al.*, 2001). Portanto, é provável que a diferença primária no risco de resistência, está na presença de um único sítio agindo na toxina binária de *B. sphaericus*, ao contrário da múltipla toxina de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (Georghiou & Wirth, 1997).

Em estudo recente, avaliou-se a utilização da toxina Cyt 1Aa de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* combinada com a toxina de *Bacillus sphaericus*, contra populações de larvas sensíveis e resistentes de *C. quinquefasciatus*, objetivando atrasar a seleção de resistência nas populações deste mosquito (Wirth *et al.*, 2005).

2.5. Toxicidade de linhagens de *B. thuringiensis* a insetos

A avaliação da patogenicidade é um passo importante na seleção de novos isolados, diversos autores como Uribe *et al.* (2003) demonstraram por meio de bioensaios na dose de 100 ng/cm², que três estirpes isoladas na Colômbia, foram ativas contra *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ocasionando taxas de mortalidade variando entre 67,2 e 95%. Estas estirpes apresentavam os genes *cry* 1Ca ou *cry* 1Da em comum.

Em bioensaios para avaliação de patogenicidade, em isolados provenientes de solo da Argentina, contra *A. gemmatilis*, observou-se que 16 estirpes causaram mortalidade igual ou superior a 50%, sendo que quatro causaram mortalidade de 50%, outras quatro estirpes ocasionaram mortalidade entre 60 e 90% e oito estirpes causaram 100% de mortalidade das lagartas (Dias *et al.*, 1999).

A magnitude do efeito sinérgico de esporos vivos de *B. thuringiensis* sorovar *japonensis* com a δ -endotoxina de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* HD-1, foi 120 vezes mais alta, do que cada uma utilizada isoladamente, dois dias após a alimentação com dieta artificial. Todavia, sete dias após o tratamento o efeito sinérgico não foi constatado. Dessa forma o sinérgismo dos esporos vivos com a δ -endotoxina foi observado somente no início do tratamento. Os esporos vivos de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* HD-1 ou *japonensis* exibiram uma redução de 35% do tempo letal sobre *P. xylostella* quando eles foram combinados com a δ -endotoxina de *Bt* sorovar *kurstaki* HD-1 ou HD-73. Portanto, esporos vivos são necessários e acredita-se que o sinérgismo da δ -endotoxina ocorre quando os esporos germinam no intestino dos insetos (Asano *et al.*, 2000).

Em um bioensaio com *Plutella xylostella*, todas as estirpes de *B. thuringiensis*: K2, sorovar *kurstaki* HD-1 e sorovar *aizawai*, ocasionaram 100% de mortalidade das larvas na concentração de 1×10^6 ufc/mL. A estirpe K2 também demonstrou alta atividade tóxica

contra larvas de *Culex pipiens*, sendo sorotipada como *B. thuringiensis* subsp *kurstaki*, com toxicidade similar a subespécie *israelensis* (Lee *et al.*, 2001).

No trabalho de Bobrowski *et al.* (2001), utilizando isolados de solo do Rio Grande do Sul, foi comprovado por meio de bioensaios, que quatro dos nove isolados testados contra *A. gemmatilis*, induziram mortalidade igual ou superior as estirpes padrão: *Bt* sorovar *kurstaki* HD1 – Dipel, *Bt* sorovar *kurstaki* HD73 e *Bt* sorovar *thuringiensis* 4412.

A toxicidade de 87 isolados de *Bt* obtidos de armazéns de grãos, na China, foi avaliada por meio de bioensaios contra *Spodoptera exigua* causando mais que 60% de mortalidade. Os genes *cry* 1A, *cry* 1E e *cry* II, estavam presentes nos isolados, mas nenhum deles continha o gene *cry* III (Hongyu *et al.*, 2001).

Em bioensaios contra *Helicoverpa armigera*, a média de mortalidade da triplicata, foi acima de 70% para o controle positivo, enquanto o controle negativo foi sempre menor que 10%. Três combinações de genes *cry* mostraram alta toxicidade: (a) *cry* 1E, *cry* 1Ia e *cry* 2; (b) *cry*1Aa, *cry* 1Ab, *cry* 1Ad, *cry* 1C, *cry* 1D, *cry* 1F e *cry* 2; (c) *cry* 1D e *cry* 2. Entre as 15 estirpes mais tóxicas nenhuma característica comum foi encontrada. Todavia, quatro delas formaram um grupo muito homogêneo (*Bt* sorovar *aizawai* com os genes *cry* 1Aa, *cry* 1Ab, *cry* 1C, *cry* 1D, *cry* 1Ia e *cry* 2) (Martínez *et al.*, 2005).

A potência de formulações de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* é normalmente avaliada em bioensaios com larvas de *Aedes aegypti* e comparados com o padrão do Instituto Pasteur (França), IPS 82, que tem, um valor arbitrário de 15.000 Unidades Internacionais de Potência (UIP/mg) o mesmo que “International Toxic Units” (ITU) (Vilarinhos *et al.*, 1998). Ainda que o bioinseticida, preferencialmente seja direcionado ao controle de simulídeos, a realização de bioensaios com esta espécie de inseto torna-se inviável em razão da dificuldade de criação dos mesmos em laboratório.

Duas estirpes de *B. thuringiensis*, foram examinadas quanto a sua atividade inseticida contra larvas de dípteros: *A. aegypti*, *A. stephensi* e *C. pipiens molestus*. A estirpe de *B. thuringiensis* sorovar *sotto* foi muito tóxica contra larvas de *A. aegypti* e *A. stephensi*, mas não para *C. pipiens molestus*. Enquanto a estirpe *B. thuringiensis* sorovar *jegathesan*, que apresentava o gene *cry* 24B, não teve atividade larvicida contra nenhuma das três espécies de mosquitos, em concentrações acima de 200 µg/mL. Isto se deve, provavelmente, a similaridade entre os genes *cry* da estirpe *Bt* sorovar *sotto*, com *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (Ohgushi *et al.*, 2005).

Cavados *et al.* (2005) comprovaram através de bioensaios, que a linhagem autoaglutinante, LFB-FIOCRUZ 1035, isolada a partir de *Simulium pertinax*, na região sudeste do Brasil, foi até 2,8 vezes mais efetiva contra *Aedes aegypti* e 25 vezes mais efetiva contra *S. pertinax* do que a linhagem de referência IPS-82, aplicada rotineiramente em programas de controle de larvas de mosquitos na região sudeste do Brasil.

No trabalho de determinação da patogenicidade de 25 isolados de *Bt*, obtidos de solo de diferentes províncias da Argentina, Dias *et al.* (1999) verificaram que 22 (88%) das estirpes mostraram efeito patológico contra *A. gemmatilis* e nenhuma delas mostrou atividade tóxica contra *C. quinquefasciatus*. Enquanto Martin & Travers (1989) observaram que 40,3% de seus isolados foram ativos contra lepidópteros e 22,7% tiveram atividade contra dípteros.

Nas avaliações da patogenicidade de *Bti*, além das taxas de mortalidade, devem ser considerados outros parâmetros, pois segundo Zayed & Bream (2004) em larvas de 3º estágio de *Culex pipiens* (Diptera: Nematocera: Culicidae), observou-se que todos os isolados foram patogênicos em laboratório, causando uma taxa de mortalidade de 84%, sendo que a atividade inseticida destes, prolongou-se até o estágio de pupa, causando um efeito significativo na mortalidade das mesmas. Na emergência dos adultos, verificou-se

evidente malformação e a fecundidade das fêmeas foi afetada significativamente. Além disso, segundo Gore *et al.* (2005) em outros insetos, como larvas de *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 e *Heliothis virescens* Fabricius, 1778 (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dietas artificiais empregando diferentes concentrações de proteínas Cry 1Ac e Cry 2Ab de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Berliner, observaram atraso no desenvolvimento larval, em dosagens elevadas. A quantificação dos efeitos de doses subletais de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* sobre larvas de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) foi realizada por Erb *et al.* (2001), os quais observaram que as larvas desta espécie foram pouco afetadas por doses subletais de *Bt*, enquanto que o desenvolvimento do 4º instar foi atrasado e a massa pupal dos machos foi reduzida.

Wilson *et al.* (2005), realizaram um estudo em laboratório e a campo para avaliar as condições que afetam a potência de uma formulação de *B. thuringiensis israelensis* sorotipo H-14 contra larvas de *Simulium damnosum* e verificaram que a temperatura da água e condutividade foram negativamente correlacionadas, enquanto turbidez e pH foram positivamente correlacionados com os valores de CL₅₀.

Os termos patogenicidade e virulência são muitas vezes erroneamente empregados. A patogenicidade é a capacidade intrínseca do microrganismo penetrar o hospedeiro, ou seja, a capacidade dele provocar a doença. É uma característica genética e qualitativa do microrganismo. A virulência é a velocidade com a qual o microrganismo penetra o hospedeiro, sendo um dos parâmetros mais utilizados para comparar as estirpes isoladas com a linhagem padrão (Thomas & Elkinton, 2004).

Larvas de *Aedes* e *Culex* são geralmente mais suscetíveis a *Bti* e *B. sphaericus* que larvas de *Anopheles*. No trabalho de Fillinger *et al.* (2003) foi constatada alta sensibilidade de *Anopheles gambiae* às formulações testadas. O mesmo foi encontrado para a formulação WDG de *Bti* contra *Aedes* (CL₅₀ de 0,07 ppm) quando comparado a *Anopheles*

gambiae (CL₅₀ de 0,02 ppm). Resultados de bioensaios a campo com *Bti* WDG, mostraram que somente uma dosagem muito baixa de 200g/ha (2700 ITU/mg) é requerida para suprimir efetivamente os instares tardios que resultam em pupas. Tão baixa dosagem de aplicação oferece a possibilidade de manter os custos operacionais mais controlados, mesmo em tratamentos semanais, causada pela falta de atividade residual.

Saadoun *et al.* (2001) verificaram que de 80 isolados de *Bt* avaliados, 18 foram tóxicos para larvas de *Culex* sp. Duas estirpes de referência (*Bti* e *Btk* HD1) foram tóxicas para larvas de *Culex* sp. com valores de CL₅₀ de 6,26 e 6,60, respectivamente. Quando os valores de CL₅₀ do isolado 8₂, foram comparados com os de *Bti*, observou-se que este isolado, necessitou uma concentração de esporos 8-11% mais baixa para matar as larvas.

A mistura de toxinas permite o manejo de resistência em populações de mosquitos, de acordo com o trabalho de Park *et al.* (2005) em testes de CL₅₀ utilizando o isolado selvagem *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14, contra larvas de quarto ínstar de *C. quinquefasciatus*, após 24 e 48 horas, obtiveram-se valores de 5,92 e 4,50 ng/mL, respectivamente. O isolado recombinante apresentando uma mistura da toxina Bin de *B. sphaericus* e a toxina Cyt1A de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, teve sua toxicidade incrementada; baseado nos valores de CL₅₀, após 24 e 48 horas, esta estirpe apresentou-se 5,5 e 9,4 vezes, respectivamente, mais tóxica do que o isolado selvagem.

Em outro trabalho de isolamento de *Bt* a partir de folhas e de solo realizado por Jara *et al.* (2006), a CL₅₀ dos isolados com maior atividade contra larvas de *C. quinquefasciatus* variou entre 1,7 e 33 ng ml⁻¹. Quatro isolados contendo os genes Cry 4 e Cry 11 foram selecionados pela sua alta toxicidade para o 3º ínstar de larvas de *C. quinquefasciatus*. Os isolados 147-0901 e 147-3201 exibiram toxicidade mais alta contra estes insetos (CL₅₀ 1,7 e 2,1 ng ml⁻¹, respectivamente) do que a estirpe padrão de *B. thuringiensis* sor. *israelensis* (CL₅₀ 4,3 ng ml⁻¹).

Segundo Praça *et al.* (2004), apesar das estirpes S234 e S997 terem apresentado toxicidade nos bioensaios seletivos contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, seus valores de CL_{50} foram semelhantes entre si e maiores que o padrão *Bti*, sendo, portanto menos efetivas.

No trabalho realizado por Martínez *et al.* (2004) a linhagem HU4-2, de *B. thuringiensis aizawai*, mostrou pouca toxicidade contra *C. pipiens* e *A. aegypti*, seu valor de CL_{50} foi cerca de 100 vezes mais alto do que aqueles descritos para estirpes de *B. thuringiensis (israelensis ou jegathesan)*.

Promdonkoy *et al.* (2005), verificou que a toxina Cry 4Ba produzida em *E. coli*, foi tóxica para *A. aegypti* ($CL_{50}=140 \text{ ng ml}^{-1}$), porém foi inativa para larvas de *C. quinquefasciatus*. A toxina Cyt 2Aa2 expressada em *E. coli*, exibiu moderada toxicidade contra larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, com CL_{50} de 350 e 250 ng ml^{-1} , respectivamente. A co-expressão das duas toxinas em *E. coli* incrementou a toxicidade para ambas as larvas (CL_{50} de 7 e 20 ng ml^{-1} , respectivamente). Demonstrou-se com isso a alta atividade sinérgica entre as toxinas combinadas.

Com o objetivo de aumentar a atividade inseticida contra lepidópteros, Zhu *et al.* (2006) introduziram o gene vip3Aa7, numa estirpe de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki*. Os resultados dos testes de CL_{50} , revelaram que a toxicidade das estirpes transformantes, contra *Spodoptera exigua*, foi aumentada de 4 a 11 vezes, quando comparadas com a estirpe padrão. Apenas uma estirpe transformante demonstrou toxicidade contra *Helicoverpa armigera*, com valor de CL_{50} similar a estirpe de referência (0,021 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

Bioensaios utilizando toxinas isoladas de *B. thuringiensis*, mostraram que Cry 1Aa exibiu alta toxicidade contra *Helicoverpa armigera* com um valor de CL_{50} de 0,338 mg g^{-1} , mas somente um baixo nível de toxicidade contra *S. exigua*, com um valor de CL_{50} de 3,936 mg g^{-1} . Ao contrário Cry 1C exibiu, relativamente, maior toxicidade para *S. exigua*,

com uma CL_{50} de 1,466 mg g⁻¹, apresentando somente moderada toxicidade contra *H. armigera*. Quando Cry 1C e Cry 1Aa, foram misturadas, esta combinação demonstrou ser mais tóxica para *S. exigua* do que para *H. armigera*, do que as toxinas utilizadas de forma isolada, confirmando-se o efeito sinérgico de diferentes combinações de toxinas (Xue *et al.*, 2005).

De acordo com Praça *et al.* (2004) das 300 estirpes testadas, apenas S234 e S997, foram selecionadas para os testes de CL_{50} . A estirpe S234 foi a mais efetiva contra *S. frugiperda* e apresentou CL_{50} três vezes menor que a do padrão utilizado, *Btk*. Já a estirpe S997 se mostrou tão virulenta quanto o padrão. Em relação a *A. gemmatalis*, as estirpes S234 e S997, se mostraram semelhantes ao padrão *Btk*, em relação a mortalidade.

Uma estirpe denominada de Leapi01 foi isolada a partir de larvas mortas do lepidóptero *Mythimna loreyi* durante uma epizootia natural em cultura de milho, na Espanha. Os testes de CL_{50} demonstraram que esta estirpe apresentou atividade tóxica similar a *Btk*, quando testada em *Helicoverpa armigera* e exibiu uma atividade inseticida intermediária quando comparada a *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, contra *Spodoptera littoralis* (Porcar & Caballero, 2000). Silva *et al.* (2004) isolaram uma estirpe de solo que demonstrou um valor de CL_{50} 2,6 vezes menor do que a estirpe *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* HD-1, contra larvas de *Spodoptera frugiperda*. A estirpe S1265 foi a mais efetiva contra *A. gemmatalis*.

A eficiência de *B. thuringiensis*, sobre larvas de mosquitos, é influenciada por fatores ambientais como a exposição à luz solar e temperatura, quantidade e composição de nutrientes, qualidade da água, densidade larval e co-habitação com outros organismos filtradores de alimento que competem entre si. A diluição do patógeno e inibição alimentar na presença de partículas não-alimentares, são consideradas as maiores causas para a redução da mortalidade (Kondo *et al.*, 1995). A taxa de ingestão é mais rápida na presença

de alimento do que com partículas não-nutritivas, indicando um papel de fagoestimulação pelos componentes químicos, mas é inibida em proporção da concentração de ambos os tipos de partículas (Gaugler & Molloy, 1980).

2.6. Vantagens da utilização de toxinas produzidas por *B. thuringiensis*

O mercado mundial de agroquímicos está estimado em 20 bilhões de dólares, dos quais 25% corresponde ao controle de insetos. Apenas pequena proporção deste mercado (1,6%) está baseada na utilização de inseticidas biológicos, dos quais o *B. thuringiensis*, representa 90-95 %. De um modo geral, em 2002, aproximadamente 360 toneladas de *Bti* foram usadas no combate de vetores no Brasil (Funasa, 2002), consumindo US\$ 2,2 milhões.

Entre as vantagens da utilização de *B. thuringiensis* destacam-se: sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência de toxicidade às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986). De acordo com Becker (2000), todos os estudos feitos após a introdução de *Bti*, mostram que ocorreu um controle eficiente, sem que fossem constatados danos ao ambiente, não havendo redução da biodiversidade nos locais tratados.

A partir de um estudo sobre o uso repetido de bioinseticidas comerciais, como Vectobac G, para o controle de larvas de mosquitos, verificou-se que este produto, não mostrou ter maior impacto ecológico em reservas naturais. Os esporos de *Bti* tenderam ao desaparecimento no ecossistema, de aproximadamente 10 vezes após 220 dias, apesar da aplicação sazonal deste larvicida biológico, por muitas décadas (De Respinis *et al.*, 2006).

De acordo com Vilarinhos *et al.* (1998), a eficiência das formulações de *Bti* varia de 96 a 100% até 72 horas após a aplicação do produto. Com esta alta eficiência, apesar do

Bti atuar somente sobre larvas, ele restringe o nível populacional dos mosquitos de tal modo, que o inseto torna-se incapaz de causar epidemia. Para confirmar isso, diversos testes a campo têm sido realizados. Uma formulação desenvolvida pelo Instituto Oswaldo Cruz, de

B. thuringiensis sor. *israelensis*, estirpe IPS-82, denominada INPALBAC, foi testada em córregos no Rio Grande do Sul, contra *Simulium pertinax*, atingindo 100% de mortalidade das larvas, resultados similares já haviam sido obtidos antes, quando duas formulações comerciais de *Bti* foram usadas no mesmo local (Mardini *et al.*, 1999).

Testes em laboratório mostraram que *Bti* pode persistir por até 100 dias quando dissolvido na água. Ensaio a campo mostraram um efeito residual de uma formulação por duas a três semanas. Diversos fatores ambientais influenciam na efetividade de *Bti* em programas de controle de mosquitos, incluindo a alta temperatura e exposição a luz solar.

Comprovou-se que a irradiação dos esporos por luz ultravioleta, causa uma dramática redução no efeito sinérgico, sugerindo que a germinação dos mesmos, é importante para sua patogenicidade. Em um estudo comparativo de laboratório entre duas formulações, obteve-se alto efeito residual, sendo que Vectobac G foi até duas vezes mais persistente que Aquabac G (95% até 101 e 45 dias, respectivamente) (Lima *et al.*, 2005).

Devido ao seu modo de ação, *B. thuringiensis* apresenta uma potência biológica alta quando comparada aos inseticidas químicos, estimando-se que *Bti* aplicado em proporções da ordem de 25×10^{20} esporos/ha é 300 vezes mais potente que piretróides sintéticos e 80.000 vezes mais potente que organofosforados (Feitelson *et al.*, 1992). Uma característica de todas as linhagens mosquitocidas é a presença da toxina Cyt, a qual não é muito tóxica quando aplicada isoladamente.

Segundo Wirth *et al.* (2005) o principal componente inseticida de *Bti* é um corpo paraesporal esférico produzido durante a esporulação e composto de 4 proteínas principais: Cyt 1Aa, Cry 4Aa, Cry 4Ba e Cry 11Aa. Este corpo paraesporal é um dos inseticidas mais conhecidos, com uma CL₅₀ numa escala de 10ng/mL, contra o 4º ínstar de várias espécies de mosquitos. O amplo espectro de atividade e a alta toxicidade do *Bti*, são devidos a interação sinérgica entre Cyt 1Aa e as proteínas Cry, assim como o sinergismo existente entre as proteínas Cry.

Num estudo feito por Armengol *et al.* (2005), eles comprovaram que as toxinas Cry 4Ba, Cry 4Aa, Cry 11Aa e Cyt 1Aa de *Bti* interagem sinergisticamente e são altamente tóxicas contra larvas de mosquitos. Todavia uma limitação de *Bti* para o uso no controle de mosquitos é a baixa persistência, causada pela rápida sedimentação do complexo esporo-cristal na água, necessitando freqüente aplicação. Para superar este problema, tem sido feita a transferência dos genes das toxinas mosquitocidas de *Bti* para diversos microrganismos aquáticos que habitam as camadas mais superficiais.

Segundo Guerchicoff *et al.* (2001) outros fatores inseticidas também contribuem para o efeito biológico final, entre eles as proteínas inseticidas vegetativas (Vip), além de proteases, quitinases, exotoxinas e lipases, têm sido descritas. Ao contrário da proteína-cristal, a qual pode ser efetiva na ausência de uma célula *Bt* viável, as toxinas Vip requerem claramente uma célula em crescimento vegetativo para exercerem seu efeito patogênico (Bravo *et al.*, 2002). As Vips não mostraram nenhuma similaridade com as δ -endotoxinas de *Bt*. Estas proteínas vegetativas possuem toxicidade da mesma magnitude das δ -endotoxinas, contra insetos suscetíveis. O espectro inseticida das Vips incluem pragas importantes, que tem mostrado serem insensíveis as δ -endotoxinas de *Bt* (Bhalla *et al.*, 2005).

Mais de 100 genes que codificam para proteínas Cry têm sido isolados até agora; eles constituem uma família biodiversa contra insetos-alvo, nematóides e protozoários. Linhagens de *Bt* anti-dípteros, comumente caracterizam-se pela presença de proteínas Cyt, com atividade citolítica e hemolítica. As toxinas Cyt podem agir de maneira menos específica, como um detergente, de acordo com esta hipótese, a toxina adsorvida sobre a superfície da membrana, forma agregados não-específicos sobre esta estrutura, o que a desestabiliza e causa defeitos no empacotamento dos lipídios, através do qual o citoplasma pode escapar para fora da célula. Eventualmente a membrana lipídica é quebrada em proteínas micelares e lipídios complexos, e a célula é completamente desintegrada. A toxina forma canais ou poros, que mediam a lise colóide osmótica das células epiteliais, no intestino do inseto, eventualmente matando-o por inanição (Manceva *et al.*, 2005).

2.7. Reservatórios naturais para a obtenção de isolados de *Bacillus thuringiensis*

Os dados sobre a diversidade e ecologia de bactérias do gênero *Bacillus* em substratos naturais (solos, plantas, insetos e carcaças de animais), são restritos. Alguns estudos pontuais como o isolamento de *Bt* de amostragens de solo, mostram que, entre vinte mil bactérias isoladas, aproximadamente oito mil têm sido identificadas como *B. thuringiensis* (Martin, 1994). O fator chave para utilização de *Bt*, corresponde à toxicidade dos corpos de inclusões paraesporais (cristais), sendo que cerca de 60% dos isolados obtidos de amostras de solo, têm sido tóxicos para larvas de lepidópteros e dípteros, enquanto o restante não apresenta efeito entomopatogênico (Lereclus *et al.*, 1993).

A busca de linhagens de *Bt* com alta atividade tóxica e diferentes especificidades a insetos é de extrema importância tanto para a produção de novos biopesticidas, como para

a utilização destas linhagens como fonte de genes, para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos (Bobrowski *et al.*, 2001).

Estudos ecológicos relatam que o solo pode ser considerado como um depósito dos esporos, sua multiplicação não ocorre em função das células vegetativas de *Bt* morrerem rapidamente no ambiente, possivelmente devido a sua incapacidade de competirem com microrganismos autóctones. Isto é reforçado por alguns autores que relatam o decréscimo significativo do número de células de *Bt* em solos não esterilizados quando comparado a solos esterilizados (Martin & Travers, 1989; Ferreira *et al.*, 2003).

Considerando a hipótese de que os esporos de *Bt* encontram-se no ambiente como resultado da morte de insetos alvo, espera-se que a distribuição desta bactéria ocorra aleatoriamente e que os isolados de um mesmo lugar sejam similares. Desta forma os estudos de Martin (1994), demonstraram que as amostras de solo que apresentam isolados tóxicos para uma dada espécie de inseto, são raras, quando comparadas com outras que contém isolados de *Bt* com amplo espectro entomopatogênico. Entretanto, algumas podem conter linhagens tóxicas, ou não, simultaneamente, para lepidópteros e dípteros.

Este patógeno pode se multiplicar em microhabitats favoráveis como, por exemplo, os insetos-alvo, embora possa crescer e esporular em solos ricos em nutrientes. No entanto devido à sua baixa ocorrência epizootica, é pouco provável que a principal fonte de toxinas e esporos sejam os insetos colonizados. Também existe a hipótese que esse patógeno tenha algum tipo de relação simbiótica, provavelmente com plantas, para explicar a produção de toxinas tão específicas e eficientes (Aronson & Shai, 2001). Foi sugerido que a morte de larvas de insetos por *Bt*, poderia ser uma fonte de nutrientes para os esporos e que, dessa forma, todas as subespécies deste microrganismo que ocupam o mesmo nicho ecológico, seriam beneficiadas (Apoyolo *et al.*, 1995).

Kim (2000), sugeriu que o isolamento de *B. thuringiensis* de habitats onde ocorre o

inseto-alvo é a forma mais eficiente para selecionar novas linhagens díptero-ativas ou lepidóptero-ativas. Em seus testes de toxicidade, os isolados de solo, ativos contra dípteros, foram menos freqüentes, quando comparados com os isolados de solo, ativos contra lepidópteros.

De acordo com Rampersad & Ammons (2005) existe um grande interesse no isolamento de novas linhagens de *Bt*, com especificidade a um único hospedeiro ou elevada toxicidade. Em seus experimentos, grande proporção de isolados (33,5% a 98%), continham o gene Cry 1 ou um cristal de forma bipiramidal, conhecido pela toxicidade contra lepidópteros praga.

A busca de novos isolados de *Bt* e sua caracterização tem sido realizada por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo. Estes isolados têm sido importantes para o controle de insetos, pois representam novas alternativas no Manejo Integrado de Pragas.

B. thuringiensis é encontrado em todos os ambientes terrestres e também insetos mortos, plantas e detritos (Uribe *et al.*, 2003). O número de células obtidas de *Bt* varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 ufc/cm^{-2} (Damgaard, 2000).

No trabalho de Hajaij *et al.* (2005) foi verificado que a variação na quantidade de *Bacillus*, durante a reprodução dos mosquitos, depende mais do biótopo larval do que da estação do ano ou aplicação do larvicida. Maiores quantidades de bacilos foram encontrados no solo ($10^4 - 10^6$ esporos/g) do que em amostras de plantas ($10^2 - 10^4$ esporos/g). A abundância na água (10^5 a 10^7 esporos/g) parece estar correlacionada com o nível de água do local de reprodução dos mosquitos.

A diversidade geográfica de 115 isolados de *Bt*, provenientes de 493 amostras de solo da Espanha, foi estudada por Quesada-Moraga *et al.* (2004) que mostraram que o solo

de praias, é uma fonte mais pobre de *Bt*, enquanto florestas e habitats agriculturáveis e urbanos, mostraram porcentagem similar desta bactéria.

Num trabalho de isolamento realizado na Antártica, Forshyt & Logan (2000) verificaram que das 62 amostras estudadas, 36 (58%), produziram bactérias aeróbicas formadoras de endósporos e três produziram isolados identificados como *B. thuringiensis*, sendo que duas destas amostras foram coletadas em local raramente visitado por humanos, sugerindo que estes microrganismos se estabeleceram no solo, antes que existisse chance de contaminação.

Bernhard *et al.* (1997) examinaram a morfologia de cristais de 2973 isolados e observaram a predominância de cristais bipiramidais, esféricos, retangulares ou cubóides ou ainda na forma de pontos irregulares. De acordo com observações feitas por Glare & O'Callaghan (2000) os cristais bipiramidais são tóxicos para lepidópteros, enquanto que os ovóides e cubóides mostram atividade para lepidópteros e dípteros, demonstrando desta forma a relação entre o formato do cristal e especificidade inseticida.

Apesar do *Bt* ter ampla distribuição ambiental, esta pode não estar relacionada com a distribuição dos insetos alvo (Schnepf *et al.*, 1998). Assim, os trabalhos iniciais de isolamento de *Bt* (Höfte & Whiteley, 1989), foram associados aos insetos hospedeiros. Entretanto Martin (1994) menciona que, amostrando áreas com alta e baixa densidade de insetos para determinar o índice de *Bt*, observa-se uma baixa frequência de isolados em solos de climas temperados e tropicais onde ocorrem muitos insetos, ao passo que amostras de solos de 5.540 m de altitude (coletadas no Himalaia) apresentaram os maiores índices de ocorrência de *Bt*, sendo que os isolados identificados, apresentaram toxicidade às espécies de lepidópteros e dípteros que não ocorrem no local de origem das amostras, no Nepal. Considerando ainda os ecossistemas, especialmente os terrestres, pode-se observar que *Bt* tem sido raramente encontrado em areias de praias e camadas de solos abaixo de

dez centímetros de profundidade, porém tem sido isolado freqüentemente em florestas, campos, lavouras e áreas urbanas (Höfte & Whiteley, 1989; Martin, 1994; Schnepf *et al.*, 1998).

Bt é uma bactéria esporulante, Hossain *et al.* (1997) e Glare & O'Callaghan (2000) ressaltam que os esporos permanecem em latência no solo entre 3 e 16 meses. Assim sendo, dentro deste período, os esporos precisam germinar, crescer e formar esporos para continuarem viáveis. A germinação dos esporos pode ser prejudicada em solos arenosos, devido a pouca quantidade de nutrientes e água. Os cristais e esporos de *Bt* podem persistir no sedimento por pelo menos 22 dias e exibir atividade larvicida quando o sedimento é suspenso na camada de água (Sheeran & Fisher, 1992). Um estudo demonstrou que os esporos podem sobreviver por longos períodos no solo ou em partes da planta, mas que seu nível permanece estável através do tempo. Nenhuma germinação foi observada em folhas ou diretamente no solo, mas foi observada germinação no trato digestivo de minhocas, sugerindo assim, que a sobrevivência de *Bt* poderia ser um processo dinâmico, envolvendo germinação, divisão celular e esporulação em microhabitats favoráveis (Hendriksen & Hansen, 2002).

Benz (1997) sugeriu que os microrganismos do solo são responsáveis pela perda da atividade da δ -endotoxina e pela inativação parcial dos esporos. Embora o pH básico (>7) seja o mais favorável para o crescimento de *Bt*, valores mais baixos, não inviabilizam a presença deste patógeno, provavelmente ele permanece latente nestas condições e quando encontra valores mais favoráveis, desenvolve-se normalmente.

A obtenção de *B. thuringiensis* a partir de insetos pode representar uma fonte de novos isolados com elevada especificidade.

Utilizando insetos-praga, coletados em áreas de plantio de batata, na Bolívia, Hernandez *et al.* (2005) isolaram *Bt* de 60% das amostras. A maior porcentagem de amostras contendo esta bactéria, foi isolada de larvas de *Rhigopsidius tucumanus* (78%).

Pinto *et al.* (2003) isolaram *Bt* de duas espécies de formigas do gênero *Acromyrmex* e verificaram que 40% das amostras avaliadas revelaram a presença desta bactéria, os ensaios *in vivo* evidenciaram mortalidade superior a 50% na população-alvo, sendo que o isolado Bt HA48, causou 100% de mortalidade.

De acordo com Hansen *et al.* (1997) dos 8 isolados obtidos de *Pieris brassicae* e *Trichoplusia ni*, 5 foram tóxicos para larvas de ambas as espécies, demonstrando que existe uma atividade inseticida específica em relação ao hospedeiro. Praticamente todas as linhagens encontradas em ambientes naturais são efetivas contra Lepidoptera e linhagens de *Bt* ativas contra Diptera ou Coleoptera são mais difíceis de se isolar, por esta razão, uma das alternativas é o isolamento utilizando larvas mortas pertencentes a estas ordens (Mohammedi *et al.*, 2006).

Segundo Praça *et al.* (2004) a toxicidade a algumas estirpes de insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas de *Bt* encontradas, ou mesmo pela interação destas com os esporos. Dessa forma, torna-se necessário realizar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto, para confirmar a toxina responsável pela mortalidade.

Os genes das ICPs estão presentes em plasmídeos conjugativos, este tipo de organização, facilita a recombinação e troca destes elementos, fornecendo um importante mecanismo de geração de novas especificidades. Uma recombinação eficiente pode ser obtida, quando existe suficiente densidade de células e os esporos germinam em um meio adequado, fornecido pela larva morta (Aronson, 1993).

No trabalho de Maeda *et al.* (2001) um total de 18 isolados de *B. thuringiensis* foram recuperados de oito amostras de sedimentos (36,4%), sendo que dois isolados exibiram alta toxicidade contra larvas de *Culex pipiens molestus* e células de mamíferos. Outros 16 isolados não mostraram toxicidade contra mosquitos e células de mamíferos e nove isolados mostraram atividade tóxica contra a lagarta *Plutella xylostella*.

Num estudo recente, Shan *et al.* (2005) avaliaram o fluido intestinal de diferentes invertebrados e sua habilidade para extrair proteínas *Bt* do solo. Para tal, desenvolveram um fluido intestinal artificial para extração destas proteínas, obtendo resultados efetivos, o que pode representar uma ferramenta útil para recuperação das proteínas *Bt* no solo. Verificaram também, que a degradação de proteínas por microrganismos do solo e sua ligação irreversível com partículas do mesmo, são consideradas como o principal fator que pode afetar a avaliabilidade de proteínas no solo. Uma outra suspeita é que a proteína poderia decompor-se ou desnaturar-se a temperatura ambiente, contribuindo para sua diminuição, o que não foi confirmado pelos experimentos. A meia-vida da proteína purificada Cry 1Ac no solo ficou na faixa de 18 a 40 dias, dependendo das condições do solo.

No trabalho de Monnerat *et al.* (2002) foram isoladas 15 estirpes de diferentes partes de plantas de algodão e uma estirpe a partir de solo onde as plantas se encontravam. Dentre as estirpes isoladas de plantas, seis foram tóxicas para *A. gemmatilis* e *S. frugiperda*. Foi detectada a presença de *B. thuringiensis* nas larvas de *S. frugiperda* após maceramento e isolamento. A estirpe encontrada também apresentou a proteína de 130 kDa e a presença de genes Cry1. Nas lagartas utilizadas como controle, que foram alimentadas com dieta artificial, não foi detectada a presença de *B. thuringiensis*.

Durante investigações da extração de Cry 1Ac do solo, Palm *et al.* (1994) encontraram que alto pH favorece a extração de proteínas do solo. Isto é consistente com a

melhora de solubilidade das proteínas Cry 1Ac e Cry 1F, que é verificado sob condições básicas.

A observação de que diferentes espécies de insetos têm adquirido resistência às toxinas *Bt*, torna necessário o isolamento e a identificação de novas proteínas desta bactéria. Torna-se então importante, estudos sobre a expressão gênica, espectro de ação e especificidade das toxinas Cry.

2.8. Caracterização dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Em função da alta variabilidade de *Bt*, é imprescindível a caracterização dos isolados, podendo-se, para tal, empregar diversos recursos. A microscopia de contraste de fase permite verificar a presença do cristal, sendo esta seguida pela caracterização sorológica, com base nos antígenos flagelares (H). Estes métodos têm sido considerados muito trabalhosos às pesquisas que envolvam análise da diversidade ou montagem de um banco de *Bt*.

A caracterização do complexo esporo-cristal de *B. thuringiensis* é realizada pela análise protéica por SDS-PAGE. A utilização desta técnica, é uma ferramenta sensível e pode fornecer informações valiosas dentre-espécies ou similaridade de subespécies de bactérias Gram- positivas e Gram-negativas (Vandamme *et al.*, 1996). Esta técnica, tem sido comumente utilizada para caracterizar isolados de *B. thuringiensis*. Eletroforese das proteínas totais da célula, de *B. thuringiensis*, isolada à partir do intestino de pequenos mamíferos (Rodentia e Insectivora) produziram 20-30 bandas com peso molecular de 20-120 kDa (Swiecicka *et al.*, 2002).

No trabalho de Pinto & Fiuza (2003), o perfil dos isolados de solo de *B. thuringiensis* foi altamente variável, com a identificação de 14 classes de proteínas Cry, que são codificadas pelos isolados analisados, através de comparações entre os pesos moleculares obtidos e os pesos conhecidos para as proteínas Cry. Diversas outras proteínas que não correspondem as proteínas Cry já conhecidas (Schnepf *et al.*, 1998) foram encontradas, o que pode representar novos genes *cry* ainda não conhecidos. Além disso, quatro isolados apresentaram várias bandas com baixo peso molecular, que pode ser devido a degradação das proteínas cristal de *Bt*.

No trabalho de isolamento de Hajaij *et al.* (2005) a partir de solo, água e plantas, verificou-se que 386 isolados apresentaram corpos de inclusão, sendo que 330 foram identificados como *Bti* (seis de solo, 60 da água e 264 de plantas) destes, 56 foram submetidos a análise por SDS-PAGE. Vinte e quatro destas estirpes tiveram um perfil típico das proteínas cristal de *Bti* de 130 kDa (Cry 4A e Cry 4B), 68-72 kDa (Cry 11A) e 28 kDa (Cyt 1A). A análise de SDS-PAGE de uma nova estirpe isolada a partir de amostras de solo na China, também apresentou uma banda de massa molecular de 130 kDa, com o incremento do tempo de crescimento, a concentração da proteína tóxica foi aumentada gradualmente (Yu *et al.*, 2006).

A análise por SDS-PAGE de uma estirpe de *B. thuringiensis* isolada de amostras de solo, demonstrou três classes de proteína-cristal, em torno de 130 kDa (Cry 4 A, Cry 4 B e Cry 10 A); 68 kDa (Cry 11 A) e 28 kDa (Cyt 1 A) , o qual foram idênticas a *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 (Choi *et al.*, 2004).

Utilizando larvas mortas de *Melolontha melolontha* (Coleoptera : Scarabaeidae), Kurt *et al.* (2005) isolaram uma nova estirpe, que produziu proteínas de 65 kDa. O perfil de SDS-PAGE desta linhagem foi comparado com 29 diferentes linhagens que produziam Cry 3Aa e verificou-se a biossíntese desta proteína por esta nova estirpe.

Segundo Medeiros *et al.* (2005) a análise de SDS-PAGE das proteínas presentes nas estirpes de *B. thuringiensis*, apresentaram dois polipeptídeos principais de aproximadamente 130 e 65 kDa, descritas como eficazes para lepidópteros. Somente uma estirpe não apresentou o perfil protéico de 130 kDa.

Num estudo sobre a esporulação e a toxicidade de *B. thuringiensis* H14 em função da aeração, Sarrafzadeh & Navarro (2006), concluíram que em condições limitadas de aeração, durante o processo de síntese das δ -endotoxinas, ocorre a ausência da banda de 130 kDa, o que foi visualizado pela análise de SDS-PAGE, obtendo-se uma fraca atividade tóxica nos testes com larvas de *C. quinquefasciatus*, enquanto uma alta toxicidade foi observada em condições de saturação de oxigênio, onde a banda de 130 kDa torna-se mais intensa.

Konecka *et al.* (2006) isolaram do trato intestinal de larvas de *Cydia pomonella* L. durante epizootias em laboratório, diversas subespécies de *B. thuringiensis*; os resultados de SDS-PAGE, da proteína total das células, revelaram uma possibilidade de aplicar a análise do perfil de proteínas em investigações epidemiológicas de infecções causadas por *B. thuringiensis*.

Uma estirpe de *B. thuringiensis* denominada K1, foi isolada a partir de amostras de solo da Coreia, sendo selecionada com base na sua atividade tóxica contra espécies de *Spodoptera* spp. As proteínas da inclusão paraesporal de K1 e de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 foram analisadas por SDS-PAGE. O isolado K1 apresentou 2 bandas maiores que foram similares ao perfil de bandas de *Bt* subsp. *kurstaki* HD1 (Li *et al.*, 2002).

No trabalho de isolamento a partir de larvas e adultos de *S. pertinax* coletadas em diferentes rios do estado do Rio de Janeiro e São Paulo, Cavados *et al.* (2001) obtiveram 18 linhagens de *B. thuringiensis*. Os resultados da análise de SDS-PAGE do cristal

protéico, de duas linhagens, mostraram um perfil de proteínas diferente, quando comparado com a linhagem IPS-82 de *Bti*. Este perfil apresentou múltiplos componentes, variando entre 55 kDa e 100 kDa. As demais linhagens apresentaram o mesmo perfil de proteínas da linhagem padrão, IPS-82.

Uma nova estirpe de *B. thuringiensis*, denominada A4, foi obtida de amostras de solo da Grécia, consistindo de dois polipeptídeos com massa molecular de 140 e 32 kDa, que exibiu atividade inseticida contra moscas adultas de *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). O isolamento destes polipeptídeos por meio de subclones, permitiu concluir que a atividade inseticida deve-se inteiramente ao polipeptídeo de 140 kDa presente na linhagem parental (Sivropoulou *et al.*, 2000).

Diversas estirpes de *B. thuringiensis* foram isoladas do sedimento e de solo (incluindo criadouros de mosquitos e rizosfera de plantas). Uma estirpe, nomeada LFB-Fiocruz 710, foi particularmente interessante por causa de sua alta toxicidade contra larvas de *Simulium pertinax*. Pela caracterização por SDS-PAGE, esta estirpe mostrou o mesmo perfil de proteínas da estirpe padrão *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 (Rabinovitch *et al.*, 1999).

Outra forma para caracterizar isolados de *Bt*, é a técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), amplamente utilizada na detecção de novos genes *cry* (Valicente *et al.*, 2000; Hansen & Hendriksen, 2001) onde os “primers” podem ser desenhados a partir de regiões conservadas destes genes. Além disso, esta técnica permite comparar geneticamente isolados pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (Porcar & Juárez-Pérez, 2003).

A técnica de PCR requer quantidades pequenas de DNA e permite uma rápida e simultânea caracterização de muitas amostras. Este procedimento tem sido usado para determinar a presença ou ausência de genes *cry* em particular, sendo altamente sensível

rápida e podendo ser facilmente usada para estudar sua distribuição ou detectar novos genes *cry*. Todavia, o procedimento normal de PCR não pré-determina exatamente a atividade inseticida da estirpe, assim como outros fatores como, por exemplo, o nível de expressão dos genes *cry* presentes que estão envolvidos no potencial inseticida de cada estirpe (Martínez *et al.*, 2005).

O uso de PCR teve um grande aperfeiçoamento para a detecção de genes *cry*, todavia este método requer um amplo número de primers. Diversos primers universais degenerados foram designados para amplificar todos os membros de diferentes subfamílias de genes *cry*. Embora o uso destes oligonucleotídeos degenerados incremente a probabilidade de amplificação de novos genes, a eficiência é restrita para detecção de genes relativos ao mesmo grupo (Berón *et al.*, 2005).

Existem perspectivas da utilização de proteínas *Bt*, como, por exemplo, o uso da mistura espora-cristal de *Bt* para a bioabsorção de metais pesados em solução aquosa (Sahin e Ozturk, 2005). Finalmente, diversos grupos têm estudado o potencial de linhagens não inseticidas de *Bt* como um tratamento anti-câncer (Katayama *et al.*, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento de linhagens de *Bacillus*

O isolamento das linhagens de *Bacillus*, foi feito a partir de amostras de solo, provenientes de 10 municípios da Serra Gaúcha (Figura 1) incluindo locais da área urbana (terrenos baldios), área rural (vegetação nativa) e dípteros e lepidópteros, principalmente àqueles mortos por sintomas de ataque por microrganismos (corpo amolecido e coloração escura). A coleta foi realizada preferentemente em áreas onde não houve histórico de aplicação de produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*.

A coleta de amostras de solo foi realizada com uma pá, cavando até 10 cm de profundidade. O material foi peneirado em uma malha de 0,4 mm, sendo a secagem realizada a temperatura ambiente. A armazenagem foi feita em frascos de vidro, a temperatura de 25°C (Lezama-Gutiérrez & Ham, 2001).

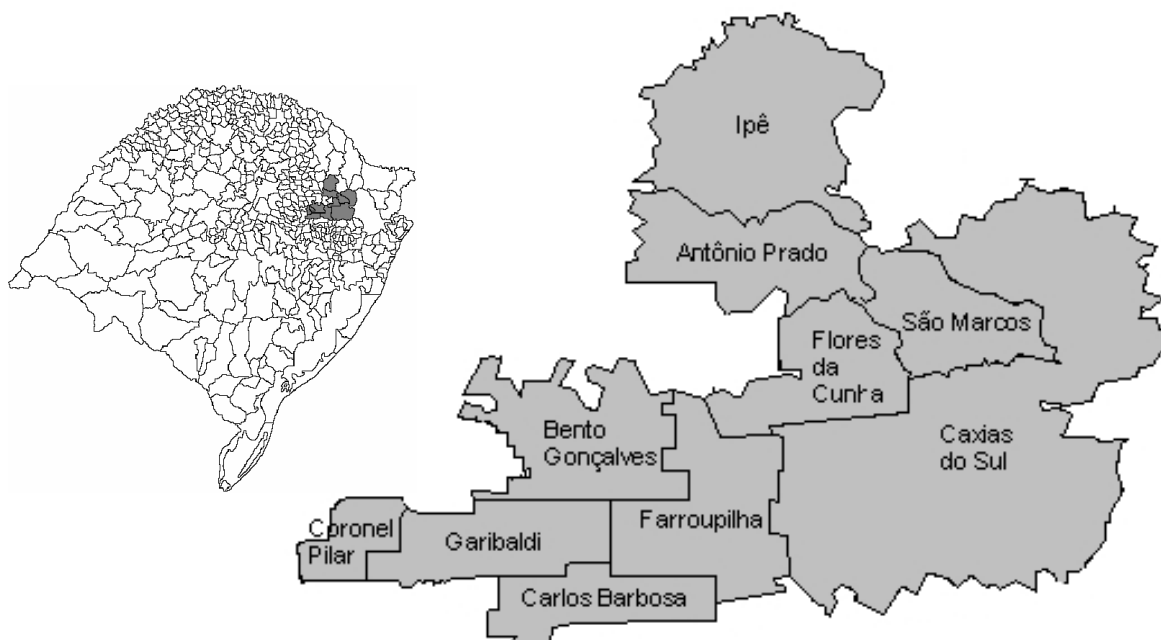


Figura 1. Mapa do Rio Grande do Sul, destacando os municípios onde foram obtidas amostras de solo e de insetos para isolamento de *B. thuringiensis*.

Para o isolamento a partir de solo, um grama de cada amostra, foi colocado em tubos esterilizados, com 10 mL de solução salina esterilizada (CaCO_3 , 0,05g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005g; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005g e 500 mL de H_2O destilada) e agitado em vortex por 2 minutos. Em seguida, 1,0 mL foi transferido para eppendorf esterilizado e submetido a aquecimento por 12 minutos a 80°C e 5 minutos no gelo, para eliminação de células vegetativas. As amostras foram então diluídas 10 e 100 vezes em solução salina esterilizada, uma alíquota de 100 μL da última diluição foi distribuída em placas de Petri contendo meio ágar nutritivo (ágar 23g; extrato de levedura 1g; K_2HPO_4 1g; H_2O destilada 1000 mL) e incubadas a 30°C por 48 horas. Tanto para as amostras de solo como para os insetos após a incubação, as colônias isoladas de *Bacillus* spp., foram selecionadas, levando-se em consideração caracteres morfológicos, como a ausência de pigmentação, bordos ondulados e forma circular (World Health Organization, 1985).

Insetos mortos que apresentavam corpo amolecido e coloração escura, foram utilizados para o isolamento das bactérias, seguindo a metodologia descrita por Alves *et al.* (1998):

- a) Insetos utilizados: *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae), *Anicla ignicans* Guenée, 1852 e *Agrotis malefida* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae) foram lavados com hipoclorito de sódio 10% e água destilada, imergindo alguns segundos em cada um dos líquidos, repetindo três vezes o procedimento.
- b) As larvas foram trituradas em solução salina, usando um almofariz esterilizado.
- c) Alíquotas de 1mL do macerado foram transferidas para tubos de ensaio esterilizados.

d) Submetidas a choque térmico, diluídas apropriadamente, inoculadas em meio LB (Luria Bertani) e incubadas durante 24 horas.

e) Após a incubação as colônias isoladas de *Bacillus* spp., foram selecionadas seguindo a mesma metodologia descrita para as amostras de solo.

3.2. Identificação e caracterização de *B. thuringiensis*

3.2.1. Seleção de bactérias esporulantes e não - esporulantes

A partir das colônias pré-selecionadas pelo método descrito no item 3.1, foi feita a transferência individual com palito esterilizado, sendo este transferido para tubo de ensaio contendo 50 µL de Meio Usual Glicosado “MUG” (De Barjac & Lecated, 1976) contendo: 50g de glicose em 100mL de H₂O destilada esterilizada, 50 µL de solução de penicilina na concentração de 100mg/L e 5 mL de meio Usual [KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, (Fe₂(SO₄)₃), H₂SO₄, CaCl₂, H₂O e peptona bacteriológica]. O crescimento foi realizado em incubador de agitação a 28°C, 180 rpm, por 24h; selecionando-se apenas os tubos que apresentavam o meio turvo, transferindo-se 1mL de cada um deles para eppendorfs esterilizados.

3.2.2. Identificação dos isolados por microscopia de contraste de fase

A partir dos meios selecionados no item 3.2.1, foram preparadas lâminas com 23µL de cada amostra, cobertas com lamínula e uma gota de óleo de imersão. A diferenciação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* foi efetuada pela presença de cristais protéicos visualizados em microscopia de contraste de fase (Leica®) (Silva-Werneck & Monnerat, 2001). Foram empregadas para os bioensaios apenas as amostras identificadas como *B. thuringiensis*.

3.2.3. Quantificação das proteínas dos isolados de *B. thuringiensis* e análise por SDS-PAGE

3.2.3.1. Determinação das proteínas pelo método de Bradford

A concentração de proteínas de cada isolado, para o SDS-PAGE, foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para reação fez-se uma diluição de 1/10 de cada amostra em água destilada esterilizada. Após 10 minutos, o complexo foi quantificado em espectrofotômetro a 595 nm.

A concentração das proteínas foi estimada com o uso de soluções padrão de albumina bovina entre 2 e 20 µg/mL. Foram construídas curvas e foi feita uma análise de regressão pelo Programa SPSS 14.0.

O reagente de Bradford foi composto de 0,01% de Comassie Brilliant Blue G250, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido fosfórico, sendo o volume completado com água destilada. Foi preparado 24 horas antes do uso e mantido sob refrigeração por no máximo dois meses no escuro.

A composição do complexo esporo-cristal foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida de sódio dodecil sulfato a 12%. Uma colônia bacteriana, crescida em Ágar nutriente, foi transferida e cultivada em 10mL de meio LB por 52 horas, para cada isolado. As amostras foram centrifugadas a 5500 g por 15 min a 4°C. Uma alíquota de 100 µL das suspensões bacterianas, foi dissolvida em 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de Mercaptoetanol e 0,1% de Bromofenol blue, aquecidas a 100°C por 10 minutos. O SDS-PAGE foi realizado de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A massa molecular das proteínas Cry encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 Classe de proteínas Cry e sua massa molecular em kDa (kiloDaltons).

Classe	Massa molecular (kDa)	Classe	Massa molecular (kDa)
Cry 1	130-140	Cry 11	72-84
Cry 2	70-71	Cry 13	88
Cry 4	128-135	Cry 15	38
Cry 5	135-152	Cry 18	76-79
Cry 7	129-130	Cry 19	75-78
Cry 8	130-134	Cry 20	86
Cry 10	78	Cry 22	79

Fonte: Pinto e Fiuza (2003).

3.3 Bioensaios para avaliação da patogenicidade e da virulência

3.3.1 Criação de insetos a serem utilizados em bioensaios

As avaliações foram feitas utilizando dípteros (*C. quinquefasciatus*) e lepidópteros (*A. gemmatilis*). A criação de *C. quinquefasciatus* foi realizada em gaiolas de acrílico, mantidas em uma sala climatizada, hermeticamente isolada, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 horas e umidade relativa de 80%, de acordo com a metodologia descrita em Consoli & Oliveira (1994). Durante a fase adulta, o repasto sanguíneo das fêmeas, foi feito colocando-se codornas anestesiadas nas gaiolas; os machos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10% disponibilizada em um cone de papel filtro. Para a oviposição dos insetos, foram colocadas no ambiente placas com, no mínimo, 30cm^2 de área e 2 cm de filme de água contendo levedo de cerveja. As placas foram substituídas diariamente, e as que apresentavam oviposição, foram mantidas até a eclosão das larvas. As larvas recém eclodidas foram transferidas para bandejas de 35 x 27 cm, com 5 cm de profundidade, adicionando-se levedo de cerveja na proporção de 10mg/L. O desenvolvimento das larvas foi observado diariamente para o acompanhamento dos instares até a formação das pupas. As pupas foram retiradas diariamente com pipetas e transferidas para gerbox com água limpa, os quais foram colocados nas gaiolas para a emergência dos adultos.

As lagartas de *A. gemmatalis* utilizadas nos bioensaios em laboratório, foram provenientes da criação mantida em dieta artificial (Parra, 2001) no Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

3.3.2 Avaliação da patogenicidade dos isolados

Os isolados de *Bt* foram cultivados em 10mL de MUG a 28°C e 180rpm por 72 horas, após o material foi submetido a centrifugação por 15 minutos a 5590 g, para eliminação do meio de cultura. Em seguida foram preparadas suspensões de 10^{-1} e 10^{-2} em água destilada esterilizada, determinando-se o número de células bacterianas conforme metodologia descrita por Alves (1998).

Para os bioensaios com larvas de *C. quinquefasciatus*, uma alíquota de 200µl da suspensão de *Bt*, na concentração de 3×10^8 esporos e cristais, foi aplicada em cada copo contendo 100mL de água desclorada e 0,01g de levedo de cerveja. Em cada copo distribuíram-se 25 larvas de 3º instar contando-se as mortas após 48 horas. Os ensaios foram conduzidos em triplicata; para o controle positivo, utilizou-se a linhagem IPS-82 e para o controle negativo somente água desclorada e a dieta com o mesmo número de larvas. Para manutenção dos bioensaios a temperatura da sala foi mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 65% $\pm 10\%$ UR e 14h de fotofase.

Nos bioensaios com *A. gemmatalis* foi utilizada a mesma suspensão de *Bt*. Uma alíquota de 100µl de *Bt* e uma gota de Tween 20, foi aplicada sobre discos de folhas de feijão medindo 25 mm de diâmetro, distribuídas em placas de acrílico. Após a evaporação do excesso de umidade, 30 lagartas de terceiro instar foram acondicionadas em grupos de 5. Para o controle negativo aplicou-se água destilada esterilizada e uma gota de Tween 20, em volume equivalente aos lotes tratados. Os bioensaios foram avaliados no 2º e no 7º dia (Silva-Werneck & Monnerat, 2001) após a aplicação, sendo que no segundo dia a folha de

feijão foi substituída por dieta artificial livre do patógeno. Utilizou-se para o acondicionamento câmara incubadora tipo B.O.D. regulada para 25°C, 65% $\pm$ 10% UR e 12h de fotofase.

3.3.3 Avaliação da virulência dos isolados

Os bioensaios para avaliação da virulência, foram realizados com a linhagem padrão IPS-82, 11 isolados de solo e cinco isolados de insetos que apresentaram as maiores taxas de crescimento, contra larvas de 3º instar de *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis* seguindo a metodologia recomendada pela WHO (1999):

- i) Os patógenos, na sua forma pura, foram quantificados, sendo sua viabilidade certificada;
- ii) Após contagem em câmara de Neubauer, foram preparadas suspensões, nas concentrações de $1,5 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^7$ esporos/mL⁻¹, que foram usadas para inocular, com o auxílio de um micropipetador, os recipientes contendo as larvas ou lagartas;
- iii) O alimento foi fornecido aos insetos, sendo o conjunto mantido em condições adequadas de temperatura e luminosidade (26°C e fotofase de 14 horas);
- iv) Após 48 horas foram contadas e retiradas as larvas mortas; no caso das lagartas foi feita a contagem após 48 horas e no 7º dia do bioensaio.

A virulência de *Bti* foi comparada com a linhagem padrão IPS-82 (WHO, 1999) através de bioensaios em laboratório seguindo metodologia descrita.

Foram testadas as concentrações descritas, com três repetições e o controle. Os resultados foram avaliados pelo método de análise estatística Probit (Programa SPSS 14.0) determinando-se CL₅₀. Quando necessário, as taxas de mortalidade foram corrigidas pela fórmula de Abbott (1925).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho baseia-se na prospecção de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo e de insetos provenientes de 10 municípios da Serra Gaúcha, envolvendo atividades de isolamento (Figura 2) e caracterização.

4.1. Isolamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* a partir de amostras de solo e insetos

Durante as atividades de isolamento foram selecionadas 721 colônias bacterianas, sendo que destas, 555 (76,9%) foram obtidas de amostras de solo da área urbana e rural e 166 (23,0%) de insetos mortos. Das colônias selecionadas, 231 (32,0%), foram identificadas pela presença de cristais paraesporais, por meio de microscopia de contraste de fase, como sendo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Destes isolados 172 (30,9%) foram oriundos de amostras de solo e 59 (35,5%) de insetos. O percentual de isolados de *Bt*, de amostras de solo, deste trabalho, encontra-se entre 20 a 70% semelhante ao referido por Chilcot e Wigley (1993). Diversos trabalhos de isolamento a partir de amostras de solo encontraram percentuais maiores, como Uribe *et al.* (2003), os quais demonstraram que 82% das amostras de solo analisadas continham pelo menos uma estirpe de *Bt* e Bravo *et al.* (1998), obtiveram 90% de amostras de solo com a presença de *Bt*. A semelhança entre os percentuais de isolados de *Bt* a partir de solo e de insetos, observada neste estudo, corrobora os resultados descritos por Chilcot & Wigley (1993), os quais verificaram que tanto solo quanto os insetos são boas fontes para o isolamento desta bactéria.

O percentual de *Bt*, recuperado a partir do isolamento de insetos mortos, neste estudo, foi inferior aos 60% e 40% encontrados por Hernandez *et al.* (2005) e Pinto *et al.* (2003), respectivamente.

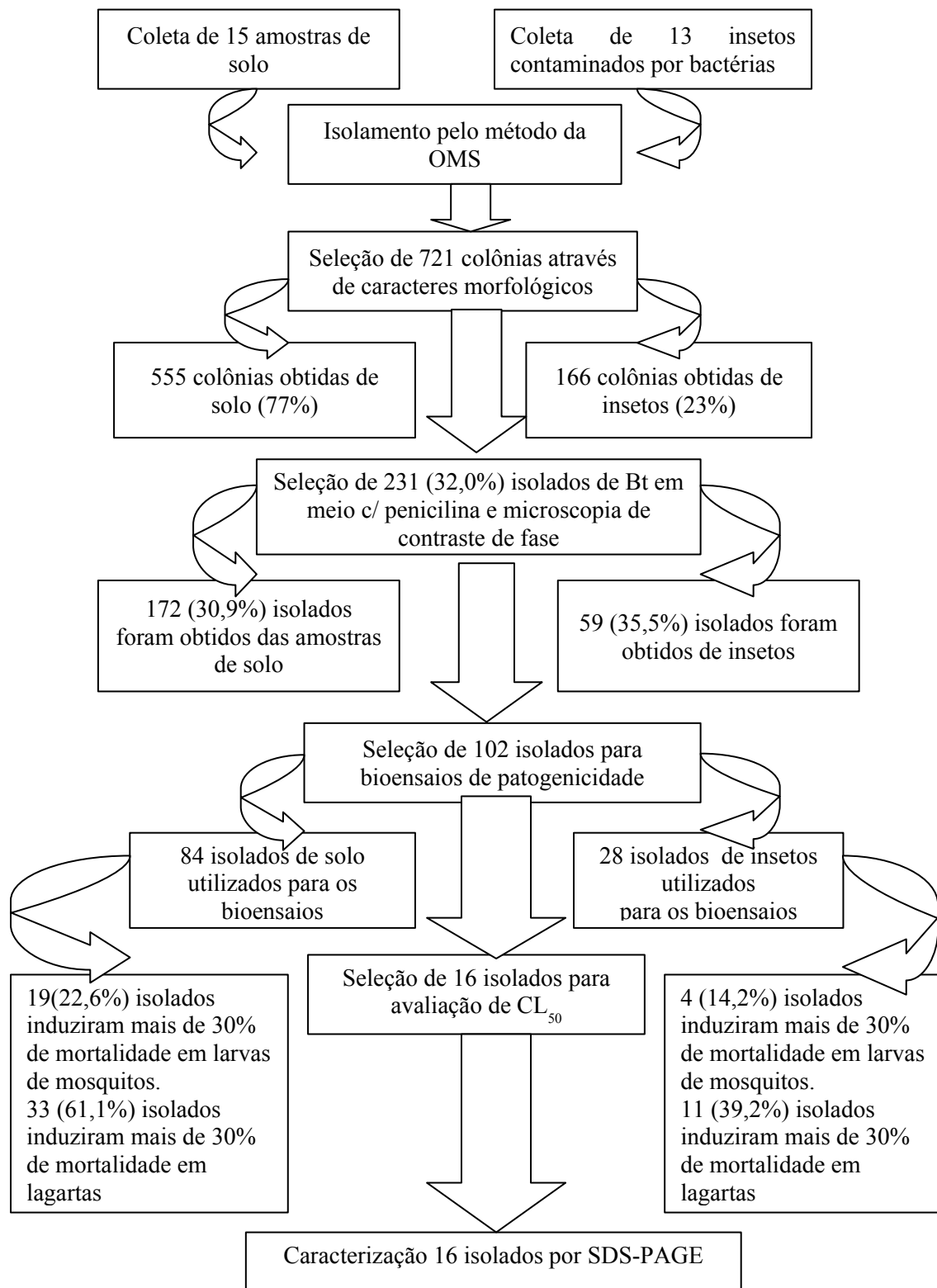


Figura 2. Fluxograma das principais etapas para a obtenção e seleção dos isolados de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo e de insetos.

4.2. Patogenicidade dos isolados *B. thuringiensis* obtidos de solo sobre *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis*

Apesar da importância da caracterização molecular dos isolados, a expressão relativa de cada um dos genes, e também interações (sinergismo ou antagonismo) das proteínas do cristal, podem limitar a predição da toxicidade medida por esta técnica. (Porcar *et al.*, 2000). Da mesma forma, a atividade biológica de uma estirpe não pode ser completamente determinada com base, somente, no conteúdo dos genes *cry*. A proporção relativa das proteínas Cry produzidas, suas interações e a possível presença de proteínas do cristal, não detectadas, não permite uma correlação direta entre as informações de PCR e a atividade biológica de uma estirpe. A quantificação da toxicidade pelos bioensaios com insetos, é uma das formas para determinar o potencial de uma estirpe para o controle de pragas (Martínez *et al.*, 2004). Desta forma, iniciou-se pela avaliação da patogenicidade dos isolados para posterior caracterização dos mais tóxicos.

A patogenicidade de *Bt* obtido a partir de amostras de solo da área urbana e rural, foi testada para os 84 isolados que apresentaram a maior taxa de esporulação. Na avaliação da patogenicidade, foram obtidos resultados de todos os isolados contra larvas de *C. quinquefasciatus* e de 54 contra *A. gemmatalis* (Tabela 2). Entre os isolados que causaram mais de 30% de mortalidade observou-se um maior percentual lepidóptero-ativo (61,1%) do que díptero-ativo (22,6%). Resultados semelhantes encontram-se descritos nos trabalhos de Martin & Travers (1989) os quais verificaram atividade de 40,3% dos isolados a partir de solo, contra lepidópteros e apenas 22,7% contra larvas de mosquitos. Diversos autores não verificaram atividade patogênica dos isolados contra dípteros, como Dias *et al.* (1999) que obtiveram 88% dos isolados de solo ativos contra *A. gemmatalis*, enquanto nenhuma atividade patogênica foi obtida em larvas de *Culex quinquefasciatus* e Martínez e Caballero (2002) os quais verificaram que 65% das linhagens isoladas de habitats

terrestres, foram tóxicas contra duas espécies de lepidópteros (*Helicoverpa armigera* e *Spodoptera exigua*), porém nenhuma foi tóxica para larvas do díptero (*Tipula oleracea*). Em testes de toxicidade contra *Plutella xylostella* (Lepidoptera) e *Culex pipiens* (Diptera), utilizando isolados de solo provenientes de florestas, lavouras, montanhas, pomares, pastagens e áreas urbanas, Kim (2000) verificou que isolados díptero-ativos eram raramente encontrados, quando comparados com isolados lepidóptero-ativos. No trabalho de Hongyu *et al.* (2001) verificou-se um alto percentual de isolados de *Bt* (71,31%) tóxicos para *Spodoptera exigua*. Com relação à reduzida efetividade de isolados, a partir de solo contra dípteros, Saadoun *et al.* (2001) obtiveram 22,5% dos isolados tóxicos para larvas de *Culex* sp.

O maior número de isolados tóxicos para insetos foi obtido a partir de amostras de solo da área rural (Tabela 2), onde presumivelmente a diversidade e densidade de dípteros e lepidópteros é maior do que em áreas urbanas. Pelo contrário, Martin & Travers (1989) analisando estirpes de *Bt* originadas de diversos habitats, não encontraram uma forte associação entre o ambiente onde vivem os insetos e a toxicidade.

A comparação entre a atividade tóxica de cada isolado contra *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis* demonstrou que 6 isolados de solo rural foram 4,5 a 30 vezes mais tóxicos sobre as lagartas do que sobre os mosquitos (Tabela 2). Entretanto, somente quatro destes apresentaram diferença significativa (Tabela 3). Dez isolados de solo urbano foram 2 a 10 vezes mais tóxicos para lagartas (Tabela 2), entretanto apenas 5 apresentaram diferença significativa (Tabela 4). Estes resultados demonstram que os isolados de *Bt* tóxicos para insetos obtidos a partir de solo rural e a maioria daqueles provenientes de solos urbanos apresentam maior atividade contra lepidópteros, conforme já verificado por Martínez e Caballero (2002) e Dias *et al.* (1999). A maior atividade entomopatogênica destes isolados contra *A. gemmatalis* pode ser atribuída à presença da proteína de 130 kDa, que é ativa para

insetos da ordem Lepidoptera (Dias *et al.*, 1999) conforme será descrito posteriormente no item 4.5.

Observou-se que diversos isolados apresentaram atividade tóxica tanto para *C. quinquefasciatus* quanto para *A. gemmatalis*, destacando-se os isolados SR-AP5 e SR-VV2, oriundos de solo rural (Tabela 2). Esta dupla atividade tóxica de linhagens de solo contra lepidópteros (*A. gemmatalis* e *S. frugiperda*) e dípteros (*C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*) também foi constatada por Silva *et al.* (2004) e Martinez *et al.* (2004).

Cabe destacar que os isolados SR-AP5 e SR-VV2 causaram percentuais de mortalidade superiores à linhagem padrão (IPS 82) contra larvas de *C. quinquefasciatus* (Tabela 2). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Ibarra *et al.* (2003) utilizando estirpes isoladas a partir de amostras de solo do México, Brasil e Colômbia, contra larvas de *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* e *Anopheles albimanus*, demonstrando que algumas das estirpes locais, apresentaram três vezes mais atividade contra *A. aegypti* e duas vezes mais atividade contra larvas de *C. quinquefasciatus*, quando comparada com a estirpe controle *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* HD567. Uma estirpe apresentou atividade inseticida similar contra *A. aegypti*, quando comparada com *Bti* HD567.

Entre os 54 isolados de solo testados contra *A. gemmatalis* observou-se que 22 (40,7%) induziram as melhores taxas de mortalidade (50 a 100%) (Tabela 2). Dias *et al.* (1999) já haviam observado comportamento semelhante em 16 estirpes de solo da Argentina, que causaram mortalidade igual ou superior a 50% em *A. gemmatalis*.

Bobrowski *et al.* (2002) testando dois isolados de *Bt* provenientes de solo do RS contra *A. gemmatalis*, também obtiveram altos níveis de mortalidade.

A constatação que diversos isolados de *Bt* obtidos de solo, demonstraram dupla atividade tóxica (Tabela 2) demonstra a necessidade de se fazerem testes de patogenicidade e virulência, para posterior avaliação das toxinas presentes em cada isolado, a fim de

correlacioná-las com a especificidade aos insetos-alvo. O fato de diversos autores já terem demonstrado esta dupla atividade, como Silva *et al.* (2004) e Martínez *et al.* (2004) em isolados de *Bt* a partir de amostras de solo, sugere que antes da produção comercial de um bioinseticida, se faz necessária a avaliação da especificidade para evitar a mortalidade de invertebrados não-alvo como já foi constatado por Schoenly *et al.* (2003).

Tabela 2. Percentual de mortalidade das larvas de *C. quinquefasciatus* e lagartas de *A. gemmatilis* aos isolados de solo da área rural e urbana

Isolados	Origem	mortalidade larvas (%)	mortalidade lagartas (%)	Isolados	Origem	mortalidade larvas (%)	mortalidade lagartas (%)
SR-AP5*	I	100,00	100,00	SU-SM1*	II	72,00	88,67
SR-VV2*	I	100,00	66,33	SU-BF4*	II	68,00	66,00
SR-AP2	I	86,67	66,67	SU-GBA1*	II	60,00	55,00
SR-CB2*	I	69,00	55,00	SU-BF7	II	57,33	77,33
SR-AP1	I	64,00	88,67	SU-ALF7	II	52,00	33,00
SR-AP3	I	56,00	77,33	SU-SM5	II	46,67	55,00
SR-VV1**	I	41,33	55,33	SU-FAR2	II	44,00	13,33
SR-CR5	I	34,67	66,67	SU-GBA2	II	44,00	88,67
SR-CB3	I	31,00	22,00	SU-GBA3	II	32,00	22,00
SR-AP4	I	25,33	22,00	SU-ALF3	II	32,00	NT
SR-VV3	I	24,00	40,00	SU-FAR3*	II	29,33	44,00
SR-CB4	I	24,00	26,67	SU-GBA5	II	27,00	66,00
SR-CR2*	I	22,67	100,00	SU-FAR16	II	25,33	NT
SR-CR1	I	18,67	26,67	SU-ALF6*	II	25,33	88,67
SR-AP11	I	17,33	26,67	SU-FAR5	II	24,00	NT
SR-CR4	I	16,00	33,00	SU-BF3	II	21,33	6,67
SR-FC1	I	16,00	22,00	SU-SM4	II	21,33	NT
SR-AP6	I	16,00	22,00	SU-GBA8	II	21,33	66,67
SR-AP10	I	13,33	22,00	SU-FAR4	II	20,00	6,67
SR-AP12	I	12,00	6,67	SU-ALF2	II	20,00	NT
SR-AP7	I	12,00	13,33	SU-SM2	II	16,00	77,33
SR-CP1	I	10,67	22,00	SU-SM3	II	13,33	NT
SR-IVS3	I	10,67	46,67	SU-SM5	II	12,00	NT
SR-CB7	I	10,67	22,00	SU-GAL1	II	12,67	40,00
SR-FC2	I	9,33	22,00	SU-ALF1	II	10,67	NT
SR-AP9	I	8,00	13,33	SU-GB1	II	9,67	26,67
SR-CB1	I	6,67	60,00	SU-BF8	II	9,67	NT
SR-CP2	I	6,67	60,00	SU-GBA4	II	8,00	53,33
SR-IVS2	I	5,33	NT	SU-BF1	II	6,67	NT
SR-CB5	I	5,33	NT	SU-GBA9	II	5,33	NT
SR-AP13	I	4,00	22,00	SU-FAR1	II	5,33	NT
SR-AP15	I	3,67	NT	SU-SM12	II	5,33	26,67
SR-CB8	I	2,67	40,00	SU-GAL2	II	4,00	13,33
SR-CB6	I	2,67	NT	SU-ALF8	II	4,67	NT
SR-CR3	I	2,67	60,00	SU-GBA6	II	5,33	40,00
SR-FC3	I	2,67	NT	SU-BF6	II	4,67	6,67
IPS-82	--	98,67	NT	SU-ALF5	II	3,67	NT
				SU-BF5	II	1,67	NT
				IPS-82	--	100,00	NT

(NT) não testado (I) solo área rural (II) solo área urbana. Os isolados que causaram percentuais de mortalidade <1%, contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, foram omitidos da tabela.

* Isolados que foram selecionados para avaliação de CL₅₀ de ambas as espécies.

**Isolados que foram utilizados para avaliação de CL₅₀ somente de lagartas.

Tabela 3. Comparação entre os percentuais médios de mortalidade de larvas de Diptera e de Lepidoptera, para cada isolado de *Bacillus thuringiensis*, proveniente de solo rural, com respectivos erros-padrão. Teste *t* para duas médias (n= 3) presumindo-se variâncias diferentes ao nível de 95% probabilidade.

Isolados	DIPTERA		LEPIDOPTERA		Significância
	Percentual médio	Erro Padrão	Percentual médio	Erro Padrão	
SR-AP5	100,00	0,00	100,00	0,00	ns
SR-VV2	100,00	0,00	66,33	19,34	ns
SR-AP2	86,67	3,53	66,67	33,33	ns
SR-CB2	69,00	31,00	55,00	11,00	ns
SR-AP1	64,00	23,44	88,67	11,33	ns
SR-AP3	56,00	14,42	77,33	11,33	ns
SR-VV1	41,33	4,81	55,33	29,36	ns
SR-CR5	34,67	12,72	66,67	33,33	ns
SR-CB3	31,00	5,00	22,00	22,00	ns
SR-AP4	25,33	4,81	22,00	22,00	ns
SR-VV3	24,00	2,31	40,00	11,55	ns
SR-CB4	24,00	7,77	26,67	13,33	ns
SR-CR2	22,67	9,33	100,00	0,00	*
SR-CR1	18,67	5,81	26,67	5,90	ns
SR-AP11	17,33	1,33	26,67	5,21	ns
SR-CR4	16,00	10,58	33,00	0,00	ns
SR-FC1	16,00	6,36	22,00	10,39	ns
SR-AP6	16,00	8,33	22,00	6,24	ns
SR-AP10	13,33	5,33	22,00	6,11	ns
SR-AP12	12,00	6,93	6,67	6,67	ns
SR-AP7	12,00	3,46	13,33	6,67	ns
SR-CP1	10,67	2,67	22,00	3,79	ns
SR-IVS3	10,67	4,81	46,67	26,67	ns
SR-CB7	10,67	1,33	22,00	3,21	ns
SR-FC2	9,33	3,33	22,00	7,37	ns
SR-AP9	8,00	2,31	13,33	1,67	ns
SR-CB1	6,67	1,33	60,00	11,55	ns
SR-CP2	6,67	1,76	60,00	10,41	*
SR-AP13	4,00	2,31	22,00	4,16	*
SR-CB8	2,67	0,33	40,00	10,00	ns
SR-CR3	2,67	1,33	60,00	0,00	*

ns – não significativo * significativo.

Tabela 4. Comparação entre os percentuais médios de mortalidade de larvas de Diptera e de Lepidoptera, para cada isolado de *Bacillus thuringiensis*, proveniente de solo urbano, com respectivos erros-padrão. Teste *t* para duas médias (n= 3) presumindo-se variâncias diferentes ao nível de 95% probabilidade.

Isolados	DIPTERA		LEPIDOPTERA		Significância
	Percentual	Erro	Percentual	Erro	
	médio	Padrão	médio	Padrão	
SU-SM1	72,00	6,11	88,67	11,33	ns
SU-BF4	68,00	4,00	66,00	11,00	ns
SU-GBA1	60,00	10,07	55,00	11,00	ns
SU-BF7	57,33	3,53	77,33	11,33	ns
SU-ALF7	52,00	8,33	33,00	19,05	ns
SU-SM5	46,67	25,96	55,00	11,00	ns
SU-FAR2	44,00	4,00	13,33	1,67	*
SU-GBA2	44,00	6,00	88,67	11,33	*
SU-GBA3	32,00	15,14	22,00	11,00	ns
SU-FAR3	29,33	4,81	44,00	11,00	ns
SU-GBA5	27,00	9,85	66,00	0,00	ns
SU-ALF6	25,33	9,84	88,67	9,33	*
SU-BF3	21,33	5,81	6,67	6,67	ns
SU-GBA8	21,33	5,81	66,67	3,33	*
SU-FAR4	20,00	6,11	6,67	6,67	*
SU-SM2	16,00	6,11	77,33	8,51	ns
SU-GAL1	12,67	8,67	40,00	11,55	ns
SU-GB1	9,67	3,18	26,67	6,67	*
SU-GBA4	8,00	4,62	53,33	24,04	ns
SU-SM12	5,33	2,03	26,67	6,67	ns
SU-GAL2	4,00	0,58	13,33	13,33	ns
SU-GBA6	5,33	2,19	40,00	20,00	ns
SU-BF6	5,33	2,03	6,67	2,89	ns

ns – não significativo; * significativo.

4.3. Patogenicidade de isolados de *B. thurigiensis* oriundos de díptero e lepidópteros

A partir dos 59 isolados oriundos de díptero e lepidópteros, foram selecionados 28 para os bioensaios (Tabela 5). Destes, quatro (14,2%) induziram mais de 30% de mortalidade em larvas de *C. quinquefasciatus* e 11 (39,2%) para lagartas de *A. gemmatilis*. Observou-se que três (ID-MD4, ID-MD1, ID-MD5) apresentaram toxicidade para ambos os insetos, quatro isolados (ID-MD4, ID-MD1, ID-MD3, ID-MD5) apresentaram maior toxicidade para larvas de mosquitos, enquanto sete isolados (IL-ANI4, IL-ANIH, IL-ANI3, IL-ANI2, IL-AGR3, IL-AGR1, IL-AGR2) foram mais tóxicos para lagartas. Porém três (IL-AGR4, IL-AGR6 e IL-AGR11) foram pouco tóxicos para as espécies testadas. A maioria dos autores referem uma alta especificidade de *Bt* aos hospedeiros (Hansen *et al.*, 1997; Mohammedi *et al.*, 2006). Dessa forma a ocorrência de alguns isolados tóxicos para ambas as espécies indica a ocorrência de isolados não-específicos. Autores como (Glare & O' Callaghan, 2000; Joung & Côté, 2000; Schoenly *et al.*, 2003) já relataram o efeito de *Bt* sobre invertebrados não-alvo, o que justifica a seleção de linhagens com alta especificidade para diminuir os efeitos deletérios ao ambiente.

Quando os isolados foram comparados em relação aos insetos dos quais foram obtidos, verificou-se que em média, os isolados obtidos de mosca doméstica, foram mais efetivos contra *C. quinquefasciatus*. Entretanto não observou-se diferença significativa entre o percentual médio de mortalidade de *A. gemmatilis*, induzido a partir de isolados de lepidópteros e dípteros (Tabela 6). Apesar de não terem sido verificadas diferenças significativas entre a mortalidade média causada pelos isolados obtidos de dípteros e lepidópteros contra lagartas de 3º instar de *A. gemmatilis* (Tabela 6) destaca-se que os isolados mais tóxicos para este lepidóptero, foram obtidos de representantes da mesma ordem (um de *A. ignicans* e três de *A. malefida*), o que corrobora a idéia de especificidade em relação ao hospedeiro do qual o isolado foi obtido (Hansen *et al.*, 1997, Mohammedi *et*

al., 2006).

O isolado ID-MD4 apresentou o mesmo padrão de mortalidade da linhagem IPS-82, porém os isolados oriundos de lepidópteros demonstraram serem pouco patogênicos contra larvas de *C. quinquefasciatus* (Tabela 5). Cavados *et al.* (2005) descrevem comportamento semelhante ao comprovarem que a linhagem isolada a partir de *S. pertinax*, coletado em campo na região Sudeste do Brasil, foi mais efetiva em bioensaios contra *A. aegypti* e *S. pertinax*, do que a linhagem comercial de referência, IPS-82.

Os isolados recuperados a partir de lagartas infectadas naturalmente, apresentaram maior especificidade ao hospedeiro (Tabela 5), em relação aos isolados de solo e de mosca (Tabelas 2 e 5). Resultados semelhantes foram observados com isolados de *Bt*, obtidos de insetos por Aronson (1993).

Tabela 5. Percentual de mortalidade das larvas de *C. quinquefasciatus* e lagartas de *A. gemmatalis* aos isolados de insetos.

Isolados de insetos	Origem	% mortalidade <i>C.</i> <i>quinquefasciatus</i>	% mortalidade <i>A.</i> <i>gemmatalis</i>
ID-MD4*	<i>Musca domestica</i>	100,00	66,33
ID-MD1*	<i>Musca domestica</i>	98,67	55,00
ID-MD3	<i>Musca domestica</i>	92,67	NT
ID-MD5	<i>Musca domestica</i>	40,00	33,00
IL-ANI4*	<i>Anicla ignicans</i>	18,67	100,00
IL-ANI3	<i>Anicla ignicans</i>	10,67	40,00
IL-ANIH**	<i>Anicla ignicans</i>	6,67	33,00
IL-ANI2	<i>Anicla ignicans</i>	5,33	53,33
IL-AGR3**	<i>Agrotis malefida</i>	0,67	88,67
IL-AGR1	<i>Agrotis malefida</i>	0,67	77,33
IL-AGR2	<i>Agrotis malefida</i>	0,67	55,00
IL-AGR5	<i>Agrotis malefida</i>	5,33	33,67
IL-AGR9	<i>Agrotis malefida</i>	NT	10,67
IL-AGR7	<i>Agrotis malefida</i>	NT	8,00
IL-AGR11	<i>Agrotis malefida</i>	6,67	6,67
IL-AGR6	<i>Agrotis malefida</i>	5,33	22,00
IL-AGR4	<i>Agrotis malefida</i>	8,00	22,00
IPS-82	--	100,00	NT

(NT) não testado (ID) isolado de díptero (IL) isolado de lepidóptero.

Isolados que induziram percentuais de mortalidade de insetos < 0,5% foram excluídos da tabela.

* Isolados que foram utilizados para avaliação de CL₅₀ de ambas as espécies.

**Isolados que foram utilizados para avaliação de CL₅₀ somente de lagartas.

Tabela 6. Análise de variância do percentual médio de mortalidade de *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis*, induzido por isolados de *B. thuringiensis* obtidos a partir lepidópteros e díptero.

Origem do isolado	N	<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>A. gemmatalis</i>
<i>Agrotis malefida</i> (Lepidoptera)	20	4,05 ^b	42,50 ^a
<i>Anicla ignicans</i> (Lepidoptera)	13	9,61 ^b	57,31 ^a
<i>Musca domestica</i> (Diptera)	9	79,55 ^a	51,44 ^a
Significância		0,000	0,420

Médias seguidas de letras diferentes, em cada coluna, diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4. Virulência dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Considerando-se que a virulência de um patógeno refere-se a quantificação de seu potencial para desencadear a doença no hospedeiro, foram selecionados 16 isolados que apresentaram a maior taxa de crescimento, para cálculo de CL_{50} sobre *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis*, conforme destacado nas tabelas 2 e 5.

O isolado mais tóxico dentre os estudados, contra larvas de *C. quinquefasciatus* foi SU-BF4 (Tabela 7) com valor de CL_{50} não diferindo estatisticamente daquele obtido com a linhagem padrão IPS-82. Em trabalhos em que são feitas comparações entre a toxicidade de isolados e o padrão, normalmente é referida a ocorrência de estirpes menos efetivas (Praça *et al.*, 2004 ; Martínez *et al.*, 2004) com valores de CL_{50} maiores que o padrão, sendo consideradas, por isso, menos tóxicas. Entretanto autores como Saadoun *et al.* (2001) e Jara *et al.* (2006) identificaram isolados cujo valor de CL_{50} foi inferior ao padrão *Bti*, necessitando de uma concentração menor de esporos para matar as larvas.

Cabe destacar que o isolado SU-BF4 ocasionou um percentual médio de mortalidade semelhante ao de SU-SM1 e SU-GBA1 (Tabela 4), que apresentaram valores de CL_{50} significativamente maiores (Tabela 7). Dessa forma, o percentual médio de mortalidade não é suficiente para a seleção de isolados mais efetivos.

Na avaliação da CL_{50} contra lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, verificou-se que os isolados mais tóxicos foram, IL-ANI4, SR-AP5, SU-SM2, SR-CR2, não apresentando

diferença estatística entre eles (Tabela 8) sendo que o isolado IL-ANI4 foi obtido a partir de *Anicla ignicans*, proveniente de uma criação massal de laboratório, alimentada com azevém (*Lolium multiflorum* Lam. – Gramineae) coletado a campo. A infecção de lagartas em laboratório, pela ingestão de alimento coletado a campo, foi comprovada por Monnerat *et al.* (2002) os quais detectaram a presença de *B. thuringiensis* em larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de algodão, nas quais previamente havia sido constatada a presença desta bactéria por meio de isolamento, indicando a possibilidade destas larvas terem sido infectadas pela ingestão de folhas. Porcar & Caballero (2000) também obtiveram um isolado a partir de lepidóptero, durante uma epizootia natural, referindo uma alta atividade tóxica contra duas espécies de lepidópteros (*H. armigera* e *S. littoralis*).

Dos 11 isolados obtidos a partir de solo, em que foi avaliada a CL₅₀ contra *A. gemmatilis* (Tabela 8) quatro mostraram-se mais efetivos. Este resultado é comparável àquele referido por Praça *et al.* (2004) e Silva *et al.* (2004) que isolaram a partir de amostras de solo, diversas estirpes efetivas contra *A. gemmatilis*, com valores de CL₅₀ semelhantes ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Tabela 7 Concentração Letal Mediana (CL₅₀) de diferentes isolados de *B. thuringiensis* obtidos de solo e de insetos contra larvas de *Culex quinquefasciatus*

Isolados	CL ₅₀ (10 ³ a 10 ⁷ esporos/mL ⁻¹)	IC(95%)
SR-AP5	7,76 ^a	6,86-12,64
SU-ALF6	6,00 ^{bc}	5,25-6,53
SU-GBA1	6,40 ^b	6,01-6,78
SU-SM1	6,15 ^b	5,67-6,56
SR-CB2	5,74 ^{bc}	5,28-6,10
SR-CR2	7,22 ^{ab}	5,96-10,36
ID-MD1	6,74 ^{ab}	5,41-9,34
ID-MD4	7,82 ^{ab}	6,64-12,41
SU-FAR3	6,69	--
SR-VV2	5,20 ^{bc}	3,11-6,11
IL-ANI4	8,05 ^a	7,32-10,23
SU-BF4	4,67 ^c	2,39-5,42
IPS-82	5,13 ^c	4,81-5,36

CL₅₀=Concentração letal mediana.

IC(95%)=Intervalo de confiança. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 8 Concentração Letal Mediana (CL₅₀) de diferentes isolados de *B. thuringiensis* obtidos de solo e de insetos, contra *Anticarsia gemmatilis*

Isolados	CL ₅₀ (10 ³ a 10 ⁷ esporos/mL ⁻¹)	IC(95%)
SR-AP5	3,78 ^b	2,45-4,96
SU-ALF6	7,59 ^a	6,59-18,51
SU-GBA1	6,39 ^{ab}	5,57-7,15
SU-SM1	5,80 ^{ab}	3,12-6,67
SR-CB2	7,98 ^a	7,29-10,09
SR-CR2	4,77 ^b	1,14-5,76
ID-MD1	6,13 ^{ab}	3,82-7,20
ID-MD4	6,24 ^{ab}	3,72-7,55
SU-FAR3	7,88 ^a	6,94-14,55
SR-VV2	7,66 ^a	6,93-10,41
IL-ANI4	3,49 ^b	2,64-4,91
SU-BF4	7,66 ^a	6,90-10,25
SU-SM2	4,69 ^b	5,08-5,74
SR-VV1	8,09 ^a	7,32-10,93
IL-AGR3	7,34 ^a	6,68-8,79
IL-ANIH	7,37 ^a	6,95-7,97

CL₅₀=Concentração letal mediana.

IC(95%)=Intervalo de confiança. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.5 Caracterização das proteínas dos isolados de *B. thuringiensis*

A maioria dos isolados produziu quantidades superiores de proteína após 52 horas de cultivo (avaliado pelo método de Bradford), enquanto que em 72 horas, houve um decréscimo na produção da proteína (Figura 3), que pode estar associado ao processo de autólise (pós-esporulação) durante o qual diversas proteases degradam proteínas hidrossolúveis, como referido no trabalho de Aronson & Wermus (1965).

Para que a síntese das δ -endotoxinas de *Bt* seja mais efetiva é necessário avaliar o tempo de cultivo, além de outros parâmetros como meio de cultura, pH, potencial redox e temperatura ideal durante o processo fermentativo (Tokcaer et al., 2006).

O resultado do perfil das proteínas da mistura esporo-cristal são mostrados nas figuras 4 e 5. Os isolados ID-MD1 e ID-MD4, demonstraram um perfil de proteínas semelhante a linhagem padrão IPS-82, porém observou-se a ausência da banda de 130 kDa, que pode ser correspondente ao gene *cry* 4, o que foi verificado recentemente no

trabalho de Sarrafzadeh & Navarro (2006), que verificaram que em condições limitadas de aeração, durante o processo de síntese das δ -endotoxinas, verifica-se o mesmo comportamento (Figura 4). Segundo Dulmage (1989) um suprimento adequado de oxigênio é essencial nas fermentações com *Bt*, influenciando não só o crescimento como a produção da δ -endotoxina. A toxicidade de alguns isolados contra *C. quinquefasciatus*, verificada neste trabalho, sugere a presença da proteína de 27 kDa, correspondente ao gene *cyt*, que confere uma ação citolítica contra insetos da Ordem Diptera (Figura 4).

Identificou-se proteínas de alto peso molecular, provavelmente relacionadas ao gene *cry 1*, nos isolados SR-AP5 e SR-CR2 (Figura 4) o que pode explicar a sua maior toxicidade para lepidópteros, conforme já constatado por diversos autores (Uribe *et al.*, 2003; Monnerat *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). O perfil protéico destes isolados com bandas de 65 e 130 kDa, é semelhante ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Medeiros *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002 e Dias *et al.*, 1999).

Os isolados IL-ANI4, SU-SM1, IL-AGR3 (Figura 4), ANIH e SU-SM2 (Figura 5) apresentaram diversas bandas com peso molecular entre 25 e 120 kDa, conforme o que já foi referido por Pinto & Fiuza (2003) que também encontraram proteínas de peso molecular variado em isolados de solo do Rio Grande do Sul. A maioria destes isolados demonstrou maior toxicidade contra *A. gemmatilis*. O isolado SR-VV2 (Figura 5) apresentou um perfil com uma proteína de alta concentração de aproximadamente 100 kDa, sendo mais tóxico contra larvas de mosquitos. Cavados *et al.* (2001) também isolaram duas linhagens que apresentaram um perfil de proteínas diferente de *Bti*. Este perfil tinha componentes múltiplos com peso molecular entre 55 e 100 kDa, sendo tóxicas contra *A. aegypti*.

Alguns isolados demonstraram um perfil de proteínas bastante complexo, que pode ter diversas causas:

- Células vegetativas presentes;
- Diversas proteínas solubilizadas a partir dos esporos;
- Diversas proteínas Cry produzidas e acumuladas em concentrações maiores.

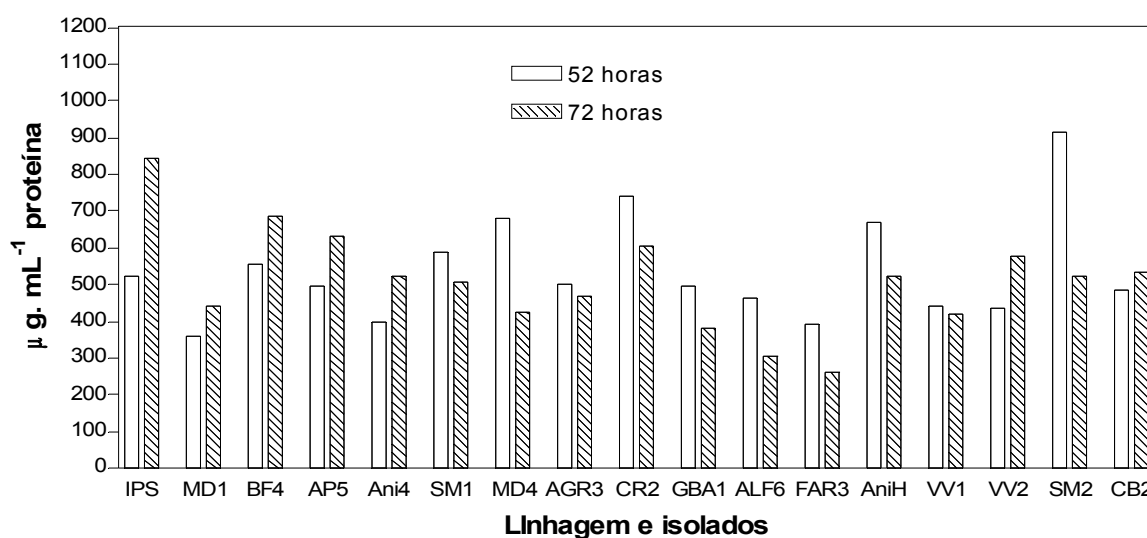


Figura 3. Concentração das proteínas totais da mistura esporo-cristal (método de Bradford) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e da linhagem IPS-82, no período de 52 e 72 horas.

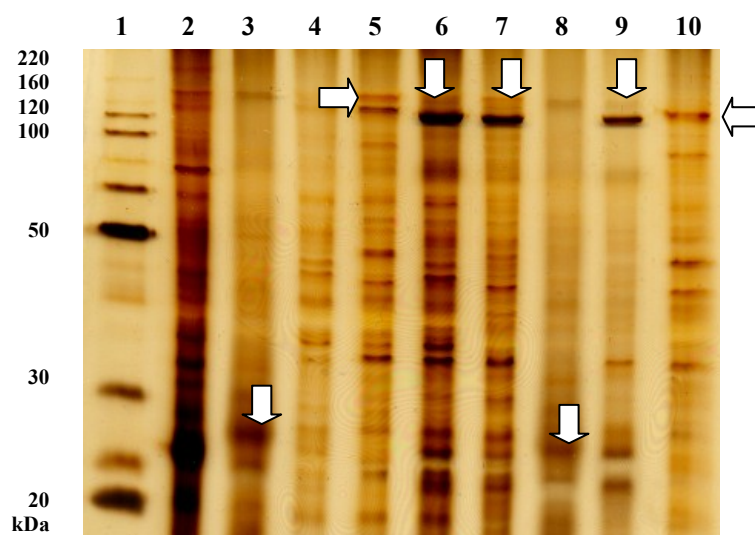


Figura 4 SDS-PAGE da mistura esporo-cristal (cultivo de 52 horas) dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. 1, marcador de peso molecular (Invitrogen); 2, IPS-82; 3, ID-MD1; 4, SU-BF4; 5, SR-AP5; 6, IL-ANI4; 7, SU-SM1; 8, ID-MD4; 9, IL-AGR3; 10, SR-CR2.

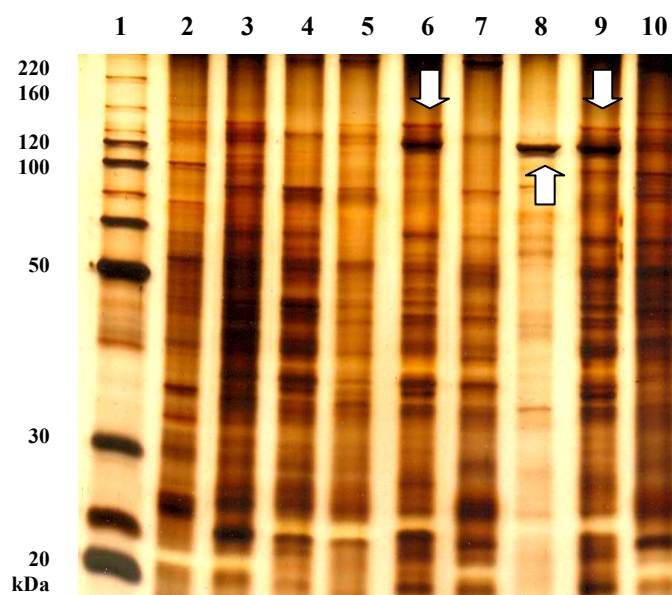


Figura 5 SDS-PAGE da mistura espora-cristal (cultivo de 52 horas) dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. 1, marcador de peso molecular (Invitrogen); 2, IPS-82; 3, SU-GBA1; 4, SU-ALF6; 5, SU-FAR3; 6, IL-ANIH; 7, SR-VV1; 8, SR-VV2; 9, SU-SM2; 10, SR-CB2.

5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste trabalho, concluiu-se que:

- Foi encontrado um percentual maior de isolados de solo lepidóptero-ativos (61,1%) quando comparado ao percentual de isolados díptero-ativos (22,6%).
- O isolado mais tóxico contra larvas de *Culex quinquefasciatus* foi SU-BF4, com valor de CL_{50} similar a linhagem padrão IPS-82.
- Verificou-se dupla atividade tóxica contra *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis*, em diversos isolados de solo, sugerindo baixa especificidade.
- A maioria dos isolados obtidos a partir de lagartas infectadas naturalmente, foram mais específicos contra *A. gemmatalis*, quando comparados com os obtidos a partir de amostras de solo e de mosca.
- A proteína de aproximadamente 130 kDa, que pode ser pertencente a família de genes *cry 1*, foi detectada em dois isolados de solo, os quais apresentaram maior toxicidade contra *A. gemmatalis*.
- O perfil de proteínas dos isolados obtidos de duas espécies de lagartas é muito semelhante, caracterizando-se pela presença de proteínas de alto peso molecular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. 1925, A method of computing the effectiveness of an insecticide: **Journal of Economic Entomology**. 18 265–267.
- ALVES, S.B., MOINO JR. & ALMEIDA, J.E.M. 1998. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos, p. 1143-1163. In: ALVES, S. B, (ed). **Controle microbiano de insetos**. FEALQ, São Paulo.
- ANDERSON, J.R., VOSKUIL, G.H. 1963. A reduction in milk production caused by the feeding of blackflies (Diptera: Simuliidae) on dairy cattle in California, with notes on the feeding activity on other animals. **Mosquito News**. 23:126-131.
- APOYOLO, C.I., DRIF, L., VASSAL, J.M., DE BARJAC, H., BOSSY, J.P., LECLANT, F., FRUTOS, R. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth *Homoeosoma nebulella*. **Applied and Environmental Microbiology**. 61:4343-4347.
- ARMENGOL, G., GUEVARA, O.E., ORDUZ, S., CRICKMORE, N. 2005. Expression of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry 11Aa in the aquatic bacterium *Asticcacaulis excentricus*. **Current Microbiology**. 51:430-433.
- ARONSON, A. I. 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. **Molecular Microbiology**. 7:489-496.
- ARONSON, A.I., SHAI, Y. 2001. Why *B. thuringiensis* insecticidal toxin are so effective unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**. 195: 1-8.
- ARONSON, J.N., WERMUS, G.R. 1965. Effects of m-Tyrosine on Growth an Sporulation of *Bacillus* Species. **Journal of Bacteriology**. 90:38-46.

- ASANO, S., OGIWARA, K., INDRASITH, L.S., TAKAHASHI, M., SUZUKI, N., HORI, H. 2000. Synergism of the spore on insecticidal activity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) is not observed at late stage in bioassay. **Applied Entomology and Zoology**. 35: 583-590.
- BECKER, N. Bacterial control of vector mosquitoes and black flies. In: Charles, J.F; Delécluse, A.; Le Roux, C. N. 2000. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**. 383-398.
- BECKERT, N. & MARGALIT, J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. IN: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Higgs, S. *Bacillus thuringiensis*, **Environmental Biopesticide: Theory and Practice**, p. 147-170.
- BEN-DOV, E., SAXENA, D., WANG, Q., MANASHEROB, R., BOUSSIBA, S., ZARITSKI, A. 2002. Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Entomology**. 127:146-152.
- BEN-DOV, E., ZARITSKI, A., DAHAN, E. 1997. Extended screening by PCR for seven-cry groups genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 63:4883-4890.
- BENZ, G. 1997. Environment. In: FUXA, J.R.; TANADA, Y. Epizootiology of insect diseases . New York: Wiley. 13:177-214.
- BERNHARD, K., JARRET, P., MEADOWS, M. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**. 70:59-68.
- BERÓN, C.M., CURATTI, L., SALERMO, G.L., 2005. New strategy for identification of novel cry type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. 71: 761-765.

- BERRY, C., O'NEIL, S., BEN-DOV, E., JONES, A.F., MURPHY, L., QUAIL, M.A., HOLDEN, M.T.G., HARRIS, D. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis , the toxin coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* . **Applied and Environmental Microbiology**. 68:5082-5095.
- BHALLA, R., DALAL.M., PANGULURI S.K., JAGADISH, B., MANDAOKAR, A.D., SINGH, A.K., KUMAR, P.A. 2005. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *B. thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**. 243:467-472.
- BOBROWSKI, V.L. 2001. Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera:Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, 32:105-109.
- BOBROWSKI, V.L., PASQUALI, G., ZANETTINI, M.H.B., PINTO, L.M.N., FIUZA, L.M. 2002. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from south Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**.25:129-135.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analisis Biochemical**. 72:248-254.
- BRAVO, A., SANCHEZ, J., KOUSKOURA, T., and CRICKMORE, N., 2002. N-terminal activation is an essencial early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac inscticidal toxin. **Journal of Biological Chemestry**. 277:23985-23987.
- BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**. 64:4965-4972.

- CAMPOS, J, ANDRADE, C F.S. 2003. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**.37:2.
- CAVADOS, C.F.G., FONSECA, R.N., CHAVES, J.Q., RABINOVITCH, L., ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. 2001. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera: Simuliidae) larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96:1017-1021.
- CAVADOS, C.F.G., MAJEROWICZ, S., CHAVES, J.Q., ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C., RABINOVITCH, L. 2004. Histopathological and Ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera: Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99:493-498.
- CAVADOS, C. F.G., FONSECA, R., CHAVES, J.Q., ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C., RABINOVITCH, L. 2005. A new black fly isolate of *B. thuringiensis* autoagglutinating strain highly toxic to *Simulium pertinax* (Kollar) (Diptera, Simuliidae) larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100:795-797.
- CERÓN, J., COVARRUBIAS, L., QUINTERO, R., ORTIZ, A., ORTIZ, M., ARANDA, E., LINA, L., BRAVO, A. 1994. PCR analysis of the Cry 1 insecticidal crystal family genes from *B. thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**.60:2415-2420.
- CHAK, K.F., CHAO, D.C., TSENG, M.Y., KAO, S.S., TUAN, S.J., FENG, T.Y. 1994. Determination and distribution of cry type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**. 60: 2415-2420.
- CHILCOT, C. N.; WIGLEY, P. J. 1993. Isolation and toxicity of *B. thuringiensis* from soil and insect habitats in New –Zealand. **Journal of Invertebrate Pathology**, 61:244-247.
- CHOI, Y.S., CHO, E.S., JE, Y.H., ROH, J.Y., CHANG, J.H., LI, M.S., SEO, S.J., SOHN, H.D., JIN, B.R. 2004 Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus thuringiensis*

subsp.*morrisoni* PG-14 Encoding δ -endotoxin Cry 1AC. **Current Microbiology**. 48:47-50.

CLARK, J.L. & ROWLEY, W.A. 1984. Evaluation of Granular *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (setotype H-14) Formulation Against Mosquito Larvae in Central Iowa. **Mosquito News**, 44: 502-505.

CONSOLI, R. A.B.G., OLIVEIRA, M. A, 1994. Preliminary observations on the infectiveness of a new formulation of a *Bacillus sphaericus* 2362 larvicidae against *Culex quinquefasciatus* in natural sites in Belo Horizonte, MG, Brazil, p. 7. In **resumos do Simpósio de Controle Biológico**, Foz do Iguaçu, 451 p.

COSCARON, S. 1987. Los Estudios en Simulideos Neotropicales (*Diptera: Insecta*). In: **Anais do XI Congresso de Entomopatologia**, 69-98, Campinas, SP, 12 a 17/07/1987.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J, BRAVO, A. and DEAN, D.H. 2005. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J. SCHNEPF, E., VANRIE, D. LERÉCLUS, J., BAUM, and DEAN, D. H. 1998. Revision of de nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62:807-813.

CROSSKEY, R.W., & HOWARD, T.M. 1997. A new taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae). **The Natural History Museum**, London, 144 p.

DAMGAARD, P.H. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Netherlands:**

Kluwer Academic Publishers. p. 23-40.

De BARJAC, H., LECATED, M.M. 1976. Dosage biochimique d l'exotoxine thermostable de *Bt* d'après l'inhibition d'RNA-polymerases bactériennes. **Comptes Rendus de L'academie des Sciences**, 282:2119-2122.

De RESPINIS, S., DEMARTA, A., PATOCCHI, N., LÜTHY, P., PEDUZZI, R. and TONOLLA, M. 2006. Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. **Letters Applied Microbiology**.43:495-501.

DIAS, G.S.D., SILVA, S.F., MARTINS, E.S., SOARES, C.M.S., FALCÃO, R., GOMES, A.C.M.M., PRAÇA, L.B., DIAS, J.M.C., MONNERAT, R.G. 2002. Prospeção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. Cenargen Embrapa Brasília. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 30.

DIAS, S.C., SAGARDOY, M.A., SILVA, S.F., DIAS, J.M.C.S. 1999. Characterization and phatogenic evaluation of *Bt* and *B. sphaericus* isolates from Argentinean soils. **BioControl**. 44:59-71.

DIAS, J.M.C. 1992. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 27:59-76.

DU, C. and NICKERSON, K.W. 1996. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry 1Ac toxin: physiological and phatogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology** .62:3722-3726.

DULMAGE, H.T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis*-Perspective from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 84:113-122.

ERB, S.L., BOURCHIER, R.S., VAN FRANKENHUYZEN, K. and SMITH, S.M. 2001. Sublethal effects os *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera; Lymantriidae) and the tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae) **Environmental Entomology**. 30:1174-1181.

- ESTRUCH, J. J. 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, 15:137-141.
- FATORETTO, J.C. 2002. Associação de bioensaio e caracterização molecular para a seleção de isolados de *B. thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda*. Jaboticabal. Monografia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. 105 p.
- FEDERICI, B.A., PARK, H.W., BIDESHI, D.K., WIRTH, M.C. and JOHNSON, J.J. 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. **Journal of Experimental Biology**. 206 3877-3885.
- FEDHILA, S., GUILLEMET, E., NEL, P., LERECLUS, D. 2004. Characterization of two *B. thuringiensis* genes identified by *in vivo* screening of virulence factors. **Applied and Environmental Microbiology** 70:4784-4791.
- FEITELSON, J.S.J. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. **Bio/Technology**: 273-275.
- FERRÉ, J., VAN RIE, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *B. thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**. 47:501-533.
- FILLINGER, U., BART, G.J., KNOLS and BECKER, N. 2003. Efficacy and efficiency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**.8:37-47.
- FORSYTH, G and LOGAN, N.A. 2000. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from northern Victoria Land Antarctica. **The Society Applied Microbiology**. 30:263-266.
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Roteiro para capacitação de agentes PACS/PSF nas ações de controle da dengue. Brasília (DF); 2002.

- GAUGLER, R., MOLLOY, D. 1980. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and its effect on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Environmental Entomology**. 9:704-708.
- GEORGHIOU, G.P. and WIRTH, M.C. 1997. Influence of single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* of development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology** 63:1095-1101.
- GLARE, T.R. O'CALLAGHAM, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*; biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 350 p.
- GORE, J., ADAMCZYK, J.J., BLANCO, C.A. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Economic Entomology**. 98(1): 88-94.
- GUERCHICOFF, A., DELÉCLUSE, A. and RUBINSTEIN, P. 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**. 67:1090-1096.
- HAJAJ, M., CARRON, A., DELEUZE, J., GAVEN, B., SETIER-RIO, M., VIGO, G., THIÉRY, I., LE-ROUX, C.N., LAGNEAU, C. 2005 Low Persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* Spores in four Mosquito Biotopes of a Salt Marsh in Southern France. **Microbial Ecology**. 50:475-487.
- HANSEN, B.M., DAMGAARD, P.H., EILENBERG, J., PEDERSEN, J.C. 1997. Molecular and phenotypic characterization of *B. thuringiensis* isolated from leaves and insects. **Journal of Invertebrate Pathology**. 71:106-114.
- HANSEN, B.M., HENDRIKSEN, N.B. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, n.1, p. 185-189.

- HANSEN, B.M. 1998. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, 71:106-114.
- HANSEN, B.M., SALAMITOU, S.2000. Virulence of *B. thuringiensis*. In: CHARLES, J.F., DELÉCLUSE, A.,NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application** Netherlands: Kluwer Academic publishers, 41-64.
- HENDRIKSEN, N.B., HANSEN, B.M. 2002 Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. **Canadian Journal of Microbiology**. 48:256-261.
- HERNANDEZ, C.S., ANDREW, R., BEL, Y., FERRE, J. 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato growing areas in Bolivia. **Journal of Invertebrate Pathology**. 88:8-16.
- HERRERO, S., OPPERT, B., FERRÉ, J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:1085-1089.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. 1989. Inseticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews** 53: 242-255.
- HONGYU, Z., XIAOHUI, Z., ZINIU, Y., WANGXI, D. 2001. Characterization and toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses to *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) **Journal of Applied Entomology**. 125:211-214.
- HOSSAIN, M., AHMED, S., HOQUE.S. 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology**, 70:221-225.

- IBARRA, J.E.; DEL RINCÓN, M.C.; ORDÚZ, S. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**. 69:5269-5274.
- ITO, T., BANDO, H., ASANO, S. 2006. Activation process of the mosquitocidal δ -endotoxin Cry39A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* BUN1-14 and binding property to *Anopheles stephensi* BBMV. **Journal of Invertebrate Pathology**. 93:29-35.
- JARA, S., MADUELI, P., ORDUZ, S. 2006. Diversity of *B. thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. **Journal of Applied Microbiology**. 101:117-124.
- JOUNG, K.B., CÔTÉ, J.C. 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *B. thuringiensis*. **Technical bulletin. Canadá** n° 29:5-10.
- JURAT-FUENTES, J.L., ADANG, M.J. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. 92:166-171.
- KATAYAMA, H., YOKOTA, H., AKAO, T., NAKAMURA, O., OHBA, M., MEKADA, E., and MIZUKI, E. 2005. Parasporin 1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Biochemical**. 137:17-25.
- KIM, H.S. 2000. Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and Cry genes contents of *B. thuringiensis* from three environments. **Current Microbiology**. 41: 250-256.
- KONDO, S.; OHBA, M.; ISHII, T. 1995. Comparative susceptibility of Chironomid larvae (Dipt., Chironomidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* with special reference to altered susceptibility due to food difference. **Journal of Applied Entomology**. 119:123-125.

- KONECKA, E., KAZNOWSKI, A., ZIEMNICKA, J., ZIEMNICKA, K. 2006. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. **Journal of Invertebrate Pathology**. 10:1016.
- KRIEG, A. 1971. Concerning α -exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 17: 134-135.
- KURT, A., ÖZKAN, M., SEZEN, K., DEMIRBAG, Z., ÖZCENGİZ, G. 2005. Cry 3Aa11: a new Cry 3Aa δ -endotoxin from a local isolate of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**. 27:1117-1121.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- LEE, L.H., JE, Y.H., CHANG, J.H., ROH, J.Y., OH, H.W., LEE, S.G., SHIN, S.C., BOO, K.S. 2001 Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. **Current Microbiology**. 43:284-287.
- LERECLUS, D., DELÉCLUSE, A., LECADET, M.M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons Ltd., p. 255-267.
- LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., HAMM, J. 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. **Florida Entomologist**. 52:23-29.
- LI, M. S., JE, Y. H., LEE, I. H., CHANG, J.H., ROH, J.Y., KIM, H.S., OH, H.W., BOO, K.S. 2002. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new δ -endotoxin gene. **Current Microbiology**. 45:299-302.
- LIMA, J.P.B., MELO, N.V., VALLE, D. 2005. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera:

- Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**.47:125-130.
- LIMA, A. F., FILHO, F.C. 1996. Manual de Pragas e Praguicidas. **Receituário Agrônômico**. Ed. Univer. Rural, pg 92 e 324.
- LUTHY, P., WOLFERSBERGER, M. 2000. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane of the cabbage butterfly. **Comparative Biochemical Physiology**.86:301-308.
- MAAGD, R.A., BRAVO, A., CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, 17:193-199.
- MAEDA, M., MIZUKI, E., HARA, M., TANAKA, R., AKAO, T., YAMASHITA, S., OHBA, M. 2001. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from intertidal brackish sediments in mangroves. **Microbiological Research**. 156:195-198.
- MANCEVA. S.D., CAREY, M.P., RUSSO, P.S., BUTKO, P. 2005. A detergent-like mechanism of action of the cytotoxic toxin Cyt 1A from *B. thuringiensis* var. *israelensis* **Biochemistry** 44;589-597.
- MARDINI, L.B. L. F., SOUZA, M.A. T., RABINOVITCH, L., ALVES, R. S.A., SILVA, C. M. B. 1999. Field studies with bacterial larvicide INPALBAC for *Simulium* spp. Control in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 94:679-681.
- MARTIN, P.A. W. 1994. The iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. **American Entomologist** 4: 85-90.
- MARTIN , P.A.W., and TRAVERS, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. 55:2437-2442.

- MARTÍNEZ, C., CABALLERO, P. 2002. Contents of Cry genes and insecticidal toxicity of *B. thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**. 92:745-752
- MARTÍNEZ, C., PORCAR, M., LÓPEZ, A., ESCUDERO, I.R., CABALLERO, P. 2004. Characterization of the *B. thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 11:71-77.
- MARTÍNEZ, C., IBARRA, J.E., CABALLERO, P. 2005. Association analysis between serotype, Cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**. 90:91-97.
- MEDEIROS, P.T., FERREIRA, M.N., MARTINS, E.S., GOMES, A.C., FALCÃO, R., DIAS, J.M., MONNERAT, R.M. 2005. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle da traça das crucíferas *Plutella xylostella*. **Boletim de Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 40:1145-1148.
- MOHAMMEDI, S., SUBRAMANIAN, S.B., YAN, S., TYAGI, R.D., VALÉRO, J.R. 2006. Molecular screening of *B. thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. **Process Biochemistry**. 41:829-835.
- MONNERAT, R.G., SANTOS, R.C., BARROS, P.C., BATISTA, A.C., BERRY, C. 2002. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas do algodão. **Circular técnica nº 10**. Embrapa 4 p.
- MORALES, L., MOSCARDI, F., KASTELIC, J.G., SOSA-GOMEZ, D.R., PARO, F.R., SOLDORIO, I.L. 1995. Suscetibilidade de *A. gemmatilis* Hübner e *Chrysodeixis includens* a *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 24:593-598.
- OHGUSHI, A., SAITOH, H., WASANO, N., UEMORI, A., OHBA, M. 2005. Cloning and characterization of two novel genes, Cry 24B and *slorf2*, from mosquitocidal strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto*. **Current Microbiology**. 51:131-136.

- PALM, C.J., DONEGAN, K., HARRIS, D., SEIDLER, R.J. 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. **Molecular Ecology**. 3: 145-151.
- PARK, H.W., BIDESHI, D.K. and FEDERICI, B.A. 2005. Synthesis of additional endotoxins in *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 and *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* significantly improve their mosquitocidal efficacy. **Entomological Society of America**. 42:337-341.
- PARRA, J.R.P. 2001. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 6th.ed. Piracicaba. Fealq, 134 p.
- PILCHER, C.D., OBRYCKI, J.J., RICE M.E., LEWIS, L.C. 1997. Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *B. thuringiensis* corn. **Environmental Entomology** 26;446-454.
- PINTO, L.M.N., FIUZA, L.M. 2003 Distribuição de genes Cry de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. 33:699-702.
- PINTO, L.M.N., AZAMBUJA, A.O., DIEHL, E., FIUZA, L.M. 2003. Pathogenicity of *B. thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Brazilian Journal of Biology**. 63:301-306.
- POLANCZYK, R.A., ALVES, S. B. 2003 *B. thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência** 7:1-10
- POLANCZYK, R.A. 2004. Tese de doutorado: Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) ESALQ, Piracicaba, SP.
- PORCAR, M., and CABALLERO, P. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. **Journal of Applied Microbiology**. 89:309-316.

- PORCAR, M., and JUÁREZ PÉREZ, 2003. PCR-based identification of *B.thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology**. 26:419-432.
- PRAÇA, L.B., BATISTA, A.C., MARTINS, E.S., SIQUEIRA, C.B., DIAS, D.G.S., GOMES, A.C.M.M., FALCÃO, R., MONNERAT, R.G. 2004. Estirpes de *B. thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 39:11-16.
- PROMDONKOY, B., PROMDONKOY, P., PANAYIM, S. 2005. Co-expression of *B. thuringiensis* Cry4 Ba and Cyt 2Aa2 in *E. coli* revealed high synergism against *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* larvae. **FEMS Microbiology Letters** 252:121-126.
- QUESADA-MORAGA, E., GARCIA, T.E., VALVERDE, G.P., SANTIAGO, A.C. 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. **Microbiology Research**.159:59-71.
- RABINOVITCH, L. 1997. Controle Biológico de Vetores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 1: 45-45.
- RABINOVITCH, L., CAVADOS, C.F.G., CHAVES, J.Q., COUTINHO, C. J. P.C.A., ZAHNER, V., SILVA, K.R.A., SELDIN, L. 1999. A new strain os *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* very active against blackfly larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 94:683-685.
- RAMPERSAD, J., AMMONS, D. 2005. A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain low selection and high throughput produced atypical results. **BMC Microbiology**. 5:52-57.
- RASKO, D. A., ALTHER, M.R., HAN, C.S., AND RAVEL, J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**. 29:303-329.
- REGEV, A., KELLER, M.,STRIZHOV, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E., CHET, I., GINSBERG, I., KONCZ-KALMAN,Z., KONCZ, C., SCHELL, J & ZILBERSTEIN,

- A. 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**.62:3581-3586.
- RUIZ, L.M., SEGURA, C., TRUJILLO, J., ORDÚZ, S. 2004. In vivo binding of the cry 11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae).**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99:73-79.
- SAADOUN, I., MONAMI, A.F., OBEIDAT, M., MEQDAM, M., ELBETIEHA, A. 2001. Assessment of toxic potencial of local Jordanian *B. thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera). **Journal of Applied Microbiology** 90:866-872.
- SAHIN, Y., and OZTURK, A.2005. Biosorption of chromium (VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Process Biochemistry**. 40:1895-1901.
- SALEH, M.S., EL-MENIAWI, F.A., KELADA, N.L., ZABRAN, H.M. 2002. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Applied Entomology**. 127:29-32.
- SAMPSON, M. N., GOODAY, G.W. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* in insects. **Microbiology**. 144:2189-2194.
- SANCHIS, V., LERÉCLUS, D., MENOU, G., CHAUFAX, J., LECATED, M. 1998. Multiplicity of δ -endotoxins genes with different insecticidal specificities in *B. thuringiensis aizawai*. **Molecular Microbiology**. 2: 393-404.
- SARRAFZADEH, M. H. and NAVARRO, J.M. 2006. The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. **Journal of Microbiology & Biotechnology**. 22:305-310.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; DEAN, D. H. 1998 *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62: 775-806.

- SCHOENLY, K.G., COHEN, M.B., BARRION, A.T., ZHANG, W., GAOLACH, B., VIAJANTE, V.D. 2003. Effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. **Environmental Biosafety Research**. 2:181-206
- SEBESTA, K & K., HORSKA. 1981. Inhibition on DNA dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta** 169: 281-282.
- SHAN, G.; EMBREY, S.K.; HERMAN, R.A. 2005. Biomimetic extraction of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins from soil based on invertebrate gut fluid chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 6630-6634.
- SHEERAN, W., FISHER, S.W. 1992. The effects of agitation, sediment and competition on the persistence and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 24:338-346.
- SHELLEY, A.J., LOWRY, C.A., MAIA-HERZOG, M., DIAS, A.P.A & MORAES, M.A.P. 1997. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. **Bulletim Brazilian Museum Natural History (Entomologia)**. 66:1-120.
- SHIMADA, N., MIYAMOTO, K., KANDA, K., MURATA, H. 2006. Binding of Cry 1Ab toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin, to proteins of the bovine intestinal epithelial cell: An *in vitro* study. **Applied and Environmental Microbiology**. 72:295-301.
- SIEGEL, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, 77:13-21.
- SILVA-WERNECK, J., MONNERAT, R. 2001. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 4 p. (Circular técnica 10).

- SILVA, S.M.B., SILVA-WERNECK, J.O., GOMES, A.C., FRAGOSO, R.R., QUEZADO, M.T., NETO, O.B.O., AGUIAR, J.B., de SÁ, M.F.G., BRAVO, A., MONNERAT, R.G. 2004. Characterization of novel Brazilian *B. thuringiensis* strains active against *S. frugiperda* and other insects pests. **Journal of Applied Entomology**. 128:102-107.
- SIVROPOULOU, A., HARITIDOU, L., VASARA, E., APTOSOGLOU, S., KOLIAIS, S. 2000. Correlation of the insecticidal activity of the *Bacillus thuringiensis* A4 strain against *Bactrocera oleae* (Diptera) with the 140 – kDa crystal polypeptide. **Current Microbiology**. 41:262-266.
- STODOLA, T.J., ANDOW, D.A., HYDEN, A.R., HINTON, J.L., ROARK, J.J. 2006. Frequency of Resistance to Bt Toxin Cry 1Ab in Southern United States Corn Belt Population Of European Corn Borer (Lepidoptera:Crambidae) **Journal of Economic Entomology**. 2:502-507.
- SWIECICKA, I., FIEDORUK, K. and BEDNARZ. 2002. The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. **Letters in Applied Microbiology**. 34:194-198.
- SYMSTAD, A., CHAPIN, F., WALL, D., GROSS, K., HUENNEKE, L., MITTELBACH, G., PETERS, D., TILMAN, D. 2003. Long term and large-scale perspectives on the relationship between biodiversity and ecosystem functioning. **Bioscience** 53:89-98
- THOMAS, S.R., ELKINTON, J.S. 2004. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**. 85:146-151.
- TOKCAER, Z., BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, U., OZCENGİZ, G., ALAEDDINOGLU, N.G. 2006. Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD 500. **Process Biochemistry** 41:350-355.

- URIBE, D.; MARINEZ, W.; CERÓN, J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colômbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, 82:119-127.
- VALADARES-INGLIS, M.C.C., SOUZA, M.T., SHILER, W. 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Embrapa : Jaguariúna. 102-225.
- VALICENTE, F.H. *et al.* 2000. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Londrina, v. 29, n.1, p. 153-174.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K and SWINGS, J.1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**.60:407-438
- VAN FRANKENHUYZEN, F., NYSTROM, C.W., TABASHNIK, B.E. 2000. Variation in tolerance to *B. thuringiensis* among and within populations of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in Ontario.**Journal of Economic Entomology**. 88:97-105.
- VILARINHOS, P.T.R., DIAS, J.M.C.S., ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. 1998 Uso de bactérias para o controle de Culicídeos e Simulídeos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. FEALQ, 2ed., V.4, Cap. 13, 1163 p.
- WHITELEY, W. R., SCHNEPF, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, 40:549-576.
- WHO. 1999. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide.TDR/BCV/85.3.
- WILSON, M.D., AKPABEY, F.J., ATWENEBOANA, M.Y., BOAKYE, D.A., OCRAN, M., KURTAK, D.C., CHEKE, R.A., MENSAH, G.E., BIRKHOLO, D., CIBULSKI,

- R. 2005. Field and laboratory studies on water conditions affecting the potency of Vectobac against larvae of the blackfly, *Simulium damnosum*. **Medical and Veterinary Entomology**. 19:404-412.
- WIRTH, M.C., JIANNINO, J.A., FEDERICI, B.A., WALTON, W.E. 2005 Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 88(2):154-162.
- WIRTH, M.C., FERRARI, J.A. and GEORGHIOU, G. 2001. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in population of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from Mediterranean Island of Cyprus. **Journal of Economic Entomology**. 94:920-928.
- WOLFENBARGER, L.R., ESPINOSA, M.G. 2004. Maize and Biodiversity: The Effects of Transgenic Maize in Mexico. **Comission for Environmental Cooperation of North America**. Cap. 4 pg 16-21.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informal consultation the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: UNDP/World Bank/ WHO 1985. 24p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).
- XUE, J.L., CAI, Q.X., ZHENG, D.S. and YUAN, Z.M. 2005. The synergistic activity between Cry 1Aa and Cry 1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters Applied Microbiology**. 40:460-465.
- YAMAGIWA, M., ESAKI, M., OTAKE, K., INAGAKI, M., KOMANO, T., AMACHI, T., SAKAI, H. 1999. Activation process of dipterian-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 65:3464-3469.
- YAMAGIWA, M., OGAWA, R., YASUDA, K., NATSUYAMA, H., SEN, K., SAKAI, H. 2002. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry IIA produced by

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis*. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**. 66:516-522.

YEZZA, A., TYAGI, R.D., VALÉRO, J.R., SURAMPALLI, R.Y. 2006. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *B. thuringiensis* var. *kurstaki* grown in wastewater sludge. **Process Biochemistry**. 41:794-800.

YU, H., ZHANG, J., HUANG, D., GAO, J., SONG, F. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian Cockchafer; *Holotrichia parallela*. **Current Microbiology**. 53:13-17.

ZAYED, M.E., BREM, A.S. 2004. Bioassay of some Egyptian isolates of *Bacillus thuringiensis* against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Commun **Agricultural Applied Biology Science**. 69:219-28.

ZHU, C., RUAN, L., PENG, D., YU, Z. and SUN, M. 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. **Letters Applied Microbiology**. 42:109-114.