

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BERNADETE DE SOUZA SANTOS

**“ESTUDO DE DOZE SOROVARES DE *Bacillus thuringiensis*:
CURVA DE CRESCIMENTO, DETERMINAÇÃO DA
PRESENÇA DE GENES CRY 4 A/B E
VARIABILIDADE GENÔMICA”.**

Dissertação de Mestrado

BELO HORIZONTE

MINAS GERAIS – BRASIL

2.000



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

FORMULÁRIO PARA A DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ESTUDANTE: BERNADETE DE SOUZA SANTOS

Nº Matrícula: 9682589

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - MESTRADO

Defesa de Dissertação: 16 de outubro de 2000.

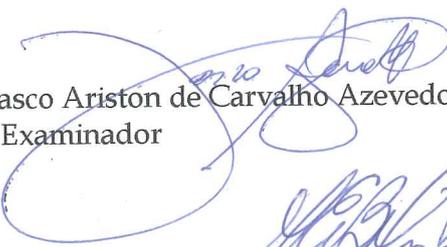
TÍTULO: "Estudo de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*: curva de crescimento, determinação da presença de genes Cry 4 A/B utilizando a PCR e variabilidade genômica observada por AP-PCR".

Co-orientador: Dr. Leon Rabinovitch

A dissertação foi submetida à apreciação da Profa. Edel Figueiredo Barbosa, que emitiu parecer favorável para a defesa.


Dr. Marcelo de Carvalho Resende
Examinador

Aprovada: *sem*


Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Examinador

Aprovada: *Sim*


Profa. Maria Elizabeth Bernardes Margutti Pinto
Orientadora

Aprovada: *Sim*


Profa. Matilde Cota Koury
Sub-coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia -ICB-UFMG

BERNADETE DE SOUZA SANTOS

**“ESTUDO DE DOZE SOROVARES DE *Bacillus thuringiensis* :
ATIVIDADE LARVICIDA, CURVA DE CRESCIMENTO
DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES Cry4A/B
E VARIABILIDADE GENÔMICA.”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Microbiologia do Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de
Minas Gerais-UFMG, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração Microbiologia.

Orientadora: Dra. Maria Elizabeth Bernades Margutti Pinto

Co-orientador: Dr. Leon Rabinovitch.

Belo Horizonte

2.000

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bactéria Aeróbias em colaboração com os laboratorios de Biologia de Microrganismos Intracelulares, do Departamento de Microbiologia no Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFMG e o Laboratório de Fisiologia Bacteriana IOC/FIOCRUZ - RJ., com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

**“... haveremos de transpor os confins das noções adquiridas ,
e penetrar nessa zona sem limites de hipóteses indecisas ,
de interpretações duvidosas , de incógnitas absolutas ,
em que se debate o espírito do pesquisador,
observando ou experimentando , para
criar a verdade e destruir o erro.”**

Carlos Chagas , 1928

**A memória de meu pai, José Cirino Dos Santos,
que embora ausente, esteve e estará sempre presente
em todos os momentos da minha vida.**

**A minha mãe Maria do Carmo Souza Santos,
a maior incentivadora deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Hoje finaliza mais uma etapa na minha vida e certamente outras se farão presentes, porém jamais duvidei que em cada um dos momentos de tristeza, em cada dificuldade transposta e em cada sorriso de vitória, Deus não estivesse presente. Obrigada, meu Deus!

A Dra. Rotraut A. G. B. Consoli, que foi a minha iniciadora na carreira científica, e ensinou-me não somente o conteúdo prático e didático, mas também respeito, ética e dignidade profissional acima de qualquer coisa. Obrigada por sua amizade e pela convivência harmoniosa que sempre tivemos nestes quase 20 anos.

Ao Dr. Leon Rabinovitch, pela convivência sempre tão agradável nos últimos dez anos, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela confiança, pela co-orientação na realização deste trabalho e incentivo para o meu crescimento profissional.

A Dra. Maria Elizabeth B. Margutti pela orientação desse estudo, pela abertura nos nossos diálogos, por tudo que me ensinou no decorrer da nossa convivência, por ter aberto portas antes intransponíveis, por acreditar em mim como profissional, pela sua amizade e pela sua atenção, muito obrigada. Espero sinceramente que os Anjos continuem dizendo Amém..!

A minha mais nova amiga Andréia Corsino, pela sua valiosa colaboração na realização deste trabalho, por sua paciência, sempre pronta para nos escutar, e por sua disposição para nos ajudar e ensinar a todo momento. Por suas orações e seu alto nível de espiritualidade, obrigada.

A Vanessa Cristina Araújo, aluna de iniciação científica desse trabalho, um pouco “minha filha”, na carreira científica, pela sua contribuição valiosa, pelo seu apoio, carinho e amizade.

Ao Lydston Rodrigues Carvalho, um amigo sempre presente e atuante nos momentos mais difíceis, aquele que dá a mão e oferece ombro, sem nenhum constrangimento, obrigada meu amigo, por você existir.

Ao amigo Rodrigo Redondo pelas críticas e ajuda nos programas de estatísticas

A Dra. Edel Figueiredo Barbosa, chefe do Lab. de Biologia de Microrganismos Intracelulares, mestra e grande colaboradora desse trabalho, com quem eu pude dividir dúvidas, compartilhar tristezas e alegrias, obrigada por sua sempre disposição em nos ajudar a crescer profissionalmente.

Ao Dr. Vasco Ariston Carvalho Azevedo, chefe do Laboratório de Genética Celular e Molecular, mestre 24 horas por dia, seu lema é ensinar e dividir sempre, obrigada pelo carinho, apoio e acolhida. Axé, professor!

Ao Dr. Carlos Augusto Rosa, chefe do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, mestre e amigo sempre pronto a ajudar, obrigada pela confiança em nós depositada, colocando a nossa disposição toda a infraestrutura de seu laboratório. Mais uma vez, obrigada.

Ao Dr. Marcelo de Carvalho Resende, chefe do Núcleo de Entomologia do Estado de Minas Gérias, Centro de Referência Nacional, da Fundação Nacional de Saúde, FUNASA - Orgão do Ministério da Saúde, pela acolhida , pelas idéias e críticas a este estudo. Obrigada.

À minha amiga e colega Marlúcia Abílio Lamounier, Entomologista, atuante no Núcleo de Entomologia do Estado de Minas Gerais, pela convivência, companherismo e disposição constante em nos apoiar em todos os momentos.

Ao meu querido amigo Nilton Barnabé Rodrigues, "Niltinho" pelos ensinamentos e estímulo.

À minha mãe Maria do Carmo Souza Santos, a mais importante das pessoas na minha vida, pelo seu apoio irrestrito, seu carinho, sua compreensão nos momentos mais difíceis, e acima de tudo por seu amor incondicional, muito obrigada. Tenha certeza, que este trabalho tem também a sua assinatura. Obrigada, "DUDUDE".

A todos os professores do Departamento de Microbiologia - ICB/UFMG especialmente ao Dr. Jacques Robert Nicoli coordenador da pós-graduação em Microbiologia.

Ao professor Luís de Macêdo Farias, chefe do Departamento de Microbiologia pelo apoio.

A Maria Cristina de Almeida Prado, secretária da pós-graduação Microbiologia, muito obrigada por tudo

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ na pessoa do seu Diretor Dr. Roberto Sena Rocha, pelo apoio e acolhida .

Aos colegas do Laboratório de Bactériologia de Aeróbios, ICB/UFMG Maria Clara Fernandes Silva, Luís André de Lima, Ana Carolina Campi Azevedo, Ana Lúcia, Fabíola, obrigada pelo carinho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Bacteriana- IOC/FIOCRUZ-RJ, Cláudia, Regina, Rosângela, Jeane, Edmar, Sônia e Clara de Fátima.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Microrganismos, ICB/UFMG Anderson, Maria Rosa, Mônica e Daniela, obrigada pela força e pela atenção.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares, ICB/UFMG, Cláudia, Luciana, Roberto e Gustavo.

Aos colegas do Núcleo de Entomologia (FUNASA-MG), João Batista, Cleider, Anderson, Estela, Renata, Suzana, George, Jeovani e Martucheli.

Ao pessoal do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Maria Esther Macêdo, Maria Angélica de Oliveira, Maria Cristina (Tinacóptera).

Aos meus colegas de turma, bons amigos, João, Raquel, Henrique, Betinha, Ronaldo, Michelyne, Izabela, Carolina, Roseane e Luís André.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Microbiologia, pela realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, a minha eterna gratidão

Bernadete de Souza Santos.

SUMÁRIO

Tópicos	página
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE GRÁFICOS	111
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS DOS SOROVARES	VI
RESUMO	VII
ÍNDICE	
INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Histórico do <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.2. Taxonomia do <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.3. Síntese e Estrutura do Corpo Paraesporal de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
2.4. Características das Toxinas do <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	17
Bti.	
2.5. Mecanismo de Ação das Toxinas do <i>Bacillus thuringiensis</i> .	20
2.6 Resistência dos Insetos às Toxinas do <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.7 A Genética e a Biologia Molecular do <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
2.8. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	27
2.9. Amplificação Randômica de DNA Polimórfico através da Reação em Cadeia da Polimerase	29
2.10. Mosquitos de Importância em Saúde Pública	31
2.11. Relevância da Utilização de Inseticidas Biológicos	32

3.OBJETIVOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Amostras utilizadas para obtenção de esporos	39
4.2. Cultivo dos Bacilos	39
4.3. Curvas de Crescimento	40
4.4. Colônia de Mosquitos	42
4.5. Teste da Atividade Larvicida dos <i>Bacillus thuringiensis</i>	43
4.6. Extração de DNA de <i>Bacillus thuringiensis</i>	44
4.7. Dosagem do DNA	46
4.8. Reação em Cadeia da Polimerase - Condições de Amplificação para PCR	47
4.8.1 Condições de Amplificação para PCR	47
4.8.2. Iniciadores	48
4.8.3. Condições de Eletroforese para Produtos de PCR	48
4.9. Condições de Amplificação através de RAPD	49
4.9.1. Iniciadores	49
4.9.2. Dosagem do DNA para Utilização em AP-PCR (RAPD)	50
4.9.3. Condições de Eletroforese para produtos de AP-PCR.	50
4.9.4. Coloração dos Géis de Poliacrilamida	50
4.9.5.Cálculo da porcentagem de Bandas Compartilhadas (Coeficiente de Similaridade)	51
5.RESULTADOS	52
5.1. Atividade Larvicida	53
5.2. Curvas de Crescimento	58
5.3. Dosagem do DNA de doze sorovares de <i>Bacillus thuringiensis</i>	75
5.4. Dosagem de DNA do sorovar ISR em três diluições	78
5.5. Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase	80
5.6. Amplificação Aleatória de DNAs Polimórficos (RAPD)	82
6. DISCUSSÃO	87
6.1. Atividade Larvicida	88
6.2. Curvas de Crescimento	91

6.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	93
6.4. Produtos de RAPD	95
7. CONCLUSÃO	97
8. SUMMARY	101
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figuras	página
Fig. 1. Mortalidade de larvas L3 de <i>Aedes fluviatilis</i> (LUTZ,1904), tratadas com 12 sorovares de <i>Bacillus thuringiensis</i> , após 72 horas	55
Fig.- 2. Mortalidade de larvas L3 de <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS,1762), tratadas com 12 sorvares de <i>Bacillus thuringiensis</i> , após 72 horas	56
Fig.- 3. Mortalidade de larvas L3 de <i>Culex quinqüefasciatus</i> (SAY,1823), tratadas com 12 sorvares de <i>Bacillus thuringiensis</i> , após 72 horas	57
Figura 4: Dosagem do DNA de 9 sorovares de <i>Bacillus thuringiensis</i> Gel de Poliacrilamida 4% corado pela prata mostrando produto de amplificação por Reação em cadeia da polimerase (PCR) de 12 sorovares de <i>Bacillus thuringiensis</i>	76
Fig. 5: Dosagem do DNA de 3 sorovares de <i>Bacillus thuringiensis</i>	77
Fig. 6: Dosagem do DNA do sorovar ISR , em três diferentes diluições	79
Fig.7 Gel de Poliacrilamida a 4% mostrando produtos de PCR	81
Fig 8 Gel de Poliacrilamida 8% corado pela prata mostrando produto de RAPD (AP-PCR) de 12 sorovares de <i>Bacillus thuringiensis</i>	84
Fig 9 Fenograma	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos		página
Graf. I.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>kyshuensis</i>	63
Graf.II.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>brasiliensis</i>	64
Graf.III.	Curva de Crescimento <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>oswaldocruzi</i>	65
Graf.IV.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>nigeriensis</i>	66
Graf.V.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>toumanoffi</i>	67
Graf.VI.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>kurstaki</i>	68
Graf.VII.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>thompsoni</i>	69
Graf. VIII.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>morrisoni</i>	70
Graf. IX.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	71
Graf. X.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>canadensis</i>	72
Graf. XI.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>darmstadiensis</i>	73
Graf. XII.	Curva de Crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>ostriniae</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabelas		página
Tab. 1	Cronologia do <i>Bacillus</i> entomopatogênicos e sua utilização	11
Tab. 2.	Sorovariedades de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas no presente estudo.	39
Tab.3	Valores de absorvâncias em OD _{600nm} e Unidades formadoras de Colônias/ml (UFC/ml) de BRA	60
Tab.4	Valores de absorvâncias em OD _{600nm} e Unidades formadoras de Colônias/ml (UFC/ml) de ISR	61
Tab.5.	Tabela de Similaridade obtida pelo Coeficiente de DICE	85

LISTA DE ABREVIACÕES UTILIZADAS

AP-PCR : Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores arbitrários

B.t.i.: *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*

B.t.: *Bacillus thuringiensis*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Deoxynucleotídeo trifosfato

EDTA: Ácido etilenoaminotetracético

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

IPS-82: Linhagem padrão de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*. Pó-padrão

Liofilizado do Instituto Pasteur de Paris - França

Kb: Quilobase, unidade correspondente a mil pares de bases

LFB: Laboratório de Fisiologia Bacteriana

pb: Pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD: Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente

SDS: Duodecil Sulfato de Sódio

Tm - Temperatura de desnaturação das fitas de DNA.

TBE - Tris-borato EDTA

TRIS Tris (hidroximetil) amino metano

ABREVIATURAS DOS SOROVARES

BRA	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>brasiliensis</i>
CAN	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>canadensis</i>
DAR	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>darmstadiensis</i>
ISR	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>
KUR	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>kurstaki</i>
KYU	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>kyushuensis</i>
NIG	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>nigeriensis</i>
MOR	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>morrisoni</i>
OST	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>ostrinae</i>
OSW	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>oswaldocruzi</i>
THO	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>thompsoni</i>
TOU	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>toumanoffi</i>

RESUMO

Entre as bactérias do gênero *Bacillus* algumas espécies destacam-se como controladores biológicos microbianos de insetos vetores e pragas, dentre estas destaca-se o *Bacillus thuringiensis*, bactéria de solo, aeróbia e gram-positiva.

Suas características tóxico/específicas para larvas de inseto, a sua inócuidade para o homem e outros mamíferos vertebrados, bem como fauna e flora, estão relacionadas com a formação de um corpo paraesporal protéico intracitoplasmático, denominado δ -endotoxina, produzido durante a fase de esporulação das bactérias.

No presente estudo, avaliou-se a atividade larvicida de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*, **KYU, BRA, OSW, NIG, TOU, KUR, THO, MOR, CAN, DAR, OST e ISR** contra tres espécies de mosquitos: *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis* & *Culex quinquefasciatus*, bem como foram realizadas curvas de crescimento dos referidos sorovares com o intuito de observar o comportamento das bactérias. Também foram realizados PCR com iniciadores específicos para determinação da presença de genes Cry4A/B de *Bti* e variabilidade genômica observadas por AP-PCR.

Os resultados da atividade larvicida mostraram diferenças significativas para as tres espécies de mosquitos estudadas. As larvas de *Aedes aegypti* foram susceptíveis a somente ao controle positivo, entretanto as larvas de *Aedes fluviatilis* apresentaram taxas de mortalidade para os sorovares KUR, KYU enquanto que, as larvas de *Culex quinquefasciatus* foram 100% sensíveis ao sorovar **DAR**.

Nas curvas de crescimento os sorovares apresentaram comportamento semelhante, iniciando a esporulação em 32 horas de crescimento, exceto para o **MOR**, que iniciou sua esporulação em 24 horas de crescimento. O tempo de crescimento para estas bactérias ficou estimado em 0,50 hora e a velocidade de crescimento foi de 1,381 horas⁻¹. A técnica de PCR para amplificação dos genes cry4A/B mostrou um produto já esperado de 439bp para o sorovar **ISR**.

A reação de AP-PCR apresentou produtos (RAPD), que foram equacionados utilizando-se a fórmula de DICE (1945), para estabelecer coeficientes de similaridade entre os referidos sorovares. Através de fenograma, pode-se concluir um percentual de similaridade entre os bacilos partindo da linha de *fenon*. Os sorovares de maior coeficiente de similaridade foram **NIG** e **KYU** aproximadamente 92% de similaridade. Enquanto que, os sorovares **MOR** e o **KUR** apresentaram -se isolados no fenograma. **ISR** aparece mais próximo do sorovar **OST** e as duas variedades nacionais **BRA** e **OSW** mostram um coeficiente de similaridade em torno de 65%.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

o controle de insetos vetores e pragas tornou-se um grave problema e, como consequência imediata em Saúde Pública, observa-se o aumento progressivo das populações dos transmissores de doenças como a malária, dengue, febre amarela, filariose bancroftiana, leishmaniose e oncocercose, que têm a comprovada participação de anofelinos, culicíneos, flebotomíneos e simulídeos respectivamente.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1995), a malária é considerada um problema mundial, resultando em quase 270 milhões de casos anualmente, matando 1 milhão de crianças somente na África. No Brasil, em 1992, foram registrados 600.000 novos casos de malária (MARGALIT et al., 1998). Da mesma forma a dengue clássica e a dengue hemorrágica vêm se constituindo cada vez mais num grave problema nas Américas do Sul e Central onde, na maioria das vezes as epidemias acontecem de maneira explosiva e extensa (RABINOVITCH, 1997).

Segundo o “Plano diretor de erradicação do *Aedes aegypti*” do Ministério da Saúde do Brasil (1996), a dengue já havia acometido 220.885 pessoas em 28 países das Américas do Sul e Central, dos quais não se incluem Brasil, Guatemala, Haiti e Belize.

No Brasil, os primeiros casos de dengue surgiram em 1986, apresentavam até 1989 apenas um sorotipo - DEN1, responsável pelos surtos e epidemias de dengue registrados em São Paulo, Minas Gerais, Ceará, Bahia, Alagoas, Pernambuco e Rio de Janeiro. Em 1990 com o aparecimento de um novo sorotipo, o DEN2 surgiram os primeiros casos do dengue hemorrágico no Rio de Janeiro, infectando pessoas que já tinham contraído a doença anteriormente. De 1990 a 1998 foram registrados em todo o

Brasil, 718 casos de dengue hemorrágico, com 27 óbitos (FUNASA, 1998; NOBRE et al., 1994).

Dados recentes do Ministério da Saúde do Brasil, através de Pronunciamento do Exmo Senhor Ministro da Saúde, Dr. José Serra, no dia 14/02/2.000, em cadeia Nacional de Televisão, mostraram que em 1998 foram mais de 500.000 casos de dengue clássico no Brasil, e que embora o número de casos tenha reduzido para pouco menos da metade em 1999, o número ainda é assustador, ficando em torno de 208.000 pessoas acometidas pelo vírus da dengue.

A filariose bancroftiana, outra doença de caráter endêmico, cuja infestação se dá através da picada de culicídeos, apresentava na década de 90 cerca de 300 milhões de pessoas contaminadas em todo o mundo, com *Wuchereria bancrofti*, um parasita, helminto pertencente à família *Filaridae* (WHO,1990). No Brasil, segundo a SUCAM (1985) e DREYER & MEDEIROS (1990), os focos de real importância médico-sanitária encontram-se nas cidades de Belém (Pará) e no Recife (Pernambuco). Em 1993, foram também encontrados através de um inquérito epidemiológico, mosquitos naturalmente infectados com larvas do parasita na cidade de Maceió, no estado das Alagoas (FONTES et al., 1994).

Já a oncocercose, é uma doença causada pela filária *Onchocerca volvulus* e transmitida por alguns simulídeos, também conhecidos como “borrachudo” ou “blackfly”. Esse nematódeo pode atingir o globo ocular ocasionando cegueira, conhecida como a “cegueira dos rios” pois, os simulídeos vivem normalmente em regiões próximas a cursos de água limpa e encachoeirados. A situação endêmica não é muito diferente das outras parasitoses, a distribuição se dá em países da África e da América do Sul.

No Brasil, existem casos de oncocercose na região Amazônica, e estima-se que uma tribo de índios Yanomamis esteja amplamente acometida pelo parasita *Onchocerca volvulus* e, a preocupação dos técnicos do Ministério da Saúde é de impedir que a doença se espalhe para outras regiões do país (COELHO et al., 1998)

Estima-se que por mais de meio século os pesticidas sintéticos têm sido usados para controlar insetos vetores de doenças e pragas agrícolas. A introdução dos inseticidas químicos resultou no mais espetacular método de combate aos insetos, levando à euforia, e a se acreditar que os insetos estavam definitivamente controlados sob a face da terra (MARGALIT et al., 1998). Desde o advento do Dicloro-Difenil-Tricloreto (DDT) em 1940, produzido por síntese em escala industrial, várias classes de inseticidas se sucederam, como os organo-fosforados, carbamatos e mais recentemente os piretróides. As propriedades dos inseticidas químicos, tais como: a atividade tóxica para um amplo espectro de organismos, a facilidade de aplicação, um longo período de efeito residual e um baixo custo operacional, tornaram seu emprego um completo sucesso. Entretanto, a sua longa persistência no solo, associada a outros fatores de risco levaram ao desequilíbrio ecológico provocando um grande impacto ambiental o que torna o seu emprego constante, um forte agravo ao ambiente. Associado a todos estes fatos, outro grave problema foi o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos insetos alvo, aos inseticidas químicos convencionais (WHO, 1970; FRIDLENDER et al., 1989).

A crescente resistência dos insetos aos inseticidas convencionais fez com que na década de setenta a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1970) iniciasse uma campanha com cientistas do mundo inteiro recomendando a busca de medidas

alternativas de controle dos insetos vetores e pragas. Assim, os chamados inimigos naturais, ou seja parasitas, predadores e patógenos de insetos foram sugeridos como métodos de controle (FEDERICE, 1995). Sabe-se que predadores e, ou, parasitas são adequados em alguns casos, mas que apresentam limitações quanto a sua obtenção e uso em larga escala, portanto, tornou-se evidente a necessidade de um agente biológico capaz de reunir todas as condições necessárias para seu emprego em grandes proporções, e que, sobretudo, apresente especificidade aos organismos alvo em questão. Tal agente deve possuir propriedades pesticidas naturais, não podendo ser patogênico para a fauna e flora, bem como inócuo para o homem e outros animais vertebrados, podendo ser estocados por grandes períodos de tempo, além de ser facilmente transportado. (WHO, 1984; BRUCE - CHWATT, 1986; WHO, 1987).

Dentre os microrganismos, os patógenos constituem, os mais promissores agentes de controle biológico, destacando-se fungos, vírus e as bactérias entomopatogênicas.

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. Aproximadamente 80% das doenças de insetos tem como agentes etiológicos os fungos pertencentes a 90 diferentes gêneros e mais de 700 espécies já catalogadas e a maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos são encontrados no Brasil (ALVES, 1995). A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle de insetos.

Um programa bastante conhecido e que envolve a utilização do fungo *Metarhizium anisopliae*, no Brasil, é conhecido como controle da Cigarrinha, *Mahanarva posticata*, que ataca plantações de cana-de-açúcar. Em 1987 foram tratados

130.000 hectares de cana-de-açúcar com esse patógeno, o que estimulou consideravelmente as pesquisas nesta área (ALVES, 1998).

Diversos vírus têm sido encontrados causando doenças, tanto em insetos úteis à humanidade, como em vetores de doenças e pragas. Isto justifica o desenvolvimento de várias linhas de pesquisas procurando identificar e caracterizar tais vírus, a fim de controlá-los no caso de insetos de interesse industrial como o bicho-da-seda e as abelhas, ou para usá-los como medida de controle biológico na forma de biopesticidas virais. Os biopesticidas virais têm como vantagem a sua especificidade, o que os torna extremamente atrativos sob o ponto de vista de segurança e preservação do meio ambiente (LUCKOW & SUMMERES, 1988).

No Brasil, a partir de 1980, um grupo de pesquisadores vem desenvolvendo, um programa de controle biológico usando bioinseticida viral a base de *Baculovirus anticarsia* para controlar uma praga de agricultura conhecida como a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (ALVES, 1998).

Os baculovírus constituem uma família de vírus isolados da Classe **Arthropoda** que, em sua maioria são encontrados em insetos da Ordem Lepidoptera. Uma das características dos baculovírus é o seu grande tamanho, devido ao cristal protéico que os envolve. Este cristal é constituído principalmente da proteína poliedrina, que confere a forma de poliedro ao vírus. Esta estrutura é responsável pela proteção das unidades virais (nucleocapsídeo) nele contidas. Além disso, o acúmulo de poliedros no núcleo é responsável pela lise celular. Assim, a morte do inseto ocorre por ação mecânica e não química (BISHOP et al., 1990).

No grupo dos microrganismos as bactérias tem merecido maior destaque devido a seu modo de ação e sua especificidade sobre diferentes ordens de insetos (MARGALIT et al., 1998).

São conhecidas como bactérias entomopatogênicas as pertencentes às famílias *Bacillaceae*, *Streptococaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Achromobacteriaceae* (AROSON et al., 1986). Dentre elas, as que têm oferecido melhores resultados práticos são as pertencentes à família *Bacillaceae* ao Gênero *Bacillus* e correlacionados, e, por isso mesmo, têm sido as mais estudadas quanto as suas atividades tóxicas (DE BARJAC, 1978,1981; LACEY & UNDEEN, 1986; PRIEST, 1992). No Gênero *Bacillus* estão descritas mais de 150 espécies, Gram-positivos, aeróbios, ou anaeróbios facultativos e formadores de esporos (SNEATH, 1986). Dentre os *Bacillus* entomopatogênicos são reconhecidos: *Bacillus popilliae*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus larvae*, atualmente referidas como espécies que integram o novo Gênero *Paenibacillus* (ASH & PRIST, 1994), *Bacillus sphaericus*, e o *Bacillus thuringiensis*, sendo que estas duas últimas espécies são lisenciosamente designadas como *B.s.* e *B.t.*, respectivamente.

O *Bacillus popilliae* e o *Bacillus lentimorbus* causam em seus hospedeiros uma doença conhecida como “doença leitosa com os tipos A e tipo B”, respectivamente. Essa doença leitosa foi descoberta nos Estados Unidos da América, em New Jersey em 1933, logo após o registro do seu principal hospedeiro, o besouro-japônes *Popillia japonica*. Esse coleoptero, nativo das ilhas do arquipélago japonês onde é uma praga, se espalhou no leste americano, atacando vorazmente mais de 300 espécies de plantas e causando perdas anuais estimadas em 25 milhões de dólares (GORDON et al., 1973).

O nome doença leitosa define a sintomatologia da doença, uma vez que em estados de infecção avançada a enorme quantidade de esporos na hemolinfa do inseto dá uma coloração leitosa, e qualquer ruptura no tegumento deixa extravasar uma hemolinfa com dezenas de milhões de esporos (GORDON et al., 1973). Infelizmente essas duas espécies de *Bacillus* são parasitas obrigatórios (KLEIN, 1981). Crescem sob condições de cultivo especiais, com uma multiplicação vegetativa razoável. No entanto a capacidade de esporulação é baixa.

No Brasil, GALLO e colaboradores (1988), fizeram estudos sobre a utilização do *Bacillus popilliae* e do *Bacillus lentimorbus* no controle de besouros que atacam a cana-de-açúcar mediante programas de manejo integrado, onde são alternados a aplicação de inseticidas químicos e biológicos.

O *Bacillus larvae* é o agente etiológico da doença americana das crias das abelhas, conhecida como "American Foulbrood Disease", sendo portanto um patógeno de insetos úteis para o homem. É provavelmente a maior causa de mortalidade de abelhas em todo o mundo. A doença americana das crias de abelhas, ou pútrica dos berçários, como também é conhecido no Brasil, ataca as pupas e principalmente as larvas no final da fase de crescimento larvaria, quando os opérculos já estão selados, alguns dias antes da pupação (STALHY et al., 1981).

O *Bacillus sphaericus*, dentre os entomopatogênicos, é a única bactéria Gram-lável, embora a maioria das linhagens sejam Gram-positivas, sendo resistente à estreptomicina, podendo tolerar meios anaeróbios. É uma bactéria cosmopolita, encontrada no solo e em ambientes aquáticos. Seu esporo esférico se localiza na

extremidade do bacilo, dilatando as suas células (WHO, 1980; DAVIDSON & SWEENEY, 1983; WEISER, 1991). Produz duas toxinas que estão associadas à célula bacteriana e que, portanto, não são liberadas no meio. Este bacilo é altamente tóxico para larvas de mosquitos sobretudo aqueles do Gênero *Culex*.

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva e catalase positiva, encontrada no solo, é formadora de esporos, aeróbia, podendo crescer facultativamente em anaerobiose, numa faixa de temperatura entre 10 a 45°C. Em geral, decompõe a tirosina, hidrolisam a caseína e o amido. Possui uma atividade entomopatogênica que está diretamente relacionada à presença de uma inclusão cristalina sintetizada durante a fase de esporulação. O cristal, também denominado de δ -endotoxina por HEIMPEL (1963), ou corpo paraesporal de δ -endotoxina, é composto por proteínas tóxicas específicas para larvas de insetos de diferentes Ordens tais como: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera e mais recentemente foram encontrados isolados ativos contra insetos das ordens Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga, também contra nematódeos, ácaros e protozoários (FEITELSON, et al., 1992). As toxinas sintetizadas e contidas no cristal são inócuas para o homem, os vegetais, os animais e outros invertebrados. A maioria das linhagens pode sintetizar mais de um tipo de cristal (LERECLUS et al., 1993) e os cristais podem ser formados por diferentes δ -endotoxina, sendo todas elas correlacionadas, podendo haver casos em que até cinco toxinas são encontradas num mesmo cristal.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico do *Bacillus thuringiensis*.

Tab. 1 Cronologia dos Bacilos Entomopatogênicos e sua utilização *

EVENTO	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
1. Bacilo causador de doença em <i>Bombyx mori</i>	ISHIWATA, 1902
2. <i>Bacillus sphaericus</i> não patogênico	NEIDE, 1904
3. <i>Bacillus thuringiensis</i> atacando a <i>Anagasta kuehniela</i>	BERLINER, 1915
4. Sporeine - primeiro produto industrializado/ omercializado	1938
5. Sorotitpos H	de BARJAC & BONNEFOI, 1992
6. <i>Bacillus sphaericus</i> patogênico para mosquito	KELLEN et al, 1965
7. <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i> patógeno de mosquito.	GOLDBERG & MARGALIT, 1977
8. <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>tenebrionis</i> infectando Coleoptera	KRIEG et al, 1983
9. Tabaco transgênico	ADANG et al., 1987. BARTON et al., 1987.
10. Tomate transgênico	FISCHOFF et al., 1987.
11. Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> empacotadas em <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	GEGERNTER & QUICK, 1989.

***Fonte DIAS, J.M.C.S.**

Ao contrário de outros microrganismos cuja utilização e exploração comercial se dá a muitos séculos, a descoberta e o emprego das bactérias entomopatogênicas das espécies *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* são eventos do Século XX, podendo ser observados na tabela 1, onde se apresenta a cronologia de alguns fatos marcantes relacionados a esses microrganismos.

Os primeiros achados relacionados com doenças em insetos causadas por bactérias do gênero *Bacillus* e correlacionados datam de 1902 quando Ishiwata, no

Japão, identificou uma bactéria esporulante que causava mortalidade no “bicho-da-seda” (*Bombyx mori*) (DE BARJAC & BONNEFOI, 1968).

Em 1911, Berliner, na região da Thuringia, Alemanha, isolou o mesmo tipo de bactérias e que atua sobre a traça-das-farinhas (*Anagasta kuhniella*). Em 1915, denominou-a de *Bacillus thuringiensis* (HABIB & ANDRADE, 1986).

O potencial do *Bacillus thuringiensis* para o controle de Lepidoptera foi logo reconhecido tanto que, um produto à base dessa espécie passou a ser comercializado na França em 1938, sob a denominação de Sporeine e, embora sua produção fosse muito rudimentar, era efetivo contra diversas lagartas de hortaliças e frutas (DAOUST, 1990).

No caso do *Bacillus sphaericus* o reconhecimento de sua entomopatogenicidade foi bastante demorado. NEIDE em 1904 descreve um bacilo com esporo subterminal esférico, deformante e, em 1965, KELLEN e colaboradores reconhecem sua atividade contra larvas de Culicídeos, mas a estirpe descoberta não era muito potente, o que limitou sua utilização.

Ainda na década de 1960, o desenvolvimento da sorologia flagelar por DE BARJAC & BONNEFOI (1962), permitiu grande avanço na sistemática e classificação dos bacilos entomopatogênicos, inicialmente para as subespécies de *B. thuringiensis* e, posteriormente, *B. sphaericus* (DE BARJAC & FRACHON, 1990).

Em 1976 e 1983 ocorreram descobertas marcantes que ampliaram o espectro de utilização dos bacilos entomopatogênicos. A primeira se deu em Israel, mais precisamente em agosto de 1976, quando da descoberta de uma bactéria isolada de um charco contendo água estagnada, localizado no deserto de Negev, nas proximidades do Kibutz Zeelim (GOLDBERG & MARGALIT, 1977). Este novo isolado era tóxico para

dípteros Culicídeos e Simulídeos e logo chamou a atenção pelo seu elevado potencial larvicida. Desse material, a partir da colônia ONR-60^A derivam todas as culturas de *Bacillus thuringiensis* “variedade” *israelensis* (MARGALIT & DEAN, 1985). Da mesma forma, em 1983 na Alemanha, foi isolada uma estirpe bacilar efetiva contra Coleopteros, principalmente crisomelídeos, e que foi denominada por KRIEG e colaboradores, (1983) com o nome de *B. thuringiensis* sorovar *tenebrionis*.

Em 1987 foram realizados os primeiros ensaios, para obtenção de plantas transgênicas, com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* em tabaco (ADANG et al. 1987; BARTON et al. 1987) e em tomate (FISCHHOFF et al. , 1987). Estes trabalhos abriram grandes perspectivas para a criação de novas variedades de plantas que podem incorporar características de resistência seletiva a insetos com interesse econômico imediato.

Em 1989 foi introduzido o conceito de “toxinas empacotadas”, onde os genes codificadores das toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* (*B.t.k.*) foram transferidos para *Pseudomonas*, que passaram então a produzir os cristais protéicos (GELERNTER & QUICK, 1989). O bioinseticida a base de genes de *B.t.k.* em *Pseudomonas*, denominado MVP, foi aprovado em 1º de março de 1990, para ensaios de campo nos Estados Unidos da América (GELERNTER, 1990).

CHARLES e colaboradores, (1996), em recente revisão sobre o histórico do *Bacillus thuringiensis* descreveram cepas de *Bacillus laterosporus*, cuja nomenclatura atual é *Brevibacillus laterosporus*, encontradas na Rússia, que não foram ainda devidamente estudadas. ORLOVA e colaboradores, (1998) demonstraram que os cristais de *Brevibacillus laterosporus* produzidos durante a esporulação são altamente tóxicos

para larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*. Isto estimulou estudos com esta espécie de bactérias.

Recentemente, no Brasil ZAHNER e colaboradores (1999), realizaram estudos para caracterização do genoma de linhagens de *Brevebacillus laterosporus* e observaram toxicidade para mosquitos *Culex quinquefasciatus*

2.2. Taxonomia do *Bacillus thuringiensis*

A diferenciação entre *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* como espécies diferentes tem sido motivo de grande discussão. Considerando que, HEIMPEL & ANGUS (1958) declararam que a formação de um cristal tóxico paraesporal seja a característica representativa de *Bacillus thuringiensis*, esta espécie ficaria assim definida. Porém, TOUMANOFF & LECORROLER (1958) têm opinião contrária e estes autores acreditam que a formação do cristal não é uma característica constante, podendo então não ser considerado uma característica básica para diferenciar os *Bacillus* entomopatogênicos.

O grande avanço para identificação de novas linhagens de *Bacillus thuringiensis* se deu com a introdução da técnica de sorotipagem do antígeno flagelar (DE BARJAC & BONNEFOI, 1962), onde várias subespécies foram identificadas.

VANKOVA (1964), estudou e avaliou doze linhagens de *Bacillus thuringiensis* quanto a patogenicidade para insetos da Ordem Lepidoptera, e em oito deles encontrou patogenicidade seletiva, para espécies diferentes de Lepdoptera. Vários autores confirmam a hipótese de co-evolução e adaptação entre linhagens e hospedeiros (GRIGOROVA 1964, SHAIKH & MORRISONI 1966).

Existem várias semelhanças morfológicas e bioquímicas entre as diferentes variedades de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*, entretanto estudos recentes comprovam que a presença ou ausência do cristal continua sendo o maior critério para distinguir essas duas espécies do gênero *Bacillus*.

Métodos genotípicos, usados como ferramentas moleculares para taxonomia de *Bacillus thuringiensis* sugerem uma estreita relação entre *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* e até mesmo *Bacillus anthracis*. Alguns pesquisadores distinguem com sucesso o *Bacillus cereus* do *Bacillus thuringiensis*. GIFFEL et al (1997), descreveu a possibilidade de discriminar o *B. thuringiensis* do *B. cereus* usando sondas específicas de DNA baseadas particularmente em regiões variáveis de RNA16S. Outros métodos moleculares tais como RAPD-PCR ou ribotipagem também são descritos para classificar bactérias entomopatogênicas.

Um estudo recente de classificação de *Bacillus thuringiensis* foi realizado por LECADET e colaboradores (1999), com base no antígeno flagelar, determinação de caracteres bioquímicos, sobretudo utilização de açúcar, bem como a presença e morfologia do cristal de proteínas, analisados em SDS-PAGE com o objetivo de determinar também o grau de toxicidade para insetos das diferentes linhagens. A morfologia dos cristais é uma característica muito importante, pois estes podem refletir um tipo específico para determinadas linhagens, suas formas variadas dependem diretamente da composição das suas subunidades. Este estudo foi realizado com colaboração da WHO (Organização Mundial de Saúde) no IEBC (Centro Internacional de *Bacillus* Entomopatogênicos), onde estão oficialmente catalogadas e classificadas atualmente 80 sorovares-H.

2.3. Síntese e Estrutura do corpo Paraesporal de *Bacillus thuringiensis*

A formação do corpo paraesporal dentro do esporângio do *Bti*, segue um curso similar para todas as outras espécies de *Bacillus thuringiensis*. A síntese das maiores proteínas do corpo paraesporal é iniciada nas três primeiras horas da fase de esporulação, e continua por diversas horas (LEE, ECKBLAD & BULLA, 1985). A formação das inclusões começa durante a fase 2 da esporulação e coincide com a formação do septo paraesporal (CHARLES & DE BARJAC, 1982) e, após uma hora, inclusões de diferentes densidades estão dentro do corpo paraesporal. A síntese do corpo paraesporal continua até o final do quinto estágio de crescimento, o qual pode algumas vezes apresentar esporos refringentes. As paredes do esporângio são lisadas no último estágio de crescimento ou sétimo estágio, e o corpo paraesporal é lançado intacto para o meio do cultivo. Sob condições de crescimento padrão, usando meios comuns tais como Caldo Nutriente ou leite peptonizado, a formação do corpo paraesporal se completa em 24 horas após início do cultivo, porém, a autólise do esporângio ainda necessita de mais 24:00 a 48 horas para liberar o corpo paraesporal.

A estrutura morfológica do corpo paraesporal do *Bti* é esférica ou ovóide, medindo em torno de 1µm de diâmetro, sendo constituído de três tipos de inclusões protéicas, limitadas por uma rede de lâminas envelopadas de composição química ainda indeterminada. Observa-se que cada uma dessas inclusões encontra-se também envolvida individualmente por uma ou mais membranas do mesmo material do envelope (HUMBER & LUTHY, 1981; TYRELL et al. 1981; MIKKOLA et al. 1982; INSELL & FITZ-JAMES, 1985). Este envelope não é uma característica específica do *Bti*, outras

linhagens também podem apresentá-lo. Segundo RIBIER & LECADET (1975), este envelope é resistente à ação de detergentes e proteases.

2.4. Características das Toxinas do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Bti)

As toxinas do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* são sintetizadas após ter-se completado o crescimento exponencial da bactéria e todas estão presentes em um único cristal, embora uns poucos isolados produzam cristais que aparentemente não estão associados com a toxicidade para nenhum inseto. A produção de toxinas ativas contra diferentes Ordens de inseto não é restrita a um único sorovar de *B. thuringiensis*, mas pode ser encontrado em muitos sorovares. O maior interesse são as toxinas ativas contra Dipteros, devido ao envolvimento destes com enfermidades relevantes em saúde pública e agricultura (YOUSTEN, 1996).

O *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* tem um corpo paraesporal constituído por pelo menos 4 proteínas, embora haja uma certa discrepância quanto ao número e tamanho destas, duas propriedades são características básicas para o corpo paraesporal (CRICKMORE et al., 1995; HOFTE & WHITELEY, 1989).

A primeira delas mostra o corpo paraesporal constituído por quatro grandes proteínas com massa molecular de 125 KDa (Cry4A), 135 KDa (Cry4B), 68KDa (Cry11A) e 58KDa (Cry10A), cujos genes já se encontram clonados e seqüenciados. O *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* possui além dessas uma proteína de 28 kDa, referida como Cty1A (YOUSTEN, 1996; HOFTE & WHITELEY, 1989).

A segunda propriedade básica é sobre o aumento do número de proteínas detectadas também por SDS-PAGE, quando o corpo paraesporal é solubilizado em

condições alcalinas, particularmente pH 9,5 ou mais. Estas proteínas adicionais têm massa molecular em média menores que os das proteínas detectadas no corpo paraesporal intacto (PFANNENSTIEL, et al., 1984).

Proteases similares existentes em condições alcalinas no intestino médio das larvas dos dípteros, aumentam a taxa de ativação da toxina “in vivo”. De fato CHARLES & DE BARJAC (1983), demonstraram uma completa dissolução do corpo paraesporal do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, agindo no intestino médio das larvas *Aedes aegypti*, sugerindo assim um maior envolvimento das enzimas proteolíticas dos intestinos dos insetos.

A proteína de 28kDa do corpo paraesporal tem sido a mais estudada porque foi a primeira envolvida com a atividade larvicida, pelo tamanho da proteína, e pelas suas propriedades citolíticas que diferem das outras proteínas dos outros sorovares de *Bacillus thuringiensis*. THOMAS e ELLAR (1983b) foram os primeiros a detectar a atividade citolítica da proteína de 28 KDa. Essa proteína é a mais abundante no corpo paraesporal, e causa lise nas células de vertebrados e invertebrados em condições experimentais de laboratórios. Foi considerada primeiramente responsável pela atividade citolítica e solubilização do corpo paraesporal (DAVIDSON & YAMAMOTO, 1984; CHILCOTT & ELLAR, 1988).

A proteína de 65kDa, codificada pelo gene cryIVD (DONOVAN et al., 1988), não é um produto de clivagem proteolítica, resultado de produto de solubilização como foi sugerido por IBARRA & FEDERICI (1986), entretanto muitos estudos são ainda necessários para o seu entendimento. Baseado na sequência de nucleotídeos, a massa dessa proteína é de 72,4 kDa vistas em gel de poliacrilamida (SDS PAGE). Quanto à

atividade larvicida, CHILCOTT & ELLAR (1988), demonstraram que a proteína 68 kDa (Cry11A) é a mais tóxica para mosquitos, porém é menos tóxica que o cristal intacto, sugerindo assim um sinergismo na ação das toxinas, sobretudo para larvas de estágio de crescimento mais avançado (GILL et al. 1992).

A purificação da proteína de 68 kDa(Cry11A) pode revelar a seqüência dos aminoácidos dessa proteína e permitiu aos pesquisadores (DONOVAN, DANKOCSIK & GILBERT, 1988) determinarem a seqüência N-terminal para os 16 primeiros aminoácidos dessa proteína: Met-Glu-Asp-Pro-Leu-Asp-Leu-Asp-Leu-Ser-isoLeu-Val-Asn-Glu-Thr-Asp.

As proteínas de 128 kDa e 135 kDa foram estudadas partindo-se do enfoque dado às proteínas 27 kDa e 65 kDa. A avaliação dos dados da literatura sobre a toxicidade dessas duas proteínas é complicada por diferentes fatores, que são a identificação das proteínas testadas, a forma na qual elas serão utilizadas nos bioensaios (cristalina, solubilizada ou precipitada), a espécie de hospedeiro susceptível e o estágio larval. Embora haja poucas informações relativas à existência da toxicidade dessas proteínas, várias análises foram realizadas por cromatografia de coluna por CHILCOTT & ELLAR (1988), e para as duas proteínas 128 kDa e 135 kDa, ficou definido que a proteína 135 kDa é a mais tóxica das duas, pelo menos para larvas de *Aedes aegypti* apesar de haverem diferenças na especificidade tóxica dessas proteínas para diferentes espécies de mosquitos (DELECLUSE et al., 1988). Isto não é considerado um dado surpreendente pois, achados similares foram relatados para toxinas de *Bacillus thuringiensis* ativas contra insetos lepidopteros (HOFTE & WHITELEY, 1989).

Um estudo recente feito por CRICKMORE e colaboradores (1995), para avaliar a toxicidade individual de cada uma das δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (Cry4A, Cry4B, Cry11A e a Cty1A) procedendo ensaios biológicos contra larvas de *Aedes aegypti* utilizando cristais purificados das toxinas demonstraram que a toxina 68kDa (Cry11A) é aquela que apresenta maior atividade, sendo duas vezes mais ativa que a proteína de 135kDa (Cry4B), e cerca de cinco vezes mais ativa que as proteínas 68kDa (Cry11A) e Cty1A, mesmo em concentrações suficientes para matar 50% das larvas. Em concentrações maiores a toxina CtyA foi a que apresentou maior atividade contra *Aedes aegypti*. Foi também observada interações sinérgicas em todas as combinações de toxinas testadas, entretanto nenhuma mistura mostrou-se tão ativa quanto o cristal nativo de *Bti*.

2.5 Mecanismo de Ação das Toxinas do *Bacillus thuringiensis*

A ação das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* esta diretamente envolvida com a solubilização do cristal no intestino médio dos insetos alvo, através de processos proteolíticos, onde as proteases quebram as pró-toxinas favorecendo a ligação das toxinas Cry aos sítios receptores no intestino dos insetos. Ocorre assim, uma inserção na membrana apical o que levará à formação de poros ou canais iônicos, inespecíficos, cuja formação se dá nas células do epitélio intestinal das larvas de Dípteros, principalmente culicídeos e simúlídeos, lepidópteros e coleópteros, terminando em um processo conhecido como lise osmótico-coloidal. Além disso ocorre uma parada alimentar por parte das larvas desses insetos, ocasionando assim a morte dos mesmos. Desse modo, os

cristais são na verdade pró-toxinas, e para que elas sejam completamente ativas é necessário que os insetos suscetíveis se alimentem dos mesmos (HOFMANN et al., 1986).

Os estudos sobre o mecanismo de ação das pró-toxinas de *Bacillus thuringiensis* nos insetos, bem como a natureza dos canais iônicos, são ainda bastante controversos. Alguns autores descrevem a formação desses canais iônicos como sendo um grande poro lítico que não é específico para íons em particular, outros referem-se a estes como canais específicos para íons que, ocasionariam a ruptura da membrana, mas não necessariamente seriam responsáveis pela lise das células do epitélio intestinal dos insetos (KNOWLES & ELLAR, 1987).

Experimentos “in vivo” têm demonstrado que as proteínas *Cry* se ligam às microvilosidades no intestino médio dos insetos. “In vitro” foram construídos recombinantes entre *Cry1Aa* e *Cry1Ac* e evidenciaram que a especificidade estava localizada no domínio central da toxina para alguns insetos e domínio C-terminal e central para outros (VISSER et al. 1993). VAN RIE e colaboradores (1990) demonstraram que a especificidade e os domínios de ligação para a toxina eram colineares para *Cry1Aa*. Exames da estrutura do cristal de *Cry3A*, sugeriram que a base física do próprio cristal é o que facilita a ligação da toxina aos sítios receptores. Com base nesses achados, estudos de mutageneses tem sido direcionados, com o objetivo de se entender um pouco mais sobre a cinética das toxinas *cry* e sua especificidade para diferentes Ordens de insetos.

Diferenças da extensão da solubilização, em alguns casos podem explicar as diferenças encontradas no grau de toxicidade entre as proteínas *Cry* (DU et al. 1994). Uma redução na solubilização dos cristais foi especulada como sendo um mecanismo

potencial para a resistência por parte dos insetos às proteínas Cry (MCGAUGHEY & WHALON, 1992).

Outros estudos de mecanismo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* também demonstraram que existe um sinergismo na interação das toxinas. WU & CHANG (1985) foram os primeiros a observar que quando a proteína tóxica era fracionada através de purificação das inclusões do corpo paraesporal de *Bti* e depois misturadas e testadas contra as larvas de *Aedes aegypti*, a atividade de algumas combinações era maior que, quando testadas em frações individuais, sugerindo assim um sinergismo entre as proteínas. Outros autores confirmaram essa interação entre as várias toxinas de *Bti* (CHANG et al. 1993).

A toxina citolítica Cyt1A de *Bti* atua de maneira similar às proteínas Cry, diferindo-se apenas nos componentes da membrana celular que são necessários para iniciar a interação entre estas toxinas e a membrana celular do epitélio intestinal dos mosquitos. Enquanto as proteínas Cry se ligam a glicoproteínas presentes nas microvilosidades da membrana, a proteína Cyt1A tem como afinidade primária componentes lipídicos da membrana, mais especificamente para ácidos graxos insaturados (WIRTH et al., 1997).

2.6. Resistência dos insetos as toxinas de *Bacillus thuringiensis*

A evolução da resistência tem sido um mecanismo de defesa dos insetos contra as táticas de controle, haja visto o que acontece com os inseticidas químicos, onde mais de 500 espécies de insetos e ácaros tem sido resistentes a um ou a múltiplos inseticidas (GEORGHIOU & LAGUNES-TEJEDA, 1991).

Devido ao mecanismo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* esperava-se que os insetos não desenvolvessem resistência às toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Porém, na década de 80, experimentos realizados em laboratório, mostraram que um número considerável de insetos de várias espécies, já apresentavam diferentes níveis de resistência ao cristal de proteínas. Estes bioensaios foram realizados com exposição direta ao cristal de toxinas, sob pressão seletiva de gerações sucessivas de insetos coletados no campo, bem como insetos que foram criados em laboratório. O grau de resistência observado nas populações de insetos é expresso pela Concentração Letal 50% (LC_{50}) dos insetos resistentes/ Concentração Letal 50% (LC_{50}) dos insetos susceptíveis (TABASHNIK, 1994).

Insetos da Ordem Lepidoptera, como a *Plodia interpunctella*, lagarta do algodão e a *Spodoptera littoralis*, são exemplos de populações de insetos resistentes à toxina Cry1. Algumas espécies de besouros que atacam os cultivos de batatas, também se incluem nos insetos refratários a toxina de *Bacillus thuringiensis*. (MCGAUGHEY, 1985).

Nenhuma resistência foi até o momento detectada em populações de insetos da Ordem Diptera em trabalhos de campo, tratados com *Bti* em programas estabelecidos há mais de 10 anos na África, na Alemanha e na França. Ainda assim há uma preocupação constante dos pesquisadores em isolar novos sorovares de *Bacillus thuringiensis* e avaliá-los quanto a toxicidade para diferentes ordens de insetos (MARGALIT, 1998).

2.7. A genética e a Biologia Molecular do *Bacillus thuringiensis*

O genoma de diferentes linhagens de *B. thuringiensis* pode variar de tamanho, em torno de 2,4 a 5,7 milhões de bp (CARLSON et al., 1994). Mapas físicos tem sido construídos para estudar e comparar *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus*, e tem mostrado que os cromossomos de ambas espécies, tem uma organização similar próximo a metade da origem de replicação, por outro lado exibem grande variabilidade na sua porção terminal (CARLSON et al., 1996). A maioria dos isolados de *B. thuringiensis* têm diversos elementos extracromossomais, podendo ser circulares ou lineares. Sabe-se que, o cristal de proteínas que compõem o corpo paraesporal é geralmente codificado por grandes plasmídeos (GONZÁLEZ et al, 1981). CLARK & DEAN (1983), empregando técnicas de utilização de mutantes Cry identificaram um possível envolvimento de plasmídeos específicos na produção de δ -endotoxina de *Bti*. WARD & ELLAR (1983) também assinalaram que um plasmídeo de 75-Md está essencialmente envolvido na produção da toxina de *Bti*. Uma análise de mais de 100 plasmídeos isolados, revelou que a perda do plasmídeo 75-Md está invariavelmente acompanhada pela perda da toxina de *Bti*, o que confirma o envolvimento do plasmídeo 75-MDa na produção do cristal de toxinas desse sorovar.

No ano seguinte, GONZÁLEZ & CARLTON (1984) examinando um complexo plasmidial de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* contendo 8 plasmídeos de uma linhagem do tipo HD-567, sendo que, esta linhagem era um reisolado de ONR-50-A, com tamanhos de 3.3, 4.2, 4.9, 10.6, 69, 75, 105 e 135 Md também confirmaram o envolvimento do 75Md com a toxicidade. Observações posteriores de HIMENO e colaboradores (1995), confirmaram esses resultados.

Em 1989, HÖFTE & WHITELEY fizeram uma revisão a cerca dos genes que codificam as proteínas inseticidas do *B. thuringiensis*, denominados Cry. Segundo esses autores são quatorze os genes que especificam uma família de proteínas, denominadas δ -endotoxinas, com ação inseticida, que foram separadas em quatro grandes grupos e diversos subgrupos, baseando-se nas similaridades estruturais e no espectro de ação das toxinas que codificam. Desse modo os genes CryI estariam associados às toxinas específicas contra insetos lepidopteros, os genes CryII tóxicos para lepidopteros e dipteros, os genes CryIII tóxicos contra coleopteros e os genes CryIV especificamente tóxicos para insetos da Ordem Diptera.

Além dessas o *Bti* H-14 apresenta um gene que codifica uma toxina com peso molecular entre 26 e 28 KDa, e que é citolítica e ativa contra dípteros. Este gene não se relaciona estruturalmente aos genes Cry e recebeu o nome de CytA, por causa da sua ação. FEITELSON e colaboradores (1992) relacionaram 29 proteínas dos cristais, e sugeriu a existência de duas novas categorias de genes Cry ; CryV e CryVI, ativas contra nematóides.

Uma característica comum dos genes Cry de *B. thuringiensis* é a sua expressão durante a fase estacionária dessa bactéria. Seus produtos geralmente se acumulam na célula mãe para formar inclusões ou cristais protéicos que podem chegar de 20% a 30% do peso seco das células esporuladas. O alto nível de síntese de cristais de proteínas pelo *B. thuringiensis*, e a sua ocorrência exatamente na fase estacionária de crescimento, é coordenada por uma série de mecanismos ocorridos na transcrição, pós-transcrição e pós-transdução para expressão dos genes Cry (AGAISSE & LERECLUS, 1994; BAUM & MALVAR., 1995).

O mecanismo de transcrição dos genes Cry têm sido considerado como exemplo típico de expressão dependente de esporulação. Porém, estudos recentes da expressão gênica de genes Cry3Aa tem revelado que essa suposição pode ser questionada, desse modo torna-se necessário distinguir entre os genes Cry que são expressos durante a fase estacionária, ou seja, dependentes de esporulação, daqueles que são expressos independentemente da fase esporulada do crescimento bacteriano (ERRINGTON, I., 1993).

A expressão dos genes Cry parece estar associada a um controle temporal e espacial, devido à fase de crescimento da bactéria em que eles são produzidos. Estudos realizados usando como modelo o *Bacillus subtilis* têm fornecido informações detalhadas dos complexos mecanismos que controlam a esporulação.

Durante a transcrição gênica, o processo de esporulação parece ser controlado por sucessivos fatores de ativação, denominados fatores sigma, que se ligam no centro da RNA polimerase para transcrição direta através de sítios específicos ou seja, aos promotores para a esporulação.

Visando o aprimoramento da utilização de *B. thuringiensis* como agentes de controle biológico, diversos programas de isolamento de cepas e identificação de genes Cry, com diferentes atividades entomopatogênicas, tem sido desenvolvidos em todo o mundo (CARLTON et al., 1990).

A expressão dos genes de δ -endotoxinas tem sido analisada em outros organismos (GELERNTER & SCHWVAB, 1993). Esses sistemas são utilizados como alternativas mais apropriadas para produção das proteínas Cry e sua veiculação.

Historicamente, a PCR foi descoberta e também assim denominada por SAIKI colaboradores (1985), embora seus princípios já tivessem sido descritos por KLEPPE e colaboradores, em 1971 e PANET & KHORONA em 1974. A princípio, a técnica consistia em banhos ajustados às temperaturas adequadas e a utilização do fragmento de Klenow da DNA polimerase I de *Escherichia coli*. Este fragmento é produzido após clivagem proteolítica da DNA polimerase de *Escherichia coli*, e o produto obtido é uma proteína de 76kDa, que não apresenta atividade exonucleásica da enzima nativa. Todavia, esta enzima tornava-se inativa em presença de altas temperaturas, assim a cada ciclo da PCR, era necessário acrescentar uma nova alíquota desta. Essa termo-sensibilidade da enzima, apresentava inúmeras desvantagens como o surgimento de bandas inespecíficas, além da possibilidade de contaminação cada vez que os tubos eram manipulados ao final de cada ciclo, quando então, era adicionada mais enzima (MULLIS & FALLONA, 1987).

O fragmento de Klenow, permite que uma molécula específica seja copiada cerca de 200.000 vezes, entretanto o produto final é irrisório no tocante a seqüência alvo. Desse modo era necessário o uso de sondas específicas em ensaios de hibridização para visualização do produto amplificado (SAIKI et al., 1985-1986).

A grande revolução da PCR foi obtida por SAIKI et al., 1988 quando ele usou uma enzima - DNA polimerase extraída de uma bactéria termófila (*Thermus aquaticus*), enzima esta capaz de resistir a grandes variações de temperatura, o que possibilitou um aumento na especificidade da reação, uma vez que a temperatura ótima da ação da enzima passou de 25°C a 37°C para 72°C, conseqüentemente aumentando a estringência da reação. O uso da enzima termoestável levou a uma automação no processo

(termocicladores automáticos programáveis), uma vez que tornou-se absolutamente desnecessária a adição constante de enzima ao final de cada ciclo da PCR, diminuindo assim a possibilidade de contaminação.

A metodologia da PCR consiste numa síntese enzimática “in vitro” levando a geração exponencial de seqüências gênicas partindo de misturas simples ou complexas de RNA ou DNA (MULLIS & FALOONA, 1987).

Basicamente, a reação tem os seguintes componentes: o DNA a ser amplificado (DNA molde, alvo ou “Template”), 4 desoxiribonucleotídeos tri-fosfato (Adenina, Timina, Citosina e Guanina), DNA polimerase e um par de oligonucleotídeos sintéticos, também denominados iniciadores ou “primers”, complementares às regiões adjacentes à região a ser amplificada, e por último um tampão adequado a reação. Todos estes componentes juntos, associados a alterações sucessivas de temperaturas levarão a desnaturação do DNA, os iniciadores se anelam as fitas de DNA então desnaturadas e a fita molde será então copiada. Desse modo teremos três situações: desnaturamento, anelamento e extensão do DNA em ciclos repetidos que variam de 25 a 40 ciclos, dependendo do protocolo estabelecido para diferentes estudos moleculares.

2.9. - Amplificação Randômica de DNA Polimórfico através da Reação em Cadeia da Polimerase (RAPD) (AP-PCR)

Genomas amplificados com iniciadores de seqüência arbitrária através da técnica de AP-PCR resultam em produtos de amplificação denominados RAPDs (STEPHAN, et al., 1994)

A metodologia RAPD-PCR foi descrita por WILLIAMS e colaboradores,(1990) e WELSH & MCCLELLAND (1990), com conotações diferenciadas. WILLIAMS e colaboradores, 1990 empregava na sua técnica iniciadores de 09 a 10 bases enquanto que o WELSH & MCCLELLAND (1990), utilizavam iniciadores longos com mais de 20 bases e baixa estringência de anelamento nos ciclos iniciais. O uso de iniciadores grandes permite que após os ciclos iniciais da PCR, a temperatura seja elevada para um valor mais próximo da temperatura média de desnaturação de fitas de DNA (T_m), já os iniciadores curtos são mais baratos para aquisição no mercado e geralmente apresentam perfis mais claros durante a análise dos géis, podendo ser visualizados facilmente em géis de agarose corados com brometo de etídio, portanto um procedimento simples, porém com menor poder de resolução.

Os produtos da AP-PCR visualizados nos diversos tipos de géis, podem ser utilizados na distinção, identificação, caracterização e determinação de relações filogenéticas entre os mais diversos organismos. Para este estudo pode-se considerar as bandas pela sua presença/ausência ou presença/intensidade/ausência. A maioria dos autores considera as bandas obtidas apenas pela presença/ausência em cada par de taxons, e os dados obtidos são utilizados na construção de matrizes. Estas matrizes são empregadas em coeficientes de similaridade baseados na proporção de bandas compartilhadas e não compartilhadas entre cada par de taxons analisado. Obviamente, o índice de similaridade é diretamente proporcional à similaridade existente entre os genomas comparados, e estes índices de similaridades podem ser posteriormente empregados na construção de fenogramas através de programas específicos para este fim (DIAS, 1994).

Atualmente as aplicações de AP-PCR tem merecido destaque no estudo da variabilidade genética de fungos (CALIGIORNE et al.,1999) bactérias (ZAHNER et al., 1999) leveduras, protozoários (STEINDEL et al.,1994), plantas (PARAN et al., 1991) e mamíferos (WELSH et al., 1991b).

2.10. Mosquitos de Importância em Saúde pública.

Os mosquitos pertencem à Ordem Diptera, que compreende mais de 150.000 espécies, agrupadas em 100 famílias. A ordem ainda se divide em duas subordens, *Brachycera* e *Nematocera*, nesta segunda encontra-se a família *Culicidae*, com cerca de 3.000 espécies, na qual estão classificados os mosquitos dos Gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, que são os principais vetores de endemias no Brasil (CONSOLI et al.,1989)

Os mosquitos *Aedes aegypti*, (LINNAEUS, 1762) vetores de Dengue e Febre Amarela urbana são, provavelmente originários da África Tropical, tendo sido introduzido nas Américas durante a colonização. Atualmente encontra-se amplamente disseminado, nas Américas, Austrália e Ásia.

No Brasil, a primeira epidemia de Febre Amarela aconteceu no Recife em 1685, e somente em 1955 foi eliminado o último foco do *Aedes aegypti*, porém em 1976 aconteceu a reintrodução do vetor no Brasil, e de 1994 em diante ele está presente em todo o território nacional (FUNASA, 1994).

O mosquito *Aedes fluviatilis* (LUTZ,1904) é uma espécie neotropical, doméstica e semi-doméstica em muitas regiões do Brasil, não tem sido implicada na transmissão de doenças em condições naturais. Entretanto, em condições de laboratório o *Aedes fluviatilis* é capaz de se infectar experimentalmente com o parasita de malária

aviária (*Plasmodium gallinaceum*) produzindo grandes quantidades de esporozoítas. Na natureza são encontrados em escavações de rochas que acumulam águas de chuva, podendo ser encontrados facilmente nas habitações urbanas, ovipõem em caixas d'água, tanques, barris entre outros, e tem comportamento semelhante ao *Aedes aegypti*. (CONSOLI & LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

O *Culex quiqüefasciatus* (SAY, 1823) é um mosquito cosmopolita, ocorre em regiões meridionais da Ásia, África, e nas Américas. É conhecido como o mais doméstico dos pernilongos, sendo um incômodo para moradores de áreas menos frias (CONSOLI & LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Esta espécie é o vetor primário da filariose bancroftiana no Brasil, sendo altamente hematófago, tendo predileção pelo sangue humano e praticando sua hematofagia à noite, período em que a microfilaremia é aumentada, facilitando assim o contato das microfilárias com este vetor, tornando-o mais eficaz que outros mosquitos susceptíveis.

2.11- Relevância da Utilização de Inseticidas Biológicos

Os inseticidas à base de *B. thuringiensis* são usados atualmente em todo mundo, em países desenvolvidos ou em desenvolvimento para controlar pestes bem como, vetores de doenças humanas e animais (MARGALIT et al., 1998).

Diversas linhagens de *B. thuringiensis* já foram isoladas e até o momento, o *Bti* tem merecido maior atenção devido as suas características tóxico-larvicidas para dípteros, vetores de enfermidades de importância em saúde pública (YOUSTEN, 1996), bem como a sua relativa facilidade de produção em escala industrial, seu longo período de estocagem, além de ser facilmente transportado.

Quanto ao emprego de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* calcula-se que acima de 300.000 litros são aplicados anualmente na África Ocidental contra simuliídeos “borrachudos”, vetores da Oncocercose. Na Europa, ao longo do Rio Reno, mais de 100 comunidades com uma população estimada em 2,5 milhões de habitantes são protegidas dos mosquitos “pernilongos”, através de programas de saúde que usam o *Bti*. Nos Estados Unidos e Canadá existem registros do crescente uso de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* em diferentes distritos (MARGALIT et al., 1998). O *Bti* foi também utilizado na Argentina de 1991 a 1995 (RABINOVITCH, 1997). Por outro lado o *Bacillus sphaericus*, embora seja comprovadamente tóxico contra mosquitos do gênero *Culex*, tem sido utilizado de maneira limitada, restringindo-se as áreas peridomiciliares, ficando dessa maneira deficitário o controle deste vetor quando presente em grandes volumes de água ou em plantas epífitas.

O controle biológico da dengue clássico e dengue hemorrágico com emprego de inseticidas bacterianos com princípio ativo de pró-toxinas de *Bti*, parece não ter sido muito considerado pelos técnicos ou profissionais da área no Brasil, pois estes preferiram aos inseticidas químicos. Para combater o transmissor da dengue, o *Aedes aegypti*, utiliza-se Temephos, cujo nome comercial é Abate, para o tratamento dos criadouros.

Além deste, usa-se a técnica do ultrabaixo volume -UBV - também denominada “Fumacê” para controlar o mosquito adulto, especialmente durante os períodos onde a transmissão do dengue é exacerbada (Ministério da Saúde, 1986).

Os inseticidas biológicos comerciais a base de *B. thuringiensis* apresentam segundo RABINOVITCH et al. (1998) vantagens e desvantagens para o seu emprego. Como vantagens pode-se salientar:

- Seus sorotipos atuam de modo seletivo contra um curto espectro de ordens de insetos.
- São larvicidas e/ou lagarticidas, não tem atividade sobre formas adultas de insetos.
- Devem ser ingeridos pelo inseto susceptível, e atuam no trato intestinal das larvas.
- São biodegradáveis, as pró-toxinas não se transformam em toxinas no trato digestivo humano e de outros animais.
- São facilmente cultiváveis em laboratório e permitem uma rápida produção em massa de pró-toxinas.
- A resistência do inseto alvo é reversível; *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* não possui contra si forma de resistência que comprometa o seu emprego como inseticida.
- O desenvolvimento de inseticidas bacterianos é de custo inferior se comparado com o de inseticidas convencionais, e novas pró-toxinas estão sendo descobertas.
- São estáveis num amplo intervalo de temperaturas.

Como desvantagens no uso de inseticidas bacterianos (RABINOVITCH et al., 1998), a principal barreira está voltada para a duração da ação residual das toxinas, sabe-se da existência de produtos a base de pró-toxinas revestidas ou incapsuladas, para aumentar a ação residual. Nas formulações atuais estão incluídos pós, líquidos concentrados e grânulos. Formulações em forma de tabletes estão sendo desenvolvidas, e algumas tem apresentados uma ação residual de até 30 dias.

O *Bti* e o *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* apresentam baixa reciclagem no meio ambiente, além disso os inseticidas bacterianos apresentam um tempo de estocagem menor que os inseticidas convencionais.

No Brasil, o uso de inseticidas a base de *Bti* se restringe a projetos experimentais (RUAS, et al., 1985; ARAÚJO-COUTINHO & LACEY, 1990).

Somente agora o Ministério da Saúde do Brasil, recomendou a utilização de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, apresentando um programa de erradicação do dengue, visando a eliminação do vetor, *Aedes aegypti*, com o emprego de inseticida bacteriano como medida alternativa em combinação com inseticidas químicos (Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti*, 1996).

3 - OBJETIVOS

- Avaliar a atividade larvicida de doze sorovares de *Bacillus thuringiensis* contra três espécies de mosquitos, (Diptera:Culicidae) *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis* e *Culex quinquefasciatus*, quando tratados com tais bactérias.
- Construir curvas de crescimento dos referidos sorovares, utilizando-se de avaliação turbidimétrica, com o objetivo de conhecer a biologia e comportamento dos *Bacillus* entomopatogênicos, sua velocidade de crescimento e o tempo de geração destas bactérias.
- Amplificar a região gênica que codifica os genes Cry4A/B nos diferentes sorovares de *Bacillus thuringiensis* através da Reação em Cadeia da Polimerase e avaliar a presença dos genes Cry4A/B nos sorovares que apresentaram atividade larvicida contra as tres espécies de mosquitos estudadas.
- Utilizar a técnica de RAPD para avaliar o grau de similaridade entre os diferentes sorovares de *Bacillus thuringiensis*, e tentar estabelecer um elo de ligação entre o perfil de bandas apresentadas pelos diferentes sorovares e a atividade larvicida apresentada nos ensaios biológicos contra larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis* e *Culex quinquefasciatus*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Amostras utilizadas para obtenção de esporos

Os sorovares de *Bacillus thuringiensis* utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Dr. Leon Rabinovitch e sua equipe, do “ Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB), Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ”, pertencentes a Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* (CCGB) e encontram-se na Tabela 2.

Tab. 2. Sorovares de *Bacillus thuringiensis* utilizados no presente estudo

Sorovar	Nº LFB	Nº IEBC	Fonte	Origem	País	Ano
KYU	727	T11A001	<i>Bombyx mori</i>	Michio Ohba	Japão	1978
BRA	869	T39001	pimenta do reino em pó	L. Rabinovitch	Brasil	1992
OSW	856	T38001	pimenta do reino em pó	L. Rabinovitch	Brasil	1992
NIG	725	T08001	<i>Gites larvares</i>	J.Weiser .	Tchecoslovaquia	1980
TOU	715	T11001	<i>Galleria mellonella</i>	A. Krieg	Alemanha	1970
KUR	475	T03A175	<i>Heliotis armigera</i>	P.Jacquemard	Tchad	1982
THO	724	T12001	<i>Galleria mellonella</i>	J. V.Thompson	USA	1969
MOR	756	T08028	solo, João Pessoa, PB	L. Rabinovitch	Brasil	1990
ISR	584		pó padrão, IPS-82	Inst. Pasteur	França	1977
CAN	677			ITAL,SP	Brasil	-
DAR	731	T1001	<i>Galleria mellonella</i>	A.Krieg .	Alemanha	1967
OST	717	T08A001		Ren Gai Xin	China	1979

4.2 Cultivo dos Bacilos

Todas as bactérias foram cultivadas em meio Ágar Metal Nutriente - AMN, líquido ou sólido (RABINOVITCH et al.,1975), para obtenção de esporos e cristais em abundância para bioensaios contra larvas de Culicídeos. O meio líquido consiste em; caldo nutriente, cloreto de sódio, magnésio, manganês e água destilada nas seguintes concentrações.

Meio AMN líquido	g%
CALDO NUTRIENTE	0,8
NaCl	0,5
Mg ²⁺ (como MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	0,001
Mn ²⁺ (como MnSO ₄ . 4H ₂ O)	0,001
Água Destilada	qsp

Os componentes do meio de cultura foram diluídos em 80% de água destilada, e o pH (7,2 - 7,4) foi ajustado com NaOH1N. O volume final foi então completado, e distribuído em frascos adequados e em seguida, autoclavado a 121° C, durante quinze minutos.

Para a preparação do meio de cultura sólido foram acrescentados 1,3 % de ágar-ágar em pó. Os sorovares de *Bacillus thuringiensis* cresceram no meio AMN sólido contido em tubos de ensaio inclinado, de modo que o crescimento cobrisse toda a superfície do meio. A incubação foi de 33°C a 35°C e não excedeu ao tempo de 48 a 72 horas de incubação

Os tubos não foram fechados completamente para proporcionar um ambiente de aerobiose favorecendo assim, o crescimento dos sorovares *Bacillus*.

4.3 Curvas de Crescimento.

Os mesmos sorovares de *Bacillus thuringiensis* que foram utilizados nos bioensaios de atividade larvicida foram usados para a construção das curvas de crescimento.

Os sorovares de *Bacillus thuringiensis* que estavam estocadas em AMN (Ágar Metal Nutriente) foram inoculadas em 5,0mL de Caldo Nutriente Difco, como um pré-inóculo, e incubadas em estufa bacteriológica a 33° C, por 24 horas. Após este tempo de crescimento, foi retirado 1mL da cultura e inoculado em 50,0 mL de Caldo Nutriente (Difco), sendo incubados a 33°C em agitador (New-Brunswick- Série 25 - Scientific), em 150 rpm, a 33°C por 14 horas, num frasco de Erlenmeyer de 150mL.

Para obtenção de uma concentração inicial padrão de 1×10^7 bactérias/mL, retirou-se 1mL de cada cultivo para leitura da densidade ótica em 600nm, em espectrofotômetro (Shimadzu-UV-1201) cujo alcance era de 3,0 OD (Densidade ótica). Partindo do padrão estabelecido para *E. coli*, onde para densidade ótica igual a 2,0 tem-se $1,2 \times 10^{10}$ bactérias/mL estabeleceu-se o inóculo inicial para 200mL de Caldo Nutriente. Após a homogeneização, dividiu-se em dois frascos de Erlenmeyer contendo 100mL de cultura.

Os pontos estabelecidos para observação do crescimento dos *Bacillus thuringiensis*, foram a partir de leituras da turbidez das amostras em espectrofotômetro. Desse modo foram estabelecidas duas leituras para cada um dos pontos, sendo T_0 o primeiro ponto da curva e os quatro primeiros pontos da curva (T_1, T_2, T_3 e T_4), foram monitorados de trinta em trinta minutos. Já os tempos T_5 e T_6 foram lidos com intervalo de uma em uma hora, enquanto que os pontos T_7 até o T_{10} a leitura foi realizada num espaço de uma hora e trinta minutos. Os tempos T_{11}, T_{12}, T_{13} e T_{14} foram lidos entre 24:00, 32:00, 48:00 e 72 horas, respectivamente.

Para o acompanhamento da transformação celular (formas vegetativas e esporuladas), durante os diferentes tempos de incubação, foram feitas lâminas após 7:00

horas de crescimento, 24 horas, 32 horas, 48 horas e 72 horas. As lâminas foram coradas pelos Métodos de Gram e de Bartolomeu-Mitwer (CARVALHO, 1998).

Das doze linhagens de *Bacillus thuringiensis* usadas para a curva de crescimento, duas foram escolhidas para plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias/mL - UFC/mL: *Bacillus thuringiensis brasiliensis* e o *Bti*.

4.4. Colônia de Mosquitos.

As larvas de mosquitos *Aedes aegypti*, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Carvalho de Resende e sua equipe do Núcleo de Entomologia do Estado de Minas Gerais, Laboratório de Referência Nacional, pertencente à Fundação Nacional de Saúde, FUNASA, Ministério da Saúde.

Os mosquitos *Aedes fluviatilis* e *Culex quinquefasciatus*, foram cedidos pelo Dr. Paulo Pimenta, chefe do Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

Para a colônia de *Aedes aegypti* as larvas e mosquitos adultos foram mantidas em insetário de segurança máxima, aclimatado com temperaturas entre 25^oC a 28^oC e umidade em torno de 70%. As fêmeas adultas eram mantidas em gaiolas de acrílico transparente teladas. A oviposição das fêmeas se dava em papel cartolina vermelho, em formato de pequenos cones, mergulhados em copos de vidro de 250ml. Os cones de cartolina eram então mergulhados em cubas plásticas contendo 2 litros de água aproximadamente, para eclosão dos ovos e as larvas emergentes eram alimentadas com ração de peixe. Assim que, as larvas atingiam o terceiro estágio de crescimento, L3 eram utilizadas para os testes de atividade larvicida frente as bactérias. Os insetos adultos

alimentavam-se a cada dois dias de sangue de cobaias do tipo codornas (*Coturnix cournix japonica*), especialmente mantidas em biotério, para esse fim (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos *Aedes fluviatilis* e *Culex quiquefasciatus*, foram criados em insetário aclimatado, com temperatura em torno de 25°C a 28°C. e umidade entre 70 a 80%. As fêmeas adultas eram mantidas em gaiolas de acrílico transparente, teladas (40x40x40 cm) e alimentadas com sangue de camundongos (*Mus musculus*), e de codornas (*Coturnix cournix japonica*), para maturação dos ovos.

Os ovos eram depositados pelas fêmeas diretamente na superfície da água e transferidos para bacias plásticas contendo 4 litros de água desclorada, para posterior eclosão e crescimento das larvas. Desse modo, não havia um controle de gerações dessas duas espécies de mosquitos. As larvas dos insetos eram alimentadas com ração de camundongo triturada, peneirada e autoclavada (CONSOLI et al, 1989).

Quando as larvas atingiam o terceiro estágio de crescimento, (L3 maduras), eram utilizadas para os testes “in vivo”, contra os sorovares de *Bacillus thuringiensis*.

4.5. Teste da Atividade Larvicida dos *Bacillus thuringiensis*

A metodologia que foi utilizada nos vários testes, visando observar a toxicidade das linhagens de *Bacillus* contra larvas de mosquitos, segue o procedimento usado por OLIVEIRA e colaboradores, (1998).

Para os bioensaios, 1mL da suspensão bacteriana com uma densidade ótica igual a 2, e um comprimento de onda ajustado para 600nm, foi adicionado a 50 mL de água desclorada, contida em copos plásticos descartáveis encerrando ainda 25 larvas L3

maduras. Os testes foram sempre realizados em quatro réplicas para cada bactéria, mais um grupo controle positivo *Bti* e um negativo sem inóculo. Paralelamente, foi feita uma suspensão de esporos em água desclorada da linhagem padrão *Bti* na mesma concentração e plaqueada em diluições sucessivas de 10^{-4} a 10^{-12} em ágar simples, com o auxílio de 5 pérolas de vidro, a fim de determinar o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

A leitura dos resultados dos testes de atividade biológica foi realizada após 24, 48 e 72 horas do início do experimento. O número de larvas mortas eram então, anotadas e depois transformados em percentual de mortalidade.

Os resultados foram considerados conforme (OLIVEIRA, et al., 1998) de acordo com a seguinte classificação:

- 20% de mortalidade igual a baixa toxicidade
- 21% a 50% de mortalidade igual a média toxicidade
- ≥ 50 % de mortalidade igual a alta toxicidade

Também foram realizados, segundo esta metodologia, ensaios com as formas vegetativas de *Bacillus thuringiensis*, com objetivo de avaliar se havia dentre os 12 sorovares, algum que apresentasse atividade tóxica na fase vegetativa, conforme aqueles que expressam os genes Cry, que codificando as proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis*, independentes de esporulação (DE SOUZA et al., 1993).

4.6 Extração de DNA de *Bacillus thuringiensis*

A extração do DNA seguiu a metodologia usada por HARWOOD e colaboradores, (1990) e consiste nos seguintes passos:

De culturas esporuladas foram retirados os doze sorovares de *Bacillus thuringiensis* e inoculados em 3mL de caldo LB (Luria-Bertoni) contidos em tubos do tipo Falcon, "overnight", a 30°C em agitação a 130rpm para crescimento. Desse pré-inóculo foram retirados 100µL que foram inoculados em 10mL de caldo LB e novamente colocados sob agitação nas mesmas condições do pré-inóculo. Depois disto, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 5.000 rpm para obtenção de um sedimento. Este sedimento foi ressuspensão em 1mL de tampão ou Solução I, que consiste de Tris-HCl pH 7; EDTA pH 8; NaCl. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 13.000rpm e sendo-se descartado o sobrenadante. Logo após, foram acrescentados 300µL da Solução I, seguida de homogeneização em vortex. Depois foram adicionados 300µL de solução de Lisozyma (10mg/mL), homogeneizando-se em vortex e invertendo-se \pm 15 vezes, a seguir colocado no gelo por 15 minutos e imediatamente colocado em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida foi acrescentado 25µL de Lauril Sarcosil (30%), homogeneizando-se delicadamente e colocado novamente no banho-maria a 65°C por 28 minutos. Em seguida deixou-se descansar 10 minutos em gelo, logo após seguiu-se o tratamento com fenol-clorofórmio v/v 700µL, homogeneização em vortex até aparência leitosa e centrifugação por 6 minutos a 13.000rpm. Foi então feita a recuperação da fase superior, colocando-a em tubos novos. Depois foram acrescentados 600µL de clorofórmio 1:1, levado ao vórtex e centrifugado por 3 minutos, a 13.000rpm, para recuperação da fase superior que foi transferida para novos tubos, em seguida foi acrescentado 2,5 vezes (v/v) de álcool etílico gelado e em seguida colocado 10µL NaCl na concentração de 5M. A

homogeneização foi feita apenas por inversão dos tubos suavemente. Após este procedimento os tubos foram colocados em freezer -20°C “overnigh” para precipitação do DNA. No dia seguinte os tubos eram retirados do freezer e centrifugados por 7 minutos a 13.000rpm, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 μL de etanol 70% gelado, sendo então centrifugado por mais 5 minutos e descartado o sobrenadante. Por fim, os tubos contendo DNA foram colocados em capela química com exaustão por algumas horas até que estivessem bem secos. Seguiu-se ressuspensão-se em água Mili Q estéril, sendo então estocado em freezer a -20°C , para posterior utilização.

4.7 - Dosagem do DNA

Após a extração, a concentração de DNA foi determinada conforme o SAMBROOK e colaboradores (1989). Assim, as amostras de DNA de concentrações desconhecidas foram aplicadas em gel de agarose 2% em Tris-borato EDTA (TBE), (Tris-borato 89mM; EDTA 2mM pH 8,0), juntamente com padrões de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de Brometo de Etídio 0,5mg/mL, em água, durante 20 minutos. Depois de corado, o gel foi irradiado com luz ultravioleta, através transluminador U.V. (UVP, Inc.) e a intensidade de fluorescência das amostras foi estimada por comparação com o padrão Lambda (λ), onde 1 μL de λ . = 55ng.

4.8. Reação em Cadeia da Polimerase

Para a PCR foi usado um kit PCR (Promega n° 97454) contendo tampão de taqDNA polimerase (5 units/ μ L- estoque 250 unidades), os 4 dNTP - 10mM cada, e o controle positivo para DNA plasmidial -1ng/ μ L.

4.8.1. Condições de Amplificação para PCR

A amplificação foi realizada em um termociclador automático (MJ Reserch, Inc; modelo PTC-100/ Programmable Thermal Controller), utilizando os iniciadores descritos anteriormente. As 12 reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL, contendo uma camada de óleo mineral, de forma a evitar evaporação. Sobre este, foi acrescentado 2uL de cada um dos iniciadores - direto e reverso, 0,4uL de dNTP (mix), 0,1uL de Taq.DNA polimerase (10Xbuffer, w/15mM MgCl₂) e por último 1uL de DNA completando com quantidade de água suficiente para 20 uL, determinando-se assim, o volume final de 20 μ L de cada reação. Os ciclos estabelecidos para amplificação seguem aqueles usados por BEM-DOV e colaboradores (1997), com pequenas modificações; desse modo para uma desnaturação inicial utilizamos uma temperatura de 94° C por 5 minutos para o primeiro ciclo, em seguida foram estabelecidos 35 ciclos nas seguintes condições: 94° C por 1 minuto para desnaturação do DNA, 55°C por um minuto para o anelamento e para a extensão 72°C por um minuto. Um único ciclo final, para garantir a extensão total dos fragmentos foi realizado uma extensão final a 72°C por dez minutos, ficando assim toda a reação de PCR com um total de 37 ciclos, e em cada experimento foi utilizado como padrão de peso molecular o pEL HINDIII.

Após amplificação as amostras eram guardadas em geladeira até serem submetidas à eletroforese.

4.8.2 - Iniciadores

No presente estudo, os iniciadores usados são denominados Primers Universais para Cry4A/B, segundo BEM-DOV e colaboradores, (1997) e foram sintetizados pela Bio- Synthesis Lo No. B041-1. As seqüências são apresentadas abaixo.

Iniciadores	Seqüências	Nº de Bases	Acesso GenBank	Posição dos nucleotídeos
F-CRY4A/B	5'GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC 3'	24	D00248	3324-3347
R-CRY4A/B	5'GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C 3'	25	D00247	3259-3282

4.8.3 - Condições de Eletroforese para produtos de PCR

Foram utilizadas eletroforese em gel de agarose para dosagem de DNA e de poliacrilamida 4% para corrida dos produtos de PCR. Os géis de agarose foram feitos pelo sistema de mini-gel horizontal GIBCO-BRL (modelo horizontal 58), com géis de 1% de agarose, sendo a migração feita a 150v, por aproximadamente, 25-30 minutos. Para eletroforese com géis de poliacrilamida (estoque de 40% de acrilamida/bis em TBE: 0,89mTris-base, pH 8,0) e 300uL de APS(Sigma) e 25 a 30uL de TEMED(Sigma) e água q.s.p. 25mL para polimerização. A coloração dos géis de poliacrilamida (SANGUINETTI e cols., 1994) foi realizada a temperatura ambiente, tendo sido inicialmente fixados em solução de etanol 15% e ácido acético 0,5% durante 5 minutos. Em seguida foram colocados em solução de nitrato de prata 0,2% (Merck), dissolvido

diretamente em 50mL de solução fixadora e ali permaneceram por 5 minutos, e então lavados por dois minutos em água deionizada e destilada. A revelação das bandas foi feita em solução de hidróxido de sódio 0,75M e formaldeído 1M, até visualização dos fragmentos. E finalmente, os géis eram submetidos novamente à solução fixadora para interromper a reação, e então fotografados.

4.9. Condições de Amplificação através de RAPD

Para os ensaios foi utilizado um kit da Amersham Pharmacia Biotech denominado “READY TO GO -RAPD ANALYSIS BEADS”,

A metodologia usada nesta reação, bem com os ciclos para AP-PCR seguiram as recomendações do fabricante do Kit, como a seguir. O volume final da reação deve ser de 25µL, desse modo nos tubos de “Eppendorf” foram colocados 18µL de água estéril, 5µL do iniciador nº1 e 2µL de DNA Template. Como controle positivo do Kit foi usada a *E. coli* B121(DE3)DNA e um controle negativo, isento de DNA. Os ciclos da reação de AP-PCR foram exatamente os seguintes: 1º) 95° C por 5 minutos para desnaturação, 2º) 36°C por 1 minuto para o anelamento 3º) 72°C por 1 minuto para polimerização, 4º) 95°C por 1 minuto para nova desnaturação, 5º) repetição de 45 vezes os passos 2º, 3º e 4º para amplificações, 6º) 36°C por 1 minuto e por último o 7º) 72°C por 7 minutos para extensão.

4.9.1. Iniciadores

O iniciador do Kit READY TO GO-RAPD ANALYSIS BAND usado para a reação de AP-PCR tinha a seguinte sequência [(5'- d GGTGCGGGAA.-3')].

4.9.2. Dosagem do DNA para Utilização em AP-PCR (RAPD)

A figura 03, mostra os resultados das ampliações do sorovar **ISR** nas seguintes diluições; 1:10; 1:50 e 1:100 feitas com o Kit **READY-TO-GO RAPD ANALYSIS BANDS**, Pharmacia Biotech, utilizando o iniciador nº1 [(5'- d GGTGCGGGAA.-3')]. Pela figura 03, pode-se observar bandas igualmente compartilhadas pelo sorovar **ISR** nas três concentrações de DNA. Desse modo optou-se por trabalhar com a diluição 1:100 já que o perfil de bandas foi idêntico para as três diluições. Os resultados dessa avaliação de melhor diluição do DNA do sorovar **ISR** pode ser observado na Figura 3

4.9.3. Condições de Eletroforese para produtos de AP-PCR

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (estoque de 30% acrilamida/bis em TBE: 0,89M Tris-base, pH8,0, 0,89M ácido bórico, 20mM EDTA) foi realizada em sistema de mini-gel Biorad (Mini Protean II dual Slab cell), realizada a 100v, por aproximadamente 2 horas, até que o corante xileno cianol migrasse até sair completamente da extremidade inferior do gel. O tampão de corrida utilizado foi o TBE e 3µ L de cada amostra era aplicado no gel, juntamente com o corante.

4.9.4. Coloração dos Géis de Poliacrilamida

A detecção dos produtos de amplificação nos géis de RAPD, realizada através de coloração pela prata, feita a temperatura ambiente, sob agitação, segundo SANGUINETTI e colaboradores (1994).

4.9.5. Cálculo da porcentagem de Bandas Compartilhadas (Coeficiente de Similaridade)

O percentual de bandas compartilhadas entre os 12 sorovares de *B. thuringiensis* foi realizado em princípio através de análise direta do gel por comparação das bandas de uma canaleta com todas as canaletas do mesmo gel. Através de fotos do gel foram então selecionadas bandas que apresentaram melhor resolução, à partir de 800pb aproximadamente, sendo então, estas as escolhidas para a construção de uma matriz de dados, necessária para a elaboração de um fenograma.

Para elaboração da matriz foram tomados como base a presença e ausência das bandas, partindo do número de bandas que coincidem ou não, monta-se um fenograma usando como ferramenta um programa de computador denominado NTSYS-PC versão 2.0 da Copyrigh 1995. A média da similaridade entre os indivíduos do grupo foi calculada e marcada no fenograma como linha de *fenon*.

A matriz foi baseada no cálculo do Coeficiente de Similaridade de DICE (1945), cuja fórmula é representada como: $S = \frac{2a}{2a + b + c}$ (PINTO; 1996), onde a = número de bandas compartilhadas entre os organismos 1 e 2, b = número de bandas presentes no organismo 1 que estão ausentes no organismo 2 e c = número de bandas presentes no organismo 2 e ausentes no organismo 1.

Os dados obtidos foram agrupados via UPGMA - Unweighet Pair Group Method Analysis (SNEATH & SOKAL, 1962) e usados na construção do fenograma.

5 - RESULTADOS

5.1 Atividade Larvicida

Os ensaios biológicos para avaliar a atividade larvicida dos sorovares de *B. thuringiensis* contra as larvas dos mosquitos *Aedes fluviatilis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* após 24, 48 e 72 horas de exposição são apresentados nas Fig. 1, 2 e 3.

As larvas de *Aedes fluviatilis* ensaiadas com o sorovar **KUR** apresentaram 38.0% de mortalidade com 24 horas, com um acréscimo de 12.0% em 48 horas e 10.0% em 72 horas, resultando em 60.0% de mortalidade total após 72 horas de exposição. O sorovar **KYS** apresentou 17.0% de mortalidade sobre as larvas em 24 horas, mais 6.0% em 48 horas e mais 2.0% após 72 horas, perfazendo um total de 25% de mortalidade, portanto uma toxicidade média. Enquanto que o sorovar **MOR** mostrou 9.0% de mortalidade em 24 horas e o mesmo percentual de mortalidade após 48 horas e um acréscimo de 2.0% em 72 horas de exposição das larvas, totalizando assim 20.0% de mortalidade. O **BRA** se mostrou tóxico para as larvas em 13.0% após 24 horas, 4.0% após 48 horas e 3.0% em 72 horas, portanto baixo percentual de mortalidade. Já os sorovares **OSW** e **TOU** mostraram atividade de 10.0% e 5.0% respectivamente após 72 horas de teste. Enquanto que os demais sorovares não apresentaram qualquer atividade tóxica.

De acordo com o percentual de mortalidade observado para as larvas de *Aedes fluviatilis* e o critério estabelecido por OLIVEIRA e colaboradores (1998) o sorovar **KUR** apresentou uma alta toxicidade, o **KYS** média toxicidade. Os sorovares **MOR** e **BRA** baixa toxicidade. Já para os sorovares **OSW** e **TOU** a mortalidade das larvas foi pouco significativa.

Para larvas de *Aedes aegypti* foi observada mortalidade somente para o controle positivo **ISR**, não foi observada atividade larvicida para os demais sorovares testados para nenhum dos sorovares testados.

Os mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* apresentaram para o sorovar **DAR** 100% de mortalidade, após 24:00 de exposição, tendo portanto um comportamento igual ao controle positivo representado pelo sorovar **ISR**. O **MOR** teve uma taxa de mortalidade de 15.0% após 24:00 de exposição e um acréscimo de 5.0% de mortalidade em 48 horas, em 72:00 não apresentou qualquer atividade. Sendo então considerada uma baixa taxa de mortalidade. O **KUR** mostraram-se medianamente tóxicos para larvas de *Culex quinquefasciatus* pois matou cerca de 12.0% em 24 horas, mais 10.0% em 48 horas e mais 4.0% após 72 horas de inóculo, totalizando então 26.0% de mortalidade. Os outros sorovares não tiveram qualquer atividade.

Em todos os experimentos não foi observada mortalidade das larvas no controle negativo, é importante deixar claro que, em nenhum momento foi oferecido as larvas qualquer alimento, obrigando-as assim, a se alimentarem exclusivamente das bactérias, evitando assim a introdução de outro fator que pudesse comprometer os resultados dos testes.

Os bioensaios realizados contra as larvas de Culicídeos utilizando formas vegetativas dos doze sorovares não apresentaram atividade tóxica para as larvas, comprovando que a toxicidade dos sorovares mencionados neste trabalho está diretamente relacionada com a fase de esporulação do *B. thuringiensis*.

Figura 1 : Atividade larvicida de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis* em larvas L3 de *Aedes fluviatilis* após 24 horas, 48 horas e 72 horas

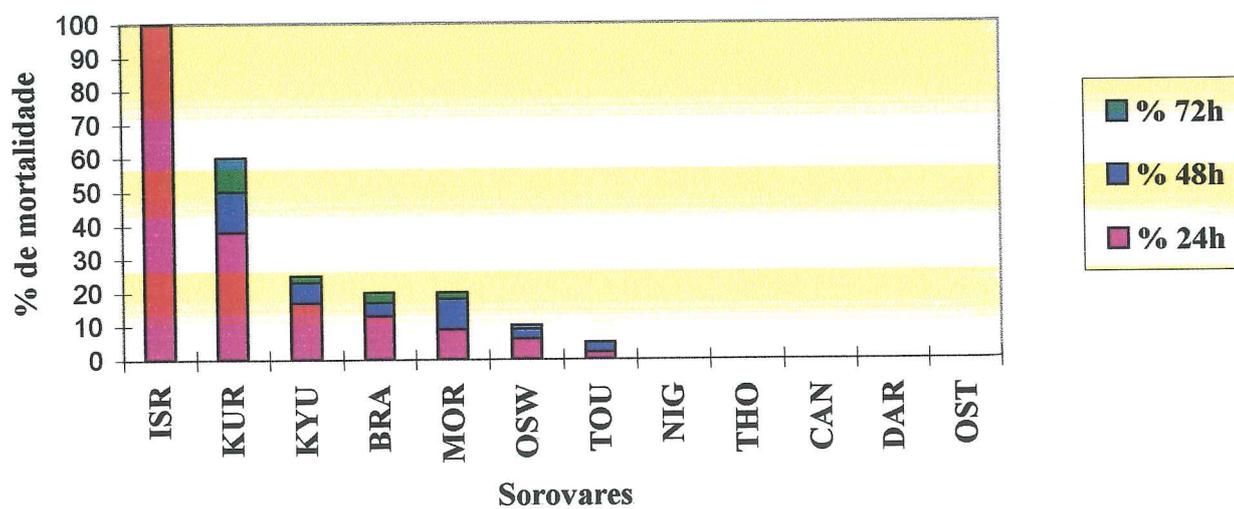


Figura 2. Atividade larvicida de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis* em larvas L3 de larvas de *Aedes aegypti* após 24, 48 e 72 horas

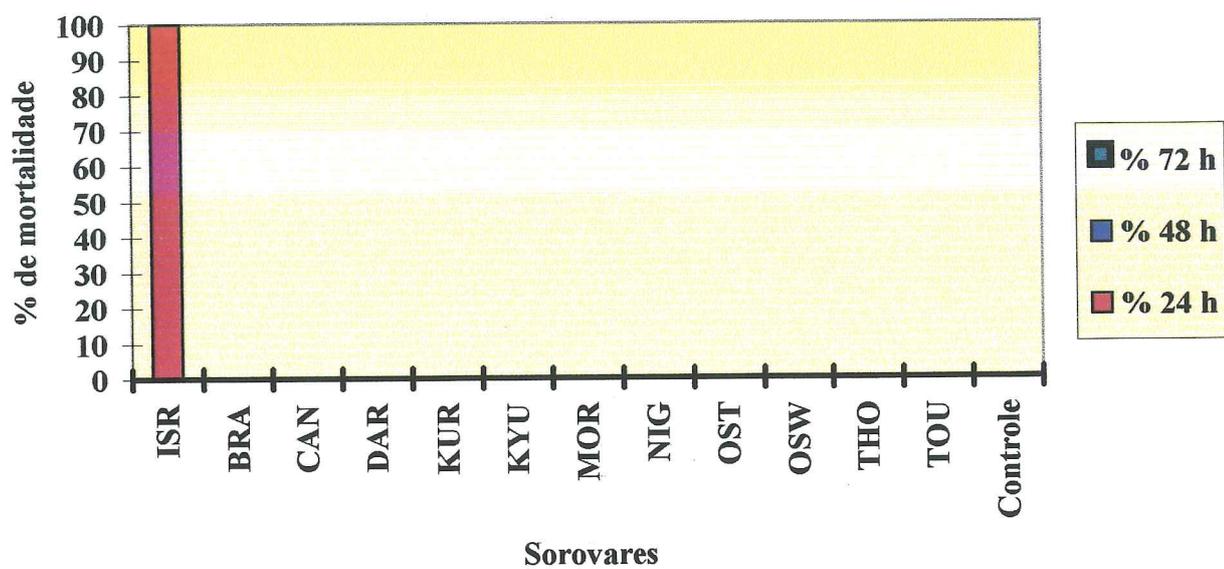
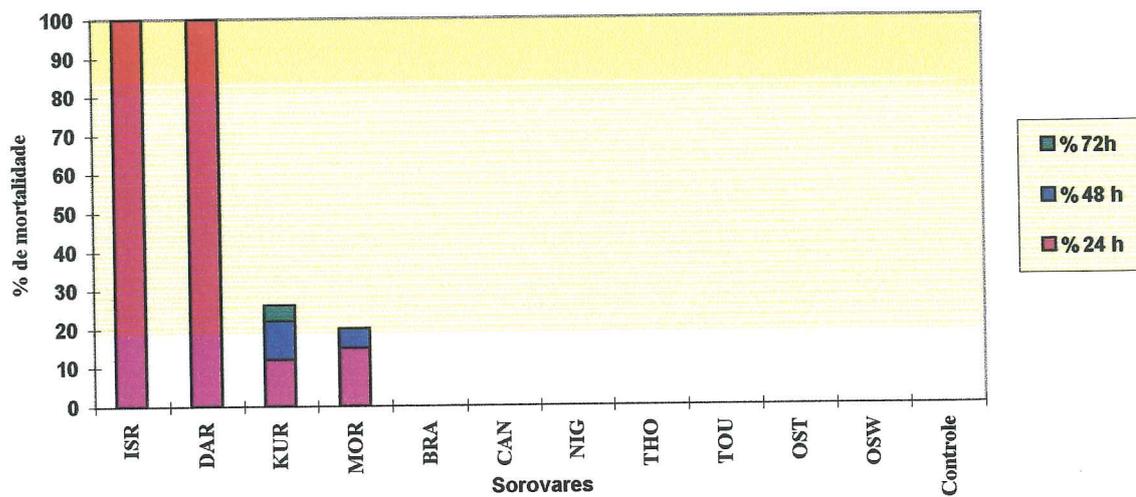


Figura 3. Atividade larvicida 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis* larvas L3 de *Culex quinquefasciatus* com após 24, 48 e 72 horas.



5.2 Curvas de Crescimento

Para as curvas de crescimento, as leituras das absorbâncias em diferentes tempos de crescimento dos *Bacillus* entomopatogênicos, não mostraram diferenças muito significativas entre os sorovares, como estão representados nas Tabelas 3 e 4. Os gráficos de I a XII representam as curvas para cada uma das bactérias.

Quanto ao tempo de geração e a velocidade de crescimento escolhemos dois sorovares para quantificar as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e o Log. de UFC/mL, com a finalidade de estabelecer um padrão uma vez que, não encontramos na literatura nenhum dado científico que pudesse assegurar ou esclarecer um padrão de crescimento para *Bacillus thuringiensis*. O valor encontrado para estes dois sorovares foi de $1,82 \times 10^8$ células correspondentes a uma OD_{600nm} igual a 2,00. Desse modo, escolhemos arbitrariamente o sorovar **BRA** e o sorovar **ISR**, com o intuito de comparar possíveis semelhanças e, ou, diferenças entre o sorovar brasileiro e aquele que é o padrão estabelecido pelo Instituto Pasteur e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), também denominado IPS-82, para ensaios biológicos de atividade mosquitocida.

Os resultados encontrados para ambos, tanto a velocidade de crescimento, quanto o tempo de geração mostraram-se semelhantes e foram calculados com base na fórmula a baixo:

$$\log^Z - \log^{Z_0} = k/2,303 \times (T - T_0) \text{ onde,}$$

K = constante; T₀ = Tempo de geração inicial; T = Tempo de geração final

Z é o log. Na base 10 das UFC/mL no tempo final de crescimento

Z₀ é o log. Na base 10 das UFC/mL no tempo inicial de crescimento

Desse modo, a média das velocidades de crescimento de **ISR - LFB-584** e **BRA - LFB-869** foi de $1,40\text{horas}^{-1}$ e a média do tempo de geração das duas bactérias foi de 0,50 horas ou 30 minutos.

Estes resultados podem ser melhor visualizados nas Tabelas 3 e 4

Tab. 3. Valores de Unidades formadoras de Colônia (UFC/mL), OD_{600nm}, para *Bacillus thuringiensis* sorovar *brasiliensis* LFB 869 após 72 horas de crescimento

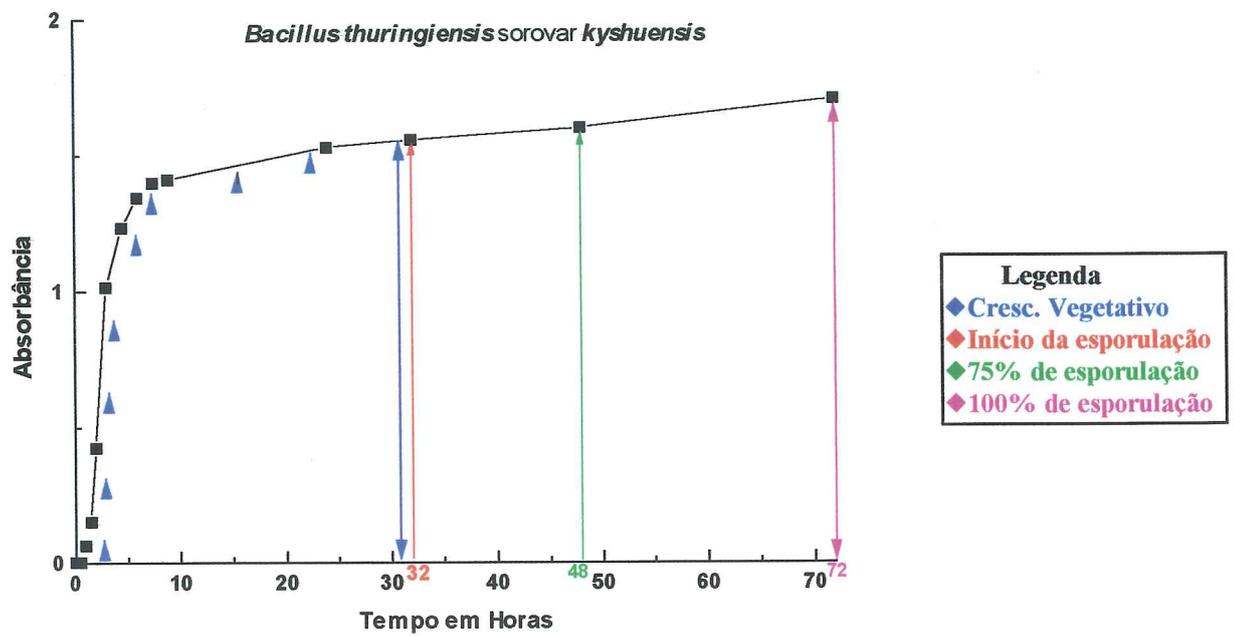
Tempo/hs	OD ₆₀₀	Plaqueamento - UFC/mL	Log UFC/mL
Zero	0,010	2,63x10 ⁵	5,41
0:5	0,012	3,89x10 ⁵	5,58
1:00	0,015	4,59x10 ⁵	5,66
1,5	0,028	9,38x10 ⁵	5,97
2:00	0,034	1,44x10 ⁶	6,16
3:00	0,278	1,39x10 ⁷	7,14
4,5	0,785	1,67x10 ⁷	7,23
6:00	1,341	5,10x10 ⁷	7,70
7,5	1,682	1,42x10 ⁸	8,15
9:00	1,778	1,51x10 ⁸	8,17
24:00	1,808	1,63x10 ⁸	8,21
32:00	1,887	1,72x10 ⁸	8,23
48:00	1,899	1,78x10 ⁸	8,25
72:00	1,987	1,85x10 ⁸	8,26

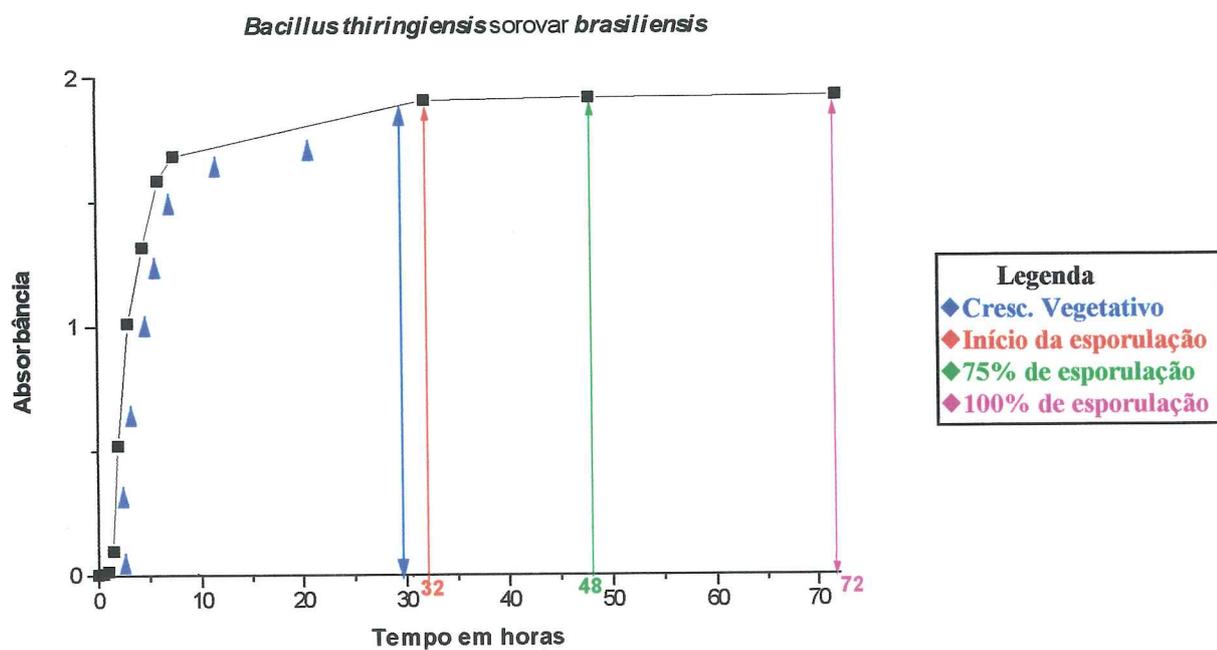
Tab. 4. Valores de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL), em OD_{600nm} para *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* LFB 584 após 72 horas de crescimento

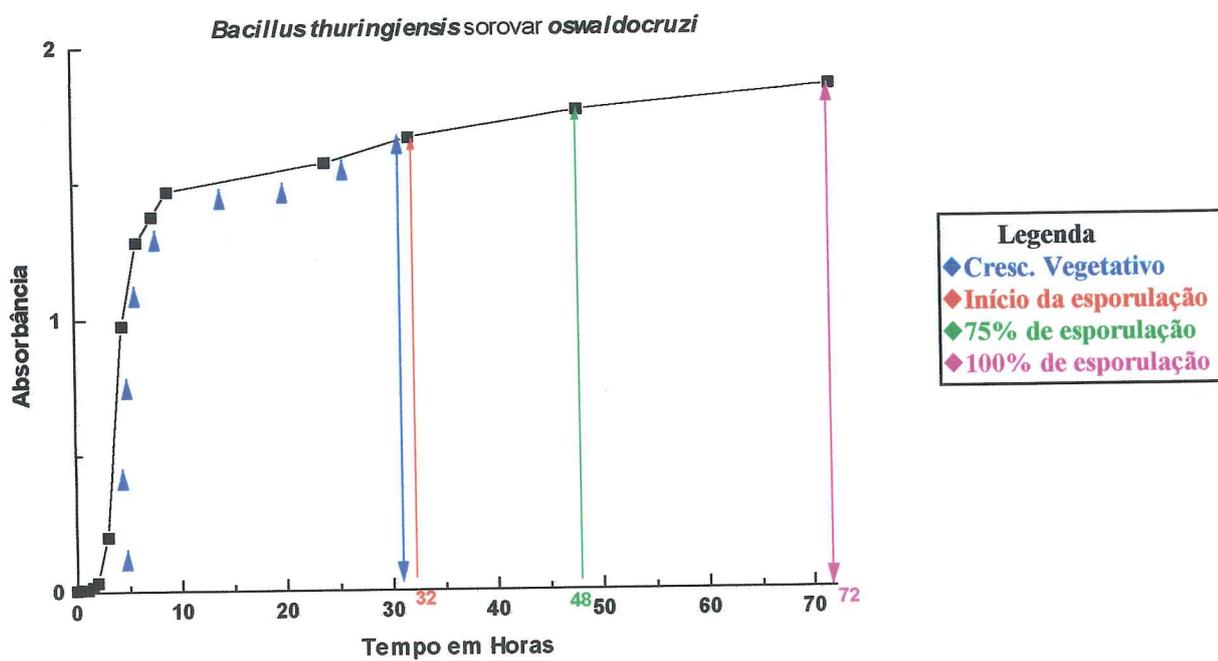
Tempo/hs	OD ₆₀₀	Plaqueamento - UFC/mL	Log UFC/mL
Zero	0,010	1,18x10 ⁵	5,07
0:5	0,015	2,35x10 ⁵	5,37
1:00	0,029	3,48x10 ⁵	5,54
1,5	0,098	8,75x10 ⁵	5,94
2:00	0,263	2,36x10 ⁶	6,37
3:00	0,715	1,27x10 ⁷	7,10
4,5	1,083	1,26x10 ⁸	8,10
6:00	1,172	2,05x10 ⁸	8,31
7,5	1,349	2,54x10 ⁸	8,40
9:00	1,445	3,05x10 ⁸	8,48
24:00	1,692	3,89x10 ⁸	8,59
32:00	1,769	4,04x10 ⁸	8,60
48:00	1,785	4,12x10 ⁸	8,61
72:00	1,959	4,23x10 ⁸	8,63

Com esfregaços observados por de microscopia ótica, que serviram para acompanhar o crescimento dos diferentes sorovares a partir de 7:00 de crescimento até 72:00, mostraram que o comportamento das bactérias parece ter sido semelhante por que, a maioria delas iniciou o seu processo de esporulação após 32 horas de crescimento, e com 48 horas 75% das células estavam esporuladas e que após 72 horas não se observava formas vegetativas. Apenas uma única bactéria, *B. thuringiensis* sorovar *morrisoni* esporulou com apenas 24 horas de crescimento, embora tenha sido incubada nas mesmas condições das demais bactérias.

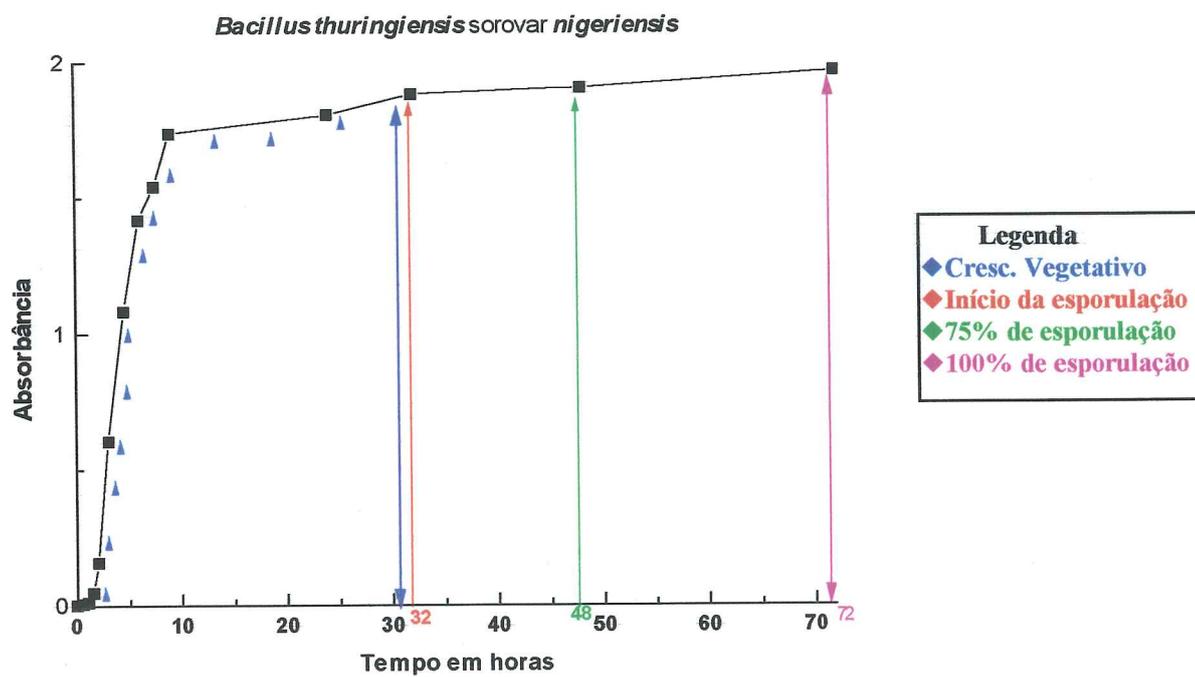
GRAF. I Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*
sorovar *kyshuensis*



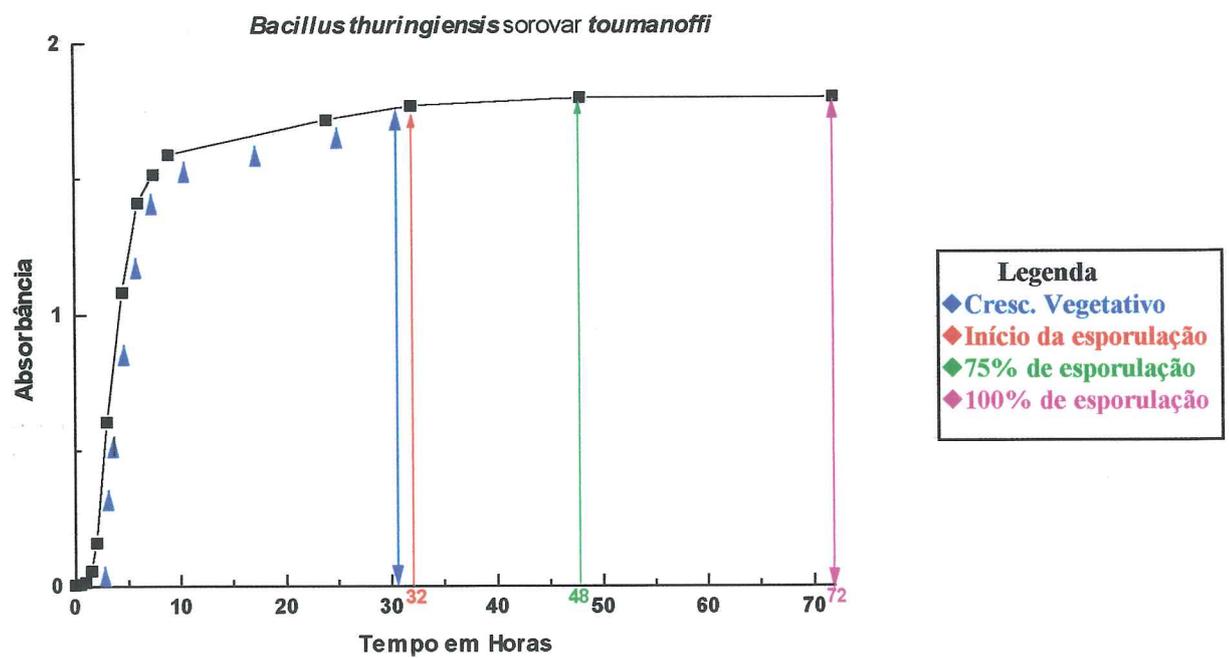
GRAF - II Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*sorovar *brasiliensis*

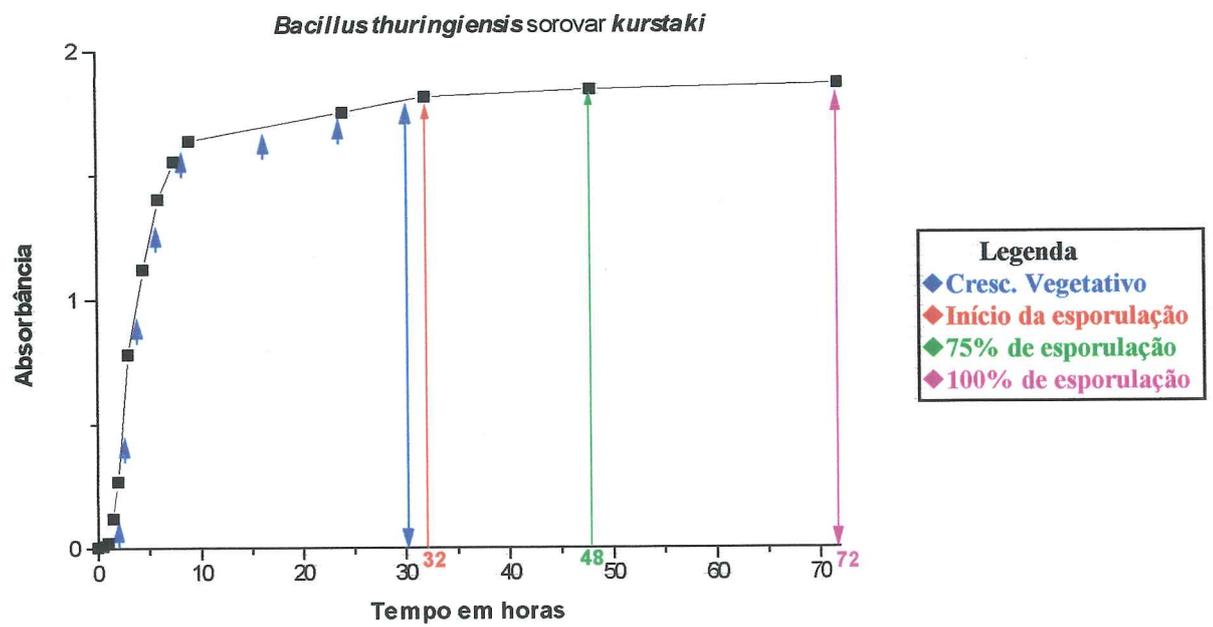
GRAF - III Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*sorovar *oswaldocruzi*

GRAF - IV Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*
sorovar *nigeriensis*

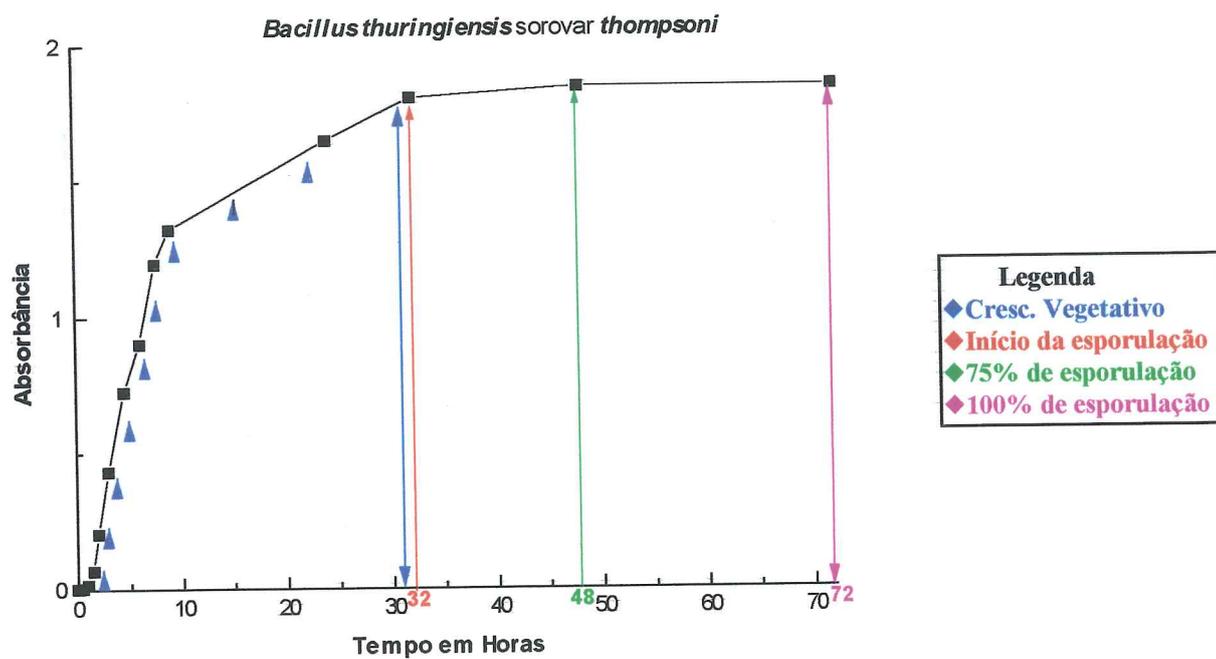


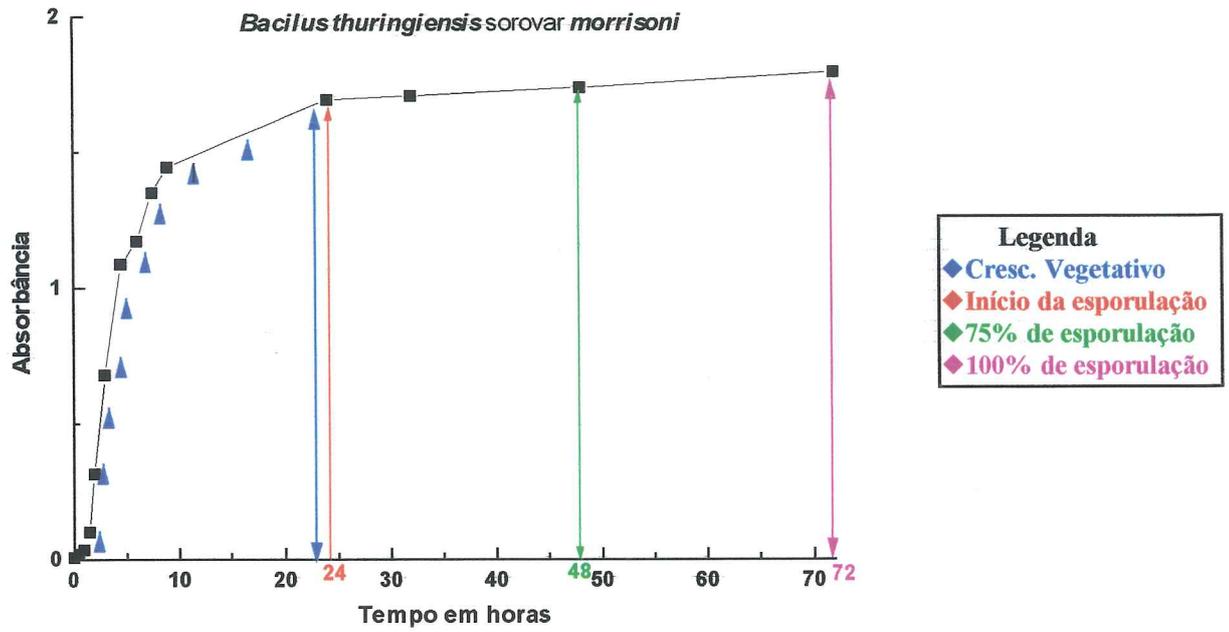
GRAF- V Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*
sorovar *toumanoffi*

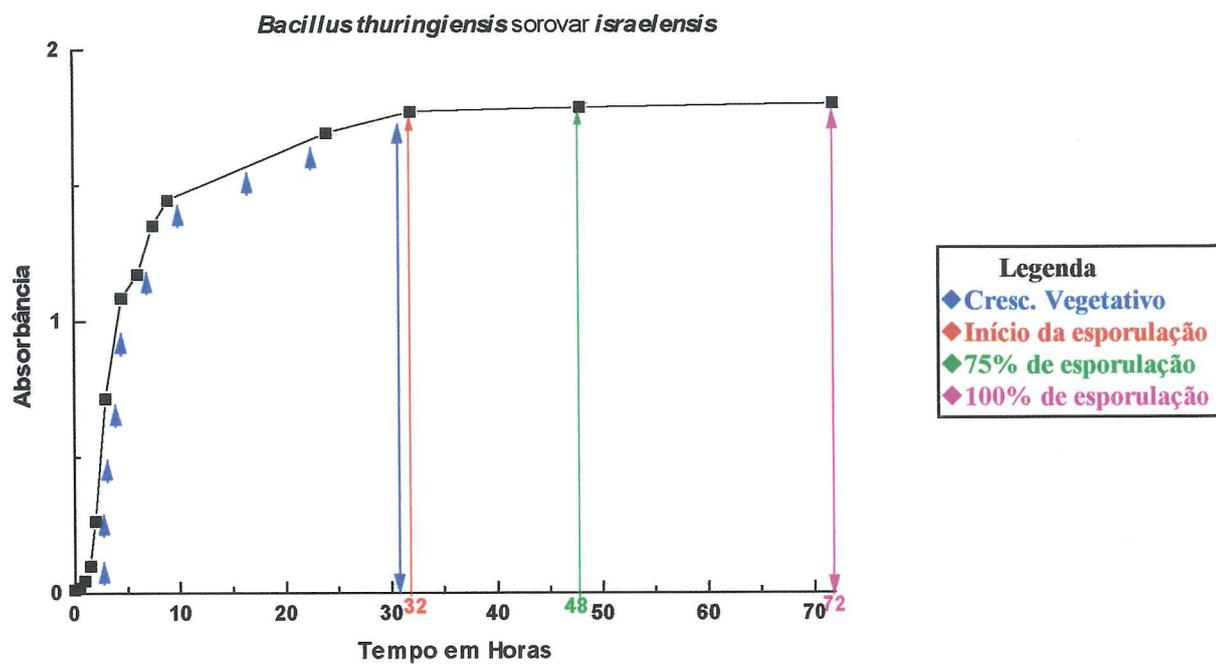


GRAF - VI Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*sorovar *kurstaki*

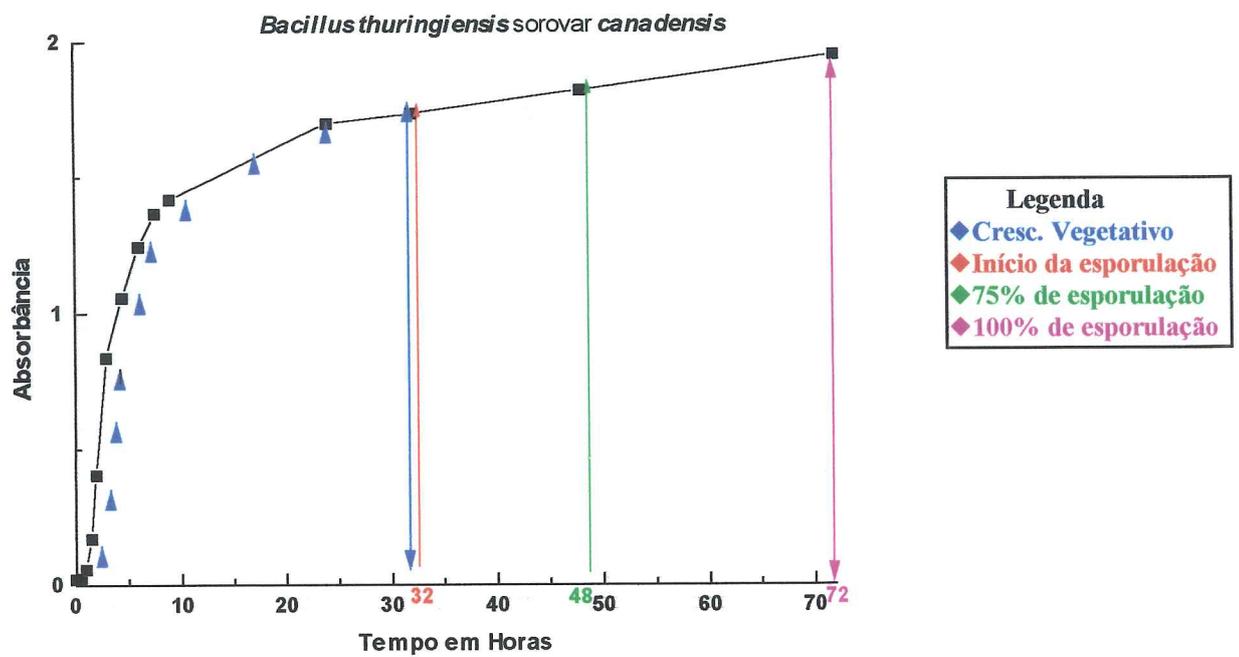
GRAF - VII Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*
sorovar *thompsoni*



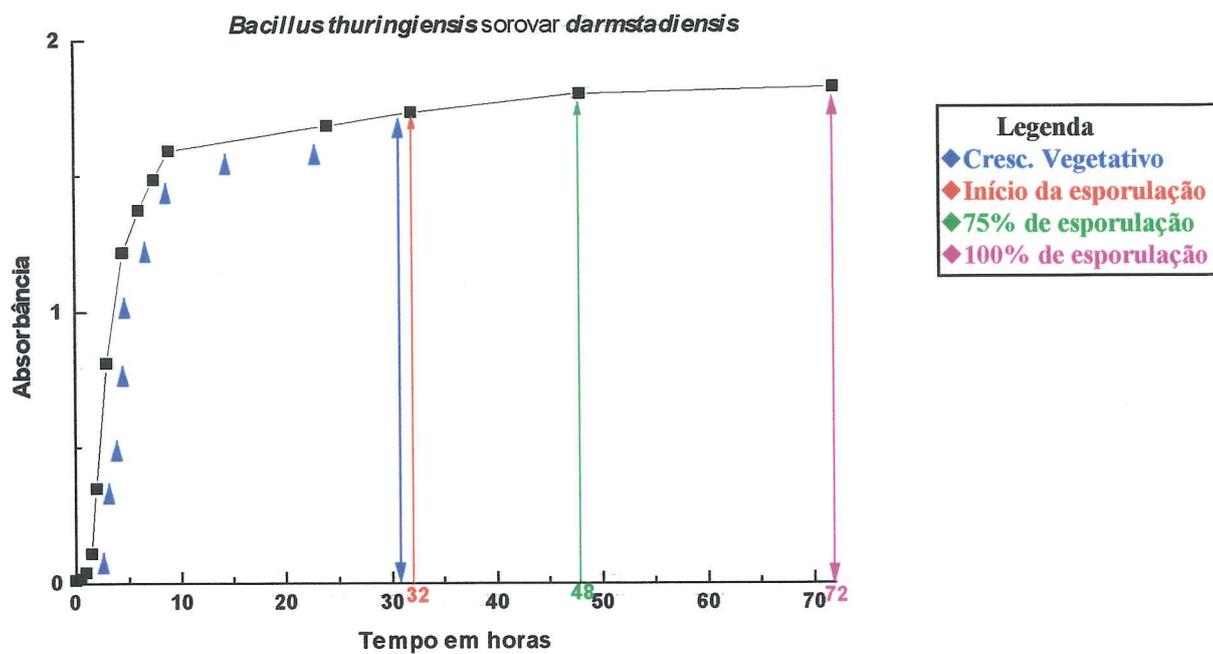
GRAF - VIII Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*sorovar *morrisoni*

GRAF - IX Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*sorovar *israelensis*

GRAF - X Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*
sorovar *canadensis*



GRAF - XI Curva de Crescimento de *Bacillus thuringiensis*
sorovar *darmstadiensis*



5.3 Dosagem e Notificação da Integridade do DNA de doze sorovares de *Bacillus thuringiensis*

A dosagem do DNA dos sorovares de *Bacillus thuringiensis* apresentou os seguintes resultados: para os sorovares **KUR**, **THO**, **MOR CAN**, **DAR** e **OST**, tiveram valores de aproximadamente 440 ng ou cerca de 4 vezes o valor do padrão lâmbda, onde 1 μ L corresponde a 55ng de DNA. Já os sorovares **TOU** e **NIG** o rendimento ficou em torno de 330 ng e os sorovares **KYU** e **BRA** apresentaram valores aproximados do dobro daquele apresentado pelo padrão ou seja 220 ng. Estes resultados podem ser observados nas figuras 4 e 5.

Figura 4 Dosagem do DNA de 9 sorovares de *Bacillus thuringiensis*

Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio, mostrando
Extração de DNA de nove amostras de *Bacillus thuringiensis*.
Peso Molecular: lambda (λ).

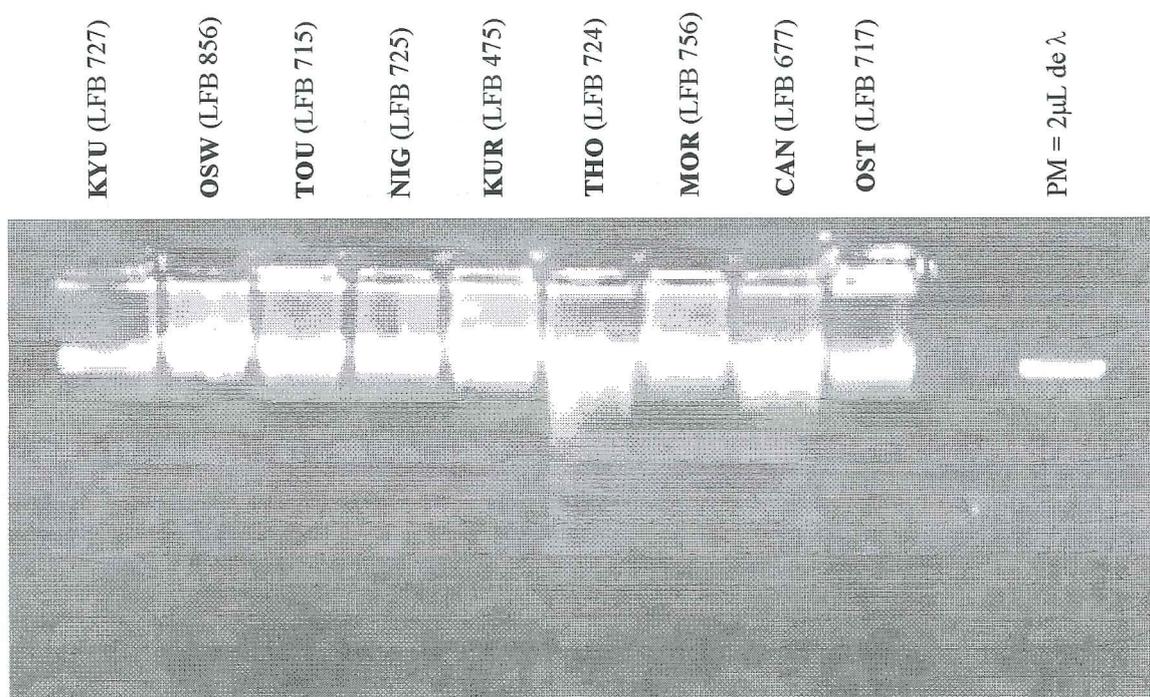
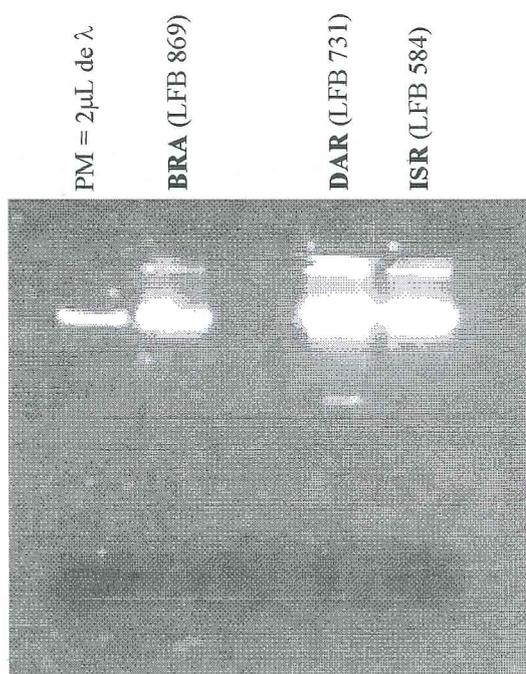


Figura 5. Dosagem do DNA de 3 sorovares de *Bacillus thuringiensis*

Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio, mostrando o resultado da Extração de DNA cromossomal de 3 amostras de *Bacillus thuringiensis*.
Peso Molecular: lambda (λ), onde 1 μ L de λ = 55 ng.

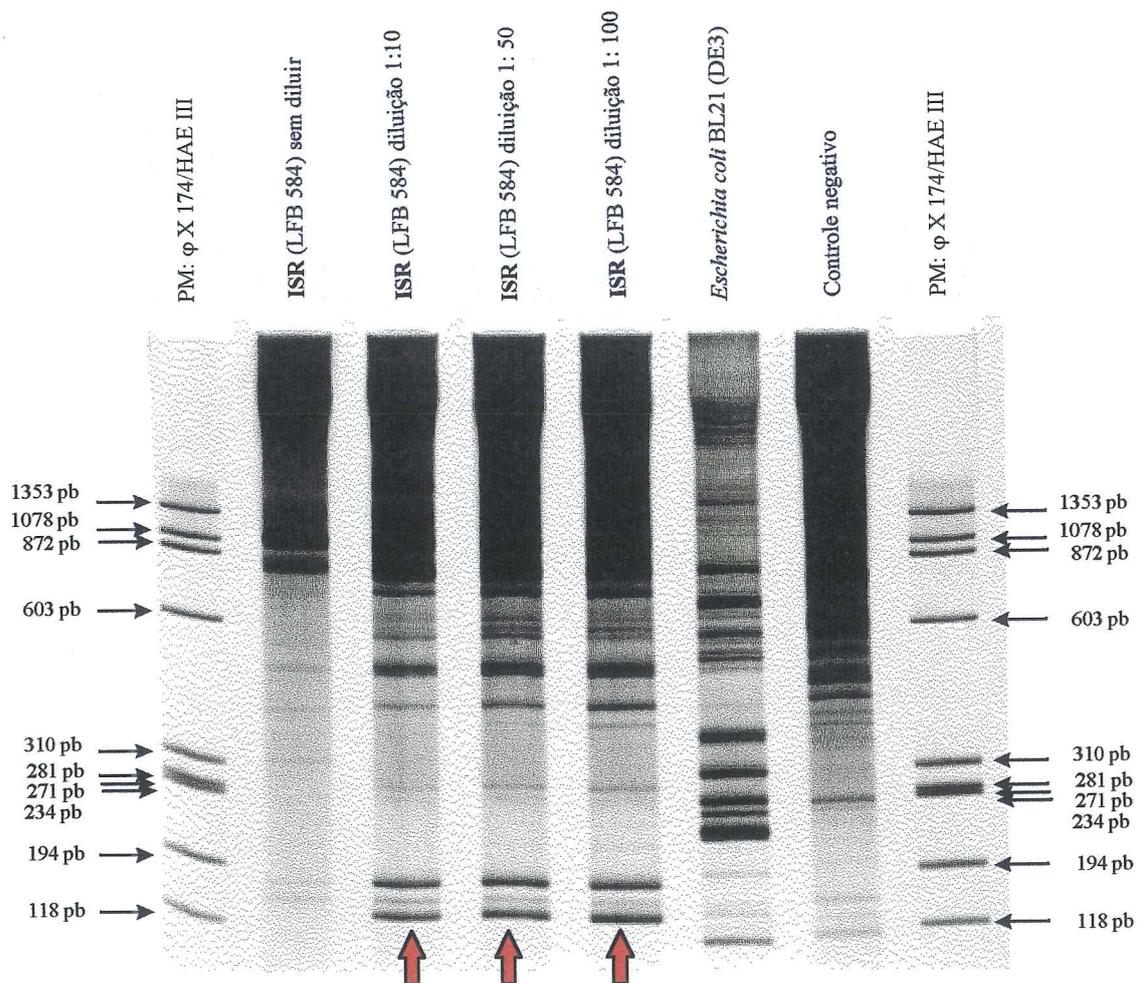


5.4 Dosagem do DNA do sorovar ISR em três diluições 1:10, 1:50 e 1:100.

O DNA do sorovar **ISR** para utilização em RAPD mostrou um perfil de bandas idêntico para as três diferentes diluições em 1:10, 1:50 e 1:100. A figura 6 mostra estes resultados, onde as setas indicam as diluições.

Figura 6 Dosagem do DNA do sorovar ISR, em três diferentes em diluições

Gel de Poliacrilamida 8% corado pela prata, amplificação de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* LFB/FIOCRUZ 584 pelo método de RAPD-PCR. Peso Molecular: ϕ X 174/HAE III.



5.5 Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os resultados obtidos por amplificação de produtos de PCR, com a utilização de um iniciador para genes Cry4A/B universal, que caracteriza os sorovares de *Bacillus thuringiensis* com atividade larvicida para insetos dípteros, podem ser visualizados na figura 7, que mostra um gel de poliacrilamida a 4% com 13 canaletas, cada uma representando respectivamente os 12 sorovares **KYU, BRA, OSW NIG, TOU, KUR, THO, MOR, ISR, CAN, DAR & OST** e uma canaleta com o padrão de peso molecular pEL HINDIII.

Somente a canaleta 09 mostrou um produto de amplificação para **ISR**. De fato, o sorovar *israelensis* apresentou 100% de atividade larvicida em todos os bioensaios, o que não é nenhuma novidade, uma vez que ele é específico para dípteros e os genes que codificam a sua proteína tóxica são sabidamente conhecidos como Cry4, tendo sido então, usado como controle positivo na reação de PCR, para iniciadores do tipo Cry4A/B universal. Embora tenha sido usado o mesmo protocolo de PCR segundo BEN-DOV, et al.,(1997) não foi observado qualquer outro produto de amplificação para genes Cry4A/B para os demais sorovares na reação de PCR.

Figura 7 : Gel de Poliacrilamida a 4% mostrando o produto de amplificação por PCR para gene Cry 4 A/B de doze sorovares de *Bacillus thuringiensis*

5.6 Amplificação Aleatória de DNAs Polimórficos (RAPD-PCR)

Para verificar a variabilidade genética entre os 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*, bem como estabelecer um coeficiente de similaridade entre as bactérias que apresentaram atividade tóxica para larvas de mosquitos, foi realizada uma análise dos perfis obtidos por amplificação de seqüências aleatórias de DNA_(s) polimórficos.

Através dos produtos de RAPD obtidos com a reação de AP-PCR não foi possível estabelecer um coeficiente de similaridade entre as bactérias, que apresentaram atividade tóxica para as larvas dos mosquitos, devido ao perfil de bandas visualizado na figura 8. Nenhum sorovar apresentou um perfil de bandas específico, que pudesse levar a um resultado conclusivo quanto, a similaridade entre aqueles sorovares tóxicos para os insetos. Entretanto, as análises de AP-PCR dos 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*, feitas diretamente no gel de poliacrilamida a 8%, a partir do posicionamento das bandas que apresentassem um maior poder de visualização (figura 8) revelaram 12 diferentes perfis num total de 32 bandas avaliadas a partir da análise dos RAPDs obtidos, tomando como ponto de partida uma posição acima de 872pb.

Os perfis encontrados foram agrupados em três padrões de similaridade, baseados no coeficiente de similaridade de DICE, através de UPGMA, conforme mostra a matriz de similaridade (tabela 5) e o fenograma (Fig.9). Desse modo, os sorovares **DAR** e **THO** se localizam no primeiro padrão de similaridade com aproximadamente 50% de similaridade, enquanto que o sorovar **MOR** aparece isolado num segundo padrão, não mostrando índice de similaridade com os demais, e um terceiro padrão composto por um número maior de representantes de *Bacillus thuringiensis*, que foram exatamente os sorovares **CAN, TOU, OSW, BRA, OST, ISR, KUR, NIG e KYU** .

Mesmo pertencendo ao maior grupo, os sorovares acima mencionados ainda se subdividem em termos de coeficiente de similaridade. Pode-se observar no fenograma (Figura 9), que as bactérias **TOU** e **CAN** apresentaram um coeficiente de similaridade próxima de 55%. Os sorovares brasileiros de *Bacillus thuringiensis* **BRA** e **OSW** mostram um coeficiente de similaridade de 62%, enquanto que, o **ISR** e o **OST** tiveram um coeficiente de similaridade um pouco maior, cerca de 64% entre estes dois sorovares. O sorovar **KUR** se apresentou de maneira isolada no terceiro padrão de similaridade, porém no contexto geral ele apresentou 61 e 62% de similaridade com o **ISR** e o **OST** respectivamente. As bactérias **KYU** e o **NIG** foram as que tiveram o maior coeficiente de similaridade em todo o grupo, chegando a 92%.

As bandas que aparecem no controle do Kit **READY TO-GO RAPS BANDS** (Pharmacia), são totalmente inespecíficas e são previstas pelo fabricante do kit que dá a seguinte explicação: “As bandas que aparecem no controle são contaminação de DNA do kit na polimerase. Estas bandas não aparecem quando o DNA molde está presente na reação, num montante equivalente a 10ng” (RAPD analysis Beads Instructions. Amersham Pharmacia Biotech. Rev. 6, p.21. 2.000).

Os resultados obtidos da reação de AP-PCR podem ser visualizados na figura 6, a qual mostra amplificações dos 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis* com o iniciador que tinha a seguinte seqüência (5'- d[**GGTGCGGGAA**]-3') do KIT **READY-TO- GO RAPD** (Pharmacia biotech) e com um Padrão de Peso Molecular ϕ X 174/HAE III.

A tabela 5, representa a matriz de similaridade dos coeficientes de similaridade de DICE dos 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*, construída a partir de 32 bandas reunidas das amplificações utilizando o iniciador nº1 (5'- d[**GGTGCGGGAA**]-3').

FIGURA: 8

Gel de Poliacrilamida a 8% corado pela prata, mostrando produtos de amplificação (RAPDs) de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis* pelo método de AP-PCR, usando o iniciador n°1 (5' - d[GGTGC GGAA] - 3') do kit READY-TO-GO RAPD (Pharmacia biotech).

Peso Molecular: ϕ X 174/HAE III.

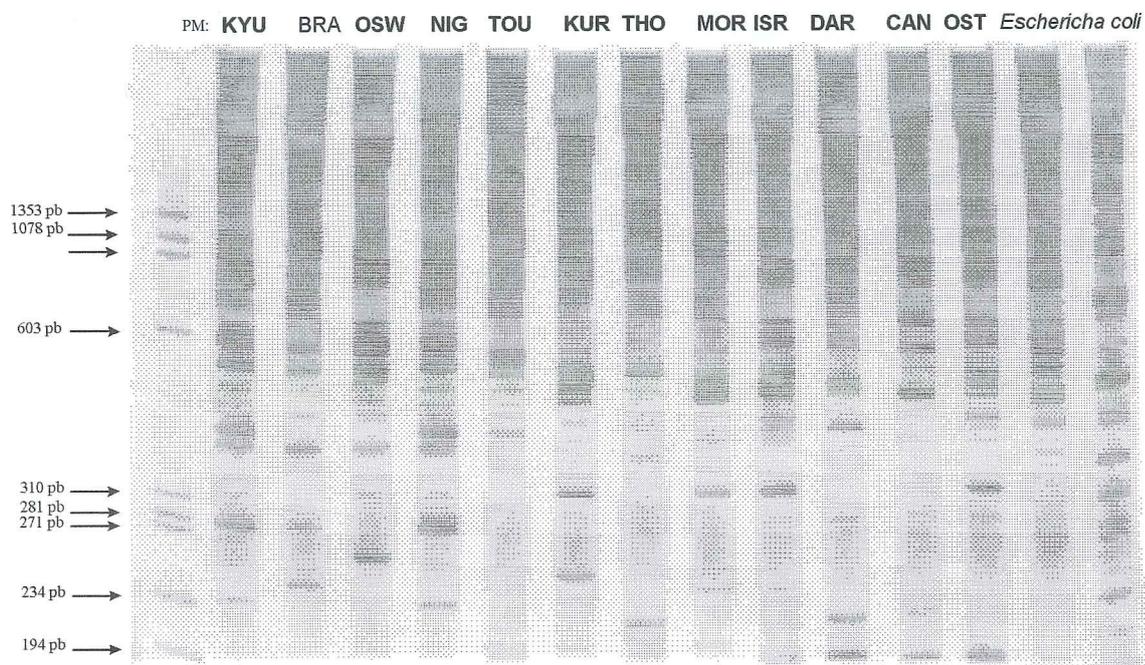
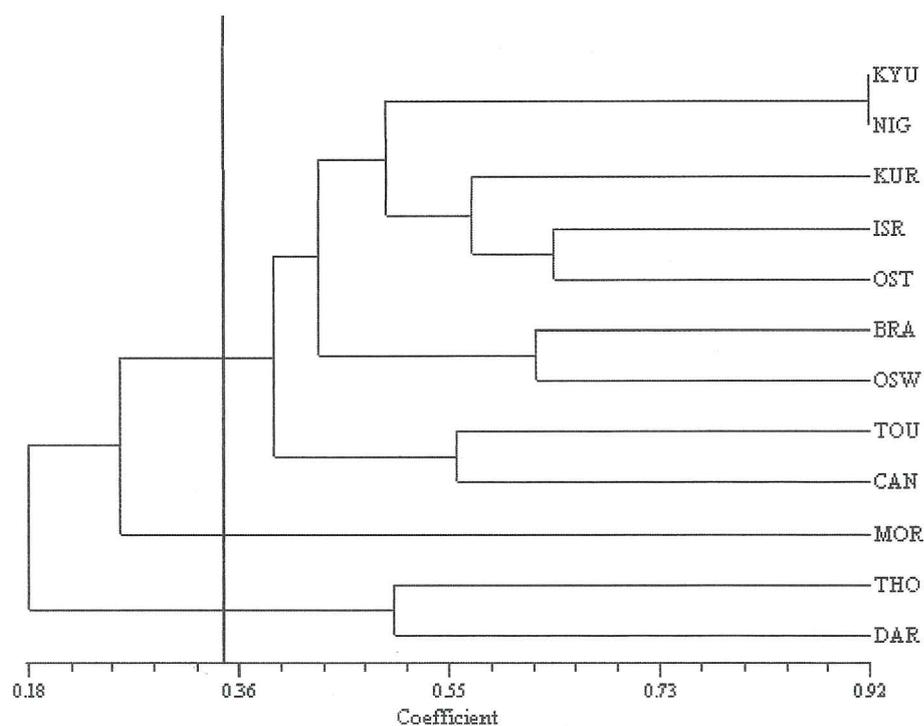


TABELA 5.

Matriz de Similaridade obtida pelo Coeficiente de Dice (1945) de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*, baseadas na análise de RAPD feitas com o iniciador N°1 (5'- d[GGTGCGGGAA]-3') do KIT READY-TO- GO RAPD(Pharmacia biotech)

	KYU	BRA	OSW	NIG	TOU	KUR	THO	MOR	ISR	DAR	CAN	OST
KYU	1,000											
BRA	0,333	1,000										
OSW	0,400	<u>0,625</u>	1,000									
NIG	<u>0,916</u>	0,400	0,454	1,000								
TOU	0,476	0,235	0,421	<u>0,521</u>	1,000							
KUR	0,434	0,315	0,476	0,480	0,272	1,000						
THO	0,111	0,000	0,000	0,100	0,117	0,210	1,000					
MOR	0,222	0,000	<u>0,375</u>	0,200	0,352	0,210	0,142	1,000				
ISR	0,480	0,285	0,521	0,518	0,500	<u>0,615</u>	0,095	0,380	1,000			
DAR	0,300	0,125	0,111	0,272	0,315	0,095	<u>0,500</u>	0,375	0,347	1,000		
CAN	0,315	0,400	0,470	0,380	<u>0,555</u>	0,200	0,133	0,266	0,454	0,352	1,000	
OST	0,545	0,555	0,600	0,500	0,380	0,521	0,111	0,333	<u>0,640</u>	0,300	0,421	1,000

Figura 9 : Fenograma de 12 sorovares de *Bacillus thuringiensis*, construído a partir da análise dos produtos de amplificação gerados pelo iniciador N°1, baseado no coeficiente de similaridade de DICE através de UPGMA. A linha vertical representa a linha de *fenon* e os números mostrados na linha horizontal são os índices de similaridade



6 - DISCUSSÃO

6.1 Atividade Larvicida

A atividade larvicida dos 12 sorovares de *B. thuringiensis* estudados, mostrou diferenças significativas entre as espécies de mosquitos testadas e dados interessantes quando comparados com a literatura existente. Nenhum sorovar testado teve atividade tóxica contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, exceto o **ISR** que é diptera/específico e portanto foi usado como controle positivo para as três espécies de mosquitos estudadas: *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis* e *Culex quinquefasciatus*.

É interessante lembrar que mesmo os sorovares classificados como pertencentes ao Grupo I ou Classe I (a mesma classe em que se encontra o **ISR**) no tocante a produção de toxinas diptero/especifica como, **MOR**, **CAN** e **THO**, não apresentaram qualquer atividade. **LARGET** et al., (1981) trabalhando com vinte e duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner, representando 15 sorotipos H, testou-os contra larvas L4 de *Aedes aegypti* e observou mortalidade de até 50% após 24 horas de exposição na diluição de 10^{-2} para o sorovar **KYU**. Para os sorovares **BRA** e **OSW** os resultados foram coerentes pois, estas linhagens tinham sido testadas contra larvas de *Aedes aegypti* e os resultados não foram significativos (**RABINOVITCH** et al, 1995).

No presente estudo, os bioensaios foram realizados em altas concentrações de esporos/mL, numa OD_{600nm} igual a 2, com larvas de terceiro estágio, expostas por 72 horas. Optou-se então por trabalhar com larvas de terceiro estágio de crescimento ao invés de L4 devido, ao tempo de 72:00 de exposição, o que evitaria a possibilidade da formação de pupas nos insetos e interrupção automática das alimentação por parte dos mesmos. Levando-se em conta que é necessário que as larvas se alimentem das bactérias

para que a toxina tenha ação, e, que quanto mais jovens forem as larvas, maior a susceptibilidade (LACEY et al.,1983), cada um dos ensaios biológicos foi realizado em 4 réplicas, repetidos por duas vezes para eliminar qualquer dúvida quanto a atividade dos bacilos, nem assim, foi verificada qualquer atividade contra *Aedes aegypti*. Alguns pesquisadores tem demonstrado que os sorovares acima descritos apresentam atividade citolítico/larvicida através de testes realizados com cristais purificados dessas amostras, algumas chegam a apresentar atividade similar aquela encontrada para *B. thuringiensis* sorotipo *israelensis*. (RAGNI et al., 1996).

As larvas L3 de *Aedes fluviatilis* parecem ter sido as mais susceptíveis aos diferentes sorovares de *B. thuringiensis* chegando a percentuais de 60% de mortalidade em **KUR**, 26% para o **KYS**, e 20% de mortalidade para o sorovar **BRA** e **MOR** os outros sorovares não apresentaram toxicidade.

Embora o *Aedes fluviatilis* seja usado como modelo experimental para testes de atividade larvicida em laboratório desde 1989, (RABINOVITCH e colaboradores,(1989) dados ainda não publicados), devido a dificuldade de se estabelecer insetário de segurança máxima para colônias de *Aedes aegypti*, não encontramos nenhum outro dado oficial que registrasse ou pudesse reforçar a temática de maior susceptibilidade do *Aedes fluviatilis* aos diferentes sorovares estudados, porém nossos resultados demonstraram tal situação.

As larvas de *Culex quinquefasciatus* são sensíveis tanto ao **ISR** quanto ao *Bacillus sphaericus*, sendo este último especialmente eficaz e específico no controle desse mosquito, em virtude do mecanismo de ação da sua toxina, que restringe o espectro de espécies sensíveis ao *Bacillus sphaericus*, possivelmente pela capacidade do

Bacillus sphaericus de suportar ambientes com elevada carga de matéria orgânica, situação típica dos criadouros de *Culex quinquefasciatus*, embora já tenha sido observado e relatado por alguns pesquisadores um grau de tolerância por parte das larvas de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* (NIELSEN,1998) em trabalhos de campo realizados em áreas urbanas na Cidade do Recife, após 26 meses de exposição. Retirada a pressão seletiva, o índice de resistência se mostrou instável e a população tornou-se novamente susceptível ao microrganismo (SILVA-FILHA,1996).

Os testes realizados no presente estudo, mostraram 100% de mortalidade para larvas L3 de *Culex quinquefasciatus* após 24 horas de exposição ao sorovar **DAR**, enquanto que, para os sorovares **KUR** e **MOR** a mortalidade foi de 26% e 20% respectivamente. Os demais não apresentaram resultados significativos. Segundo LECADET & DE BARJAC (1981) o sorovar **MOR** após 48 horas de exposição às larvas de *Culex pipiens pipiens* na concentração de 10^5 esporos/mL matou 54% das larvas.

PADUA e colaboradores, (1980) confirmam a toxicidade do **DAR** acima de 50% contra larvas de segundo estágio de *Culex quinquefasciatus*, quando tratadas 10^3 esporos/mL enquanto que, para as larvas da mesma idade de *Aedes aegypti* atingirem uma concentração letal de 50% são necessários 10^4 esporos/mL. Por outro lado, larvas L4 de *Aedes aegypti*, quando ensaiadas com sorovar **DAR**, necessitam de uma concentração 10 vezes a 100 vezes, respectivamente, maiores para atingirem uma concentração letal de 50%. KNOWLES e colaboradores (1990), confirmam que o sorovar **DAR** (Sorotipo H10), possui toxinas citolíticas com peso molecular entre 26 e 28 KDa, ativa contra dípteros. Desse modo a eficiência do *B. thuringiensis* sorovar

darmstadiensis contra larvas de *Culex quinquefasciatus* observada no presente estudo, estaria de acordo com estes pesquisadores, diferindo portanto na taxa de mortalidade que foi de 100% para as larvas de *Culex quinquefasciatus* após 24 horas de exposição.

6.2 Curvas de Crescimento

Para todos os sorovares testados contra larvas de mosquitos foram construídas curvas de crescimento, com o objetivo de constatar a partir de qual momento se iniciava o processo de esporulação dos diferentes bacilos entomopatogênicos. Dados da literatura apenas citavam que estes bacilos têm um crescimento lento. Entretanto, tendo em vista que o interesse da maioria das pesquisas com *B. thuringiensis* estão diretamente ligada à fase de esporulação, relacionada com a atividade tóxica, devido a síntese do corpo paraesporal e suas inclusões protéicas, só serem obtidas após 48 horas de crescimento, acredita-se que esta deva ser a razão pela qual levou os pesquisadores a admitirem que tais bactérias teriam uma baixa velocidade de crescimento. Assim, observamos uma velocidade de crescimento e um tempo de geração bastante rápidos, embora a esporulação possa levar até 48 horas. Segundo CABRAL (1992), a escolha de um meio adequado ao crescimento do *B. thuringiensis*, como um meio rico em açúcares e amido, além de aminoácidos e proteínas constituem substratos excelentes que podem acelerar o crescimento do *B. thuringiensis*. Ainda, segundo este autor existem trabalhos realizados na Argentina com o *B. thuringiensis kurstaki* (*Btk*) um potente lagartícida, onde o meio foi enriquecido de 3 a 11 vezes mais com extrato de levedura, glicose e sais minerais e o resultado final foi um concentração de biomassa e de células bastante alta. No presente

estudo usamos Caldo Nutriente Difco, e ainda assim obtivemos um tempo de geração e uma velocidade de crescimento em torno de 30 minutos.

SAKHAROVA e colaboradores (1985), fizeram um estudo da cinética do crescimento de *B. thuringiensis* frente a assimilação de substâncias nutrientes sob condições de cultivo, em um meio contendo extrato de levedura e outro meio quimicamente definido contendo aminoácidos. Estes autores definiram o crescimento dividido em 5 fases: crescimento exponencial, crescimento desacelerado, fase estacionária de crescimento, (quando os cristais das proteínas são formados), fase estacionária (quando os esporos são formados) e posterior lise do esporângio para lançamento dos esporos. Porém não ficou estabelecido o tempo em que cada uma destas fases acontece. Desse modo foram realizadas curvas de crescimento dos sorovares de *B. thuringiensis*, sendo plaqueadas e contadas as unidades formadoras de colônia de dois sorovares o **ISR** e o **BRA** que levou a um padrão de $1,82 \times 10^8$ células/mL na OD_{600nm} igual a 2, quando verificou-se, que eles apresentavam um tempo de geração bastante rápido, aproximadamente 30 minutos.

Para acompanhar o crescimento e a esporulação fizemos lâminas coradas com Gram e Bartolomeu Mitwer (CARVALHO,1998) , e desse modo foi observado que, a esporulação iniciava-se após 32 horas de crescimento para todas as bactérias, exceto para o sorovar **MOR** que iniciou sua esporulação em apenas 24 horas de crescimento. Esse fato foi sem dúvida um dado diferenciado no comportamento desses bacilos entomopatogênicos, pois tratando-se de indivíduos de uma mesma espécie esperava-se um mesmo tipo de comportamento, entretanto o **MOR** mostrou-se distinto em relação

os demais, iniciando o processo de esporulação 8 horas antes de todos os outros sorovares.

6.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), foi em parte uma comprovação do comportamento que as larvas tiveram nos ensaios biológicos, quando foram expostas aos sorovares de *B. thuringiensis* onde, o único produto de amplificação obtido foi somente no sorovar **ISR**. Na realidade o referido sorovar realmente matou 100% das larvas para as três espécies de mosquitos, porém outros sorovares também apresentaram atividade ainda que em menor porcentagem para espécies diferenciadas de mosquitos, e não foi possível visualizar qualquer outro produto de amplificação para os mesmos. Mesmo trabalhando nas condições de extringência sugerida por BEM-DOV et al., (1997), e usando primer universal para CRY4A/B, não conseguimos visualizar qualquer produto amplificado no sorovar **MOR** que a literatura descreve como diptera/específico, e nem tão pouco no sorovar **DAR** que apresentou 100% de atividade tóxica para as larvas de *Culex quiquefasciatus*. Embora a literatura descreva que o sorovar **DAR** possui genes *Cry4A*, com atividade mosquitocida, sendo portanto idêntico aos genes do sorovar **ISR**, (RAGNI et al.,1996) não foi possível observar nenhum produto de amplificação para esta bactéria, mesmo tendo sido usado um iniciador *Cry4A/B* conhecido como universal. O mesmo comportamento foi observado para o sorovar **KUR**, lepdoptera/díptero/específico.

YOUSTEN (1996) e DELÉECLUSE et al. (1996). descrevem que as toxinas de *B. thuringiensis* podem ser divididas em 4 classes. Na primeira classe estão incluídos

todos os sorovares com atividade larvicida semelhante ao **ISR**, como o sorovar **MOR** que tem o mesmo padrão de proteínas que o **ISR**, observados em SDS-PAGE. Nesta classe estão também incluídos e caracterizados sorovares pertencentes aos sorotipos H5a,5c, H12 e H36, que correspondem exatamente ao *B. thuringiensis* sorovar *canadensis* (**CAN**), *B. thuringiensis* sorovar *thompsoni* (**THO**) e o *B. thuringiensis* sorovar *malayensis* (**MAL**).

Na classe dois devem estar aqueles sorovares que são 10 vezes menos tóxicos que o **ISR**, aqui estão incluídas o *B. thuringiensis* sorovar *medellin* e o *B. thuringiensis* sorovar *jegathesan*, ambos tóxicos para mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores de malária. A terceira classe de proteínas *Cry* será representada por um único sorovar o **DAR** que é de 10 a 100 vezes menos tóxico do que o **ISR**, sendo ativo principalmente contra larvas de *Culex quinquefasciatus* e pertencente a categoria dos genes *Cry4A*, embora seu cristal tenha um padrão de proteínas diferente do sorovar **ISR**. E por último a classe 4 onde estariam os sorovares que são larvicidas para mosquitos e que não apresentam qualquer relação imunológica (antígeno flagelar), ou seja nenhuma aglutinação semelhante ao **ISR** tais como o *B. thuringiensis* sorovar *kyushuensis* e o *B. thuringiensis* sorovar *fukuokaensis*.

RAGNI e colaboradores (1996), fizeram um estudo para caracterizar seis "linhagens", (atualmente sorovares) de *B. thuringiensis* que tem atividade mosquitocida e que não pertencem ao sorotipo H-14 ou sorovar **ISR**. Neste estudo estes autores demonstram que o sorovar **MOR**, **CAN** e o **THO** tem fragmentos que hibridizam com genes *Cry4A*, *Cry4B*, *Cry4D* e *cty1A* da proteína tóxica do **ISR**, bem como o sorovar **DAR** que tem fragmento hibridizado para o gene *Cry4A*, e o sorovar **KYU**. Portanto,

esperava-se que os estudos de PCR pudessem amplificar algum produto sobretudo para os sorovares **MOR, THO, DAR e KYU**.

Estes resultados foram um estímulo para fazer um estudo usando iniciadores de seqüências aleatórias, utilizando como ferramenta a técnica de reação AP-PCR, buscando-se esclarecer o perfil daqueles sorovares que mataram as larvas de insetos, embora não tivessem mostrado nenhum perfil de amplificação na PCR, em presença de iniciadores de seqüência conhecida.

6.4 . Produtos de RAPD

A técnica de AP-PCR representa uma das mais poderosas ferramentas de análise genômica disponíveis atualmente. Devido à sua alta sensibilidade, versatilidade, rapidez e baixo custo. A metodologia é de ótima aplicabilidade no estudo de variabilidade genética de populações, diferenciação de espécies e determinação de relações filogenéticas entre diversos organismos, sendo extremamente adequada às condições de pesquisa normalmente encontradas no Brasil (DIAS NETO,1994).

Os resultados obtidos através da AP-PCR, mostraram perfis de amplificações dos diferentes sorovares de *B. thuringiensis*, gerados por um único iniciador de seqüência aleatória, que foi capaz de demonstrar a presença de polimorfismos que são amplamente distribuídos entre os indivíduos de mesma espécie.

Os resultados mostrados através do fenograma possibilitaram a separação em três diferentes grupos para os 12 sorovares de *B. thuringiensis*. Embora os resultados dos coeficientes de similaridade não tivesse agrupado as bactérias mosquitocidas, estes

resultados não são ainda conclusivos possivelmente, pelo fato da utilização de um único iniciador.

Nestes resultados preliminares dos produtos de AP-PCR uma observação deve ser colocada, o sorovar **MOR**, aparece totalmente isolado no fenograma não sendo possível estabelecer um coeficiente de similaridade entre este e os outros sorovares de *Bacillus thuringiensis*, além disso o **MOR** foi também, o único sorovar que iniciou a esporulação com apenas 24 horas de crescimento, mostrando assim um comportamento diferenciado dos outros sorovares.

Embora o estudo de utilizando a técnica de RAPD tenha ficado restrito ao emprego de um único iniciador, ele representou uma nova metodologia como alternativa para avaliar novos isolados de *B. thuringiensis*, e contribuir de algum modo para o aprimoramento do nosso conhecimento sobre estes *Bacillus* entomopatogênicos.

Estudos posteriores devem ser direcionados e monitorados com a utilização de outros iniciadores, com o objetivo de concluir a variabilidade genética das diferentes sorovares de *B. thuringiensis*, e possivelmente inferir alguma relação entre as variedades que possuem toxicidade para insetos da ordem diptera, onde estão classificados vetores de importantes endemias.

7. CONCLUSÃO

- Os testes de atividade larvicida comprovaram a eficácia dos sorovares. Por outro lado, revelaram resultados passíveis de discussão para outros sorovares ditos tóxicos para os insetos dípteros e que não apresentaram qualquer atividade, como aconteceu com as larvas de *Aedes aegypti* que, foram refratárias a ação dos bacilos, apresentando mortalidade somente para o *Bti*.
- O resultado obtido neste trabalho, que causou maior estímulo foi a expressiva atividade das toxinas do *Bacillus thuringiensis* sorovar *darmstadiensis*, para as larvas de *Culex quinquefasciatus* e que certamente conduzirá para estudos posteriores sobre os genes que codificam a sua proteína tóxica, e possivelmente realizando bioensaios contra larvas de mosquito, utilizando cristais purificados desse sorovar.
- As curvas de crescimento foram importantes na medida em que ampliaram os conhecimentos sobre o comportamento dos doze sorovares os quais serviram de estudo no presente trabalho. Mesmo sendo sorovares diferentes são microrganismos de mesma espécie, porém, ficou claro que existe obviamente, uma diferença sutil entre eles, ao nível de comportamento. Fato este comprovado quando, pelo comportamento do sorovar **MOR**, que esporulou com apenas 24 horas de crescimento.

- Os conhecimentos adquiridos com as curvas de crescimento nos levaram portanto a estabelecer um tempo e uma temperatura ideal de crescimento das bactérias, (cerca 14/16 horas após inóculo, e aproximadamente 33°C) para a extração do DNA dos diferentes sorovares, para melhor aplicação nos estudos moleculares dos genes Cry4A/B, que codificam toxinas de *Bti.*, bem como serviram de referência na seqüência dos próximos trabalhos com tais bactérias.
- A Reação em Cadeia da Polimerase, permitiu uma avaliação mais rápida e específica, confirmando o padrão de comportamento que foi observado nos bioensaios “in vivo”, onde o sorovar **ISR** que matou 100% das larvas em todas as espécies de mosquitos testadas foi o único que amplificou um produto esperado de 439pb, relativo ao gene Cry4A/B. Entretanto, não se conseguiu amplificar qualquer produto nos outros sorovares que apresentaram alguma mortalidade para duas espécies de mosquitos ensaiadas: o *Aedes fluviatilis* e o *Culex quinquefasciatus*. Desse modo, um estudo envolvendo outras categorias de iniciadores de seqüências conhecidas para genes Cry (Cry1, Cry2 e Cry3), talvez possa esclarecer a questão.
- A técnica de RAPD mostrou através de seus produtos coeficientes de similaridade entre os sorovares de *B. thuringiensis* e aparece como uma alternativa para estudos de variabilidade genética, com os bacilos entomopatogênicos, e novos isolados, embora não tenha sido estabelecido

uma relação de similaridade entre as amostras de *Bacillus thuringiensis* que apresentaram um comportamento tóxico para as larvas de mosquito.

- Tendo em mente que os resultados obtidos com a reação de PCR e técnica de RAPD são ainda preliminares, fica aqui a expectativa de continuar investigando tais bactérias, buscando sempre mais conhecimento sobre os referidos bacilos, objeto de estudo neste trabalho.

8 - SUMMARY

SUMMARY

The *Bacillus thuringiensis* is a gram-positive sporeforming bacterium. Different serovars of *Bacillus thuringiensis* produces many different insecticidal protein toxins on parasporal crystal. These insecticidal protein, typically have a specific and narrow host range making them very good insecticides. Their increasing use and lack of mammalian toxicity have led to an intensified search for new strains with different spectra of activities. In this study twelve serovars of *Bacillus thuringiensis*: **KYU, BRA, CAN, DAR, ISR, MOR, NIG, OST, OSW, TOU, THO** were examined the mosquitocidal, biological growth, molecular study of genes cry4A/B and genotypic diversity. For tests larvicidal activity was used three mosquitoes species: *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis* and *Culex quinquefasciatus* against twelve serovars of *Bacillus thuringiensis*, and growth and development of twelve serovars of *Bacillus thuringiensis* were monitored for 72 hours. Genotypic diversity studied among *Bacillus thuringiensis* was used Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), and cry4 A/B gene amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). Only four serovars mosquitocidal (**KYU, BRA, MOR, KUR**) for *Aedes fluviatilis* and three serovars (**KUR, MOR e DAR**) for *Culex quinquefasciatus*. None serovar presented larvicidal action for *Aedes aegypti*. Growth and development twelve serovars of *Bacillus thuringiensis*. o serovar **MOR** presented distinct behaviour spored at 24 hours growth, among the tested microorganisms. The amplification products (PCR) used specific primers Cry4A/B PCR presented fragments hybridization only in serovar **ISR**. RAPD products showed 32 bands of DNA fragments, that could be identified with confidence on basis of their intensity and separation from others products on the acrylamid gels. Similarity analysis of the serovars using UPGMA and Dice's coefficient for genetic distances were made by Ntsys program to construct a phenogram. Serovars **NIG** and **KYU** shown greater similarity (92%) than the others.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANG, M. J.; FIROZABADY, E.F.; KLEIN, J.; ROCHELEAU, T. A.; RASHKA, D.; STAFFELD, G.; STOCK, C.; SUTTON, D. & MERLO, D. J. (1987) "Staffeld of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene in tobacco plants." Molecular Strategies for crop protection. v. 48 p. 345-354.

AGAISSE, H. & LERECLUS, D. (1994) "Expression in *B. subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII_A toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and increased in spoA mutant". Journal of Bacteriology. v.176, p.4734-4741.

ALVES, S.B. (1998) Controle Microbiano de Insetos. Biblioteca de Ciências Agrárias Luís de Queiros, 2.ed. Piracicaba. São Paulo-Brasil. 1163p. Editora FEALQ.

ALVES, S.B.; J. L. STIMAC, R.M. PEREIRA & S. A. VIEIRA. (1995) "Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low temperatures". In Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, 28, New York, 75p.

ARAÚJO-COUTINHO, C. J. D. C. & LACEY, L. A.(1990) "Controle de Simulídeos com concentrado emulsionável de *Bacillus thuringiensis*." Biol. de La oficina Panamericana, 103 (3): 213-219.

- ARONSON, A. J.; BECCKMAN, W. & DUM, P. (1986) "*Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens". Microb. Rev., 50 (1): 1 - 24.
- ASH, C. & PRIEST, F. G. (1994) "Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. Proposal for the cretion of a new genus *Paenibacillus*". In: Antonie Van Leeuwenhoek. 94: 64(3-4): 253-60.
- BARTON, K. A.; WHITELEY, H. R.; YANG, N. S. (1987) "*Bacillus thuringiensis* by batch and fed batsh cultures". Plant Physiology. v.85, p 11103 - 11109.
- BAUM, J. & T. MALVAR. (1995) "Regulatin of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*". Mol. Microbiol. 18:1-12.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY. A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TRITSKAYA, E; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.& MARGALIT, Y. (1997) "Extended screening by PCR for Seven cry- group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*". Appllied and Environmental Microbiology. v. 63, n. 12. p.4883-4890.
- BISHOP, D. H. L.; ENTWISTLE, P. L.; CAMERON, I. R.; ALLEN, C.J.; POSSEE, R.D. (1990) "Field trials of genetically-engineered baculovirus insecticides". Journal of Bacteriology. v.172. p.6682-6688.

- BRUCE - CHWATT, L. (1986) "Malaria control at the crossroad! Where do we go from here ?" Mem. Inst. Osw. Cruz. 81, supl. II: 1-4.
- CALIGIORNE, B. R.; RESENDE, M.A.; PAIVA, E. & AZEVEDO, V.(1999) "Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens". Can. J. Microbiol. 45: 408-412.
- CARLSON, C.R., D. A. CAUGANT & A. B. KOLSTE. (1994) "Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains". Appl. Environ. Microbiol. 60: 1719-1725.
- CARLSON, C.R., T. JOHANSEN, M. M. LECADET & A. B. KOLSTE. (1996) "Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *Berliner* 1715".. Microbiology 142:1625-1634.
- CARLTON, B. C.; GAWRON-BURKE, C.; JONHSON, T. B. (1990)"Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new insecticides." In: International Colloquium Invertebrate Pathology and Microbial Control.
- CHANG,C.; YU, Y.M., DAÍ, S.M., LAW, S.K. & GILL, S.S. (1993.) "High-level cryIVD and ctyA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes". Appl. Environ. Microbiol. 59:815-821.

CARVALHO, L.R. “Estudo da Microbiota Bacteriana Indígena do Trato Digestivo de Urubu Comum (*Coragyps atratus* BECHSTEIN,1793) e Pesquisa de Substâncias Antagonistas”. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas de 1998. 142p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia).

CHARLES, J. F. C.; NIELSEN-LEROUX & DELECLUSE, A. (1996) “*Bacillus sphaericus* toxins”: Molecular biology e mode of action” . Annu. Rev. Entomology. 41: 451 - 472.

CHARLES, J. F. & DE BARJAC, H.(1982) “Sporulation et cristallogénese de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* en microscopie électronique”.Ann.Rev. Microbiol (Inst. Pasteur) 133A: 425-442.

CHARLES, J. F. & DE BARJAC, H. (1983) “Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur l’intestin moyen des larves de *Aedes aegypti*, en microscopie électronique”. Ann. Rev.. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134^A: 197-218.

CHILCOTT, C. N. & ELLAR, D. J.(1988) “Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal protein in vivo and in vitro”. J. Gen. Microbiol. 134: p. 2551-2558.

- CLARK, B. D. & DEAN, D. H. (1983) "A high molecular weight plasmid is associated with toxicity in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*". Abstr.. Ann. Mtg. ASM, 121, H-91.
- COELHO, G. E.; VIEIRA, J. B. F.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. & SCHUERTZ, J.C.M. (1998) "Identificação de áreas de estratificação epidemiológica no foco de oncocercose na Região Yanomami, Roraima, Brasil". Cadernos de Saúde Pública. v.14. No.3, p.607-611.
- CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO, O. R. (1994) "Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil." Editora FIOCRUZ. 1º Edição, p.223.
- CONSOLI, R. A. G. B.; CASTRO, M. M. T.; SILVEIRA, J. N. & SANTOS, B. S. (1989) "Influência da coloração do substrato no comportamento de oviposição de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae)". Revista Bras. Entomol., 32: 375-381.
- CRICKMORE, N.; BONE, E.J.; WILLIAMS, J.A. & ELLAR, D. J. (1995) "Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." FEMS Microbiology Letters, v.131.p.249-254.

- DAOUST, R. A. (1990) "Commercialization de bacterial insecticides". International colloquium of invertebrate pathology and microbial control. p: 7- 11.
- DAVIDSON , E. W. & SWEENEY, A. W. (1983) "Microbal control of vectors: a decade of progress". J. Med. Entomol., v.20, p.235-247.
- DAVIDSON, E. W. & YAMAMOTO. (1984)"Isolation and assay of the toxic component from the crystals of *Bacillus thuringiensis var israelensis*". Curr. Microbiol. 11: p. 171-174.
- DE BARJAC, H. & BONNEFOI, A. (1962) "Essai de classification Bichimique et Sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*". Entomophaga, 7; 5 - 29
- DE BARJAC, H. & BONNEFOI, A. (1968) "A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation". Journal of Invertebrate Pathology . v.11: 335-347.
- DE BARJAC, H. (1978) " Un nouveau Candidat a la Lutte Biologique contre les Moustiques: *Bacillus thuringiensis var israelensis*". Entomophaga, 23: 309-319.

- DE BARJAC, H. (1981) "Insect pathogens in the genus *Bacillus* in: pathogenesis of invertebrate microbiol diseases". (eds). E. Davidsom, Albanheosmum & C 1, section II, chapter 10: 241 - 250.
- DE BARJAC, H. (1990) "Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*". In: Bacterial control of Mosquitoes and Blackflies, (eds) DE BARJAC, H. & SUTHELAND. D. J., pp: 15 New Bruswick: Rutgers University Press.
- DE BARJAC, H. & FRACHON, E. (1990) "Classification of *Bacillus thuringiensis* strains". Entomophaga, 35 (2); 233 - 240.
- DELECLUSE, A., BOURGOUIN, C., KLIER, A. & RAPPPOORT, G. (1988) "Specifi of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes". Mol. Gen. Genet 214: 42-47.
- DE SOUZA, M.T., M.M. LECADET & D. LERECLUS. (1993) "Full expression of the cryIIIa toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription". J. Bacteriol. 175:2952-2960.
- DIAS, J. M. C. S. (1992) "Produção e utilização de Bioinseticidas bacterianos". Pesq. Agropec Bras. v.27, p.59 a 76.

DIAS-NETO, E. “Aplicação e desenvolvimento de técnicas baseadas em PCR na análise genotípica de esquistosomose”. Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. 142p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular). Belo Horizonte, 1994.

DICE, L.R. (1945) “Measures of the amount of ecological association between species”. Ecology 40: 132-134.

DONOVAN, W. P. ; DANKOCSIK, C. C.; GILBERT, M. P. (1988) “Amino sequence and entomocidal activity of the crystal protein”. J. Biol. Chem. 263: 561-567.

DREYER, G. & MEDEIROS, Z. (1990) “Filariose linfática: Ainda um desafio”. Ciência Hoje. v.12, nº 68, p.6-7.

DU, C.; P. A.W. MARTIN & K.W. NICKERSON. (1994) “Comparasion of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals”. Appl. Environ. Microbiol. 60:3847-3.853.

ERRNGTON, J. (1993) “*Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and controlof morphogenesis”. Microbiol. Rev. 57:1-33.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D. & SNINSKY, J. J. (1991) “ Recent advances in the polymerase chain reaction”. Science 252: 1643-1.651.

- FEDERICE, B. A.(1995) "The future of microbiol insectcides as vector control agentes". Journal of the American Mosquito Control Association, 11(2): 260-268.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J. & KIM, L. (1992) "*Bacillus thuringiensis*: insects and beyond". Bio/Technology 10: 271-275.
- FONTES, G.; BRITO, A. C.; CAVALHEIROS, C. M. L.; ANTUNES, M.F. & ROCHA, E. M. M. (1994) "Situação atual da filariose bancroftiana na cidade de Maceió, estado das Alagoas, Brasil". Cadernos de Saúde Pública, v.10, Supl. 2,
- FRIDLENDER, B.; KEREN-ZUR, M.; HOFSTEIN, R.; BAR, E.; SANDLER, N.; KEYNAN, A. & BRAUN, S. (1989) "The development of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as bioconytol agents: From research to industrial production". Men.Inst. Oswaldo Cruz, v.84, p. 123-127, Sup. 3.
- FISCHHOFF, D. A.; BROWDISH, K. S. P.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; MELORNIC, S.M.; NEIDERMEYER, N. G.; DEAN, D. A. ; KUSANORKRETZMER, K. & FRALEY, R. T.; (1987) "Insect tolerant transgenic tomato plants". Biotecnology. v.5, p: 807-813.
- FUNASA- (1994) Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde,Brasil. "Controle de Vetores da Febre Amarela e Dengue. Instruções para pessoal de operações - Nomas Técnicas". 1º edição - Brasília: 95p.1994.

- FUNASA- (1998) Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. In: <http://www.funasa.gov.br>.
- GALLO, D. O. ; NAKANO, S. S.; NETO, R. P.; CARVALHO, G.C.; BATISTA, E. B., FILHO, J. R. & PARRA, R. A (1988) Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba. 1° ed. 649p.
- GELERNTER, W.D. (1990) "MVP bioinsecticide bioengineered bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae". In: International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control, 5., p. 14. Adelaide, Australia.
- GELERNTER, W. & QUICK, T.C. (1989) "The maccap (tm) delivery system: a novel approach for enhancing efficacy and foliar persistence of biological toxins". Annual Meeting of Society of Invertebrate Pathology. Abstracts - p:24.
- GELERNTER, W. & SCHWAB, G.E. (1993) "Transgenic bacteria, viruses and other microorganismos as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems". *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. v. 1p.89-104.
- GEORGHIOU, G.P. & LAGUNES-TEJEDA. (1991) "The occurrence of resistance to pesticides in arthropods". Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 318 p.

- GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R. KLIJN, N.; WAGENDROP, A. & ROMBOUSTS, F. M. (1997) "Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16sRNA". Abstrat. FEMS Microbiology Letters 146, 47-51.
- GILL, S. S.; COWLES, E. A & PIETRANTONIO, P.V. (1992) "The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins". Ann. Rev. Entomol., 37: 615-636.
- GOLDBERG, L.J. & MARGALIT, J. (1977) "A Bacterial spore demonstrating rapid larvicidae activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculatta*, *Culex unvitattus*, *Aedes aegypti* e *Culex pipiens*". Mosquito news, 37: 355 - 358.
- GONZÁLEZ, J. M. JR.; H. T. DULMAGE & B. C. CARLTON. (1981) "Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacills thuringiensis*". Abstrat.
- GONZÁLEZ, J. M. JR & CARLTON, B. C. (1984) " A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*". Plasmid. v.11: 28-38
- GORDON, R. E.; HAYNES, W. C. & PANG, C. H. N. (1973) "The Genus *Bacillus*". Agric. Handb., 283-427.

- GRIGOROVA, R.(1964) “ Deuxsoches de *Bacillus thuringiensis* Berliner isolles de chenilles du *Bombys disparate Lymantria dispar*. Entomophaga Mém”. v.2: 179-191.
- HABIB, M. E. M. & ANDRADE, C. F. S.(1986) “Bactérias entomopatogênicas”. Rev. Controle microbiano de insetos. p: 127- 170.
- HARWOOD, C. R. & CUTTING, S. M. (1990) “Molecular Biologycal Methods for Bacillus. Wiley & Sons Ltd. . p.65.West Sussex, England.
- HEIMPEL, A. M. & ANGUS, A. (1958) “The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland e Frankland. Can. J. Microbiol., 4:531-541.
- HEIMPEL, A. M. & ANGUS, A. (1963) “Diseases caused by certan sporeforming bacteria”. IN: Insect Pathology. An. Advanced Treatise, (ed) E.A. Steinhaus, pp: 21-67. Academic Press, New York.
- HIMENO, M. & H. IBARA. (1995) “Mode of action of δ -entotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. aizawai. In: J. M. Clarck (ed), Molecular Action of Insecticides on ion Channels. American Chemical Society, Washington. D. C.
- HOFTE, H. & WHITELEY, H. R. (1989) “Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*”. Microbiol. Rev. 53: p. 242-255.

- HOFMANN, C. ; P. LÜTHY.; R. HÜTTER & V. PLISKA.(1986) "Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*)". Eur. J. Biochem. 173: 85-91.
- HUMBER, H. E. & LUTHY, P.(1981) "*Bacillus thuringiensis* delta endo-toxin: composition and activation". In Pathogens of invertebrate microbiol disease, ed. E. W. Davidson, 209-233.
- IBARRA, J. E. & FEDERICE, B. A.(1986) "Isolation of a relatively nontoxic 65-kildalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*". J. Bacteriol. 165(2): 527-533.
- INSELL, T. & FITZ-JAMES, P. C. (1985) "Composition and toxicity of the inclusion of *Bacillus thuringiensis subs. israelensis*." Appl. Environ. Microbiol. 50(1): 56-62.
- ISHIWATA, S. (1902) "On a kind of seven flachene (sotto disease)". Danohon Sanshi Kaiho. v.114.p.1-5.
- KELLEN, W.; CLARK, T.; LINDEGREN, J. & ROGOFF, M.; SINGER, S. (1965) "*Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes". Journal of Invertebrate Pathology. v.7 p: 442.

- KLEPPE, K.; OHSTUKA, E. KLEPPE, R.; MOLINEUX, L. & KHORANA, H. G. (1971) "Studies on polynucleotides - XCVI - Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases". Journal of Mol. Biol. 56: 341-361.
- KLEIN, M. G (1981) "Mass trapping suppression of japonese beetle". Management of Insect Pests Witho Semio-chemicals, ED. E.R. Mitchel, p.183-190.
- KRIEG, A.; HUGER, M.; LANGENBRUSCH, G. A. SCHNETTER, W. (1983) "*Bacillus thuringiensis var tenebrions* ein neuer gegenuber larvven von Coloopteren wirskamer pathotpy". Zeitschrift Tur Angewandte Entomologies, v.96, pp.500. Abstracts.
- KNOWLES, B. H. & D. J. ELLAR.(1987) "Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity". Biochim. Biophys. Acta 924:509-518.
- KNOWLES, B. H.; NICHOLLS, G.; ARMSTRONG, M. TESTER & D. J. ELLAR. (1990) "Broad spectrum cytolytic toxins made by *Bacillus thuringiensis*". In Proceedings International Colloquium Invertebrate Pathology MicrobiolControl, 5, Australia.
- LACEY, S. G. & UNDEEN, A. H. (1986) "Microbiol control of black flies and mosquitoes". Ann. Rev. Entomol. 31: 265-296.

- LARGET, I. & DE BARJAC.(1981) "Activité comparée de 22 variétés de *Bacillus thuringiensis* sur 3 espèces de Culicidae". Entomophaga. 26: 143-148.
- LEE, S. G.; ECKBLAD, W & BULLA, I. A. JR. (1985) "Diverssity of protein inclusion bodies and identification of mosquitocidal protein in *Bacillus thuringiensis subs. israelensis*". Biochem. Biophys. Rev. Commun. 126(2): 953-960.
- LECADET. M-M. & DE BARJAC, H.(1981) "*Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin". In: Pathogenesis of Invertebrate Microbial Disease, Chapter II. Section II.(eds) E. Davidson, Allanheld, Osmun & C° .Totowa, N.J.
- LECADET, M.M.; E. FRACHON.; V. COSMAO DUMANOIR.; H. RIPOUTEAU.; S. HAMON.; P. LAURENT & I. THIÉRY. (1999) "Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*". Journal of Applied Microbiology 86: 660-672.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. & LECADET, M. M. (1993) "Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes". Bio-Technology. v.13, p: 67-71.
- LUCKOW, V.A.; SUMMERS, M.D. (1988) "Treds in the development of baculovirus expression vectores". Biotechnology v. 6, p:47-55.

- MARGALIT, J & DEAN, D. (1985) "The story of *Bacillus thuringiensis* (B.t.i)". J. Amer. Mosq. Control Assoc. 1:1-7.
- MARGALIT, J. (1998) "BTI - Present status and Future". Trends. Anais: Conferências e Mesas-Redondas. 6º Simpósio de Controle Biológico. 24 a 28 de Maio de 1998. Rio de Janeiro-Brasil
- MCGAUGHEY, W.H. & M. E. WHALON. (1992) "Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins". Science.258: 1451-1453.
- MIKKOLA, A. R.; CALBERG, G. A.; VAARA, T.; & GYLLENBERG, H. G. (1982) "Comparasion of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains: An electron microscope study". FEMS Microbiol. Lett 13: 401-408.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. (1986) "Manual de Combate ao *Aedes aegypti*, para guardas de campo".pp.97.
- MULLIS, K.B. & FALOONA, F. (1987) "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalized chain reaction". Meth. Enzymol. 155: 335-350.
- NEIDE, E. (1904) "Botanische beschreibung einiger sporenbildenden bacterien." Zentralblatt fuer bakteriologie parasitenkunde infektions krankheiten hygiene Abstracts, v.12, p.01.

NIELSEN-LE ROUX, C. (1996) Instituto Pasteur. Unité des Bacteries Entomopathogenes. " Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* toxins". Anais - Conferencias e Palestras. V Simpósio de Controle Biológico. 09 a 14 de Junho de 1996. Paraná - Brasil.

NIELSEN- LE ROUX, C. (1998) "The apparance of resistance to *Bacillus sphaericus* in mosquito control programs". In: Simpósio de Controle Biológico, 6. Rio de Janeiro, RJ. Resumos. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ,. p.47-52.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D. & TAUILL, P. L. (1994) "Febre amarela e Dengue no Brasil. Epidemiologia e Controle". Revista Brasileira de Medicina Tropical vol. 27. Suplemento II, p.59-66. Out-Dez.

ORLAVA, M. V., SMIRNOVA, T. A. GANUSHKINA, L. A. YACUBOVITCH, V. Y. & AZIZBEKYAN, R. R. (1998) "Insecticidal activity of *Bacillus latrosporus*". Appl. Environ. Microbiol. 64:2723-2725.

OLIVEIRA, E. J.; SILVA, E. A. & RABINOVITCH, L. (1998) "A standardized protocol for the raid detection of gelatin hydrolysis by *Bacillus sphaericus*". Israel Journal of Entomology. v.XXXII. p.141-146.

- PADUA, L. E.; M. OHBA. & K. AIZAWA (1980) “ The isolates de *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae”. J. Invertebr. Pathol. 36: 180-186.
- PANET, A. & KHORANA, H. G. (1974) “The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication”. Journal of Biological Chemistry 249: 5213-5221.
- PARAN, I.; KESSELI, R.;& MICHELMORE, R. (1991) “Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near isogenic lines”. Genome 34: 1021-1027.
- PFANNENTIEL, M. A.; ROO, E. J. ; KRAMER, V. C. ; & NICKERSON, K. W. (1984) “Toxicity and composition of protease-inhibited *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals”. FEMS Microbiol. Lett 21: 39-42.
- PINTO, P. M. “Variabilidade genética em populações de campo de *Fasciola hepatica* e *Shistosoma mansoni* observada por AP-PCR (Arbitrarily primed - polymerase chain reaction)”. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou. FIOCRUZ. 1996. 142p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Celular e Molecular).

PORTER, A. G. (1993) "Mosquitocidal toxins bacilli and their genetic manipulation for affective biological control of mosquitoes". Microbiological. Reviews, vol.57, No.4. p.838-861.

PLANO DIRETOR DE ERRADICAÇÃO DO *Aedes aegypti* DO BRASIL.(1996)
Elaborado pelo Ministério da Saúde em Articulação com o Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde (CONASS), e Conselho Nacional de Secretários Municipais de Saúde (CONASEMS). Assessoria da Organização Panamericana de Saúde - OPAS. Janeiro

PRIEST, F. G. (1992) "Biological Control of Mosquitoes and Bitingflies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*". J. Appl. Bacteriol., 72: 357 - 369.

RABINOVITCH, L.; PALMEIRA, M. L. E SILVA S. M.(1975) " Spontaneous spo mutant of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism". Rev. Microbiolog. (S. Paulo), 6 (12) 47 - 49.

RABINOVITCH, L.; JESUS, F.F.; CAVADOS, C. F. G.; ZAHNER, V.; MOMEN, H.; SILVA, M.H. L.; DUMANOIR, C. V.; FRACHON, E. & LECADET, M. M. (1995) "*Bacillus thuringiensis* subsp. *oswaldocruzi* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *brasiliensis*, two novel Brazilian strains which determine new serotype H38 and H 39, respectively". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 90 (1); 41 - 42.

RABINOVITCH, L.(1997) “ Situação atual e necessidade de pesquisa de controle biológico de vetores de importância para Saúde Pública”. Biotecnologia Ciência e desenvolvimento. pp: 42 - 45. Ano 01 N°. 01- maio de 1997.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C. F. G. & LIMA, M. M. “*Bacillus* entomopatogênicos. (1998) Dos *Bacillus* entomopatogênicos, o que se espera? Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 40-41.

RABINOVITCH, L.; BRAZÃO E SILVA, C. M. & ALVES, R.S. A.(1998) “Controle Biológico de Vetores de Doenças Tropicais utilizando *Bacillus* ntomopatôgenicos”. Vol.1, Cap.1. p. 17- 81. Controle Biológico. 1° Eds.EMBRAPA.SP. MEIO AMBIENTE. São Paulo-Brasil. 388P.

RAGNI, A.; THIÉRY, A. & DELÉCLUSE, A. (1996) “Characterization of six highly mosquidocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype”. Current microbiology. v.32. p.48-54.

RAPD analysis Beads Instructions Amersham Pharmacia Biotech. Manual de Instruções. Rev. 6, p.21. 2.000

RIBER, J.; & LECADET, M. M. (1973) “Etude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715: Remarques sur la

infotmation de inclusion parasporales". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124A: 311-344.

RUAS NETO, A. L. & OLIVEIRA, C. M. (1985) "Controle biológico de Culicídeos e Similídeos: inseticidas bacterianos". Revs. Bras. Malariol D. Trop., 37: 61-75.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E. & SIMPSON, A. J. G. (1994) "Rapid silver staining and recovery of PCRproducts separated on polyacrilamide gels. Biotechniques 17: 915-918.

SAIKI, R. K.; BUGAWAN, T.L.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A.(1985) "Analysis of enzymatically amplifield β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specificoligonucleotide probes". Nature 324: 163-166.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K.B.; & ERLICH, H. A. (1986) "Primer-dirested enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science. 239: 487-491.

SAKAHAROVA, Z. V.; IGNATENKO, I. N.; SHULZ F.; KNOVRYCHEV M.P.& RABOTNOVA I.L.(1985) "Growth and development kinetics of *Bacillus thuringiensis* in batch culture". Mikrobiologiya. 54(4): 604-9. Abstratat. (Article in Russian).

- SAMBROOK, J., FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. 3rd Volume.
- SCHARF, S. J.; HORN, G. T. & ERLICH, H. A. (1990) "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified sequences". *Science* 223: 1076-1078.
- SHAIKH, M. & MORRISONI, F. O.(1966) "Susceptibility of nine insect species to infection by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*". *J. Invertebr. Pathol.* v. 8: 347-350.
- SILVA-FILHA, M. H. ; L. REGIS, C. NIELSEN-LEROUX & J. F. CHARLES (1995) "Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)". *J. Econ. Entomol.* 88: 525-530.
- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, P. R. (1962) "Numerical taxonomy". *Nature*. 193: 855-860.
- STAHLY, D. P.; ANDREWS, R. & YOUSTEN, A. A.(1981) "The genus *Bacillus*: insect pathogens". In: *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, (eds). Ballows, A. Truper, H.; Dworken, M.; Harder, W. & Schleifer, k., p. 1697-1745. 2nd. Springer-Verlag, New York.

STEPHAN, R.; SCHRALF, D. & UNTERMANN, F.(1994) "Characterization of *Bacillus licheniformes* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA)". Letters In Applied Microbiology. v.18: 260-263.

STEINHAUS, E. A. (1961) "On the correct author of *Bacillus sotto*" J. Insect Pathool. v. 3: 97-100.

STEINDEL, M.; DIAS, E. N.; PINTO, C. J. C.; GRISARD, E. C.; MENEZES, C. L. P. ; MURTA, S. M. F.; SIMPSON, A. J. G. & ROMANHA, J. A. (1994) "Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains ". J. Euk. Microbiol., v.41, No.3. p.261-267.

SUCAM. Controle de Endemias no Brasil (de 1979 a 1984) - Ministério da Saúde - Brasília, DF. 1985.

TABASHNIK, B. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Ann. Ver. Entomol. 39: 47-79.

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J.(1981) " Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ - endotoxin": FEBS Lett. 154: 362-368.

- TOUMANOFF, C & LEE COROLLER, Y.(1958) "Contribution à l'étude de *Bacillus cereus* cristallophores et pathogènes pour les larves de Lepdoptera". Ann. Inst. Pasteur. v.96. p. 680-689.
- TYRELL, D. J., BULLA, I. A., ANDREWS, R.E., KRAMER, K. J., DAVIDSON, I. & NORDIN, P.(1981) "Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains". J. Bacteriol. 145(2): 1050-1062.
- VAN, R J. MCGAUGHEY, W. H., JOHNSON, B. D., BARNET, B. D. & MELLAERT V. H. (1990) "Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*". Science 247: 72-74.
- VANCOVA, J. (1964) "*Bacillus thuringiensis*". P. Ang. Entomol. v.2:271-291.
- VISSER, B., BOSCH, D. & HONÉE, G. (1993)"Domain-function studies of *Bacillus thuringiensis* crystals a genetic approach". Appl. Envirom Microbiol. 60: 3.711-3717.
- WARD, E. S. & ELLAR, D. J.(1983)"Assigment of the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to specific plasmid by curing analyses". FEBS Lett. 158:45-59.

WEISER, J.(1991) “ Biological control of vectors”. Chichester, England: John Wiley & Sons, p.189.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. (1990) “Fingerprinting genomes using PCR with arbitraryprimers”. Nucleic Acids Rev. 18: 7213-7218.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M.; (1991)“Fingerprinting genomes using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers”. Nucleic Acids Rev. 19: 5275-5.279.

WILLIAMS, J. G. K. ; KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V.(1990) “DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers”. Nucleic Acids Rev. 18: 6531-6535.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P.; FEDERICE, B. A. (1997) “ CtyA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of Cry IV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America, v.94, p: 10536-10540

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. (1970) “Insecticidi resistance and vector control”. Technical Report Series n. 445, 270 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. (1980) "Data sheet on biological control agent". WHO/ TDR/ VBC/ 80.777.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. DE BARJAC, H.; LARGET- THIÉRY I. (1982) "Characteristics of IPS - 82 as Standard for Biological assay of *Bacillus thuringiensis* H - 14 preparations". WHO / TDR/VBC/ 84. 892.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. (1984) "Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors". TDR/ BCV/ SWG - 7/ 84.3, 33 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. (1987) "Report an informal consultation on the detection isolation, identification and ecology of Biocontrol agents de disease vectors". TDR/ BCV/ IC - GE/ 87.3, 41p.

YOUSTEN, A. (1996) "Mosquitocidal toxins from bacteria og the genus *Bacillus*". Anáís do V Simpósio de Controle Biológico. 09 a 14 de Junho de 1996. Fóz de Iguaçú. Paraná - Brasil.

ZAHNER, V., RABINOVITCH, L., SUFFYS, P.; & MOMEN, H. (1999) "Genotypic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains". Applied and Environmental Microbiology. 5.182-5.185.