

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECOLOGIA**

**TOXICIDADE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus sphaericus* DA
AMAZONIA E PARÂMETROS DO CRESCIMENTO MICROBIANO PARA A
PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA**

ELEILZA DE CASTRO LITAIFF

MANAUS - AM

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**TOXICIDADE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus sphaericus* DA
AMAZONIA E PARÂMETROS DO CRESCIMENTO MICROBIANO PARA A
PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA**

ELEILZA DE CASTRO LITAIF

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia, área
de concentração em Saúde.**

ORIENTADOR: DR. WANDERLI PEDRO TADEI

CO-ORIENTADOR: DR. JORGE IVAN REBELO PORTO

MANAUS - AM

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na fonte pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Amazonas

LITAIFF, Eleilza de Castro

Toxicidade, caracterização molecular de *Bacillus sphaericus* da Amazônia e parâmetros do crescimento microbiano para a produção de bioinseticida./
Litaiff, E.C. – Manaus: UFAM, 2006.

xvii. 126 p.: il.

Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas.

1. Controle biológico. 2. Mosquitos. 3. *Bacillus sphaericus*. 4. Caracterização molecular. 5. Biolarvicidas. 6. Entomopatogênicos.

CDD 19. ed. 595.77

SINOPSE

Foi realizado um estudo com vinte estirpes de *Bacillus sphaericus* isoladas da Amazônia, sob os aspectos de determinação da atividade larvicida em *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus*, caracterização molecular da toxina binária e descrição dos parâmetros do crescimento microbiano: produção de biomassa e atividade em tempo letal ao longo do processo de fermentação em meio NYSM.

Palavras-chave: Controle biológico, Mosquitos, *Bacillus sphaericus*, Caracterização molecular, Biolarvicidas, Entomopatogênicos.

TOXICIDADE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus sphaericus* DA AMAZONIA E PARÂMETROS DO CRESCIMENTO MICROBIANO PARA A PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA.

ELEILZA DE CASTRO LITAIFF

Aprovada em 03/04/2006

Banca Examinadora:

Dr. Neliton Marques da Silva
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Neusa Hamada
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dra. Thania Virgínia Guaycurus
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Dra. Vera Margarete Scarpassa
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dr. Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

DEDICATÓRIA

*À meus pais Eduardo e Luíza
e avó Laudelina (“In
memoriam”)...*

...Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pela permissão para realizar este trabalho, pelos ensinamentos e amparo em todos os momentos, principalmente nos de maior angústia,

Aos meus pais e irmãos por todos os ensinamentos de vida, amor, apoio e compreensão, principalmente, quando precisei estar ausente,

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA/CPCS) pela orientação, demonstração de confiança, respeito, incentivo e amizade,

Ao Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto (INPA/CPBA) e Dra. Ila Maria Aguiar de Oliveira (UFAM), pela relevante contribuição profissional e pessoal, no carinho e respeito demonstrados,

Ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – UFAM pela oportunidade de formação. Ao professor Dr. Spartaco Astolfi Filho, conselheiros, professores, secretários e colegas de curso,

À FAPEAM, CTPETRO e PIATAM, pelo suporte financeiro,

À Dra. Iléa Brandão Rodrigues (INPA/CPCS), pela valiosa contribuição ao longo da minha formação profissional, pelos conselhos e amizade,

À Dra Thania Guaycurus (FIOCRUZ-RJ) e Dr Norbert Becker (KABS Alemanha), pelas valiosas discussões e sugestões que muito contribuíram para a realização dos experimentos,

Ao Dr. Wladimir João Tadei pela revisão do trabalho, valiosas sugestões e auxílio na análise estatística,

Aos técnicos do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue – INPA, pelo auxílio e dedicação em todos os momentos,

À Dra Rose Gomes Monnerat (CENARGEN/EMBRAPA - DF), pela cessão de algumas
estirpes de *B. sphaericus*

À equipe do Laboratório Temático de Biologia Molecular – INPA, em especial, a Audrey
D' Assunção e Renata Schmitt

Ao técnico Alan (Laboratório de microbiologia, Faculdade de Farmácia – UFAM), pelo
auxílio durante as atividades de crescimento microbiano,

Ao amigo Gláubio Fernandes da Silva pelo auxílio durante a manutenção das larvas no
insetário, pela incansável dedicação, profissionalismo e amizade,

Aos amigos que sempre me incentivam,

e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

... *Meus sinceros agradecimentos*

EPÍGRAFE

*“Mas é preciso morrer e nascer de novo,
semear no pó e voltar a colher.
Há que ser trigo, depois ser restolho,
há que penar para aprender a viver.
E a vida não é existir sem mais nada,
a vida não é dia sim, dia não.
É feita em cada entrega alucinada
pra receber daquilo que aumenta o coração”*

Mafalda Veiga

RESUMO

A atividade larvicida de *B. sphaericus*, procedentes de diversas localidades da Amazônia, foi estimada por meio de bioensaios com *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus*. Pela análise de Probit foi determinada a concentração letal mediana (CL50) e a potência em relação à estirpe padrão 2362. Os resultados apontaram as estirpes IB15 (CL50 = 0,040 ppm), IB19 e S1116 (CL50 = 0,048 ppm), IB16 (CL50 = 0,052 ppm) e S265 (CL50 = 0,057 ppm) como mais efetivas, sendo IB15 com potência cerca de 50% superior à estirpe 2362 nos bioensaios realizados contra *A. darlingi* e IB16 e S1116 mais potentes nos testes com *C. quinquefasciatus*, mostrando-se cerca de 300-400% superiores. Na caracterização molecular o gene da toxina binária foi diagnosticado em todas as estirpes estudadas e a toxina MTX1 foi observada em apenas quatorze estirpes. Com base nas sequências de BinA, foram observados 23 sítios polimórficos nas sequências, sendo apenas quatro informativos para parcimônia. Ao total obteve-se dez haplótipos entre as estirpes da Amazônia, sendo o haplótipo 1 (nove estirpes) similar a 2362 (Tipo 2) e o restante com sequências distintas. Os 16 sítios polimórficos observados nas sequências de aminoácidos resultaram em 19 aminoácidos variantes e, com base na distância genética, não foi possível estabelecer uma correlação entre variações nas sequências da toxina BinA e o nível de toxicidade, bem como a procedência das estirpes. Como *B. sphaericus* desperta um interesse biotecnológico na produção de biolarvicidas para controle de mosquitos vetores, foi estudado o crescimento microbiano da estirpe IB15 em meio NYSM, durante 24 horas de fermentação. IB15 apresentou um perfil de crescimento semelhante à estirpe 2362 quanto às produções de células, esporos, biomassa e em atividade larvicida ao longo da fermentação. Ao final, obteve-se $1,61 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹ com IB15 e $6,46 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹ com 2362. Os valores de TL50 foram semelhantes, sendo em média 2,5h nos testes com uma cultura do bacilo ao final de 24 horas. A estirpe IB15 demonstrou ser adequada para crescimento em meio NYSM, apresentando níveis desejados de produção de esporos e toxinas ao longo da fermentação. São necessários estudos complementares sobre produção em grande escala com essa estirpe para o desenvolvimento de

biolarvicidas. Portanto, com os resultados obtidos nesse trabalho, verifica-se a grande importância do controle biológico de mosquitos com o emprego de bactérias entomopatogênicas, mostrando ser uma alternativa ou complemento viável no controle de mosquitos vetores na Amazônia.

PALAVRAS-CHAVE

Controle biológico, Mosquitos, *Bacillus sphaericus*, Caracterização molecular, Biolarvicidas, Entomopatogênicos.

ABSTRACT

Larvicidal activity of *B. sphaericus* from several places in Amazonia, was estimated to *Anopheles darlingi* and *Culex quinquefasciatus*. Pobit analysis was used to determine the median lethal concentration (LC50) and potency relative to the 2362 standard strain. Findings pointed out strains IB15 (LC50 = 0.040 ppm), IB19 and S1116 (LC50 = 0.048 ppm), IB16 (LC50 = 0.052 ppm) and S265 (LC50 = 0.057 ppm) as the most effective ones, being IB15 with a potency of close to 50%, higher to strain 2362 in the assays carried out with *A. darlingi*. IB16 and S1116 were more potent in the experiments with *C. quinquefasciatus*, showing to be nearly 300-400% higher. Through molecular characterisation were diagnosed the binary toxin gene in all twenty studied stains and MTX1 toxin was found only on fourteen of them. Twenty-three polymorphic sites on the sequences were observed on the basis of the BinA sequences, being only four of them informative for the parsimony. As a whole, ten haplotypes were obtained amongst the Amazonian strains, being haplotype 1 (nine strains) similar to that of 2362 (Type 2) and the rest presenting distinct sequences. The 16 polymorphic sites observed on the aminoacid sequences resulted into 19 variant aminoacids and, on the basis of the genetic distance among the strains, it was not possible to establish a correlation between variations on BinA toxin sequences and toxicity level, as well as precedence of the strains. As *B. sphaericus* raises biotechnological interest in the production of biolarvicides, IB15 strain microbial growth in NYSM medium during 24h of fermentation, was studied. It was found that IB15 presented a growth profile similar to 2362 strain to production of cells, spores, biomass and larvicidal activity throughout fermentation, with no statistically significant differences. At the end, 1.61×10^9 spores.mL⁻¹ was obtained with IB15 and 6.46×10^8 spores.mL⁻¹ with 2362. LT50 values were similar, being in average 2.5h in the

experiments with one culture of the bacillus at the end of 24 hours. Strain IB15 showed to be suitable for growth in NYSM medium, presenting desirable levels of production of spores and toxins throughout fermentation. Further studies are needed on the large-scale production with that strain for the development of biolarvicides. Therefore, with the findings obtained in this study, one verifies the great importance of mosquito biological control with the use of entomopathogenic bacteria, showing to be a viable complement or alternative on the control of vector mosquitoes in Amazonia.

KEYWORDS

Biological control, Mosquitoes, *Bacillus sphaericus*, Molecular characterisation, Biolarvicides, Entomopatogenics.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.	i
BANCA EXAMINADORA	ii
DEDICATÓRIA.. . . .	iii
AGRADECIMENTOS.	iv
EPÍGRAFE.	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE	xi
LISTA DE TABELAS.	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 <i>Bacillus sphaericus</i> Neide	5
2.2 Caracterização molecular	6
2.3 Toxinas entomopatogênicas e modo de ação	8
2.4 Efeitos sobre espécies não-alvo	11
2.5 Controle biológico	13
2.6 Inseticidas bacterianos	14
2.7 Controle de vetores por <i>Bacillus sphaericus</i>	16
3. OBJETIVO GERAL.	18
CAPITULO I. AÇÃO TÓXICA DE ESTIRPES DE <i>Bacillus sphaericus</i> DA AMAZÔNIA EM LARVAS DE <i>Anopheles darlingi</i> E <i>Culex quinquefasciatus</i> .	
I.1 Introdução	19
I.2 Objetivos	21
I.3 Material e Métodos	22
I.3.1 Isolamento de <i>Bacillus sphaericus</i>	22
I.3.2 Liofilização	23
I.3.4 Bioensaios	25
I.4 Resultados	27
I.4.1 Isolamento de <i>Bacillus sphaericus</i>	27
I.4.2 Atividade larvicida	27

I.4.3 Concentração letal mediana	37
I.4.4 Potência relativa.	40
I.5 Discussão	45
I.5.1 Atividade larvicida	45
I.5.2 Concentração letal mediana.	47
I.5.3 Potência relativa	47

CAPITULO II. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO NA ANÁLISE DA TOXICIDADE EM ESTIRPES DE *Bacillus sphaericus* DA AMAZÔNIA

II.1 Introdução	49
II.2 Objetivos	51
II.3 Material e Métodos	52
II.3.1 Extração do DNA genômico	52
II.3.2 Quantificação de DNA	52
II.3.3 Desenho e escolha dos oligonucleotídeos iniciadores	53
II.3.4 Condições da PCR	54
II.3.5 Reações de purificação do produto da PCR	55
II.3.6 Reações de sequenciamento	56
II.4 Resultados	58
II.4.1 Toxicidade e amplificação gênica.	58
II.4.2 Composição nucleotídica	58
II.4.3 Caracterização molecular da toxina binária de <i>B. sphaericus</i> da Amazônia.	62
II.5 Discussão.	70

CAPITULO III. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE *Bacillus sphaericus* PARA PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA

III.1 Introdução.	75
III.2 Objetivos	76
III.3 Material e Métodos	77
III.3.1 Seleção da bactéria entomopatogênica	77
III.3.2 Processo fermentativo.	77
III.3.2.1 Meios de fermentação	77
III.3.2.2 Inóculo	78
III.3.2.3 Crescimento microbiano	79
III.3.3 Determinação de pH	80
III.3.4 Atividade larvicida	80

III.4 Resultados.	81
III.4.1 Crescimento de <i>B. sphaericus</i> IB15 e 2362.	81
III.4.2 pH.	85
III.4.3 Biomassa.	85
III.4.4 Parâmetros do crescimento microbiano.	85
III.4.5 Atividade larvicida.	88
III.5 Discussão.	92
III.5.1 Produção de células e esporos.	92
III.5.2 pH.	93
III.5.3 Biomassa.	94
III.5.4 Tempo letal mediano.	95
4. CONCLUSÕES.	97
4.1 Capítulo I.	97
4.2 Capítulo II.	98
4.3 Capítulo III.	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes de <i>B. sphaericus</i> isoladas em amostras de solos provenientes de diversas localidades da região Norte do Brasil.	29
Tabela 2. Mortalidade das larvas de <i>Anopheles darlingi</i> em valores cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas, observada nos bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> . .	30
Tabela 3. Mortalidade das larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> em valores cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas, observada nos bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> . .	31
Tabela 4. Mortalidade média das larvas de <i>Anopheles darlingi</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em três bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> após 24 horas de contato	35
Tabela 5. Mortalidade média das larvas de <i>Anopheles darlingi</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em três bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> após 48 horas de contato	36
Tabela 6. Concentração letal mediana (CL50) de <i>Bacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Anopheles darlingi</i>	38
Tabela 7. Concentração letal mediana (CL50) de <i>Bacillus sphaericus</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	39
Tabela 8. Potência de isolados de <i>Bacillus sphaericus</i> da Amazônia em relação à estirpe padrão 2362.	41
Tabela 9. Resultado dos testes de paralelismo e igualdade entre três isolados de <i>B. sphaericus</i> em relação à estirpe padrão 2362	42
Tabela 10. Valores de probit esperado e observado obtidos nos bioensaios da atividade de <i>Bacillus sphaericus</i> em <i>Anopheles darlingi</i>	43
Tabela 11. Amplificações obtidas dos genes das toxinas binária (BinA e BinB) e mosquitocida (MTX1) em estirpes de <i>B. sphaericus</i> procedentes de diversas localidades da Amazônia por meio da técnica de PCR.	60

Tabela 12. Composição média de nucleotídeos de um fragmento de 173pb da toxina BinA em diversas estirpes de <i>B. sphaericus</i> . (A = adenina, T = timina, C = citosina, G = guanina).	61
Tabela 13. Comparação entre sequências da toxina BinA de espécies Tipo de <i>Bacillus sphaericus</i>	67
Tabela 14. Produção de células e esporos de <i>B. sphaericus</i> IB15, crescidas em meio NYSM a 30°C e 200rpm	82
Tabela 15. Produção de células e esporos de <i>B. sphaericus</i> 2362, crescidas em meio NYSM a 30°C e 200rpm.	83
Tabela 16. Parâmetros do crescimento microbiano de <i>B. sphaericus</i> IB15 e 2362 cultivados em meio NYSM.	89
Tabela 17. Tempo letal mediano nos bioensaios com <i>C. quinquefasciatus</i> durante o crescimento microbiano de <i>B. sphaericus</i> IB15 e 2362.	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos de malária registrados no Brasil entre os anos de 1980-2005. Fonte: CGPNCN/SUS/MS.	2
Figura 2. Complexo parasporal de <i>Bacillus sphaericus</i> . S (esporo), C (cristal de toxina). E (esporângio).	5
Figura 3. A. Copos telados usados para coleta (maior) e desovas (menores) e B. cubas esmaltadas para criação das larvas de mosquito.	24
Figura 4. Disposição dos copos plásticos durante um bioensaio.	25
Figura 5. Larvas mortas nos bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> em 24 e 48 horas de contato, em valores cumulativos por espécie-alvo	32
Figura 6. Larvas mortas de <i>Anopheles darlingi</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> observadas nos bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> em valores não cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas	33
Figura 7. Regressão linear dose-probit da mortalidade das larvas de <i>Anopheles darlingi</i> nos bioensaios com <i>Bacillus sphaericus</i> IB15, IB19, S1116 e 2362. (reta: probit calculado, pontos: probit observado).	44
Figura 8. Esquema representativo do posicionamento dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da toxina binária (BinA, BinB).	53
Figura 9. Esquema representativo do posicionamento dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da toxina MTX1.	54
Figura 10. Produto da amplificação do DNA dos genes da toxina binária (BinA e BinB) em estirpes de <i>B. sphaericus</i> . 1. Marcador DNA 1kb <i>Ladder</i> , 2. controle negativo, 3. controle positivo 2362, 4. IB15, 5. IB16, 6. IB19, 7. S265, 8. S1116, 9. IB07, 10. IB08, 11. IB09, 12. S323, 13. S662, 14. S841, 15. IB10, 16. S589, 17. IB05, 18. IB11, 19. IB18, 20. IB12, 21. IB17, 22. S579. 23. S594. 24. Marcador DNA 1kb <i>Ladder</i>	59
Figura 11. Produto da amplificação do DNA dos genes da toxina mosquitocida MTX1 em estirpes de <i>B. sphaericus</i> . 1. Marcador DNA 1kb <i>Ladder</i> , 2. controle negativo, 3. controle positivo 2362, 4. IB15, 5. IB16, 6. IB19, 7. S265, 8. S1116, 9. IB07, 10. IB08, 11. IB09, 12. S323, 13. S662, 14. S841, 15. IB10, 16. S589, 17. IB05, 18. IB11, 19. IB18, 20. IB12, 21. IB17, 22. S579. 23. 2362. 24. Marcador DNA	

1kb <i>Ladder</i>	59
Figura 12. Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene BinA de diferentes estirpes de <i>B. sphaericus</i> . ?(nucleotídeo não determinado), *obtidas no <i>GenBank</i>	65
Figura 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína BinA de <i>B. sphaericus</i> da Amazônia. *Sequências obtidas no <i>GenBank</i>	66
Figura 14. Matriz de distâncias genéticas entre estirpes de <i>B. sphaericus</i> , considerando sequências de 393pb da toxina BinA. 1. BSP224478 (2297), 2. BSY13319 (9002), 3. BSY13320 (LP1-G), 4. BSP224477 (2297), 5. 2362, 6. IB05, 7. IB07, 8. IB08, 9. IB09, 10. IB10, 11. IB11, 12. IB12, 13. IB15, 14. IB16, 15. IB17, 16. IB18, 17. IB19, 18. S1116, 19. S265, 20. S323, 21. S579, 22. S589, 23. S662, 24. S841.	68
Figura 15. Cladograma obtido pelo método de agrupamentos vizinhos (Neighbor-Joining) a partir de sequências de 393 nucleotídeos da toxina BinA de <i>B. sphaericus</i> , segundo o modelo Kimura-2-parâmetros. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de <i>Bootstrap</i> superior a 50.	69
Figura 16. Culturas de <i>B. sphaericus</i> em incubador rotativo	78
Figura 17. Filtragem do meio de cultura de <i>B. sphaericus</i> para determinação da biomassa seca.	79
Figura 18. Curva de crescimento celular e produção de esporos de <i>B. sphaericus</i> IB15 e 2362 em meio NYSM a 30°C e 200rpm.	84
Figura 19. Valores de pH medidos ao longo da fermentação de <i>B. sphaericus</i> IB15 e 2362, em meio NYSM a 30°C e 200rpm.	86
Figura 20. Biomassa produzida durante o crescimento microbiano de <i>B. sphaericus</i> IB15 e 2362, em meio NYSM a 30°C e 200rpm.	87
Figura 21. Mortalidade nas larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> em bioensaios realizados durante o crescimento microbiano de IB15 e 2362.	90

1. INTRODUÇÃO

A malária, a filariose e o dengue estão entre as doenças transmitidas por mosquitos que registram os maiores números de casos em todo o mundo. Está em quinto lugar nas causas de morte por doenças infecto-parasitárias, superada apenas pelas doenças respiratórias, AIDS, diarreia e tuberculose (WHO 2005). Além do sofrimento que causam às pessoas acometidas, essas enfermidades representam um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico e social, sobretudo nos países mais pobres, pois seus efeitos interferem diretamente na capacidade produtiva dos trabalhadores ativos (SAUME & MALDONADO 1993, TAUIL 2000).

Entre essas doenças citadas acima, uma das mais graves em termos de saúde pública mundial é a malária. Também conhecida como paludismo, essa doença está presente em mais de 107 países. Segundo dados da OMS, os registros anuais estão em torno de 500 milhões dos casos, dos quais cerca de um milhão levam os doentes a óbito. As mortes são verificadas, principalmente, no continente africano e em crianças menores de cinco anos de idade (WHO 2004).

Atualmente no Brasil, a incidência da malária está quase que totalmente concentrada na região amazônica onde é registrado 99,7% dos casos de todo o país (FUNASA/EP/SISMAL). A distribuição dos focos da doença não ocorre de forma homogênea e estão relacionadas, principalmente, aos locais de ocupação desordenada de terras, entre estas, invasões urbanas, exploração de minérios, entre outras (TADEI 2001).

Um histórico dos casos de malária no Brasil, em duas décadas, pode ser visualizado na Figura 1. Nesse gráfico, observa-se o aumento progressivo nos casos a partir da década de 1980. A partir de 1999, a média anual passou a ser de 500.000 casos.

CASOS DE MALÁRIA NO BRASIL

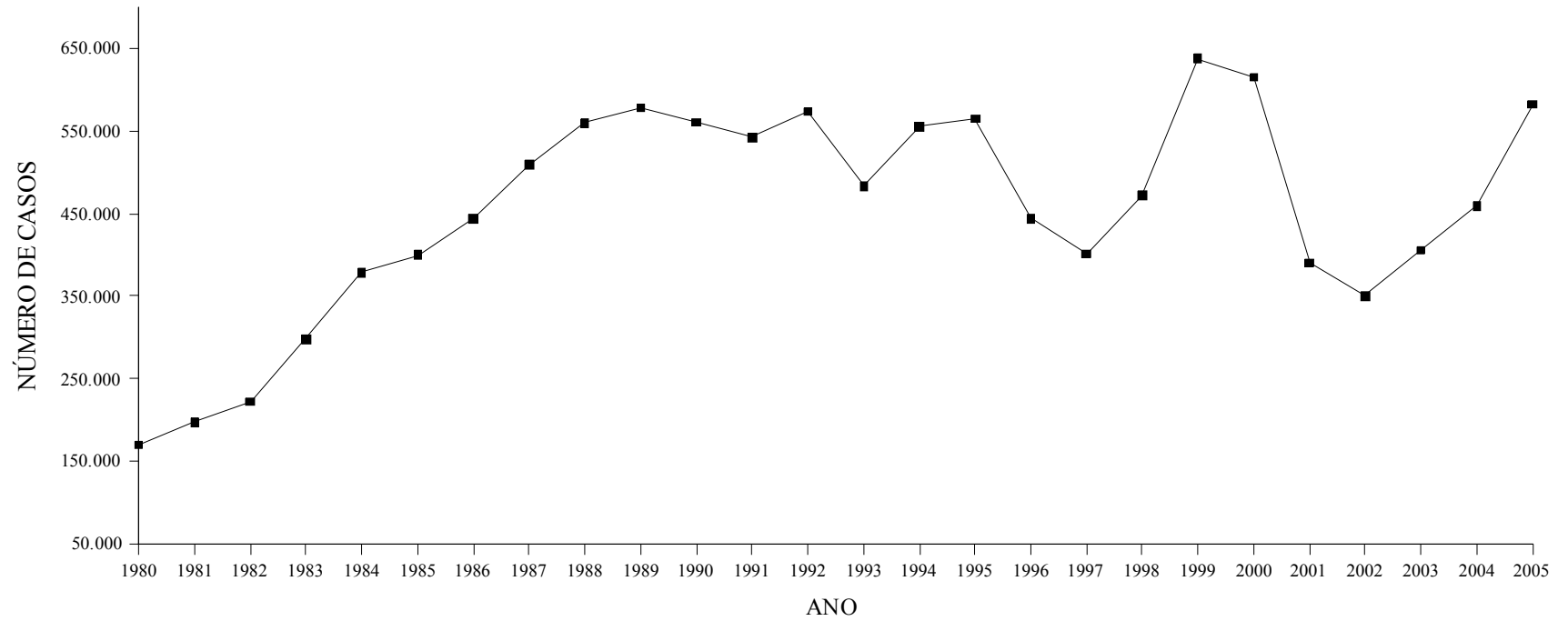


Figura 1. Casos de malária registrados no Brasil entre os anos de 1980-2005. Fonte: CGPNCN/SUS/MS.

O marco no controle de mosquitos vetores ocorreu em 1939, com a descoberta do diclorodifeniltricloroetano (DDT), um inseticida organoclorado, com elevada eficiência no controle de vetores e que apresentava baixo custo (OMS 1992). A eficácia contra as formas adultas do mosquito e o prolongado efeito residual incentivou o uso intensivo desse produto nos programas de controle no mundo todo, principalmente no período entre 1946 e 1970, onde os casos de malária foram reduzidos em até 50% nas áreas de maior incidência de malária (REY 1991).

Com a diminuição dos casos da doença, os programas de controle foram reduzidos ou até mesmo encerrados sem que houvesse o desenvolvimento de um programa extensivo de vigilância epidemiológica. Consequentemente, anos mais tarde, em decorrência dessa redução dos programas de controle, somada aos primeiros registros de resistência em populações de anofelinos ao DDT, surgiram focos da malária em locais de transmissão considerados controlados, com exceção dos países da Europa e América do Norte, onde a vigilância e o desenvolvimento de estratégias de controle passam a ser intensificadas (OMS 1970, D'AMATO 2002).

Este quadro, somado aos danos ao ecossistema e a saúde humana, resultou em uma revisão da estratégia global de erradicação da malária. Em 1992 durante a Conferência Ministerial de Amsterdã foi estabelecido o controle integrado da malária adequado às diferentes situações epidemiológicas. Outras medidas, além das relacionadas diretamente ao combate de vetores e ao parasito passaram a ser contempladas, tais como a articulação das autoridades competentes e a participação ativa da população por meio de informação sobre a doença, mecanismo de transmissão e importância do diagnóstico e tratamento precoces (SILVEIRA 2001).

Os inconvenientes da utilização de inseticidas químicos estimulam a busca de métodos alternativos no controle de pragas e vetores no campo da Saúde Pública. Um bom

exemplo é o controle biológico, um processo natural de regulação populacional por meio de agentes bióticos que lhes são tóxicos e/ou letais (FONTES 1992). Esse método baseia-se em um equilíbrio populacional onde uma espécie influencia o nível da outra, porém sem a supressão de nenhuma das duas, evitando efeitos ecológicos indesejáveis (FOWLER & DI ROMAGNANO 1992).

Entre os agentes de controle microbiano, *Bacillus thuringiensis* Berliner (1915) é um dos melhores exemplos de agentes de sucesso no controle de insetos, é responsável por 90% do mercado de bioinseticidas para controle de pragas com importância em agricultura e saúde pública (VALADARES-INGLIS *et al.* 1998). Apresenta ação tóxica principalmente em insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e apesar do largo espectro de ação, essa espécie de bacilo não é muito efetiva em águas poluídas e apresenta pouca atividade residual em campo por não se reciclarem no meio ambiente (LACEY 1984, WHO 1985, SOUZA *et al.* 1999).

Outra espécie de bactéria com ação entomopatogênica é o *Bacillus sphaericus* Neide (1904), que apesar do menor espectro de ação em comparação com *B. thuringiensis*, apresenta grande efetividade no controle de mosquitos vetores de malária (YOUSTEN 1984, BECKER 1997).

Nesse contexto, no presente trabalho avaliou-se o emprego de estirpes de *B. sphaericus* provenientes de diversas localidades da Amazônia, como agente de controle de mosquitos vetores. O estudo concentrou-se na análise da atividade larvicida em *Anopheles darlingi* Root (1926) e *Culex quinquefasciatus* Say (1823), na caracterização molecular das toxinas inseticidas e na seleção de estirpes promissoras para uso em formulações de inseticidas biológicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus sphaericus* NEIDE (1904)

Bacillus sphaericus é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporo circular de localização terminal ou subterminal deformante. De ampla distribuição mundial é comumente encontrada nos ambientes terrestres e aquáticos. É uma espécie heterogênea, definida por reações negativas nos testes fenotípicos tradicionais e pela incapacidade de utilizar açúcares como fonte de carbono para crescimento (CLAUS & BERKELEY 1986).

A toxicidade em *B. sphaericus* é devida a produção de uma toxina binária com subunidades de 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB), durante a esporulação (BAUMANN *et al.* 1991). Segundo ALVES (1998), a toxina binária constitui um cristal protéico, formando um complexo parasporal envolvido por um esporângio (Figura 2). O *B. sphaericus* apresenta ação tóxica em larvas de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Psorophora* e pouco ou nenhum efeito sobre larvas de *Aedes* sp., que são sensíveis ao *B. thuringiensis* (HABIB 1989).

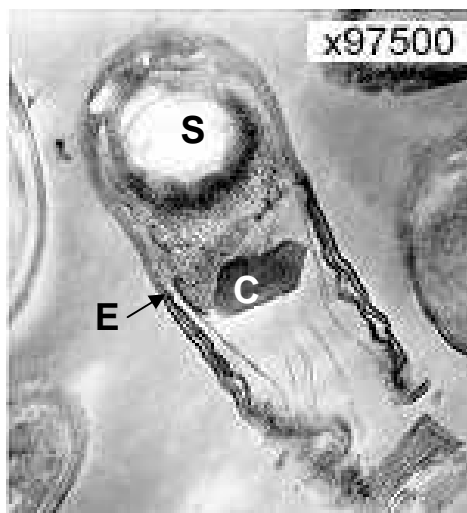


Figura 2. Complexo parasporal de *Bacillus sphaericus*. S (esporo), C (cristal de toxina). E (esporângio).

Apesar do *B. sphaericus* ter sido descrito no início do século XX, as primeiras observações de patogenicidade foram realizadas apenas em 1964 por KELLEN *et al.* (1965). O isolado denominado linhagem K apresentava baixo poder larvicida, levando cerca de sete dias para causar mortalidade em larvas de *Culiseta incidens* Thomson (1869) (Diptera: Culicidae). Posteriormente, com o isolamento da estirpe SSII-1 em mosquitos procedentes da Índia, com atividade larvicida cerca de 1.000 vezes superior à linhagem K, iniciou-se a busca por estirpes com potencial para controle biológico, visto os primeiros registros de resistência de mosquitos ao DDT (OMS 1970, SINGER 1973).

A estirpe SSII-1 foi a primeira efetivamente estudada por sua atividade larvicida. Porém, a utilização em campo iniciou-se com a estirpe 1593, procedente da Indonésia (SINGER 1981). Posteriormente, foram isoladas estirpes com alta atividade larvicida como a 2297 no Sri Lanka (WICHREMESINGHE & MENDIS 1980) e a 2362 na Nigéria (WEISER 1984). Esta última é atualmente recomendada pela OMS como estirpe padrão nos inseticidas biológicos de *B. sphaericus* (WHO 2005).

O aumento progressivo de *B. sphaericus* com alta toxicidade amplia o potencial tecnológico desse biolarvicida para controle de vetores (REGIS 2000). Outra importante característica de *B. sphaericus* e que confere vantagem para uso em campo é a persistência no ambiente por meio de reciclagem natural, utilizando as larvas mortas como substrato, inclusive em criadouros com alto teor de poluentes (HABIB 1989, CORREA & YOUSTEN 1995).

2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Os estudos iniciais de identificação do *B. sphaericus* tinham como base características morfológicas e bioquímicas. No entanto, apenas as propriedades fenotípicas eram insuficientes para separar estirpes entomopatogênicas, uma característica variável

nessa espécie, tornando imprescindível outros métodos de caracterização biológica (MERCAN & ÇÖKMÜŞ 2004). Como essa espécie apresenta pouca reatividade aos testes bioquímicos clássicos, um grande passo na identificação de estirpes patogênicas foram os estudos da susceptibilidade diferencial aos bacteriófagos (YOUSTEN *et al.* 1980) e sorotipagem por meio de antígenos flagelares (De BARJAC *et al.* 1980).

Avanços das técnicas em biologia molecular permitiram a diferenciação por meio de similaridade do DNA (KRYCH *et al.* 1980), os quais estabeleceram cinco grupos (I, IIA, IIB, III, IV e V) em 62 estirpes analisadas, sendo que as estirpes que apresentaram ação entomopatogênicas estavam agrupadas no subgrupo IIA. PRIEST *et al.* (1994) consideraram o grupo IIB de KRYCH *et al.* (1994) como uma nova espécie, o *B. fusiformis*.

ZHANER (1992) estudou a heterogeneidade genética em 140 estirpes de *Bacillus* sp., procedentes de diversas regiões do Brasil, por meio de eletroforese de isoenzimas. Os resultados apontaram *B. sphaericus* como um complexo de espécies. A similaridade entre os grupos analisados, com base em polimorfismos nos sítios de restrição enzimática (RFLP) (AQUINO DE MURO *et al.* 1992) e em ampliações ao acaso no genoma bacteriano (RAPD) (WOODBURN *et al.* 1995), confirmou a existência de grupos distintos no complexo *B. sphaericus*.

LAMPE (1998) estimou a similaridade entre estirpes de *B. sphaericus* patogênicas e não-patogênicas utilizando o gene 16S do RNA ribossomal, observando que não apenas estirpes patogênicas mostraram similaridade com o grupo IIA e que, portanto, é inadequado estudar esses grupos apenas com base em testes de patogenicidade.

Uma revisão taxonômica de *B. sphaericus* e *B. fusiformis* foi realizada por NAKAMURA (2000) utilizando sequências do gene 16S do RNA ribossômico. Foram obtidos sete grupos, o grupo 1 correspondendo ao subgrupo IIA de KRYCH *et al.* (1980) o grupo 2 ao *B. fusiformis* (IIB), o grupo 3 representa o *B. sphaericus* “*Stricto sensu*” e os

grupos 4, 5, 6 e 7 correspondem a novas taxa. O autor reafirma o parentesco entre as cepas do grupo 1 e 2, porém as considera como pertencentes ao *B. fusiformis*.

NAKAMURA *et al* (2003) validaram a nomenclatura de *B. pycnus* e de *B. nedei* para os grupos 6 e 7, respectivamente. Tendo em conta esses estudos foi proposto que *B. fusiformis* pertença ao grupo 1 e, portanto, a nomenclatura de *B. sphaericus* agrupa apenas o *B. sphaericus* “*Stricto sensu*”, bem como as cepas dos grupos 4 e 5.

2.3 TOXINAS ENTOMOPATOGÊNICAS E MODO DE AÇÃO

A patogenicidade de *B. sphaericus* resulta de uma ou mais toxinas que diferem em composição e tempo de síntese atuando no intestino médio da larva. A principal é a toxina binária, composta por um polipeptídeo de 42 (Bin A) e outro de 51kDa (Bin B). Essas toxinas são sintetizadas durante o processo de esporulação e depositadas como cristal junto ao esporo (BAUMANN *et al.* 1991, CHARLES *et al.* 1997).

A ação da toxina binária nas larvas ocorre após a ingestão dos cristais protéicos juntamente com o alimento. As toxinas interagem com receptores do epitélio do intestino médio, desencadeando uma sucessiva destruição tecidual culminando com a morte da larva por um processo septicêmico, em decorrência da multiplicação bacteriana na hemolinfa (GERMANI 1993). Segundo SINGH & GILL (1988) e POOPATHI *et al.* (1999) os eventos nas larvas seguem a ordem descrita a seguir:

1. ingestão do complexo esporo/cristal;
2. solubilização dos cristais em pH alcalino no intestino da larva e liberação dos polipeptídeos de 51 e 42kDa (protoxinas);
3. clivagem das protoxinas por ação de serina-proteases em fragmentos ativos. A toxina binária é degradada, por remoção de seqüências de peptídeos N- e C-terminal, para produtos tóxicos de 39 (BinA) e 43kDa (BinB);

4. ação da toxina ativada no epitélio intestinal e ligação aos receptores presentes na membrana do intestino médio e

5. alterações citopatológicas e lise celular.

As lesões histológicas nas larvas de mosquitos susceptíveis ao *B. sphaericus* mostraram danos em vários tecidos nos diferentes estágios da intoxicação bacteriana, com grave disfunção dos sistemas nervoso e muscular (SINGH & GILL 1988). Em larvas de anofelinos, os efeitos citopatológicos são observados a partir de 30 minutos após a ingestão da toxina, com aumento significativo de vesículas com atividades secretoras em células intestinais posteriores, seguido de um processo degenerativo nos diversos tecidos (OLIVEIRA 2005).

Comportamentalmente, as alterações nos hábitos alimentares modificam-se a partir de dez minutos com a redução na taxa alimentar (DAVIDSON *et al.* 1995), cessando completamente até a quarta hora. As larvas perdem seus movimentos característicos, ficando paralisadas na superfície da água, porém apresentando resposta aos estímulos táteis (SINGH & GILL 1988).

Os componentes da toxina binária presentes em quantidades equimolares nos cristais protéicos contribuíram para a formulação da hipótese de efeito sinérgico (DAVIDSON *et al.* 1990). O mecanismo de ação intracelular de *B. sphaericus* vem sendo elucidado com a descoberta da função dos componentes da toxina binária (BAUMANN *et al.* 1991, PORTER *et al.* 1993). Estudos no modo de ação sugeriram que BinB tenha sido o responsável pela ligação inicial na superfície do intestino larval e BinA confere a ação tóxica (BROADWELL *et al.* 1990, NICOLAS 1993). BAUMANN & BAUMANN (1991) constataram efeito tóxico de BinA em células de mosquitos, porém em um grau menor do que na presença de BinB.

O modo como a toxina binária atua após a ativação das proteínas vem sendo esclarecido com evidência de que uma simples classe de receptores seja expressa na superfície do ceco gástrico e intestino posterior em espécies de mosquitos susceptíveis (NIELSEN-LEROUX & CHARLES 1992).

Investigações sobre os efeitos da toxina binária em ensaios de afinidade com microvilosidades intestinais revelaram que o receptor em *Culex* sp é uma α -glicosidase de 60kDa (Cpm1) que se liga ao epitélio via âncora GPI (Glicosil-fostatidilinositol) (SILVA-FILHA *et al.* 1999). A interação entre os polipeptídeos seria importante para a formação de um complexo [BinA-BinB-Cpm1]-GPI (DARBOUX *et al.* 2001).

Estudos moleculares mostraram que o fenômeno de resistência a inseticidas químicos em *C. quinquefasciatus* não está relacionado à alterações no sítio de ligação da toxina, mas às mutações que expressam proteínas desprovidas da âncora GPI, conseqüentemente, a toxina Bin não se liga aos receptores na membrana celular (SILVA-FILHA 2005).

Na comparação entre as sequências do gene do receptor de membrana em *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* (ROMÃO *et al.* 2005), verificou-se variações em 83 nucleotídeos e os polimorfismos nas extremidades amino e carboxi terminais da proteína estariam relacionados com a diferença de susceptibilidade observada nessas duas espécies de mosquitos.

Além da toxina binária alguns isolados dessa espécie produzem, durante o estágio vegetativo do crescimento, toxinas de membrana ou MTX. Essas toxinas não estão presentes em todos os isolados de *B. sphaericus*, mas apresentam distribuição em estirpes com alta e baixa toxicidade (LIU *et al.* 1993). Até agora foram descritas três dessas toxinas: MTX1 de 100kDa (THANABALU *et al.* 1991), MTX2 de 31,8 kDa (THANABALU & PORTER 1996) e MTX3 de 35,8kDa (LIU *et al.* 1996).

A toxina MTX1 é produzida na forma de pro-toxina e por ação de tripsina, resulta em um produto com atividade ADP-ribosil transferase (27kDa) e um domínio de ligação (70kDa) (THANABALU *et al.* 1993). Apesar da clivagem formar a toxina ativa, o processamento não foi a base da especificidade da toxina, pois também foram observadas em MTX1 tratadas com tripsina bovina ou em extratos de insetos não susceptíveis (THANABALU *et al.* (1992).

Em bioensaio com MTX1 observou-se CL50 de 19ng.mL⁻¹ com *C. quinquefasciatus*, 4060 ng.mL⁻¹ em *Chironomus riparus* (Díptera: Chironomidae) e de 50 ng.mL⁻¹ em *A. aegypti* Linnaeus (1762) (PARTRIDGE & BERRY 2002). O efeito tóxico em *A. aegypti* tratada com MTX1 conferiu aumento no potencial das toxinas de *B. sphaericus*.

A ação das toxinas MTX2 e MTX3 é desconhecida, porém, apresenta de 20 a 27% de similaridade com as ϵ -toxinas de *Clostridium perfringens* Veillon & Zuber (1898) (Clostridia: Clostridiaceae) e acredita-se que atuem por um mecanismo semelhante. As ϵ -toxinas são responsáveis pela enterotoxemia em ovelhas e outros animais (PETIT *et al.* 1997).

Portanto, a identificação de toxinas inseticidas além de elucidar o modo de ação em organismos-alvo amplia o espectro de uso do *B. sphaericus* no controle de vetores.

2.4 EFEITOS SOBRE ESPÉCIES NÃO-ALVO

A propagação das doenças transmitidas por mosquitos é uma constante preocupação em saúde pública. Entre as bactérias entomopatogênicas, *B. sphaericus* foi rapidamente incorporado nos programas de controle de mosquitos por sua alta especificidade, sem causar danos ao meio ambiente (HORNBY *et al.* 1981, MULLA *et al.* 1984). No entanto, testes de segurança desses patógenos na natureza quanto aos efeitos em

organismos não-alvo (NTO) e ao próprio homem são exigidos pela OMS antes do uso em campo (FEDERICI 1995).

Nos estudos sobre os efeitos de *B. sphaericus* não foram observados ação tóxica em vertebrado e invertebrado não-alvo (MIURA *et al.* 1980, SIEGEL & SHADDUCK 1990), no entanto, estudos com os cristais da toxina solubilizados realizados por THOMAS & ELLAR (1983) apresentaram atividades citolíticas não específicas.

As estirpes de *B. sphaericus* SSII-1, 1404-9 e 1593 foram testadas para patogenicidade e infectividade em mamíferos por SHADDUCK *et al.* (1980). Os resultados demonstraram lesões em vários tecidos, porém não foram observadas morte ou patologias clínicas resultantes das injeções do bacilo. Dados semelhantes foram obtidos por De BARJAC *et al.* (1987) em estudos com fêmeas de ratos tratadas com doses da cultura total de *B. sphaericus* 2362, sorotipo H-5a,5b. BOSGELMEZ *et al.* (1989) estudaram a toxicidade de *B. sphaericus* em ratos e porcos-da-Guiné. Os animais receberam injeções do bacilo em áreas subcutâneas, intraperitoneais, intravenosas e percutâneas, também foram realizados testes de ingestão, inalação e irritação nos olhos com suspensões de 2×10^8 bactérias/mL. Nenhum dos animais apresentou sintomas de doença e o comportamento, curva de crescimento e peso médio dos órgãos estavam dentro da faixa de normalidade.

Os efeitos do biolarvicida VectoLex® (*B. sphaericus* 2362) nas larvas de *Aedes* e nos organismos não-alvo (copépodos, anfíbios e rotíferos) em condições de laboratório (PHAM *et al.* 1988). Os resultados apontaram mortalidade de 99% nas larvas de *Aedes*, 24 horas após a aplicação em doses a partir de 0,1 ppm. Não foram observados impactos nos organismos não-alvo em doses de até 1000 ppm.

SAMPAIO *et al.* (2005) analisaram os efeitos de *B. sphaericus* sobre a entomofauna em tanques de piscicultura no Amazonas tratados com biolarvicidas de *B. sphaericus*. Esses autores não constataram alterações nas drásticas nos níveis populacionais

da entomofauna nesses criadouros.

Um aspecto importante dos organismos não-alvo foi sugerido por YOUSTEN *et al.* (1991), a de que esses organismos poderiam contribuir com a dispersão da bactéria em áreas distantes da aplicação, pois foi observada a permanência dos esporos viáveis em ostras por até 21 dias e em caracóis por 49 dias, sem indicação de crescimento ou causa de patologias nesses animais.

2.5 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é considerado um componente fundamental do equilíbrio na natureza com base no mecanismo da densidade recíproca (BERTI-FILHO 1999). O aumento populacional de um inseto-praga implica em maior quantidade de alimento disponível aos seus inimigos naturais, cujas populações também aumentam, provocando um decréscimo na densidade da praga (disponibilidade de alimento), o que acarretará na queda dos níveis populacionais dos inimigos naturais, permitindo que a população-praga volte a crescer.

A existência de inimigos naturais propiciou o uso do controle biológico como uma tecnologia alternativa ao uso de inseticidas químicos contribuindo para a preservação de recursos naturais (DIAS 1992, LACEY & ORR 1994). Em Saúde Pública, essa ferramenta está voltada para a redução dos vetores, em níveis que não representem riscos de desencadeamento de epidemias (HABIB 1989).

Em relação aos inseticidas químicos, as bactérias entomopatogênicas apresentam vantagens quanto à especificidade de ação (HABIB & ANDRADE 1998), segurança para a fauna não-alvo, inclusive o próprio homem (SIEGEL 2001) e de não oferecer riscos de poluição ao meio ambiente. Geralmente em *B. sphaericus*, a persistência dessa espécie em campo ocorre por meio da reciclagem natural (CORREA & YOUSTEN 1995).

Entretanto, a necessidade do conhecimento da biologia das espécies envolvidas, o planejamento das aplicações sincronizadas com o período ideal de atuação do controlador, as medidas de proteção para manutenção da viabilidade dos patógenos e o menor espectro de ação contra diversas pragas, são fatores que limitam o uso desse tipo de controle (ALVES 1998).

2.6 INSETICIDAS BACTERIANOS

Em todo o mundo, os métodos convencionais de controle de insetos-praga estão baseados no uso de produtos químicos. Apesar do controle biológico ser um método ideal de manejo, o agente para controle, seja de importância agrícola, médica, veterinária ou urbana, ainda são empregados em um nível muito aquém do seu potencial, em virtude de problemas como produção em grande escala, pouca estabilidade, limitado espectro de ação e, principalmente, pela falta de uma política governamental específica (NOMURA 2003).

As bactérias são atualmente os agentes mais promissores com centenas de espécies descritas infectando inseto. Comercialmente, destacam-se *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* (REGIS *et al.* 2001). No entanto, o mercado mundial de bioinseticidas representa apenas 2% de uma movimentação comercial em torno de US\$ 30 bilhões e, deste percentual, *B. thuringiensis* corresponde a 90% (BISHOP 2002, MORAES 2005).

No Brasil, os inseticidas biológicos são utilizados há mais de 50 anos e mesmo com comprovação de causarem menor impacto ao meio ambiente do que os químicos e não serem prejudiciais ao ser humano, nunca ocuparam um lugar de destaque no mercado de vendas (NAVON 2000).

Além das inúmeras pragas agrícolas e vetores de doenças, a clonagem e a caracterização de novos genes codificadores de proteínas responsáveis pela atividade tóxica a insetos, têm ampliado as perspectivas no uso de proteínas inseticidas (SILVA-

FILHA 2005).

Segundo MORAES & CAPALBO (1986) e DIAS (1992), a produção inicial de bioinseticidas envolve diferentes etapas como:

1. Identificação de inimigos naturais;
2. Caracterização biológica;
3. Armazenamento dos recursos genéticos em coleções devidamente catalogadas;
4. Prospecção de insetos-alvo e
5. Formulação.

Ao final, o agente biológico entra na etapa final ou de desenvolvimento tecnológico, onde são realizados os estudos de produção, avaliação da tecnologia em grande escala e comercialização (GERMANI 1993, VILARINHOS *et al.* 1996).

Embora os entomopatógenos possam ser aplicados puros, muitas vezes tais condições não permitem coberturas homogêneas. Isto pode ser conseguido por meio de formulações com melhor desempenho em campo sem perda da qualidade do produto (ALVES 2001). Uma formulação adequada é a base para o sucesso de um inseticida microbiano, pois depende de aspectos relacionados à fisiologia do microrganismo e adequação ao tipo utilização, levando em consideração os hábitos comportamentais do inseto-alvo (MORAES *et al.* 2001).

A análise econômica da formulação deve ser criteriosa, uma vez que o preço final é um determinante na opção pelo produto (DIAS 1992). Portanto, é importante pesquisar com vistas em formulações de baixo custo, principalmente no caso de *B. sphaericus* que utiliza aminoácidos como fonte de carbono para crescimento.

Estudos de produção de *B. sphaericus* com resíduos industriais apontam

resultados promissores como, por exemplo, as pesquisas realizadas por SANCHES (2000) demonstrando que em baixa concentração de nutrientes (1,5%) há uma grande conversão em biomassa ($2,3 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹ e esporulação de 90%) com produção estimada em US\$ 11.00/L. Também, os experimentos de RORBERG (2000) com resíduos das indústrias de cerveja, constataram a produção de 6×10^{10} UFC/mL e $5,2 \times 10^{10}$ esporos.mL⁻¹ a um custo de US\$ 0.01/100L.

Poucas são as informações disponíveis na literatura científica sobre formulados com entomopatógenos, pois em geral, constituem-se em objeto de patentes (COUCH, 2000). Algumas instituições desenvolvem formulações em conjunto com empresas privadas como o caso do CENARGEN/EMBRAPA, associada à empresa BTHEK Biotecnologia, para o desenvolvimento do bioinseticida SPHAERUS SC, a base de *B. sphaericus* (José Manuel Cabral S. Dias, com. Pessoal).

Os processos biotecnológicos constituem-se em uma ferramenta de extrema importância nas atividades de controle de vetores em alternativas racionais de menor impacto ao meio ambiente. O fato de proporcionarem produtos resultantes da prospecção da natureza permite avaliar o potencial da biodiversidade da região.

2.7 CONTROLE DE VETORES POR *B. sphaericus*

Após a descoberta das primeiras estirpes com ação entomopatogênica em *B. sphaericus* (KELLEN & MEYERS 1964, SINGER 1973) e em *B. thuringiensis israelensis* (GOLDBERG & MARGALIT 1977), a OMS passou a incentivar o uso de bactérias em grandes programas de controle de vetores (HOUGARD & BACK 1992, BECKER 1997).

No controle de mosquitos, o *B. sphaericus* tem sido empregado com sucesso em países da África e América Latina (CASTRO *et al.* 1996, SKOVAND & BAUDUIN 1997, BERTI & ZIMMERMAN 1998, SKOVMAN & SANOGO 1999, BLANCO-CASTRO *et*

al. 2000).

No Brasil, o uso de bactérias entomopatogênicas em Saúde Pública iniciou-se em 1983 no Rio Grande do Sul com *B. thuringiensis israelensis* no controle de *Simulium pertinax* Kollar (1832) (Diptera: Simuliidae) (RUAS-NETO 1984).

Biolarvicidas a base de *B. sphaericus* foram empregados no controle de *C. quinquefasciatus* a partir de 1986 em Brasília – DF (VILARINHOS 1988), na área urbana de Recife e Olinda – PE (REGIS *et al.* 1995, REGIS *et al.* 2000) e em Montes Claros – MG (CONSOLI *et al.* 1997).

Em Manaus, biolarvicidas à base de *B. sphaericus* são empregados em programas de controle de vetores da malária nas áreas periféricas da cidade, nos criadouros naturais de anofelinos, os quais são diretamente influenciados pelos pulsos das enchentes característica da região (TADEI & RODRIGUES 2002).

Ações combinadas com diversas formas de intervenção como o exemplo das borrifações no peri e intradomicílio e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, vêm mostrando resultados significantes no emprego de métodos integrados no controle de vetores (TADEI, 2001). Aliados ao fortalecimento dos sistemas de saúde e informação e de parcerias com instituições governamentais e acadêmicas, são decisivos na redução dos riscos de epidemias de malária e contribuem para a melhoria na qualidade de vida e do meio ambiente.

3. OBJETIVO GERAL

Estudar alguns aspectos da utilização de *Bacillus sphaericus* como agente no controle biológico de mosquitos vetores de doenças com grande importância em saúde pública no Amazonas. Para atingir esse objetivo, este estudo foi dividido em três capítulos: no Capítulo I foi testada a toxicidade de vinte estirpes de *B. sphaericus* em larvas de *A. darlingi* e *C. quinquefasciatus*, em condições de laboratório; no Capítulo II, foi realizada a caracterização molecular da toxina binária em vinte estirpes de *B. sphaericus*; e no Capítulo III foi descrito o crescimento microbiano da uma estirpe de *B. sphaericus*, promissora para controle com base nos bioensaios de toxicidade, sendo, inclusive, verificada a ação tóxica ao longo do processo de fermentação.

CAPITULO I. AÇÃO TÓXICA DE ESTIRPES DE *Bacillus sphaericus* DA AMAZÔNIA EM LARVAS DE *Anopheles darlingi* E *Culex quinquefasciatus*

I.1 INTRODUÇÃO

A prospecção de isolados virulentos é uma das etapas mais importantes na consolidação de um programa de controle de mosquitos por bactérias entomopatogênicas. Por meio de bioensaios é possível verificar o efeito do patógeno sobre insetos-alvo e o grau de toxicidade, assim, selecionar os mais promissores para a produção de inseticidas biológicos.

O estudo da atividade larvicida em *Bacillus* sp. envolve diversos fatores tais como: diferença entre as estirpes, espectro de ação, efeitos sobre a espécie-alvo e influências do ambiente (ALVES 1998). Além destes, o tipo de bioensaio empregado representa um grande obstáculo na comparação dos resultados, pois a falta de padronização dos testes pode acarretar conclusões pouco confiáveis (POLANCKYZIC, 2004).

No Brasil, atividades de prospecção de *B. sphaericus* nas diversas regiões do país têm propiciado a descoberta de estirpes altamente tóxicas (SCHENKEL *et al.* 1992, VILARINHOS 1996, SILVA *et al.* 2002, LITAIFF & TADEI 2005), porém, pouco se conhece sobre o potencial de isolados da Amazônia no controle dos vetores de enfermidades como a malária, que representa um grave problema social nessa região (RODRIGUES *et al.* 1999, OLIVEIRA & RODRIGUES 2001, LITAIFF 2002).

Dentro do programa de controle de vetores de importância em saúde pública, o grupo de pesquisa em controle biológico do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue/INPA vem consolidando a construção de um banco de bactérias entomopatogênicas. Esse banco constitui-se em uma ferramenta tecnológica no controle de

vetores, ao mesmo tempo em que possibilita estimar a biodiversidade dos microrganismos da região. Portanto, a realização deste trabalho busca reunir informações sobre a atividade larvicida de *B. sphaericus*, provenientes da região Norte do Brasil em mosquitos vetores.

I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.2.1 Constituir um banco de germoplasma de *Bacillus sphaericus* com ação entomopatogênica provenientes de diversas localidades da Amazônia;
- I.2.2 Avaliar a toxicidade de *Bacillus spahericus* da Amazônia em larvas de *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus*;
- I.2.3 Determinar a potência das estirpes de *Bacillus sphaericus* em relação à estirpe padrão 2362, visando selecionar a estirpe com maior toxicidade para posterior produção de inseticidas biológicos.

I.3 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento de *B. sphaericus* e os experimentos de avaliação da atividade larvicida foram realizados no Laboratório de Vetores de Malária e Dengue, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde - INPA.

I.3.1 ISOLAMENTO DE *Bacillus sphaericus*

As estirpes de *B. sphaericus* foram isoladas a partir de amostras de solo provenientes de doze localidades do Amazonas. Estirpes oriundas de outros três estados da região Norte foram obtidas no Banco de Germoplasma de Microrganismos (CENARGEN/EMBRAPA), cedidas pela Dra. Rose Gomes Monnerat. As estirpes estudadas estão listadas na Tabela 1 e encontram-se depositadas na coleção de entomopatógenos do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue/INPA. A estirpe 2362, isolada na Nigéria (WEISER, 1984), foi utilizada como estirpe padrão nos testes de toxicidade.

O isolamento de *B. sphaericus* foi realizado segundo protocolo da OMS (WHO, 1985). Em cada amostra foi pesado um grama de solo, transferido para tubos estéreis contendo 10mL de NaCl (0,85%) e homogeneizado durante cinco minutos. Em seguida, foi submetido a choque térmico (80°C por 12 minutos e a 0°C por 5 minutos) para selecionar as bactérias formadoras de esporos (TRAVERS *et al.* 1987). Procedeu-se às diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,85%) e 1mL da diluição 10⁻⁵ foi distribuída em Placas de Petri contendo meio ágar nutritivo, cuja composição é descrita a seguir:

	g/L
Ágar	15,0
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0

Ajustado em pH 7,0 e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à temperatura de 30°C por um período de 48 horas. Após o crescimento foram observadas características morfológicas das colônias e as selecionadas por caracteres de bacilos foram plaqueadas em meio seletivo com penicilina G (100 mg.L⁻¹) e estreptomicina (25 mg.L⁻¹) e mantidas em estufa bacteriológica a 30 °C por 48h. Após esse período, as colônicas de *B. sphaericus* foram identificadas por crescimento diferencial nas placas com antibiótico e por observação em imersão em microscópio óptico de contraste de fase.

I.3.2 LIOFILIZAÇÃO

As estirpes foram liofilizadas para posterior utilização nos bioensaios. Alíquotas de 1 mL da cultura com 12 horas de crescimento foram inoculadas em 20 mL de caldo nutritivo e mantidas em incubador rotativo a 30°C e 200rpm, por 24 horas.

Após o crescimento, o caldo foi centrifugado a 12.000rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em água destilada estéril. Esse procedimento de lavagens sucessivas do meio de cultura foi realizado três vezes e o precipitado da última centrifugação foi congelado a -20°C por 12 horas. Ao final desse período, o material foi submetido à desidratação a -51°C em liofilizador de alto vácuo (Freeze Dryer Micro Modulyo – Edwards), ficando apenas o material sólido contendo os esporos. O produto foi transferido para um tubo de vidro e armazenado em dessecador com sílica-gel.

I.3.3 CRIAÇÃO DE LARVAS DE *A. darlingi* E *C. quinquefasciatus* USADAS NOS BIOENSAIOS

Os bioensaios foram realizados contra larvas de terceiro estágio de *A. darlingi* e *C. quinquefasciatus*. As larvas foram criadas em insetário sob ambiente controlado com

temperatura de 26 ± 2 °C, umidade relativa a 85% e fotofase de 12 horas, segundo SCARPASSA & TADEI (1990).

Para obtenção das larvas de *C. quinquefasciatus* foram mantidas colônias da espécie no insetário. Para *A. darlingi* houve a necessidade de coletar o mosquito adulto pela dificuldade de manutenção de colônias.

Coletas periódicas foram realizadas em Manaus e Coari – AM. Em campo, as fêmeas de anofelinos eram capturadas antes de realizarem o repasto sanguíneo e no laboratório eram alimentadas com sangue de *Gallus gallus*. As fêmeas ingurgitadas eram postas para desovar em copos individuais telados (Figura 3A), revestidos de papel-filtro umedecido para evitar dessecação dos ovos e acomodadas em caixas de isopor.



Figura 3. **A.** Copos telados usados para coleta (maior) e desovas (menores) e **B.** cubas esmaltadas para criação das larvas de mosquito.

Após período de oviposição, em média de três a cinco dias, as desovas eram transferidas para bandejas esmaltadas (Figura 3B) contendo água potável e alimento (farinha de peixe e fígado bovino 8:1). As bandejas recebiam numeração do mosquito correspondente, o qual era identificado em nível de espécie usando a chave de identificação de CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994).

A água das bandejas era trocada a cada dois dias e acrescentada nova quantidade do alimento. Esse procedimento foi repetido até as larvas atingirem o terceiro estágio, quando eram utilizadas nos bioensaios.

I.3.4 BIOENSAIOS

Os bioensaios foram realizados segundo DULMAGE *et al.* (1990). Do bacilo liofilizado obteve-se uma solução estoque de 50 partes por milhão (ppm) e por diluições sucessivas sete doses finais: 1,0 ppm; 0,5 ppm; 0,25 ppm; 0,12 ppm; 0,06 ppm; 0,02 ppm e 0,01ppm.

Em cada tratamento foram montadas réplicas de cinco copos plásticos contendo 100 mL de água destilada, 1 mL de alimento (item 1.3.3), 20 larvas de terceiro estágio e a dose do bacilo (Figura 4). Foram montados copos controle nas mesmas condições anteriormente descritas, porém sem o tratamento com bacilo. Os bioensaios foram realizados em triplicata montados em dias alternados (havendo em cada uma um grupo controle), totalizando 300 larvas por dose.



Figura 4. Disposição dos copos plásticos durante um bioensaio.

O monitoramento dos bioensaios foi realizado em intervalos de 24 e 48 horas após aplicação do bacilo com a contagem de larvas vivas e mortas. Observando que foram considerados mortos os indivíduos que não responderam com movimentos ao serem tocados por um palito. Os bioensaios onde o grupo controle apresentou mortalidade superior a 10% foram descartados. Naqueles em que a mortalidade atingiu valores acima de 5% (e inferior a 10%) foram corrigidos com a fórmula de Abbott (FINNEY 1981).

Os dados de mortalidade das larvas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa MINITAB.

A concentração letal mediana (CL50) e a potência relativa à estirpe 2362 foram obtidas por análise de Probit (FINNEY 1981), com auxílio do programa POLO-PC / LeOra Software - 1987.

Os isolados mais potentes foram comparados com a estirpe padrão em grau de virulência por meio das retas de regressão linear. As retas foram construídas com base nos valores de probit esperado a partir da equação de regressão linear e do probit observado obtido pela conversão dos percentuais de mortalidade (FINNEY 1981).

I.4 RESULTADOS

I.4.1 ISOLAMENTO DE *Bacillus sphaericus*

Foram obtidos 12 isolados de *Bacillus sphaericus* das amostras de solo coletadas no Amazonas (Tabela 1). Somando-se às oito estirpes cedidas pelo CENARGEN/EMBRAPA e a estirpe padrão 2362, totalizaram 21 estirpes estudadas nesse trabalho.

I.4.2 ATIVIDADE LARVICIDA

Os resultados obtidos nos bioensaios com as 21 estirpes, em valores cumulativos nas leituras de 24 e 48 após a aplicação do bacilo, estão representados de forma resumida nas Tabelas 2 e 3, em testes com larvas de *A. darlingi* e *C. quinquefasciatus*, respectivamente. Somando-se os testes constantes destas duas Tabelas, foram utilizadas 100.800 larvas em todos os bioensaios realizados.

Maior percentual de mortalidade das larvas ocorreu nas primeiras 24 horas. Nos testes com *A. darlingi*, os isolados mais efetivos foram IB15, com 1430 larvas mortas (68,1%), S1116 com 1366 (65,0%) e IB19 com 1364 (64,9%) em 24 horas. Em 48 horas, os resultados foram, respectivamente, 1485 larvas mortas (70,7%), 1428 larvas (68,2%) e 1432 larvas (68%). Menor efeito foi obtido com o isolado IB12, que mostrou apenas 604 larvas mortas em 48 horas, correspondendo ao percentual de apenas 28,8%. A estirpe padrão 2362 causou morte em 61,7% (1295 larvas) em 24 horas e 65% (1367 larvas) em 48 horas (Tabela 2).

Nos testes com *C. quinquefasciatus* (Tabela 3), os maiores valores de mortalidade

entre as larvas na leitura de 24 horas foram obtidos com as estirpes S1116 – 81,2% (1705 larvas mortas), S265 – 80% (1683 larvas), IB19 – 78,4% (1646 larvas), IB10 – 75,8% (1593 larvas) e IB15 – 75% (1574). Em 48 horas, a mortalidade máxima foi observada nas larvas com a estirpe IB16 - 84,7% (1778 larvas mortas) e S1116 – 84,1% (1767 larvas). Nos bioensaios com 2362 o maior percentual de mortalidade foi 63,7% (1337) em 48 horas.

Tabela 1. Estirpes de *B. sphaericus* isoladas em amostras de solos provenientes de diversas localidades da região Norte do Brasil.

ESTIRPE	PROCEDÊNCIA	ORIGEM
IB05	Tarumãzinho, Manaus – AM	1
IB07	Janauarilândia, Iranduba – AM	1
IB08	Coari – AM	1
IB09	Coari – AM	1
IB10	Tupé, Manaus – AM	1
IB11	Presidente Figueiredo – AM	1
IB12	Manaus – AM	1
IB15	Janauarilândia, Iranduba – AM	1
IB16	Manaus – AM	1
IB17	Manaus – AM	1
IB18	Presidente Figueiredo – AM	1
IB19	Tarumãzinho, Manaus – AM	1
S265	Belém – PA	2
S323	Boa Vista – RR	2
S579	Boa Vista – RR	2
S589	Boa Vista – RR	2
S594	Boa Vista – RR	2
S662	Lagoa Cacoal Grande, Belém – PA	2
S841	Belém – PA	2
S1116	Itaubal – AP	2
2362	Nigéria	3

Tabela 2. Mortalidade das larvas de *Anopheles darlingi* em valores cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas, observada nos bioensaios com *Bacillus sphaericus*.

ESTIRPE	LEITURA / DOSE* (ppm)																		
	24 HORAS									48 HORAS									
	C	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,02	0,01	TOTAL	C	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,02	0,01	TOTAL	
IB05	4 (1,3)	223 (74,3)	180 (60,0)	128 (42,7)	79 (26,3)	53 (17,7)	25 (8,3)	13 (4,3)	701,0	5 (1,7)	276 (92,0)	192 (64,0)	140 (46,7)	88 (29,3)	69 (23,0)	34 (11,3)	22 (7,3)	821,0	
IB07	5 (1,7)	263 (87,7)	230 (76,7)	176 (58,7)	105 (35,0)	64 (21,3)	17 (5,7)	7 (2,3)	862,0	5 (1,7)	280 (93,3)	239 (79,7)	184 (61,3)	114 (38,0)	87 (29,0)	27 (9,0)	16 (5,3)	947,0	
IB08	5 (1,7)	273 (91,0)	252 (84,0)	208 (69,3)	150 (50,0)	93 (31,0)	40 (13,3)	34 (11,3)	1050,0	7 (2,3)	281 (93,7)	276 (92,0)	214 (71,3)	165 (55,0)	104 (34,7)	52 (17,3)	42 (14,0)	1134,0	
IB09	2 (0,7)	268 (89,3)	242 (80,7)	202 (67,3)	135 (45,0)	74 (24,7)	27 (9,0)	8 (2,7)	956,0	4 (1,3)	283 (94,3)	250 (83,3)	209 (69,7)	149 (49,7)	88 (29,3)	34 (11,3)	15 (5,0)	1028,0	
IB10	1 (0,3)	185 (61,7)	169 (56,3)	134 (44,7)	89 (29,7)	65 (21,7)	29 (9,7)	14 (4,7)	685,0	4 (1,3)	221 (73,7)	178 (59,3)	138 (46,0)	96 (32,0)	72 (24,0)	35 (11,7)	17 (5,7)	757,0	
IB11	2 (0,7)	195 (65,0)	157 (52,3)	114 (38,0)	78 (26,0)	54 (18,0)	34 (11,3)	12 (4,0)	644,0	4 (1,3)	213 (71,0)	169 (56,3)	119 (39,7)	84 (28,0)	64 (21,3)	39 (13,0)	20 (6,7)	708,0	
IB12	5 (1,7)	176 (58,7)	149 (49,7)	95 (31,7)	62 (20,7)	39 (13,0)	14 (4,7)	9 (3,0)	544,0	5 (1,7)	192 (64,0)	157 (52,3)	100 (33,3)	74 (24,7)	52 (17,3)	17 (5,7)	12 (4,0)	604,0	
IB15	4 (1,3)	300 (100)	288 (96,0)	278 (92,7)	245 (81,7)	178 (59,3)	96 (32,0)	45 (15,0)	1480,0	7 (2,3)	-	300 (100)	284 (94,7)	256 (85,3)	191 (63,7)	101 (33,7)	53 (17,7)	1485,0	
IB16	5 (1,7)	298 (99,3)	286 (95,3)	257 (85,7)	217 (72,3)	170 (56,7)	84 (28,0)	32 (10,7)	1344,0	6 (2,0)	300 (100)	300 (100)	259 (86,3)	223 (74,3)	186 (62,0)	87 (29,0)	38 (12,7)	1399,0	
IB17	3 (1,0)	217 (72,3)	182 (60,7)	141 (47,0)	92 (30,7)	51 (17,0)	22 (7,3)	10 (3,3)	715,0	5 (1,7)	239 (79,7)	206 (68,7)	153 (51,0)	112 (37,3)	67 (22,3)	34 (11,3)	18 (6,0)	829,0	
IB18	4 (1,3)	150 (50,0)	123 (41,0)	110 (36,7)	81 (27,0)	50 (16,7)	25 (8,3)	14 (4,7)	553,0	5 (1,7)	185 (61,7)	134 (44,7)	124 (41,3)	82 (27,3)	58 (19,3)	36 (12,0)	15 (5,0)	694,0	
IB19	4 (1,3)	300 (100)	288 (96,0)	260 (86,7)	218 (72,7)	162 (54,0)	86 (28,7)	50 (16,7)	1364,0	5 (1,7)	-	300 (100)	271 (90,3)	222 (74,0)	187 (62,3)	93 (31,0)	59 (19,7)	1432,0	
S265	2 (0,7)	292 (97,3)	270 (90,0)	239 (79,7)	205 (68,3)	153 (51,0)	80 (26,7)	46 (15,3)	1285,0	2 (0,7)	300 (100)	285 (95,0)	243 (81,0)	212 (70,7)	171 (57,0)	88 (29,3)	53 (17,7)	1352,0	
S323	3 (1,0)	299 (99,7)	291 (97,0)	254 (84,7)	179 (59,7)	93 (31,0)	27 (9,0)	14 (4,7)	1157,0	4 (1,3)	300 (100)	300 (100)	262 (87,3)	186 (62,0)	103 (34,3)	37 (12,3)	23 (7,7)	1211,0	
S579	3 (1,0)	190 (63,3)	145 (48,3)	104 (34,7)	72 (24,0)	45 (15,0)	12 (4,0)	5 (1,7)	573,0	5 (1,7)	216 (72,0)	168 (56,0)	119 (39,7)	96 (32,0)	56 (18,7)	36 (12,0)	20 (6,7)	711,0	
S580	4 (1,3)	291 (97,0)	266 (88,7)	228 (76,0)	152 (50,7)	80 (26,7)	29 (9,7)	14 (4,7)	1060,0	6 (2,0)	300 (100)	275 (91,7)	238 (79,3)	158 (52,7)	96 (32,0)	36 (12,0)	23 (7,7)	1126,0	
S594	2 (0,7)	290 (96,7)	266 (88,7)	232 (77,3)	182 (60,7)	128 (42,7)	58 (19,3)	28 (9,3)	1184,0	4 (1,3)	300 (100)	269 (89,7)	244 (81,3)	198 (66,0)	143 (47,7)	67 (22,3)	32 (10,7)	1259,0	
S662	6 (2,0)	297 (99,0)	280 (93,3)	232 (77,3)	169 (56,3)	98 (32,7)	36 (12,0)	18 (6,0)	1130,0	6 (2,0)	300 (100)	296 (98,7)	241 (80,3)	174 (58,0)	116 (38,7)	43 (14,3)	25 (8,3)	1195,0	
S841	3 (1,0)	293 (97,7)	285 (95,0)	253 (84,3)	189 (63,0)	118 (39,3)	36 (12,0)	14 (4,7)	1188,0	5 (1,7)	300 (100)	300 (100)	268 (89,3)	194 (64,7)	137 (45,7)	59 (19,7)	22 (7,3)	1280,0	
S1116	4 (1,3)	300 (100)	285 (95,0)	259 (86,3)	223 (74,3)	165 (55,0)	86 (28,7)	48 (16,0)	1366,0	7 (2,3)	-	300 (100)	263 (87,7)	229 (76,3)	184 (61,3)	97 (32,3)	55 (18,3)	1428,0	
2562	4 (1,3)	295 (98,3)	276 (92,0)	251 (83,7)	188 (62,7)	158 (52,7)	82 (27,3)	45 (15,0)	1295,0	6 (2,0)	300 (100)	288 (96,0)	264 (88,0)	197 (65,7)	168 (56,0)	98 (32,7)	52 (17,3)	1367,0	
TOTAL									21.086										22.695

C = controle

() = percentual de larvas mortas

ppm = parte por milhão

- = 100% de mortalidade na leitura anterior

Tabela 3. Mortalidade das larvas de *Culex quinquefasciatus* em valores cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas, observada nos bioensaios com *Bacillus sphaericus*.

Estirpe	LEITURA / DOSE* (ppm)																		
	24 HORAS									48 HORAS									
	C	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,02	0,01	TOTAL	C	1,00	0,50	0,25	0,12	0,06	0,02	0,01	TOTAL	
IB05	1 (0,3)	273 (91,0)	261 (87,0)	238 (79,3)	200 (66,7)	150 (50,0)	89 (29,7)	70 (23,3)	1.281	3 (1,0)	296 (98,7)	288 (96,0)	245 (81,7)	214 (71,3)	180 (60,0)	97 (32,3)	93 (31,0)	1.413	
IB07	6 (2,0)	280 (93,3)	263 (87,7)	230 (76,7)	198 (66,0)	167 (55,7)	97 (32,3)	70 (23,3)	1.305	6 (2,0)	300 (100)	282 (94,0)	251 (83,7)	217 (72,3)	198 (66,0)	110 (36,7)	82 (27,3)	1.440	
IB08	2 (0,7)	296 (98,7)	286 (95,3)	274 (91,3)	233 (77,7)	184 (61,3)	107 (35,7)	53 (17,7)	1.433	4 (1,3)	300 (100)	300 (100)	296 (98,7)	255 (85,0)	213 (71,0)	114 (38,0)	71 (23,7)	1.549	
IB09	1 (0,3)	294 (98,0)	293 (97,7)	267 (89,0)	229 (76,3)	161 (53,7)	67 (22,3)	28 (9,3)	1.339	3 (1,0)	300 (100)	300 (100)	273 (91,0)	238 (78,3)	184 (61,3)	76 (25,3)	41 (13,7)	1.412	
IB10	4 (1,3)	293 (97,7)	283 (94,3)	275 (91,7)	245 (81,7)	214 (71,3)	165 (55,0)	118 (39,3)	1.593	6 (2,0)	300 (100)	300 (100)	294 (98,0)	257 (85,7)	223 (74,3)	174 (58,0)	132 (44,0)	1.680	
IB11	2 (0,7)	260 (86,7)	237 (79,0)	199 (66,3)	170 (56,7)	138 (46,0)	79 (26,3)	54 (18,0)	1.137	5 (1,7)	287 (95,7)	257 (85,7)	218 (72,7)	196 (65,3)	147 (49,0)	86 (28,7)	67 (22,3)	1.258	
IB12	3 (1,0)	297 (99,0)	285 (95,0)	277 (92,3)	251 (83,7)	210 (70,0)	140 (46,7)	90 (30,0)	1.550	3 (1,0)	300 (100)	300 (100)	289 (96,3)	264 (88,0)	229 (76,3)	157 (52,3)	97 (32,3)	1.636	
IB15	5 (1,7)	300 (100)	290 (96,7)	284 (94,7)	260 (86,7)	228 (76,0)	138 (46,0)	74 (24,7)	1.574	7 (2,3)	-	300 (100)	291 (97,0)	281 (93,7)	236 (78,7)	145 (48,3)	83 (27,7)	1.636	
IB16	3 (1,0)	300 (100)	298 (99,3)	290 (96,7)	284 (94,7)	253 (84,3)	179 (59,7)	126 (42,0)	1.730	4 (1,3)	-	300 (100)	300 (100)	296 (98,7)	263 (87,7)	184 (61,3)	135 (45,0)	1.778	
IB17	3 (1,0)	163 (54,3)	104 (34,3)	93 (31,0)	42 (14,0)	42 (14,0)	17 (5,7)	9 (3,0)	470	6 (2,0)	184 (61,3)	117 (39,0)	100 (33,3)	63 (21,0)	52 (17,3)	24 (8,0)	15 (5,0)	555	
IB18	3 (1,0)	143 (47,7)	132 (44,0)	125 (41,7)	98 (32,7)	73 (24,3)	59 (19,7)	34 (11,3)	664	3 (1,0)	183 (61,0)	158 (52,7)	134 (44,7)	103 (34,3)	94 (31,3)	64 (21,3)	48 (16,0)	784	
IB19	4 (1,3)	297 (99,0)	294 (98,0)	285 (95,0)	265 (88,3)	235 (78,3)	174 (58,0)	96 (32,0)	1.646	5 (1,7)	300 (100)	300 (100)	295 (98,3)	273 (91,0)	257 (85,7)	190 (63,3)	104 (34,7)	1.719	
S265	7 (2,3)	300 (100)	297 (99,0)	292 (97,3)	270 (90,0)	241 (80,3)	170 (56,7)	113 (37,7)	1.683	9 (3,0)	-	300 (100)	300 (100)	286 (95,3)	252 (84,0)	184 (61,3)	117 (39,0)	1.739	
S323	5 (1,7)	300 (100)	290 (96,7)	275 (91,7)	249 (83,0)	208 (69,3)	120 (40,0)	74 (24,7)	1.516	6 (2,0)	-	300 (100)	286 (95,3)	251 (83,7)	214 (71,3)	129 (43,0)	80 (26,7)	1.560	
S579	5 (1,7)	120 (40,0)	92 (30,7)	72 (24,0)	43 (14,3)	36 (12,0)	17 (5,7)	5 (1,7)	385	7 (2,3)	146 (48,7)	112 (37,3)	93 (31,0)	53 (17,7)	39 (13,0)	20 (6,7)	12 (4,0)	475	
S580	3 (1,0)	290 (96,7)	288 (96,0)	266 (88,7)	230 (76,7)	190 (63,3)	120 (40,0)	82 (27,3)	1.466	4 (1,3)	300 (100)	300 (100)	283 (94,3)	246 (82,0)	210 (70,0)	130 (43,3)	87 (29,0)	1.556	
S594	7 (2,3)	300 (100)	295 (98,3)	280 (93,3)	236 (78,3)	169 (56,3)	76 (25,3)	30 (10,0)	1.386	7 (2,3)	-	300 (100)	293 (97,7)	241 (80,3)	176 (58,7)	84 (28,0)	40 (13,3)	1.434	
S662	3 (1,0)	292 (97,3)	280 (93,3)	238 (79,3)	199 (66,3)	143 (47,7)	67 (22,3)	35 (11,7)	1.254	8 (2,7)	300 (100)	300 (100)	251 (83,7)	212 (70,7)	157 (52,3)	89 (29,7)	43 (14,3)	1.352	
S841	4 (1,3)	293 (97,7)	275 (91,7)	257 (85,7)	203 (67,7)	149 (49,7)	73 (24,3)	40 (13,3)	1.290	5 (1,7)	300 (100)	295 (98,0)	265 (88,3)	210 (70,0)	161 (53,7)	78 (26,0)	52 (17,3)	1.361	
S1116	6 (2,0)	300 (100)	299 (99,7)	291 (97,0)	282 (94,0)	248 (82,7)	168 (56,0)	117 (39,0)	1.705	6 (2,0)	-	300 (100)	300 (100)	294 (98,0)	264 (88,0)	175 (58,3)	134 (44,7)	1.767	
2362	3 (1,0)	292 (97,3)	280 (93,3)	238 (79,3)	199 (66,3)	143 (47,7)	67 (22,3)	35 (11,7)	1.254	4 (1,3)	300 (100)	300 (100)	256 (85,3)	213 (71,0)	154 (51,3)	75 (25,0)	39 (13,0)	1.337	
TOTAL									27.661										29.441

C = controle
ppm = parte por milhão
() = percentual de larvas mortas
- = 100% de mortalidade na leitura anterior

Considerando o número de larvas mortas em valores não cumulativos nos dois horários de leitura, excluindo o grupo controle, 44.100 larvas foram testadas para cada uma das espécies-alvo e o maior índice de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas. Nos bioensaios com *A. darlingi* foram obtidos 21.086 (47,81%) larvas mortas em 24 horas e 1.609 (3,65%) larvas mortas em 48 horas, nos experimentos com *C. quinquefasciatus* obteve-se 27.661 (62,72%) e 1.780 (4,04%) larvas mortas em 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 5).

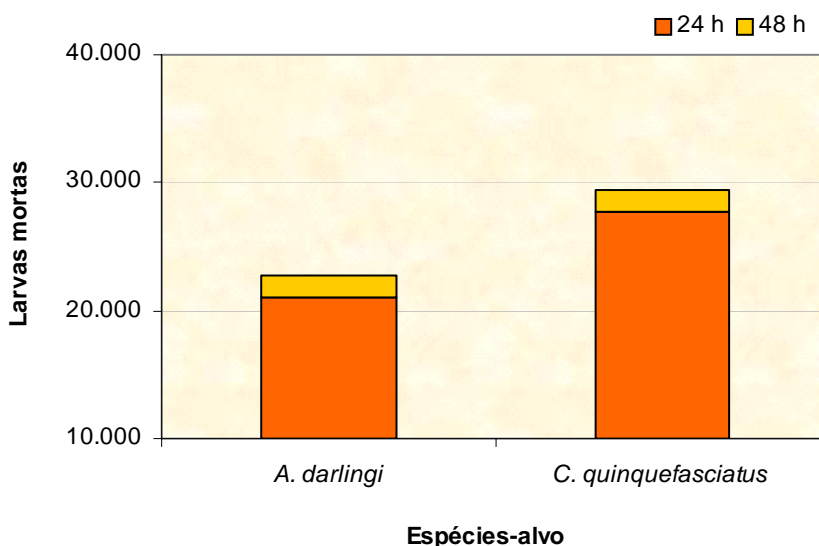


Figura 5. Larvas mortas nos bioensaios com *Bacillus sphaericus* em 24 e 48 horas de contato, em valores cumulativos por espécie-alvo.

O desempenho de cada isolado, em valores não cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas está representado na Figura 6. Cerca de 90% da mortalidade das larvas ocorreu em 24 horas e entre os isolados observou-se maior susceptibilidade nas larvas de *C. quinquefasciatus*, exceto nos bioensaios com *B. sphaericus* IB17 e S579 onde maior susceptibilidade foi constatada em larvas de *A. darlingi*.

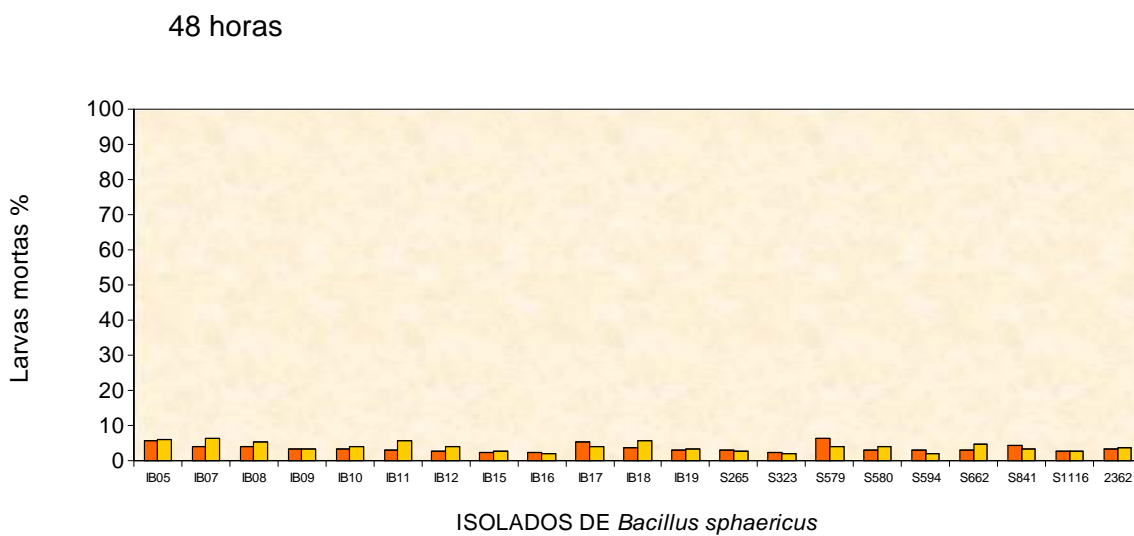
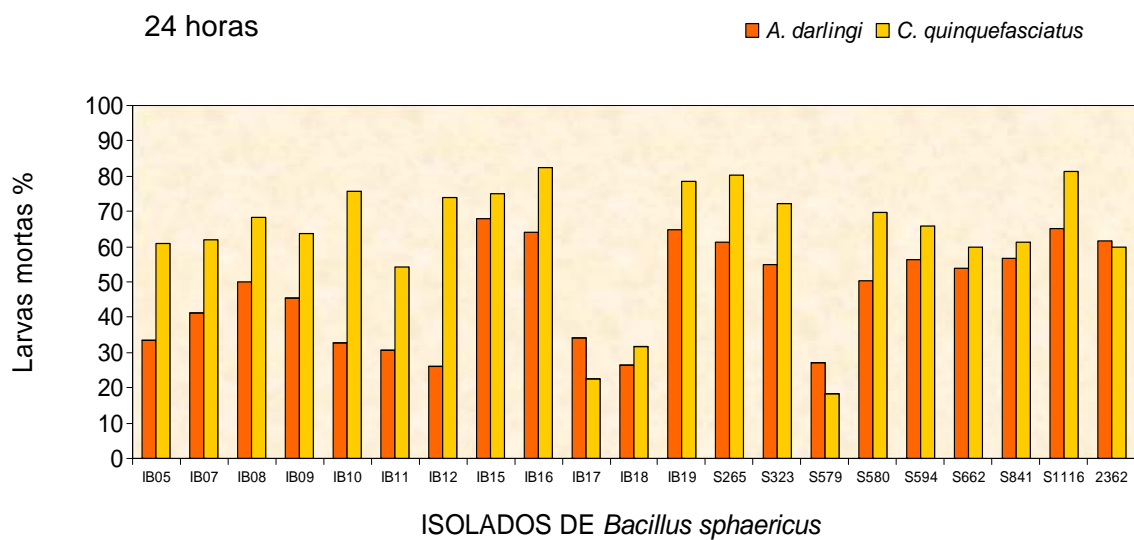


Figura 6. Larvas mortas de *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus* observadas nos bioensaios com *Bacillus sphaericus* em valores não cumulativos nos intervalos de 24 e 48 horas.

A hipótese de variações na efetividade dos isolados de *B. sphaericus* quanto à mortalidade das larvas em diferentes intervalos de leitura foram examinadas estatisticamente por meio da ANOVA, obtendo-se para a leitura de 24 horas, $F = 316,47$ ($P < 0,001$) e para 48 horas, $F = 299,58$ ($P < 0,001$). Como os valores de F foram altamente significativos, rejeitando a hipótese de homogeneidade nos resultados analisados, procedeu-se à aplicação do teste de Tukey para comparação entre as médias de mortalidade das larvas de *A. darlingi* e *C. quinquefasciatus*, nos bioensaios com *B. sphaericus*, Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Os percentuais de mortalidade nas larvas de *A. darlingi* nos três bioensaios com *B. sphaericus* em 24 horas (Tabela 4), apontaram os isolados IB15, S1116 e IB19 ($\bar{X} = 65,8\%$) como os mais eficazes nos bioensaios com *A. darlingi* e os isolados IB16, S265, S1116, IB10, IB15, IB12, S594, IB19, S580 e IB08 ($\bar{X} = 74,4\%$) foram os mais eficientes nos testes com *C. quinquefasciatus* quando comparados com os resultados da estirpe padrão 2362 ($\bar{X} = 61,6\%$) em valores estatisticamente significativos a 95% de probabilidade. As estirpes com menor efetividade foram S579, IB18 e IB12, com mortalidade média de 26,5% nos bioensaios com *A. darlingi* e os isolados IB18, IB17 e S579 ($\bar{X} = 24,1\%$), nos testes com *C. quinquefasciatus*.

Em 48 horas (Tabela 5), destacaram-se com maior efetividade os isolados IB15, IB19 e S1116 ($\bar{X} = 69,0\%$) e os isolados S579, IB11, IB18 e IB12 com menor percentual de mortalidade ($\bar{X} = 31,6\%$) nos testes com *A. darlingi*. Nos experimentos com *C. quinquefasciatus*, os maiores percentuais de mortalidade foram obtidos com os isolados IB16, S1116, S265 e IB10 ($X = 82,8\%$) e os menores com IB18, IB17 e S579 ($\bar{X} = 27,8\%$).

Tabela 4. Mortalidade média das larvas de *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus* em três bioensaios com *Bacillus sphaericus* após 24 horas de contato.

MORTALIDADE %			
ESTIRPE	<i>A. darlingi</i>	ESTIRPE	<i>C. quinquefasciatus</i>
IB15	67,42 ± 1,98 a CD	IB16	82,38 ± 1,90 a A
S1116	65,04 ± 0,46 a CD	S265	80,14 ± 1,00 a AB
IB19	64,95 ± 0,22 a CD	S1116	76,86 ± 8,67 a AB
IB16	64,00 ± 0,50 ab CD	IB10	75,86 ± 0,93 ab AB
S265	61,19 ± 0,46 b D	IB15	74,95 ± 3,41 b B
S841	56,57 ± 0,14 c E	IB12	73,81 ± 0,42 b B
S594	56,37 ± 1,30 c E	S594	72,19 ± 2,49 bc BC
S323	55,09 ± 1,05 c E	IB19	70,24 ± 1,54 bc BC
S662	53,81 ± 1,11 c E	S580	69,81 ± 1,41 bc BC
S589	50,47 ± 1,41 d EF	IB08	68,24 ± 0,58 c C
IB08	49,80 ± 2,11 d EF	S323	66,00 ± 0,50 cd CD
IB09	45,52 ± 0,22 e F	IB09	63,76 ± 1,20 cd CD
IB07	41,04 ± 1,15 f F	IB07	62,14 ± 1,68 d D
IB17	34,04 ± 1,05 g G	S841	61,43 ± 0,50 d D
IB05	33,28 ± 0,57 g G	IB05	61,00 ± 1,31 d D
IB10	32,62 ± 1,30 gh G	S662	59,72 ± 1,41 d D
IB11	30,60 ± 0,54 h GH	IB11	54,14 ± 1,40 e E
S579	27,28 ± 1,25 i H	IB18	31,62 ± 3,25 f G
IB18	26,33 ± 0,95 i H	IB17	22,38 ± 0,46 g H
IB12	25,90 ± 0,86 i H	S579	18,33 ± 1,72 g H
2362	61,66 ± 0,30 b D	2362	59,72 ± 2,35 d D
Controle	1,19 ± 0,43 g I	Controle	1,70 ± 0,40 g I

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Teste Tukey) ($P > 0,05$). Letras maiúsculas, comparações entre as médias nas colunas. Letras minúsculas, comparações entre médias nas linhas.

Tabela 5. Mortalidade média das larvas de *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus* em três bioensaios com *Bacillus sphaericus* após 48 horas de contato.

MORTALIDADE %			
ESTIRPE	<i>A. darlingi</i>	ESTIRPE	<i>C. quinquefasciatus</i>
IB15	70,71 ± 1,51 a BC	IB16	84,67 ± 1,80 a A
IB19	68,19 ± 1,25 ab C	S1116	83,72 ± 1,45 ab A
S1116	68,14 ± 1,75 ab C	S265	82,81 ± 2,80 ab A
IB16	66,33 ± 1,51 ab CD	IB10	80,00 ± 0,51 ab AB
S265	64,38 ± 1,68 b CD	IB15	77,90 ± 0,22 b B
S841	60,95 ± 1,08 bc CD	IB12	77,90 ± 0,73 b B
S594	59,67 ± 2,41 bc D	IB19	78,38 ± 1,03 b B
S323	58,71 ± 5,15 bc D	S323	74,29 ± 0,85 bc BC
S662	56,90 ± 1,66 c D	S580	74,09 ± 3,43 bc BC
IB08	54,00 ± 0,94 cd DE	IB08	73,76 ± 1,36 c BC
S589	53,62 ± 1,43 cd DE	IB07	68,57 ± 1,21 cd C
IB09	48,76 ± 0,91 d E	S594	68,29 ± 0,14 cd C
IB07	45,10 ± 1,30 de E	IB05	67,33 ± 2,08 cd C
IB17	39,47 ± 1,66 e EF	IB09	67,24 ± 0,79 cd C
IB05	39,10 ± 1,56 e EF	S841	64,81 ± 0,87 d CD
IB10	36,05 ± 1,36 e F	S662	64,38 ± 1,46 d CD
S579	33,86 ± 2,62 ef F	IB11	59,90 ± 2,70 d D
IB11	33,72 ± 0,62 ef F	IB18	37,33 ± 1,05 e EF
IB18	30,19 ± 1,03 f FG	IB17	26,43 ± 1,75 f GH
IB12	28,76 ± 1,92 f G	S579	22,57 ± 1,08 f H
2362	65,09 ± 1,46 ab CD	2362	63,66 ± 0,93 d CD
Controle	1,26 ± 0,58 g I	Controle	1,75 ± 0,58 g I

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Teste Tukey) (P>0,05). Letras maiúsculas, comparações entre as médias nas colunas. Letras minúsculas, comparações entre médias nas linhas.

I.4.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA

Os resultados nos bioensaios com *A. darlingi* (Tabela 6) e com *C. quinquefasciatus* (Tabela 7) adequaram-se à análise de regressão linear e ao modelo Probit, pois atenderam aos requisitos que exigem valor do teste t para o coeficiente angular superior, em módulo, a 1,96 (significativo a 5% de probabilidade) e χ^2 calculado menor que χ^2 Tabelado (11,071 – 0,05 e 5 graus de liberdade) (HADDAD 1998).

Quanto à concentração letal mediana para controle de *A. darlingi* (Tabela 6), maior efetividade foi observada com *B. sphaericus* IB15 (0,040ppm), S1116 e IB19 (0,048ppm), IB16 (0,052ppm) e S265 (0,057ppm), porém sem diferença estatisticamente significativa a 0,05 com o resultado da estirpe 2362 (0,057ppm). Menor efeito foi verificado com IB18 (0,864ppm), IB12 (0,617ppm) e S579 (0,524ppm).

Na Tabela 7 constam os resultados da CL50 nos bioensaios com *C. quinquefasciatus*. Os isolados IB16 (0,014ppm), S1116 (0,016ppm), S265, (0,017ppm) IB10 (0,018ppm), IB19 (0,018ppm), IB12 (0,024ppm) e IB15 (0,025ppm) foram os mais efetivos contra essa espécie de mosquito. Obteve-se CL50 de 0,065ppm com a estirpe padrão 2362. Os isolados S579 (1,89ppm), IB17 (0,96ppm) e IB18 (0,95ppm) mostraram menor toxicidade.

Tabela 6. Concentração letal mediana (CL50) de *Bacillus sphaericus* em larvas de *Anopheles darlingi*.

ESTIRPE	CL50 ppm	INTERVALO DE CONFIANÇA (0,05)	HOMOLOGIA	COEFICIENTE ANGULAR	χ^2+
IB15	0,040	0,034 – 0,047	A	1,771 ± 0,07	6,487
IB19	0,048	0,039 – 0,057	AB	1,637 ± 0,06	8,535
S1116	0,048	0,040 – 0,069	AB	1,627 ± 0,06	6,642
IB16	0,052	0,045 – 0,060	AB	1,695 ± 0,07	5,413
S265	0,057	0,051 – 0,064	B	1,404 ± 0,06	2,574
S594	0,079	0,071 – 0,087	C	1,536 ± 0,06	1,325
S841	0,082	0,074 – 0,089	C	1,984 ± 0,08	1,995
S323	0,094	0,079 – 0,109	CD	2,410 ± 0,13	7,516
S662	0,101	0,085 – 0,116	CD	2,033 ± 0,10	5,991
S589	0,118	0,106 – 0,130	D	1,948 ± 0,09	4,048
IB08	0,120	0,096 – 0,147	D	1,454 ± 0,07	8,470
IB09	0,149	0,135 – 0,164	DE	1,625 ± 0,06	3,493
IB07	0,197	0,179 – 0,218	E	1,704 ± 0,08	1,554
IB17	0,320	0,282 – 0,365	F	1,278 ± 0,06	1,450
IB05	0,354	0,311 – 0,405	FG	1,360 ± 0,08	1,439
IB10	0,401	0,342 – 0,478	FG	1,000 ± 0,05	4,384
IB11	0,463	0,393 – 0,556	G	1,031 ± 0,06	4,512
S579	0,524	0,453 – 0,616	GH	1,223 ± 0,07	3,222
IB12	0,617	0,527 – 0,737	GH	1,208 ± 0,08	2,139
IB18	0,864	0,625 – 1,312	H	0,858 ± 0,06	5,712
2362	0,057	0,047 – 0,069	AB	1,480 ± 0,06	8,084

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

+ Valor de χ^2 não significativo ($P > 0,05$) (χ^2 calculado $< \chi^2$ Tabelado).

Tabela 7. Concentração letal mediana (CL50) de *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.

ESTIRPE	CL50 ppm	INTERVALO DE CONFIANÇA (0,05)	HOMOLOGIA	COEFICIENTE ANGULAR	χ^2+
IB16	0,014	0,012 – 0,016	A	1,588 ± 0,08	3,023
S1116	0,016	0,014 – 0,018	A	1,680 ± 0,08	2,548
S265	0,017	0,014 – 0,019	A	1,576 ± 0,08	1,851
IB10	0,018	0,014 – 0,021	AB	1,117 ± 0,06	1,887
IB19	0,018	0,014 – 0,022	AB	1,441 ± 0,07	6,297
IB12	0,024	0,021 – 0,028	B	1,360 ± 0,06	2,332
IB15	0,025	0,020 – 0,030	B	1,616 ± 0,07	7,945
S323	0,030	0,026 – 0,033	B	1,561 ± 0,07	3,470
S662	0,028	0,025 – 0,031	B	1,583 ± 0,06	2,026
S589	0,032	0,027 – 0,036	B	1,309 ± 0,06	3,348
IB08	0,038	0,034 – 0,042	B	1,559 ± 0,06	1,992
S594	0,049	0,044 – 0,053	C	2,060 ± 0,08	2,552
IB07	0,052	0,044 – 0,059	C	1,130 ± 0,05	1,527
IB09	0,052	0,046 – 0,059	C	1,835 ± 0,07	5,681
IB05	0,053	0,046 – 0,060	C	1,114 ± 0,05	4,022
S841	0,059	0,053 – 0,066	C	1,557 ± 0,06	1,984
IB11	0,084	0,073 – 0,097	D	1,012 ± 0,05	1,141
IB18	0,952	0,584 – 1,930	E	0,568 ± 0,05	6,209
IB17	0,960	0,670 – 1,605	E	1,046 ± 0,08	9,570
S579	1,899	1,387 – 2,850	E	0,895 ± 0,07	4,926
2362	0,065	0,059 – 0,072	C	1,564 ± 0,07	2,984

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

+ Valor de χ^2 não significativo ($P > 0,05$) (χ^2 calculado $< \chi^2$ Tabelado).

I.4.4 POTÊNCIA RELATIVA

A potência dos isolados de *B. sphaericus* estimada em relação à estirpe 2362 está representada na Tabela 8. Com *A. darlingi* quatro isolados apresentaram atividade superior à estirpe padrão: IB15 (1,515) cerca de 50%, S1116 (1,244) e IB19 (1,238) 24% e IB16 15% (1,156). Nos bioensaios contra *C. quinquefasciatus*, maior potência em relação a padrão foi verificada em 17 isolados, sendo IB16 (4,75), S1116 (4,231), S265 (3,878), IB19 (3,435) cerca de três a quatro vezes superiores.

Os isolados IB15, IB19 e S1116 foram comparados em grau de virulência com a estirpe padrão 2362 em testes de igualdade e paralelismo entre as retas de regressão linear (Tabela 9). Quanto aos testes de igualdade entre os coeficientes angulares e lineares, os três isolados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação a 2362.

Graficamente, comparações entre os isolados IB15, IB19 e S1116 com a estirpe 2362 e entre cada uma estão representadas na Figura 7, cujos valores de probit observado e esperado constam na Tabela 10. As retas paralelas confirmam a semelhança qualitativa entre a dose efetiva das estirpes, porém quantitativamente distintas. Os isolados IB15, IB16 e S1116 mostraram-se mais eficazes que a estirpe padrão 2362 (Figura 7A,C,E). IB15 foi, ainda, mais efetiva que IB19 e S1116 (Figura 7B,F) e, estes dois últimos, apresentaram a mesma toxicidade confirmada nas retas coincidentes (Figura 7D).

Tabela 8. Potência de isolados de *Bacillus sphaericus* da Amazônia em relação à estirpe padrão 2362.

ESTIRPE	POTÊNCIA RELATIVA		
	<i>A. darlingi</i>	ESTIRPE	<i>C. quinquefasciatus</i>
IB15	1,515 (1,207 - 1,906) aC	IB16	4,750 (4,081 - 5,553) aA
S1116	1,244 (1,024 - 1,512) aC	S1116	4,231 (3,648 - 4,925) aA
IB19	1,238 (1,008 - 1,523) aC	S265	3,878 (3,339 - 4,519) aA
IB16	1,156 (0,942 - 1,420) aD	IB19	3,435 (2,891 - 4,102) abAB
S265	0,980 (0,829 - 1,160) abD	IB10	2,910 (2,108 - 4,083) abAB
S841	0,756 (0,570 - 1,000) bD	IB15	2,640 (2,289 - 3,052) bB
S594	0,737 (0,640 - 0,849) bD	IB12	2,484 (2,093 - 2,957) bB
S323	0,690 (0,465 - 1,020) abcCDE	S662	2,368 (2,056 - 2,732) bB
S662	0,620 (0,461 - 0,831) bcDE	S323	2,185 (1,895 - 2,524) bcBC
S589	0,519 (0,395 - 0,679) bcE	S589	1,891 (1,538 - 2,333) bcBC
IB08	0,477 (0,390 - 0,582) bcE	IB08	1,711 (1,488 - 1,970) cC
IB09	0,391 (0,326 - 0,466) cE	S594	1,453 (1,143 - 1,849) cC
IB07	0,296 (0,245 - 0,356) cE	IB09	1,303 (1,087 - 1,564) cC
IB17	0,182 (0,147 - 0,223) dF	IB07	1,110 (0,812 - 1,521) cdCD
IB05	0,164 (0,136 - 0,195) dF	S841	1,100 (0,957 - 1,263) dD
IB10	0,156 (0,099 - 0,233) deF	IB05	1,081 (0,767 - 1,526) cdCD
IB11	0,137 (0,089 - 0,202) deF	IB11	0,690 (0,454 - 1,038) dD
S579	0,116 (0,089 - 0,149) deF	IB18	0,130 (0,037 - 0,327) eE
IB12	0,101 (0,077 - 0,129) eFG	IB17	0,088 (0,056 - 0,130) deF
IB18	0,091 (0,048 - 0,154) deFG	S579	0,060 (0,033 - 0,099) eG

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

Tabela 9. Resultado dos testes de paralelismo e igualdade entre três isolados de *B. sphaericus* em relação à estirpe padrão 2362.

ESTIRPE	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO	IGUALDADE		PARALELISMO	
		χ^2 (gl 2)	P	χ^2 (gl 1)	P
IB15	$y = 7,466 + 1,771 * \log x$	44,99	0,000*	10,26	0,051
IB19	$y = 7,157 + 1,637 * \log x$	12,06	0,002*	3,14	0,076
S1116	$y = 7,148 + 1,627 * \log x$	12,02	0,002*	2,77	0,096

*Estatisticamente significativo (P < 0,01).

Tabela 10. Valores de probit esperado e observado obtidos nos bioensaios da atividade de *Bacillus sphaericus* em *Anopheles darlingi*.

DOSE (ppm)	IB15		IB19		S1116		2362	
	ESPERADO	OBSERVADO	ESPERADO	OBSERVADO	ESPERADO	OBSERVADO	ESPERADO	OBSERVADO
0,01	4,31	3,96	4,12	4,03	3,89	4,00	3,85	3,96
0,02	4,67	4,53	4,67	4,44	4,49	4,44	4,34	4,39
0,06	5,30	5,23	5,16	5,09	5,16	5,13	4,82	5,07
0,12	5,83	5,91	5,65	5,60	5,65	5,65	5,35	5,32
0,25	6,38	6,45	6,17	6,11	6,17	6,09	5,82	5,98
0,50	6,93	6,75	6,66	6,75	6,66	6,64	6,33	6,4
1,00	7,47	8,72	7,16	8,72	7,15	8,72	6,84	7,12

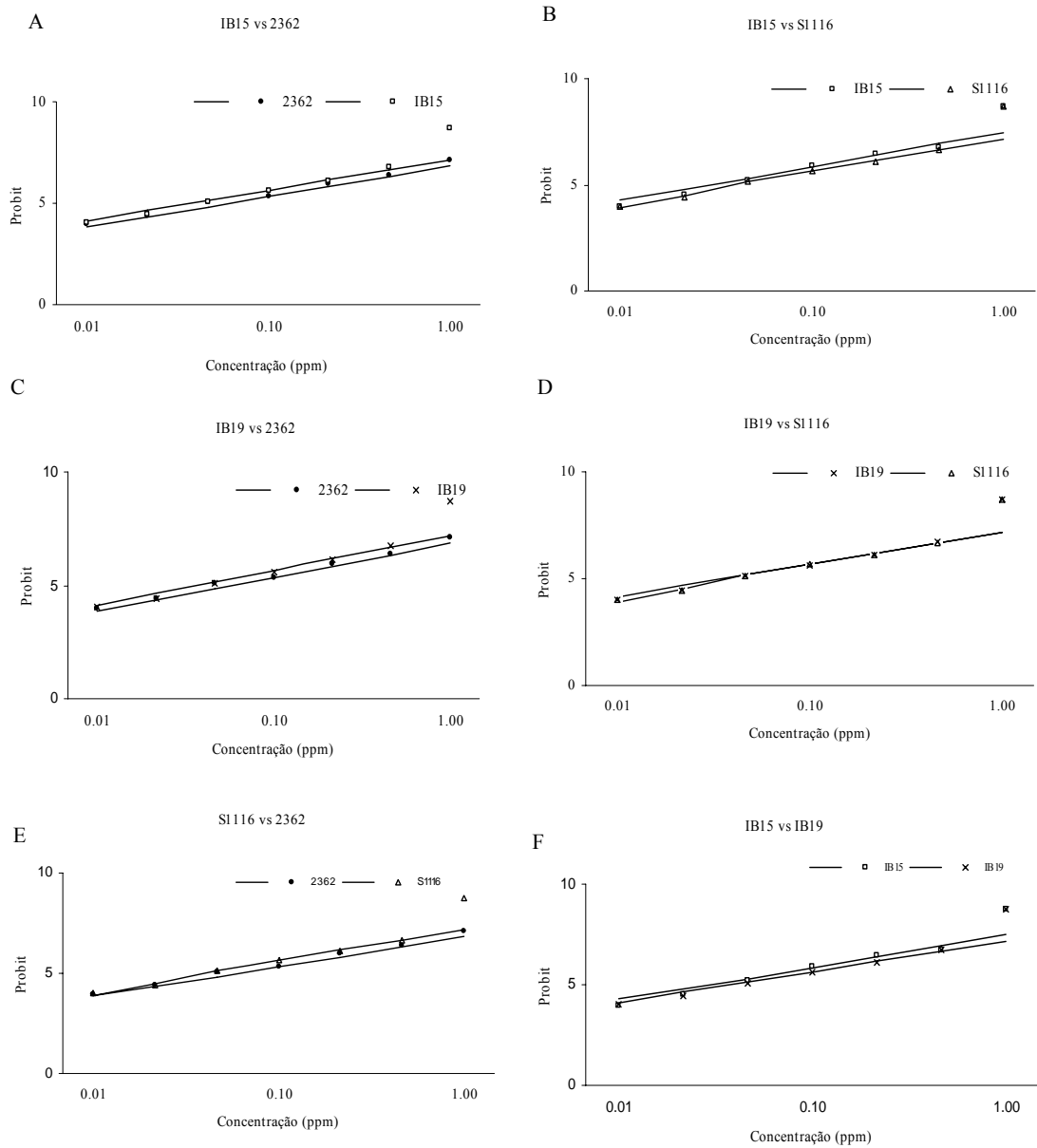


Figura 7. Regressão linear dose-probit da mortalidade das larvas de *Anopheles darlingi* nos bioensaios com *Bacillus sphaericus* IB15, IB19, S1116 e 2362. (reta: probit calculado, pontos: probit observado).

I.5 DISCUSSÃO

O uso intensivo de produtos químicos para controle de insetos ao longo dos anos evidencia o impacto negativo desse método, principalmente nos sérios danos ao meio ambiente e surgimento de resistência em populações de mosquitos (PIMENTAL 1992). Em contrapartida, o emprego de bactérias entomopatogênicas vem consolidando-se como adjuvante em métodos integrados no controle de vetores (BECKER 1997, HABIB & ANDRADE 1986, TADEI & RODRIGUES 1998).

I.5.1 ATIVIDADE LARVICIDA

Os resultados obtidos nos bioensaios com *B. sphaericus* da Amazônia apontaram maior efeito nas primeiras 24 horas, tanto nas larvas de *A. darlingi* como em *C. quinquefasciatus*, com registro médio de 90% da mortalidade total.

Em larvas aquáticas a rápida mortalidade, entre vinte minutos a três horas, nas espécies mais susceptíveis ao bacilo deve-se, em grande parte, ao colapso no sistema nervoso culminando com paralisia muscular, levando à perda da capacidade de flutuação e a asfixia acaba sendo a principal causa de morte, do que propriamente os efeitos da sucessiva destruição tecidual (HABIB 1983).

Durante a realização de bioensaios devem ser adotados critérios rigorosos que permitam conclusões confiáveis sobre a toxicidade do isolado. HABIB & ANDRADE (1998) salientam a sensibilidade natural entre os estádios larvais como um dos fatores de grande influência nos resultados.

A susceptibilidade intra-específica em larvas de mosquito às bactérias entomopatogênicas é atribuída a diversos fatores como: tempo do desenvolvimento larval, a condição nutricional e a atividade alimentar (LACEY & SINGER 1982,

BHUMIRATANA 1990). De acordo com MULLA (1990), larvas de 2º estágio no gênero *Anopheles* são até cinco vezes mais sensíveis ao bacilo que larvas de 4º estágio. Em *Anopheles* sp. RODRIGUES (1996) verificou menor susceptibilidade em *A. nuneztovari*, seguida por *A. darlingi* com diferença de até duas vezes para *A. braziliensis* em testes com larvas de terceiro estágio tratadas com 2362. Portanto, larvas entre o 3º e início de 4º estágios são consideradas ideais em bioensaios de atividade larvicida, para espécies de *Anopheles*.

Neste trabalho, verificou-se atividade larvicida em todos os vinte isolados testados, porém em níveis diferenciados de toxicidade nas duas espécies-alvo. Nos testes com *A. darlingi* apenas IB15 mostrou alta toxicidade (superior a 70%), doze isolados apresentaram média toxicidade (30 e 70%) e sete com baixa toxicidade (inferior a 30%). Em *C. quinquefasciatus* dez isolados apresentaram alta toxicidade, sete com toxicidade média e três com baixa toxicidade.

C. quinquefasciatus foi o mais susceptível atingindo 66,76%, contra 51,46% em testes com *A. darlingi*. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores que apontaram grande susceptibilidade de *Culex* sp. ao *B. sphaericus* (SINGER 1980, YOSTEN 1984, MULLA *et al.* 1986). O isolado IB16 foi o de maior percentual em *C. quinquefasciatus* (84,67%) e IB15 em *A. darlingi* (70,13%). Não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados de *B. sphaericus* 2362 nas duas espécies-alvo.

MONNERAT *et al.* (2004) selecionaram 246 estirpes nas diversas regiões do Brasil e nos testes de patogenicidade 87 causaram mortalidade superior a 50% em *C. quinquefasciatus*, sendo 18 com ação também em *A. aegypti*.

Segundo DAVIDSON (1989) a ação da toxina em insetos poderia ser explicada pela afinidade entre determinadas espécies e as toxinas. Essa suposição foi confirmada por NIELSEN-LEROUX & CHARLES (1992) com a descrição de receptores de membrana

presentes no epitélio intestinal de *C. quinquefasciatus*. SILVA-FILHA *et al.* (1997) verificaram ausência desses receptores em *A. aegypti*. Os receptores de membrana e a interação com a toxina contribuem para elucidar o modo de ação do bacilo e os mecanismos de resistência em mosquitos. Assim, a ausência de receptor de membrana no epitélio intestinal poderá causar menor eficiência das toxinas do bacilo.

I.5.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA

Os testes de patogenicidade entre novos isolados são requisitos fundamentais na seleção estirpes promissoras para produção de biolarvicidas e estimativa de virulência em produtos comerciais. De acordo com BECKER (2003), a eficácia avaliada por bioensaios em laboratório permite determinar a dose mínima efetiva do bacilo, um parâmetro para posterior uso em campo.

Nos ensaios realizados com larvas de *C. quinquefasciatus* onze isolados, com CL50 entre 0,014 e 0,038 ppm, foram significativamente mais eficientes em relação aos resultados obtidos com 2362 (0,065 ppm). Em bioensaios com *A. darlingi* apenas o isolado IB15 (0,040 ppm) foi mais efetivo que a estirpe padrão 2362 (0,057 ppm).

Resultados semelhantes foram descritos em LACEY & SINGER (1982) nos testes com *B. sphaericus* 2013-4 e 2013-6. Esses autores obtiveram CL50 igual a 0,0187 e 0,0168 ppm em larvas de *A. albimanus* e CL50 igual a 0,0527 e 0,0558 ppm em *A. quadrimaculatus*.

I.5.3 POTÊNCIA RELATIVA

Entre as duas espécies-alvo, dezesseis isolados apresentaram potência superior em comparação com a estirpe 2362. Nos bioensaios com *A. darlingi* *B. sphaericus* IB15 foi 50% mais efetivo que a padrão, seguido por S1116 e IB19 cerca de 20% superiores. Em

larvas de *C. quinquefasciatus* os isolados IB16, S1116, S265 e IB19 foram de duas a quatro vezes mais potentes.

RODRIGUES *et al.* (1998) apontaram as estirpes S20, S46, S2 e S4 com potência entre quatro e cinco vezes maiores em relação a 2362, em bioensaios com *A. nuneztovari* e *A. darlingi*. Ainda em *A. nuneztovari* LITAIFF *et al.* (2000) obtiveram quatro isolados mais potentes que a estirpe padrão, sendo S14 seis vezes mais potente.

No Brasil, diversos isolados provenientes de todas as regiões do país têm mostrado grande potencial para uso em biolarvicidas, porém, devido a diferenças na metodologia empregada nos bioensaios, os resultados não podem ser comparados com o presente trabalho (SILVA *et al.* 2002, LITAIFF 2002).

A partir dos resultados de CL50, o isolado IB15 foi comparado com a estirpe 2362. Analisando as retas de Probit verificou-se que os isolados formaram retas paralelas entre si, indicando que são qualitativamente idênticas, mas quantitativamente diferentes, ou seja, é necessária menor dose de IB15 para matar 50% da população-alvo. Portanto, *B. sphaericus* IB15 foi selecionado para ensaios de crescimento microbiano (Capítulo III).

Os estudos realizados apontam isolados da Amazônia com grande potencial no controle de mosquitos vetores de doenças, sendo uma alternativa e/ou ação complementar nas estratégias de controle na região.

CAPÍTULO II. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO NA ANÁLISE DA TOXICIDADE EM ESTIRPES DE *Bacillus sphaericus* DA AMAZÔNIA

II.1 INTRODUÇÃO

Algumas estirpes do *B. sphaericus* possuem atividade entomopatogênica e vêm sendo empregados no controle de mosquitos vetores de doenças, nos programas de saúde pública (BECKER 1997, TADEI *et al.* 2002).

A atividade entomopatogênica dessa espécie de bactéria é devida à ação de uma toxina binária, composta por duas proteínas homólogas BinA (42kDa) e BinB (51kDa). A toxina binária é produzida no início da fase de esporulação e forma um cristal protéico com as subunidades de 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB). Além da toxina binária, algumas estirpes produzem toxinas mosquitocidas, também chamadas de MTX. Essas, por sua vez, são sintetizadas durante a fase exponencial do crescimento vegetativo (BAUMANN *et al.* 1991, CHARLES *et al.* 1996).

Há um considerável interesse biotecnológico na prospecção de estirpes tóxicas, com vistas à produção de bioinseticidas. Segundo DIAS (1992) e SILVA *et al.* (2002) as estirpes entomopatogênicas oriundas de locais de ocorrência natural dos vetores, poderiam ser mais bem adaptadas às condições ambientais onde fossem empregadas, além de possibilitar a descoberta de novas toxinas.

Com o aperfeiçoamento dos métodos moleculares de investigação, tem sido possível superar as dificuldades de identificação encontradas nos métodos de análises microscópicas tradicionais, bem como aqueles relacionados com a sensibilidade de diagnóstico em pequenas quantidades de DNA presente nas amostras. Com o surgimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (SAIKI *et al.* 1988) passou a ser possível amplificar milhares de vezes uma molécula-alvo de DNA, em uma reação

enzimática através de sucessivos ciclos.

Os genes *Bin* que codificam as toxinas binárias são altamente conservados entre estirpes nos diferentes sorotipos e grupos fagos (HUMPHREY & BERRY 1998). Segundo PRIEST *et al.* (1997), portanto, a análise de seqüências de nucleotídeos das toxinas inseticidas é importante para entender a importância da relação estrutura-função nas toxinas de *B. sphaericus*.

II.2 OBJETIVOS

- II.2.1 Desenhar oligonucleotídeos específicos para amplificação conjunta dos genes da toxina binária em *B. sphaericus*;
- II.2.2 Diagnosticar, por técnica molecular de PCR, genes da toxina binária e MTX1 em estirpes de *B. sphaericus* da Amazônia;
- II.2.3 Analisar variações nas sequências do gene da toxina binária e a correlação com a toxicidade em estirpes de *B. sphaericus* da Amazônia em larvas de *A. darlingi*.

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades de caracterização molecular foram realizadas no Laboratório de Vetores de Malária e Dengue e o sequenciamento do DNA no Laboratório Temático de Biologia Molecular – INPA.

II.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foram utilizadas vinte estirpes de *B. sphaericus* obtidas de amostras de solos de localidades da Amazônia listadas na Tabela 1. As estirpes foram mantidas em meio NYSM, cuja composição está detalhada no Capítulo III (3.2.1).

Inicialmente, uma alíquota de 50µL da suspensão bacteriana de 10^8 cel.mL⁻¹ foi transferida para frascos *Erlenmeyer* contendo 20mL de caldo NYSM, mantidos por 12 horas a 30°C e agitação constante de 200rpm em incubador rotativo.

O DNA foi extraído conforme OTSUKI *et al.* (1997), com modificações na qual 20mL do caldo de cultura foi centrifugado a 6.000rpm por dois minutos e o precipitado foi utilizado para a extração do DNA.

II.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Ao final da extração, a integridade e concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, conduzida em tampão TBE 0,5X a 100V durante 60 minutos. O gel de agarose foi corado em brometo de etídio ($0,5\mu\text{g.mL}^{-1}$), e analisado em transiluminador sob luz UV, e fotodocumentados em *TLC Documentation* (VILBER LOURMAT) e as imagens geradas com auxílio do programa PhotoCapt MW 11.01.

Após a quantificação do DNA, as amostras foram padronizadas para uma concentração final de 50ng. Por fim, o material foi estocado a -20°C.

II.3.3 DESENHO E ESCOLHA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

A partir do alinhamento de quatro seqüências de *B. sphaericus* disponíveis no *GenBank* foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a toxina binária. As seqüências utilizadas foram: BinB: estirpe 2297 (números de acesso AJ224477 e AJ224478), BinA: estirpe LP1-G (número de acesso Y13320) e estirpe 9002 (número de acesso Y13319). Com auxílio do programa BIOEDIT V. 7.0 (HALL 1999) as seqüências foram alinhadas e foi obtida uma única seqüência consenso. Posteriormente, com auxílio do programa Primer 3 (ROZEN & SKALETSKY 2000) foi realizada uma busca online (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) pelo melhor conjunto de iniciadores.

A ilustração gráfica do posicionamento dos oligonucleotídeos e as seqüências utilizadas estão descritas na Figura 8 para o gene da toxina binária, com tamanho estimado da região amplificada de 1082pb correspondente às regiões codificadoras dos genes BinB e BinA, bem como uma região intergênica, com tamanho de 173pb.

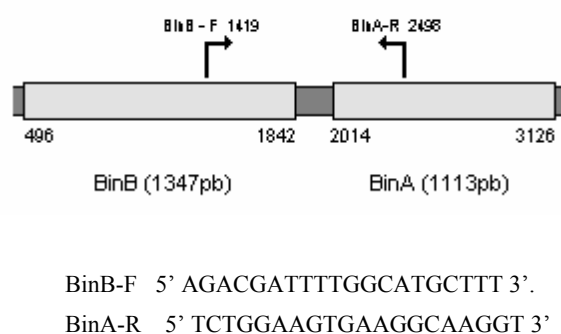


Figura 8. Esquema representativo do posicionamento dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da toxina binária (BinA, BinB).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão TBE 0,5X. A corrente elétrica aplicada foi de 100 V por 1 hora. O gel de agarose foi corado em brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador por incidência de luz UV, e fotodocumentadas em aparelho *TLC Documentation* (VILBER LOURMAT).

Como referência para o cálculo do tamanho dos fragmentos, utilizou-se o marcador de 1Kb *Ladder* (GIBCO/BRL). Após padronização, foram realizadas três ampliações para cada par de oligonucleotídeo com o intuito gerar volume suficiente para proceder à reação de sequenciamento.

II.3.5 REAÇÕES DE PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA* (Amersham Biosciences), antes de serem submetidos ao sequenciamento, seguindo-se as especificações do fabricante.

Uma alíquota de tampão TE foi incubada à temperatura de 70°C. Adicionou-se 28mL de etanol em 11mL do tampão de lavagem (H2). Em seguida, acrescentou-se 400 μL da solução ligante (H1) ao PCR de cada amostra, homogeneizando-se completamente. Colocou-se o cartucho com membrana dentro de um microtubo de 2mL, pôs-se o PCR neste cartucho e centrifugou-se por 1 minuto a 12.000g, descartando a solução do microtubo. O cartucho foi recolocado com a membrana no microtubo de 2mL. A seguir foi adicionado 700 μL de tampão da solução H2 no cartucho com a membrana. Centrifugou-se por 1 minuto a 12.000g, descartando a solução do microtubo, repetindo-se esse procedimento. O cartucho contendo a membrana foi colocado em um outro microtubo de 1,5mL acrescentando-se 50 μL de tampão TE a 70°C, diretamente no centro do cartucho com a membrana. Deixou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se a

12.000g por 2 minutos. O produto da PCR purificado DNA foi estocado a -20°C.

II.3.6 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Após a purificação, procedeu-se ao sequenciamento do DNA utilizando-se o kit *DYEnamic™ ET Terminator* (Amersham Biosciences), com os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação. Cada reação de sequenciamento foi realizada em um volume total de 10µL, correspondente a 4µL do produto de PCR purificado, 2µL da mistura de reagentes do kit *DYEnamic™ ET Terminator*, 1µL do oligonucleotídeo e 3µL de água Milli-Q autoclavada. A reação foi conduzida no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), programado para um perfil de amplificação de 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 80 segundos a 60°C e um ciclo final de cinco minutos a 4°C.

Após a reação, o DNA foi precipitado em tampão de acetato de sódio/EDTA (Acetato de sódio 1,5M pH>8,0 e 250mM EDTA) e etanol 95% conforme recomendações do fabricante e ressuspenso em tampão de formamida. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese por capilaridade em um seqüenciador automático MEGABACE/1000 – DNA *Analysis System* DNA com o perfil de injeção de amostras de 2Kv por 60 segundos e eletroforese de 6Kv por 230 minutos.

II.3.7 ANÁLISES

As seqüências obtidas foram alinhadas com auxílio do programas Sequence Analyser (Amersham Biosciences). O cromatograma obtido foi exportado para o programa BioEdit. A homologia das seqüências (5' e 3') da toxina binária foi averiguada com auxílio da sub-rotina BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) implementada no programa BioEdit. Uma vez checada a homologia das seqüências, cada cromatograma foi editado e o

produto final foi salvo no formato FASTA para posterior alinhamento. O Alinhamento final das sequências foi obtido com auxílio da sub-rotina Clustal X (THOMPSON *et al.* 1998) também disponível no programa BioEdit. O *Input file* foi transferido para o programa MEGA v 3.1 (KUMAR *et al.* 2004), onde foram obtidos o número de sítios conservados e variáveis, as distâncias genéticas e as relações evolutivas entre as estirpes, estimadas através do método de agrupamentos vizinhos (Neighbour-Joining) (SAITOU & NEI 1987), com o emprego do modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros.

Na análise de agrupamentos vizinhos foram incluídas as seqüências do gene da toxina binária das estirpes de *B. sphaericus* 2297, LP1-G e 9002.

II.4 RESULTADOS

II.4.1 TOXICIDADE E AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

O novo par de oligonucleotídeos descrito neste trabalho mostrou-se bastante eficiente (100%) para promover a amplificação conjunta dos genes BinA e BinB. Em todos os isolados amplificados foram obtidos produtos de aproximadamente 1000pb, não tendo sido observado polimorfismos quanto ao tamanho dos fragmentos (Figura 10).

Por outro lado, em relação à toxina MTX1, nem todos os isolados proporcionaram ampliações de DNA. Mais de 70% das estirpes amplificaram com sucesso fragmentos de 700pb (IB07, IB09, IB10, IB11, IB15, IB16, IB18, S265, S323, S579, S594, S662, S841, S1116 e 2362), enquanto que o restante (IB05, IB08, IB12, IB17, IB19 e S589) não o foi, conforme ilustrado na Figura 11.

Analisando-se a toxicidade com a amplificação ou não dos produtos gênicos da toxina binária e mosquitocida MTX1 (Tabela 11), pôde-se observar que não houve nenhuma correlação direta, conforme os dados apresentados.

II.4.2 COMPOSIÇÃO NUCLEOTÍDICA

A composição média dos nucleotídeos obtida no sequenciamento da toxina binária de *B. sphaericus* da Amazônia está listada na Tabela 12. Obteve-se uma proporção média de: 31,4% de timina (T), 31,2% de adenina (A), 18,2% de citosina (c) e 19,2% de guanina (G), sendo verificado uma tendência para A-T a C-G.

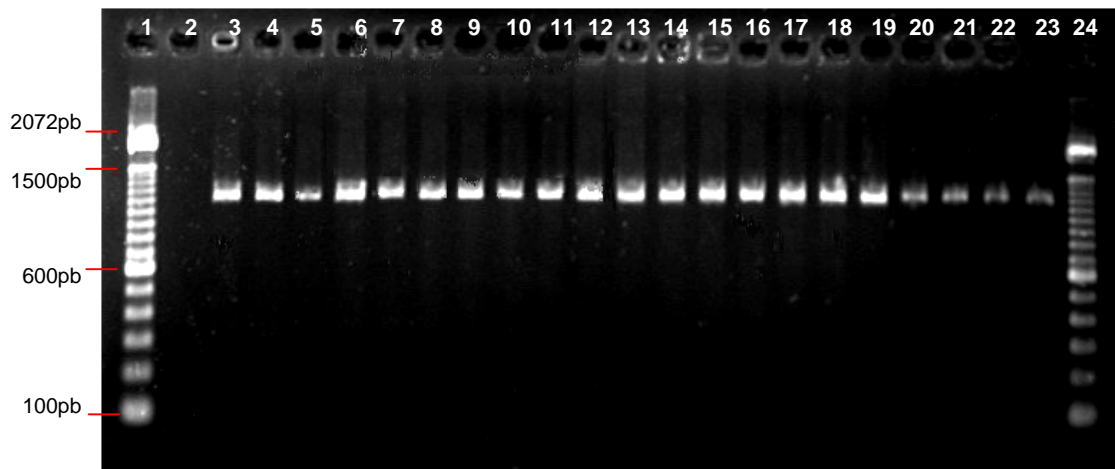


Figura 10. Produto da amplificação do DNA dos genes da toxina binária (BinA e BinB) em estirpes de *B. sphaericus*. 1. Marcador DNA 1kb *Ladder*, 2. controle negativo, 3. controle positivo 2362, 4. IB15, 5. IB16, 6. IB19, 7. S265, 8. S1116, 9. IB07, 10. IB08, 11. IB09, 12. S323, 13. S662, 14. S841, 15. IB10, 16. S589, 17. IB05, 18. IB11, 19. IB18, 20. IB12, 21. IB17, 22. S579. 23. S594. 24. Marcador DNA 1kb *Ladder*.

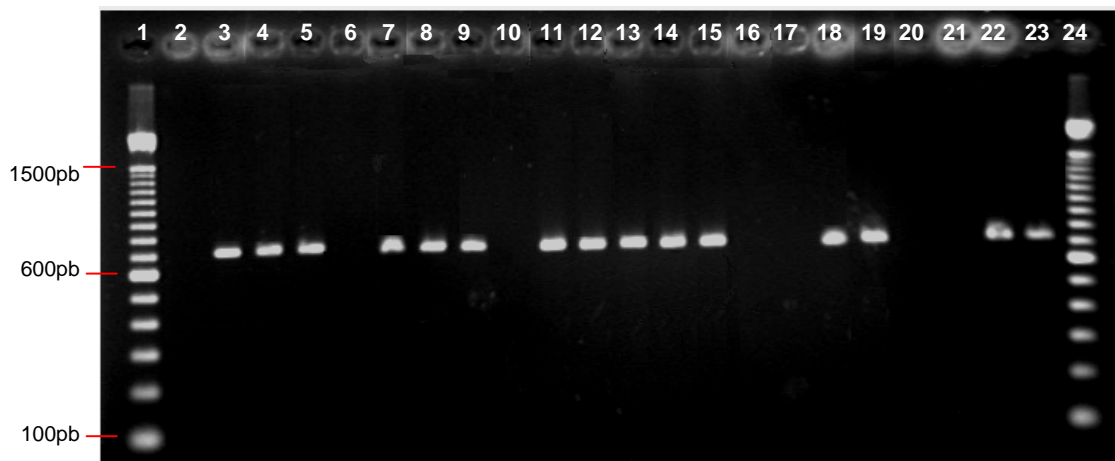


Figura 11. Produto da amplificação do DNA dos genes da toxina mosquitocida MTX1 em estirpes de *B. sphaericus*. 1. Marcador DNA 1kb *Ladder*, 2. controle negativo, 3. controle positivo 2362, 4. IB15, 5. IB16, 6. IB19, 7. S265, 8. S1116, 9. IB07, 10. IB08, 11. IB09, 12. S323, 13. S662, 14. S841, 15. IB10, 16. S589, 17. IB05, 18. IB11, 19. IB18, 20. IB12, 21. IB17, 22. S579. 23. 2362. 24. Marcador DNA 1kb *Ladder*.

Tabela 11. Amplificações obtidas dos genes das toxinas binária (BinA e BinB) e mosquitocida (MTX1) em estirpes de *B. sphaericus* procedentes de diversas localidades da Amazônia por meio da técnica de PCR.

ESTIRPE	PROCEDÊNCIA	TOXINA			TOXICIDADE*
		Bin A	Bin B	MTX1	
IB15	Janauarilândia – AM	+	+	+	1
IB16	Manaus – AM	+	+	+	1
IB19	Tarumãzinho – AM	+	+	-	1
S265	Belém – PA	+	+	+	1
S1116	Itaubal – AP	+	+	+	1
IB07	Janauarilândia – AM	+	+	+	2
IB08	Coari – AM	+	+	-	2
IB09	Coari – AM	+	+	+	2
S323	Boa Vista – RR	+	+	+	2
S589	Boa Vista – RR	+	+	-	2
S662	Lagoa Cacoal Grande – PA	+	+	+	2
S841	Belém – PA	+	+	+	2
S594	Boa Vista – RR	+	+	+	2
IB05	Tarumãzinho – AM	+	+	-	3
IB10	Tupé – AM	+	+	+	3
IB11	Presidente Figueiredo – AM	+	+	+	3
IB12	Manaus – AM	+	+	-	3
IB17	Manaus – AM	+	+	-	3
IB18	Presidente Figueiredo – AM	+	+	+	3
S579	Boa Vista – RR	+	+	+	3
2362	Nigéria (padrão)	+	+	+	1

* Conforme resultados obtidos nos bioensaios com larvas de *A. darlingi*, após 24h da aplicação do bacilo. 1 – Toxicidade alta, 2 – Toxicidade média e 3 – toxicidade baixa.
+ = Produto de PCR amplificado; - = ausência de amplificação.

Tabela 12. Composição média de nucleotídeos de um fragmento de 173pb da toxina BinA em diversas estirpes de *B. sphaericus*. (A = adenina, T = timina, C = citosina, G = guanina).

ESTIRPE	T%	C%	A%	G%
IB05	31,5	18,2	31,2	19,2
IB07	31,3	17,9	31,3	19,5
IB08	31,7	17,9	31,2	19,2
IB09	31,3	19,4	30,1	19,1
IB10	31,6	18,1	31,3	19,1
IB11	31,6	18,1	31,3	19,1
IB12	29,1	19,9	29,6	21,4
IB15	31,8	18,1	31,0	19,1
IB16	31,4	18,0	31,4	19,1
IB17	31,7	18,2	31,2	18,9
IB18	31,8	18,1	31,0	19,1
IB19	31,5	18,7	30,7	19,1
S1116	31,6	18,1	31,3	19,1
S265	28,5	19,8	30,9	20,8
S323	30,3	19,1	31,4	19,1
S579	31,0	18,1	31,6	19,3
S589	31,6	18,1	31,1	19,1
S662	31,6	18,1	31,3	19,1
S841	31,6	18,1	31,3	19,1
2362 (padrão)	31,6	18,1	31,3	19,1
2297 (BSP224477)*	31,6	18,1	31,3	19,1
2297 (BSP224478)*	32,3	17,6	31,6	18,6
LP1-G (BSY13320)*	31,8	17,8	31,6	18,8
9002 (BSY13319) *	31,6	17,8	31,6	19,1
MÉDIA	31,4	18,2	31,2	19,2

* Sequências obtidas no *GenBank*

II.4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA TOXINA BINÁRIA DE *B. sphaericus* DA AMAZÔNIA

O sequenciamento molecular foi realizado apenas para as regiões da toxina binária. Contudo, devido ao produto sequenciado não ter sido de igual qualidade em todas as estirpes, foi analisada apenas parte da região do gene BinA, o que correspondeu a 393 nucleotídeos (Figura 12) ou 131 aminoácidos com 16 sítios polimórficos (Figura 13).

Após o alinhamento das sequências foram observados 23 sítios variáveis nas sequências de nucleotídeos, dos quais apenas quatro foram informativos para análise de parcimônia (nt28, nt332, nt333 e nt356).

Dez haplótipos foram observados, dos quais o haplótipo 1 foi o mais comum agrupando as estirpes 2362, IB08, IB10, IB11, S1116, S323, S589, S662, S841 e IB17. O haplótipo 2 agregando IB15 e IB18. As demais estirpes apresentaram-se como sequências únicas, sendo o haplótipo 3 representado por IB07, haplótipo 4 por IB05, haplótipo 5 por IB16, haplótipo 6 por S579, haplótipo 7 por IB09, haplótipo 8 por IB12, haplótipo 9 por S265 e haplótipo 10 por IB19 (Figura 12). Observando que nos haplótipos 7, 8, 9 e 10, as variações iniciais encontradas podem ser artefatos da técnica devido à qualidade do sequenciamento. Porém, optou-se por incluí-los na análise devido à toxicidade diferenciada observada nas estirpes (ver Capítulo I).

Os nucleotídeos e aminoácidos variantes nas estirpes de *B. sphaericus* da Amazônia foram comparados com sequências de quatro estirpes Tipo depositadas no *Genbank* (IAB59 – Tipo 1, 2362 – Tipo 2, 2297 – Tipo 3 e LP1-G – Tipo 4) (Tabela 13). As estirpes agrupadas no haplótipo 1 apresentaram similaridade de 100% com a sequência Tipo 2 (2362). As demais estirpes mostraram-se como nove Tipos distintos entre si e com os Tipos 1, 3 ou 4.

Os 16 sítios polimórficos observados nas sequências de aminoácidos resultaram

em 19 aminoácidos variantes, distintos aos descritos nas estirpes Tipo 1, 2, 3 e 4. As estirpes IB09 (Tipo 9 – Phe aa54, Pro aa68, His aa111, Thr aa116 e Gly aa119) e IB12 (Tipo 10 – Arg aa68, Ile aa69, Tyr aa72, Asn aa117 e Gly aa119) foram as mais variáveis com cinco aminoácidos variantes cada, seguida da IB16 (Tipo 7) com quatro aminoácidos variantes, Leu aa10, Val aa14, Tyr aa22 e Lys aa110.

A distância genética média foi de 1,2% considerando-se todas as estirpes (Figura 14). Porém ao serem retiradas da análise as estirpes IB09, IB12, IB19, S265 e S323, as quais possuíam sequências menores devido à qualidade do produto sequenciado, este valor caiu pela metade.

A maior distância genética observada entre as estirpes 2297 (BSP224478) e IB12 (7,1%) pode ser o reflexo da qualidade do sequenciamento, conforme podem ser visualizados no cladograma de agrupamentos de vizinhos (Neighbor-Joining), utilizando a matriz de distâncias genéticas segundo o modelo Kimura-2-parâmetros (Figura 15). As sequências não foram efetivas para estabelecer a relação entre distância genética e toxicidade ou mesmo entre distância genética e local de origem das estirpes.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
2297_BSP224477*	ATGAGAAATT	TGGATTTTAT	TGATTCTTTT	ATACCCACAG	AAGGAAAGTA	CATTCGCGTT	ATGGATTTTT	ATAATAGCGA	GTATCCTTTC	TGTATACATG
2297_BSP224478*
LP1G_BSY13320*
9002_BSY13319*
2362
IB08?
IB10
IB11
S1116
S323	-----	-----	-----
S589
S662
S841
IB17
IB15
IB18
IB07G.....
IB05G.....T.....
IB16A.....T.....T.....
S579A.....G.....
IB12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S265	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IB19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IB09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
2297_BSP224477*	CACCCTCAGC	CCCTAATGGG	GATATCATGA	CAGAAATCTG	TAGCAGAGAA	AATAATCAAT	ATTTTATTTT	TTTTCCTACT	GATGATGGTC	GAGTAATTAT
2297_BSP224478*T.....C.....
LP1G_BSY13320*T.....C.....
9002_BSY13319*
2362
IB08?
IB10
IB11
S1116
S323
S589?
S662
S841
IB17
IB15
IB18
IB07??
IB05?
IB16??
S579
IB12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S265	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IB19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IB09??T.....

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
2297_BSP224477*	TGCAAATAGG	CATAATGGGT	CCGTTTTTTAC	CGGAGAAGCC	ACAAGTGTAG	TATCAGATAT	CTATACTGGT	AGCCCATTAC	AGTTTTTTTAG	AGAGGTCAAA
2297_BSP224478*TT.....
LP1G_BSY13320*TC..
9002_BSY13319*
2362
IB08
IB10
IB11
S1116
S323
S589
S662
S841
IB17
IB15
IB18
IB07?
IB05
IB16
S579
IB12	.AG..T....	..T.....
S265
IB19
IB09	.C.....

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	393
2297_BSP224477*	AGAACTATGG	CAACTTATTA	TTTAGCGATA	CAAAATCCTG	AATCCGCAAC	AGATGTGAGA	GCTCTAGAAC	CGCATTCCCA	TGAGCTGCCA	TCT
2297_BSP224478*TA..
LP1G_BSY13320*TA..
9002_BSY13319*A.
2362
IB08
IB10
IB11
S1116
S323
S589
S662
S841
IB17
IB15T.
IB18T.
IB07
IB05
IB16A.??
S579
IB12T.G.AC.....G.?
S265T.
IB19T.
IB09C.AA.T.G.

Figura 12. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene BinA de diferentes estirpes de *B. sphaericus*. ? (nucleotídeo não determinado), *obtidas no *GenBank*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
2297_BSP224477*	MRNLDFIDSF	IPTEGKYIRV	MDFYNSEYPF	CIHAPSAPNG	DIMTEICSRE	NNQYFIFFP	DDGRVIIANR	HNGSVFTGEA	TSVVSIDIYTG	SPLQFFREVK
2297_BSP224478*F.
LP1G_BSY13320*S.....
9002_BSY13319*
2362
IB08??
IB10
IB11
S1116
S323	-----
S589?
S662
S841
IB17-
IB15
IB18?
IB07V??
IB05VI?
IB16LV-Y?
S579NY
IB12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----RI
S265	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---V
IB19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----N
IB09	-----	-----??FP
	110	120	131							
2297_BSP224477	RTMATYYLAI	QNPESATDVR	ALEPHSHELPS							
2297_BSP224478	..S.....N							
LP1G_BSY13320	..S.....N							
9002_BSY13319	..E.....							
2362							
IB08							
IB10							
IB11							
S1116							
S323							
S589							
S662							
S841							
IB17							
IB15	L.....							
IB18	L.....							
IB07							
IB05							
IB16K??						
S579							
IB12	H.....N.G?							
S265	H.....							
IB19	H.....							
IB09	H.....T.G							

Figura 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína BinA de *B. sphaericus* da Amazônia. *Sequências obtidas no *GenBank*.

Tabela 13. Comparação entre sequências da toxina BinA de espécies Tipo de *Bacillus sphaericus*.

POSIÇÃO		NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS													
NUCLEOTÍDEO	AMINOÁCIDO	IAB59*	2362*	2297*	LP1-G*	IB05	IB07	IB16	S589	IB09	IB12	IB19	S265	IB15	
		TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	TIPO 4	TIPO 5	TIPO 6	TIPO 7	TIPO 8	TIPO 9	TIPO 10	TIPO 11	TIPO 12	TIPO 13	
		**													

2042	10	T Phe	T Phe	T Phe	T Phe	G Val	G Val	T Leu	T Phe	-	-	-	-	T Phe	
2044	10	T Phe	T Phe	T Phe	T Phe	T Val	T Val	A Leu	T Phe	-	-	-	-	T Phe	
2055	14	A Glu	A Glu	A Glu	A Glu	A Glu	A Glu	T Val	A Glu	-	-	-	-	A Glu	
2077	21	G Met	G Met	G Met	G Met	T Ile	G Met	G Met	G Met	G Met	-	-	-	G Met	
2078	22	G Asp	G Asp	G Asp	G Asp	G Asp	G Asp	T Tyr	G Asp	G Asp	-	-	-	G Asp	
2084	24	T Tyr	T Tyr	T Tyr	T Tyr	T Tyr	T Tyr	T Tyr	A Asn	T Tyr	-	-	-	T Tyr	
2101	29	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	G Ile	T Ile	-	-	-	T Ile	
<u>2139</u>	<u>42</u>	<u>C Ile</u>	<u>C Ile</u>	<u>T Ile</u>	<u>T Ile</u>	C Ile	C Ile	C Ile	C Ile	C Ile	-	-	-	C Ile	
<u>2169</u>	<u>52</u>	<u>T Asn</u>	<u>T Asn</u>	<u>C Asn</u>	<u>C Asn</u>	C Asn	C Asn	C Asn	C Asn	C Asn	-	-	-	C Asn	
2175	54	A Tyr	A Tyr	A Tyr	A Tyr	A Tyr	A Tyr	A Tyr	A Tyr	T Phe	-	A Tyr	-	A Tyr	
2181	56	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	-	A Asn	-	T Ile	
2202	63	G Gly	G Gly	G Gly	G Gly	G Gly	G Gly	G Gly	G Gly	G Gly	-	G Gly	T Val	G Gly	
2216	68	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	C Pro	A Arg	G Ala	G Ala	G Ala	
2217	68	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Pro	G Arg	C Ala	C Ala	C Ala	
2220	69	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	T Ile	A Asn	A Asn	A Asn	
2228	72	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	A Asn	T Tyr	A Asn	A Asn	A Asn	
<u>2253</u>	<u>80</u>	<u>C Ala</u>	<u>C Ala</u>	<u>T Ala</u>	<u>T Ala</u>	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	C Ala	
<u>2291</u>	<u>93</u>	<u>T Leu</u>	<u>T Leu</u>	<u>T Leu</u>	<u>C Ser</u>	T Leu	T Leu	T Leu	T Leu	T Leu	T Leu	T Leu	T Leu	T Leu	
<u>2308</u>	<u>99</u>	<u>G Val</u>	<u>G Val</u>	<u>T Phe</u>	<u>G Val</u>	G Val	G Val	G Val	G Val	G Val	G Val	G Val	G Val	G Val	
<u>2323</u>	<u>104</u>	<u>G Glu</u>	<u>G Ala</u>	<u>T Ser</u>	<u>T Ser</u>	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	
<u>2324</u>	<u>104</u>	<u>A Glu</u>	<u>C Ala</u>	<u>C Ser</u>	<u>C Ser</u>	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	
2343	110	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	A Lys	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	T Ile	
2346	111	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A His	A His	A His	A His	T Leu	
2347	111	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	A Gln	C His	T His	T His	T His	A Leu	
2359	115	C Ser	C Ser	C Ser	C Ser	C Ser	C Ser	C Ser	C Ser	A Ser	C Ser	C Ser	C Ser	C Ser	
2360	116	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	A Thr	G Ala	G Ala	G Ala	G Ala	
2362	116	A Ala	A Ala	A Ala	A Ala	A Ala	A Ala	A Ala	A Ala	T Thr	G Ala	A Ala	A Ala	A Ala	
2364	117	C Thr	C Thr	C Thr	C Thr	C Thr	C Thr	C Thr	C Thr	C Thr	A Asn	C Thr	C Thr	C Thr	
2365	117	A Thr	A Thr	A Thr	A Thr	A Thr	A Thr	A Thr	A Thr	A Thr	C Asn	A Thr	A Thr	A Thr	
2370	119	T Val	T Val	T Val	T Val	T Val	T Val	T Val	T Val	G Gly	G Gly	T Val	T Val	T Val	

*Sequências disponíveis no *GenBank*. **Incluindo as estirpes: IB08, IB10, IB11, S1116, S323, S589, S662, S841 e IB17. ***Incluindo a estirpe IB18. – Não determinado.

Letras em negrito: variações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos. Letras sublinhadas: variantes descritas em BAUMANN *et al.* (1988) e HUMPHREY & BERRY (1998).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2	0,027																						
3	0,005	0,021																					
4	0,021	0,005	0,016																				
5	0,021	0,005	0,016	0,000																			
6	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000																		
7	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000																	
8	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000																
9	0,054	0,038	0,049	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032															
10	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032														
11	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000													
12	0,071	0,054	0,066	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,054	0,049	0,049												
13	0,027	0,011	0,021	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,038	0,005	0,005	0,054											
14	0,027	0,011	0,021	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,038	0,005	0,005	0,054	0,011										
15	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005									
16	0,027	0,011	0,021	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,038	0,005	0,005	0,054	0,000	0,011	0,005								
17	0,027	0,011	0,021	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,032	0,005	0,005	0,043	0,011	0,011	0,005	0,011							
18	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005						
19	0,027	0,011	0,021	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,032	0,005	0,005	0,043	0,011	0,011	0,005	0,011	0,000	0,005					
20	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,000	0,005				
21	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,000	0,005	0,000			
22	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,000	0,005	0,000	0,000		
23	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	
24	0,021	0,005	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000

Figura 14. Matriz de distâncias genéticas entre estirpes de *B. sphaericus*, considerando sequências de 393pb da toxina BinA. 1. BSP224478 (2297), 2. BSY13319 (9002), 3. BSY13320 (LP1-G), 4. BSP224477 (2297), 5. 2362, 6. IB05, 7. IB07, 8. IB08, 9. IB09, 10. IB10, 11. IB11, 12. IB12, 13. IB15, 14. IB16, 15. IB17, 16. IB18, 17. IB19, 18. S1116, 19. S265, 20. S323, 21. S579, 22. S589, 23. S662, 24. S841.

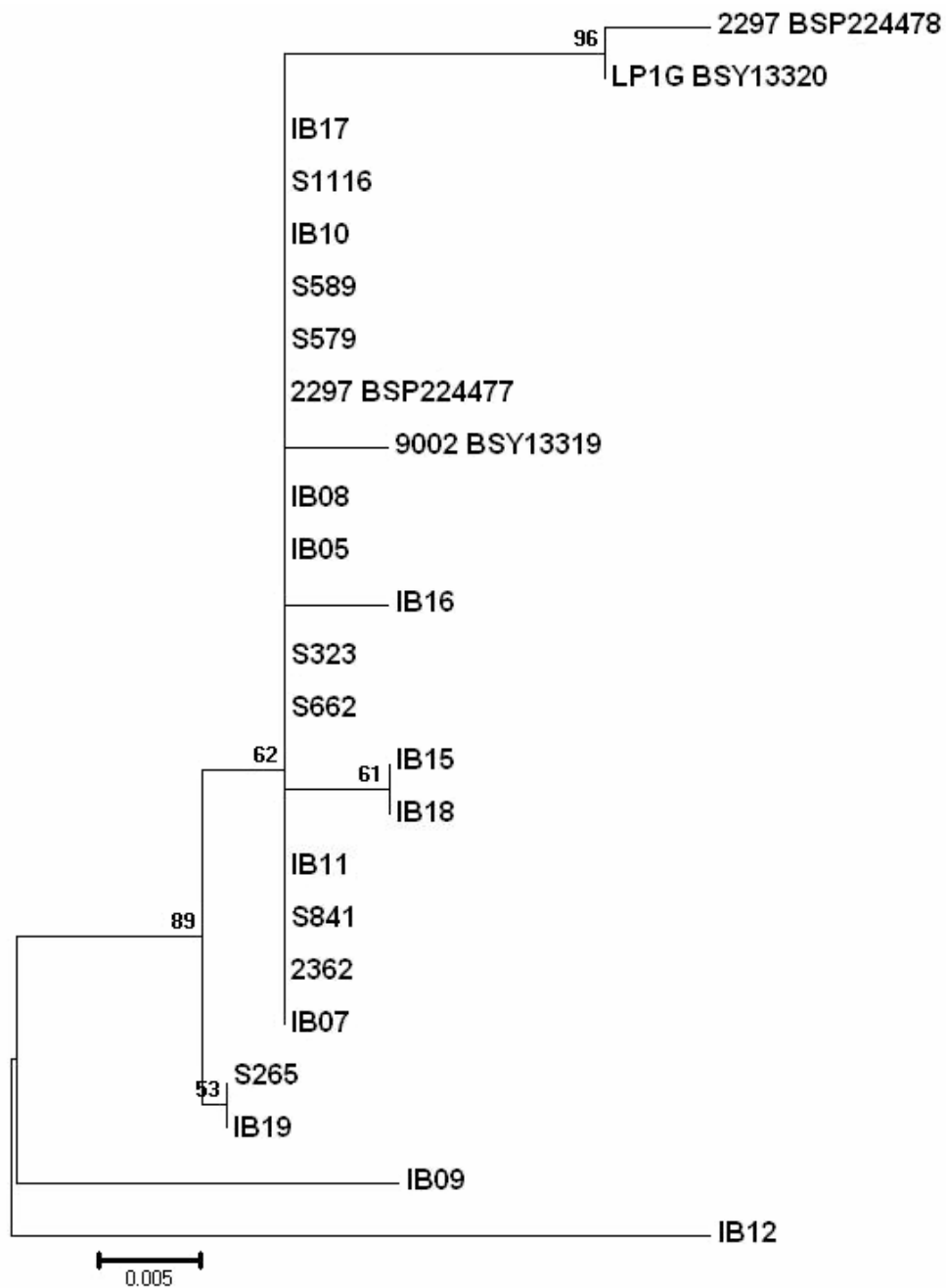


Figura 15. Cladograma obtido pelo método de agrupamentos vizinhos (Neighbor-Joining) a partir de sequências de 393 nucleotídeos da toxina BinA de *B. sphaericus*, segundo o modelo Kimura-2-parâmetros. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *Bootstrap* superior a 50.

II.5 DISCUSSÃO

Vinte e uma estirpes entomopatogênicas de *B. sphaericus* de diversas localidades da Amazônia foram selecionadas no presente estudo. Os testes de toxicidade realizados com larvas de *A. darlingi* resultaram em seis estirpes (30%) com alta toxicidade, sete estirpes (35%) com média toxicidade e sete estirpes (35%) com baixa toxicidade. Esses resultados concordam com estudos anteriores que apontam variações no nível de toxicidade entre as estirpes de *B. sphaericus* (SCHENKEL *et al.* 1992, RODRIGUES *et al.* 1999, LITAIFF 2002 e SILVA *et al.* 2002).

No presente trabalho, os oligonucleotídeos BinB-F e BinA-R mostraram eficiência para diagnosticar com sucesso a toxina binária em *B. sphaericus*. Com o desenvolvimento dos marcadores moleculares, a investigação de substâncias de interesse biotecnológico é realizada de forma mais rápida e precisa em relação aos métodos tradicionais como sorologia dos antígenos flagelares (De BARJAC *et al.* 1980) e sensibilidade aos grupos fago (YOUSTEN *et al.* 1980).

Em 100% das estirpes estudadas procedentes da Amazônia foram obtidas ampliações para o gene da toxina binária. SILVA *et al.* (1999), observaram presença em apenas 83% estirpes de *B. sphaericus* oriundas das diferentes regiões do Brasil, utilizando-se técnica de NESTED-PCR. PRIEST *et al.* (1997) relataram ausência da toxina binária entre estirpes pertencentes aos sorotipos 2a,2b; 9a,9b; 26a,26b.

Ambas as proteínas são requeridas para a toxicidade em larvas de mosquitos e a taxa equimolar destas produz a maior atividade larvicida (BROADWELL *et al.* 1990), embora BinA isoladamente tenha apresentado toxicidade em larvas de mosquitos tratadas com uma estirpe recombinante de *B. thuringiensis* no estudo realizado por NICOLAS *et al.* (1993).

Em todo o mundo, são conhecidas apenas quatro grupos de sequências variantes nos genes codificadores da toxina binária, representadas por IAB59 (Tipo 1), 2362 (Tipo 2), 2297 (Tipo 3) e LP-1G (Tipo 4), com cinco ou seis aminoácidos potencialmente variantes nas sequências de BinA e BinB (BAUMANN *et al.* 1989, BERRY *et al.* 1989, LIU *et al.* 1993).

No presente trabalho, as sequências agrupadas no haplótipo 1 mostraram similaridade genética de 100% com a sequência Tipo 2, representada pela estirpe 2362 (BAUMANN *et al.* 1989). Segundo a classificação de De BARJAC (1980), essa estirpe pertence ao sorotipo H5a,5b, no qual estão agrupadas um grande número de *B. sphaericus* que apresentam alta atividade larvicida. No entanto, apesar da similaridade, não foi observada correlação com o nível de toxicidade das estirpes, uma vez que esse haplótipo agrupou tanto estirpes de alta, como média e baixa toxicidade, conforme verificado na Tabela 12. O haplótipo 2 agrupou estirpes que foram, respectivamente, a alta (IB15) e de baixa (IB18) toxicidade nos testes com *A. darlingi*.

A identificação com a estirpe tipo 2 poderia sugerir semelhança quanto sorotipo e se caso confirmado, concordaria com resultados de SCHENKEL *et al.* (1992), os quais obtiveram exclusivamente o sorotipo H5 na caracterização sorológica de estirpes de *B. sphaericus* oriundas de amostras de solo nas diversas regiões do Brasil e de SILVA *et al.* (1999), com predominância do sorotipo H5a,5b e, ainda, foram detectados os sorotipos H9a,9b, H2a,2b e H6.

HUMPREHYS & BERRY (1998) e SILVA-FILHA *et al.* (2005) ressaltam a importância do estudo de polimorfismos nas toxinas inseticidas como base para desvendar a relação da estrutura e os mecanismos de ação das toxinas inseticidas, bem como o fenômeno de resistência natural.

Dentre os vinte e três sítios polimórficos observados nas sequências de BinA, apenas quatro mostraram ser informativos para a análise de parcimônia, os quais estão nas

posições 28, 332, 333 e 356. A análise de máxima parcimônia percorre um caminho menos tortuoso na reconstrução de árvores filogenéticas, ou seja, que abrangem o maior número de observações relacionadas a um determinado fenômeno, evitando-se a probabilidade de erro associado às explicações mais complexas durante análises de seqüências moleculares (SCHNEIDER, 2003).

Analisando-se os resultados de distância genética entre as estirpes de *B. sphaericus* da Amazônia, não foi possível estabelecer uma correlação entre as variações nas seqüências da toxina BinA com a toxicidade em larvas de *A. darlingi*, uma vez que estirpes com alta e baixa toxicidades mostraram elevada similaridade genética, como verificado entre IB15 e IB18.

Essas estirpes diferenciaram-se das seqüências Tipo 2 em apenas dois aminoácidos (Asn aa52 e Leu aa111). Cinco aminoácidos variantes foram verificados nas estirpes IB09 e IB12 que apresentaram, respectivamente, média e baixa toxicidade em larvas de mosquito. A ação de outras toxinas, além da toxina binária, poderia explicar a atividade larvicida, visto que em IB09 foi detectada a presença da toxina MTX1, enquanto que esta foi ausente em IB12.

Mudanças em apenas um aminoácido podem alterar a toxicidade em *B. sphaericus*, como descreveram YUAN *et al.* (2001). A substituição de uma Serina (posição 93) por uma Leucina na estirpe LP1-G (variante BinA4), alterou a toxicidade em larvas de *C. pipiens*, passando de não-tóxica para um nível altamente ativo, comparado ao da estirpe 1593 (SINGER 1981, BERRY *et al.* 1993). ELANGO VAN *et al.* (2000) verificaram que mutações nos resíduos de arginina C-terminal na posição 312, influenciaram diretamente na diminuição da atividade larvicida da estirpe 1593 (variante BinA2).

A atividade do gene da toxina MTX1 foi detectada em 83% das estirpes, ocorrendo de forma aleatória entre estirpes que apresentaram baixa, média e alta toxicidade, da mesma forma que os resultados observados por SILVA *et al.* (1999), os

quais verificaram presença da toxina MTX1 em 90% das estirpes de *B. sphaericus* caracterizadas com o uso de marcadores moleculares de DNA.

Embora a toxina MTX1 (100kDa) seja o principal componente ativo em muitas estirpes de baixa toxicidade, é, ainda, amplamente distribuída entre muitas estirpes de alta toxicidade (THANABALU *et al.* 1991, LIU *et al.* 1993). Da mesma forma que as toxinas VIPs (*vegetative insecticidal toxin*) de *B. thuringiensis*, as toxinas MTX são produzidas durante a fase vegetativa do crescimento microbiano, porém são instáveis em *B. sphaericus* e nos organismos-alvo, sendo degradada pela ação de serina-proteases (WATI *et al.* 1997, SILVA-FILHA *et al.* 2005). Entretanto, uma forma recombinante da proteína MTX1 de 97kDa (faltando o peptídeo sinal) expressa em *E. coli*, mostrou toxicidade estável (THANABALU *et al.* 1991, PARTRIDGE & BERRY 2002).

As bactérias entomopatogênicas utilizam uma grande variedade de toxinas para auxiliá-los a invadir, infectar e até matar os organismos-alvo através da ação no intestino do inseto. De acordo com De MAAGD *et al.* (2003), as toxinas inseticidas descenderiam de um único dobramento ou de combinações entre os domínios das toxinas conhecidas, sugerindo origem evolutiva comum.

O principal fator do espectro de ação em organismos-alvo é a presença das toxinas nos cristais parasporais que abrangem diversas estruturas, algumas das quais limitadas a uma ou em diversas espécies. A maior variedade é encontrada em *B. thuringiensis* nas toxinas codificadas pelos genes Cry.

A prospecção dessas toxinas demonstra que esses cristais se dividem em grupos distintos de homologia (CRICKMORE 2003). São conhecidos mais de 30 diferentes tipos básicos de genes Cry com mais de 100 subtipos com diversas especificidades de ação. Alguns subtipos são encontrados em espécies de outros gêneros como *Penibacillus popilliae* (Cry18) (ZHANG *et al.* 1997) e *Clostridium bifermentans* (Cry16 e Cry17) (BARLOY *et al.* 1996).

Muitas teorias são apresentadas sobre a origem das toxinas inseticidas em bactérias, principalmente sobre a comum evolução das toxinas inseticidas. Essa hipótese é reforçada pela homologia observada, por exemplo, com a toxina Cry (Cry35 e Cry36) de *B. thuringiensis* e a toxina binária de *B. sphaericus* e, de modo semelhante a essa, é ativa apenas em conjunto com a toxina Cry34 (ELLIS *et al.* 2002).

Um fator chave no emprego do controle biológico de mosquitos é a susceptibilidade entre as espécies-alvo. Atualmente, os estudos estão voltados para o mecanismo de ação dos componentes das toxinas e no fenômeno da resistência natural entre espécies de mosquito. Apesar das *B. sphaericus* apresentar um espectro de ação reduzido frente às espécies de *B. thuringiensis*, por exemplo, os estudos revelam que mecanismo de ligação no intestino da larva ocorre de forma semelhante. No entanto, os sítios de ligação intestinal são diferenciados (ROMÃO *et al.* 2005). Recentemente, SILVA-FILHA (2005) demonstraram que a resistência natural não está relacionada a alterações no sítio de ligação, mas sim a mutações que provocam falhas na expressão de proteínas das âncoras GPI (Glicosil-fostatidilinositol), que liga a toxina ao epitélio intestinal da larva.

Apesar de não estar completamente elucidado o papel das toxinas inseticidas, os resultados apontam que as toxinas e demais fatores de virulência nas espécies entomopatogênicas servem como auxiliares na invasão de espécies hospedeiras e, com isso, possibilitam a colonização de diversos nichos ecológicos.

CAPITULO III. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE *Bacillus sphaericus* PARA PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA

III.1 INTRODUÇÃO

O controle microbiano de insetos-praga é de crucial importância, pois o uso abusivo de inseticidas químicos vem causando sérios impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana (PIMENTAL 1992). Embora os bioinseticidas sejam eficientes no controle de vetores, seu uso ainda é bastante limitado com exceção da China, onde é largamente produzido e utilizado (DULMAGE 1993).

O alto custo de produção em relação aos inseticidas químicos, a especificidade de ação e a baixa persistência do efeito larvicida em campo são alguns dos fatores que limitam o uso de inseticidas biológicos (CAPALBO *et al* 2001; DIAS 1992). Porém, quanto à persistência em campo, o *B. sphaericus* possui uma vantagem frente a outras bactérias entomopatogênicas pela capacidade de reciclagem natural com a utilização das larvas mortas como substrato de crescimento (CORREA & YOUSTEN 1995).

Além da busca por estirpes altamente tóxicas, há um considerável interesse na estabilidade nas condições de produção de biomassa com atividade larvicida e com a melhoria do processo fermentativo durante a produção de bioinseticidas (MORAES *et al.* 2005).

Portanto, como passos iniciais para a produção de um biolarvicida a partir de estirpes isoladas na Amazônia, foram desenvolvidos experimentos para analisar o crescimento microbiano de *B. sphaericus* IB15 em meio NYSM (MYERS & YOUSTEN 1978) e a atividade larvicida em *C. quinquefasciatus* por meio do tempo letal mediano (TL50) ao longo do processo fermentativo.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o crescimento de *B. sphaericus* IB15 e 2362 em meio NYSM, quanto aos parâmetros de número de células produzidas, concentração de biomassa seca e formação de esporos em função do tempo de fermentação;
- Determinar a ação tóxica de *B. sphaericus* IB15 e 2632 em larvas de *C. quinquefasciatus* por meio de testes de tempo letal mediano (TL50), ao longo do processo de fermentação.

III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de crescimento microbiano foram realizados no Laboratório de Vetores de Malária e Dengue, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde - INPA e no Laboratório de Microbiologia, do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas.

III.3.1 SELEÇÃO DA BACTÉRIA ENTOMOPATOGÊNICA

A estirpe *B. sphaericus* IB15 descrita no Capítulo 1 foi selecionada para estudo de crescimento microbiano por sua elevada atividade larvicida contra *C. quinquefasciatus* e *A. darlingi*. Para efeito de comparação utilizou-se a estirpe 2362 como padrão.

As estirpes usadas neste estudo foram mantidas em refrigerador a temperatura de 4 a 8°C em ágar nutritivo, sendo repicadas a cada três meses, testando-se a viabilidade e pureza das mesmas antes dos ensaios de produção de *B. sphaericus*.

III.3.2 PROCESSO FERMENTATIVO

III.3.2.1 MEIO DE FERMENTAÇÃO

Utilizou-se o NYSM (MYERS & YOUSTEN 1978), como meio padrão para o crescimento de *B. sphaericus* (OMS 1985). O NYSM é o meio nutritivo com a adição de sais minerais. Ajustado para pH 7,0 e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. A composição do meio NYSM está descrita a seguir:

	g/L
Peptona	5,00
Extrato de carne.	3,00
Extrato de levedura	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
CaCO ₃	0,10
KH ₂ PO ₄	1,00

III.3.2.2 INÓCULO

O inóculo utilizado foi obtido a partir de culturas de *B. sphaericus* IB15 e 2362 crescidas em tubos inclinados de NYSM contendo 1,5% de ágar inclinado, durante 12 horas a 30°C. Alíquotas de 1mL da suspensão homogênea (10^6ml^{-1}) foram inoculadas em frascos *Erlenmeyers* contendo 10mL de caldo NYSM e incubados em agitador rotatório a 200rpm na temperatura de 30°C (Figura 16).



Figura 16. Culturas de *B. sphaericus* em incubador rotativo.

III.3.2.3 CRESCIMENTO MICROBIANO

Para determinação da curva de crescimento da estirpe selecionada, amostras da suspensão microbiana foram retiradas em intervalos regulares de tempo de três horas por um período total de 24 horas, para medição da massa seca por meio de filtração em membrana *Millipore* de acetato de celulose com 47mm de diâmetro e 0,45µm de poro, com posterior secagem em estufa à temperatura de 80°C até peso constante, determinado em balança analítica (Figura 17).



Figura 17. Filtragem do meio de cultura de *B. sphaericus* para determinação da biomassa seca.

Paralelamente, a cada três horas, foi realizada a contagem do número total de células e esporos de *B. sphaericus* IB15 e 2362 com auxílio de uma câmara de Neubauer, utilizando-se microscópio binocular (400x).

Os resultados do crescimento microbiano de *B. sphaericus* IB15 e 2362 em meio NYSM foram comparados em parâmetros de tempo de geração, velocidade de crescimento e produtividade de células, esporos e biomassa ao final de 24 horas conforme GERMANI (1993). Os ensaios foram realizados em condições de laboratório à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa superior a 85% e fotofase de 12horas. No total foram realizados quatro ensaios para cada estirpe, executados em dias alternados para minimizar os efeitos da manipulação.

III.3.3 DETERMINAÇÃO DE pH

A cada três horas, alíquotas do meio fermentado foram coletadas para determinação do pH, utilizando-se peagâmetro digital com eletrodo combinado DIGIMED DM-10, com precisão de $\pm 0,01$.

III.3.4 ATIVIDADE LARVICIDA

A atividade larvicida do *B. sphaericus* IB15 e 2362 foram monitoradas em função do tempo de fermentação para se determinar o tempo letal mediano (TL50) em *C. quinquefasciatus*.

Em intervalos de três horas foram realizados bioensaios compostos de réplicas de três copos plásticos contendo cada um 50mL de água destilada, vinte larvas L3 e 1mL da cultura com número de esporos conhecidos conforme descrito no item 3.3.2.3. Foram preparados três copos nas mesmas condições anteriores como grupo controle, porém aplicando apenas o meio de cultura sem o bacilo.

Após aplicação do bacilo foram realizadas leituras em intervalos de três horas por um período de 24 horas, onde se contava o número de larvas vivas e mortas por dose correspondente.

A atividade larvicida em *C. quinquefasciatus* foi medida por meio do tempo letal mediano (TL50), obtido por regressão linear entre o probit da mortalidade e o tempo de crescimento da cultura, utilizando-se o programa estatístico MINITAB.

III.4 RESULTADOS

III.4.1 CRESCIMENTO DE *B. sphaericus* IB15 E 2362

O crescimento microbiano das estirpes IB15 e 2362 em meio NYSM foram acompanhados por um período de 24 horas, de acordo com metodologia descrita no item III.3.2.3.

As contagens de células e esporos estão demonstradas nas Tabelas 14 e 15, respectivamente para as estirpes IB15 e 2362. As curvas de crescimento celular e produção de esporos estão graficamente representadas na Figura 18.

Para a IB15, a quantidade de células no tempo zero de fermentação foi em média $3,66 \times 10^7$ células.mL⁻¹, aumentando ao longo do processo fermentativo, atingindo, ao final de 24 horas $1,94 \times 10^9$ células.mL⁻¹. Os esporos presentes no inóculo eram, em média, $5,08 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ e ao final da fermentação o número total foi $1,61 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹.

Durante o crescimento microbiano, a estirpe 2362 apresentou valores médios iniciais de $5,52 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e de $6,28 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ e ao final da fermentação a quantidade média de células e esporos foi respectivamente de $8,13 \times 10^8$ e $6,46 \times 10^8$ por mL de cultura.

Tabela 14. Produção de células e esporos de *B. sphaericus* IB15, crescidas em meio NYSM a 30°C e 200rpm.

FERMENTAÇÃO (h)	ENSAIO 1		ENSAIO 2		ENSAIO 3		ENSAIO 4	
	Células/mL	Esporos/mL	Células/mL	Esporos/mL	Células/mL	Esporos/mL	Células/mL	Esporos/mL
0	5,10x10 ⁷	6,50x10 ⁶	2,65x10 ⁷	4,50x10 ⁶	3,70x10 ⁷	4,50x10 ⁶	3,20x10 ⁷	4,80x10 ⁶
3	4,55x10 ⁸	1,90x10 ⁷	4,55x10 ⁸	7,00x10 ⁶	4,20x10 ⁸	5,80x10 ⁷	7,32x10 ⁸	3,65x10 ⁷
6	8,60x10 ⁸	1,60x10 ⁸	1,34x10 ⁹	2,15x10 ⁸	8,85x10 ⁸	1,90x10 ⁸	9,90x10 ⁸	2,10x10 ⁸
9	1,03x10 ⁹	5,65x10 ⁸	1,32x10 ⁹	6,90x10 ⁸	9,90x10 ⁸	5,61x10 ⁸	1,25x10 ⁹	3,40x10 ⁸
12	1,75x10 ⁹	1,15x10 ⁹	1,47x10 ⁹	1,05x10 ⁹	1,23x10 ⁹	9,10x10 ⁸	3,20x10 ⁹	7,80x10 ⁸
15	2,20x10 ⁹	1,90x10 ⁹	1,06x10 ⁹	1,01x10 ⁹	2,10x10 ⁹	1,11x10 ⁹	2,82x10 ⁹	1,50x10 ⁹
18	2,45x10 ⁹	2,05x10 ⁹	1,18x10 ⁹	1,11x10 ⁹	1,18x10 ⁹	1,17x10 ⁹	2,86x10 ⁹	1,78x10 ⁹
21	3,45x10 ⁹	3,20x10 ⁹	1,38x10 ⁹	1,19x10 ⁹	1,39x10 ⁹	1,21x10 ⁹	2,87x10 ⁹	2,74x10 ⁹
24	3,26x10 ⁹	2,43x10 ⁹	8,90x10 ⁸	8,00x10 ⁸	1,18x10 ⁹	9,90x10 ⁸	2,42x10 ⁹	2,20x10 ⁹

Tabela 15. Produção de células e esporos de *B. sphaericus* 2362, crescidas em meio NYSM a 30°C e 200rpm.

FERMENTAÇÃO (h)	ENSAIO 1		ENSAIO 2		ENSAIO 3		ENSAIO 4	
	Células.mL ⁻¹	Esporos.mL ⁻¹	Células.mL ⁻¹	Esporos.mL ⁻¹	Células.mL ⁻¹	Esporos.mL ⁻¹	Células.mL ⁻¹	Esporos.mL ⁻¹
0	7,80x10 ⁷	1,00x10 ⁷	7,00x10 ⁷	1,00x10 ⁷	6,32x10 ⁷	2,60x10 ⁶	9,60x10 ⁶	2,50x10 ⁶
3	3,60x10 ⁸	2,50x10 ⁷	4,05x10 ⁸	4,50x10 ⁷	3,50x10 ⁸	2,55x10 ⁷	8,37x10 ⁷	4,38x10 ⁷
6	1,31x10 ⁹	7,50x10 ⁷	1,02x10 ⁹	1,15x10 ⁸	9,25x10 ⁸	1,05x10 ⁸	1,53x10 ⁸	4,75x10 ⁸
9	1,50x10 ⁹	7,00x10 ⁸	1,20x10 ⁹	4,50x10 ⁸	1,36x10 ⁹	5,61x10 ⁸	1,36x10 ⁹	6,79x10 ⁸
12	1,60x10 ⁹	1,20x10 ⁹	1,50x10 ⁹	1,00x10 ⁹	2,30x10 ⁹	1,02x10 ⁹	1,44x10 ⁹	1,20x10 ⁹
15	8,20x10 ⁸	2,80x10 ⁸	1,57x10 ⁹	1,12x10 ⁹	1,68x10 ⁹	1,15x10 ⁹	2,36x10 ⁹	1,68x10 ⁹
18	8,35x10 ⁸	2,90x10 ⁸	9,80x10 ⁸	5,30x10 ⁸	7,49x10 ⁸	6,42x10 ⁸	8,78x10 ⁸	3,65x10 ⁸
21	8,15x10 ⁸	3,25x10 ⁸	8,50x10 ⁸	3,40x10 ⁸	7,93x10 ⁸	5,98x10 ⁸	8,52x10 ⁸	7,89x10 ⁸
24	8,10x10 ⁸	6,55x10 ⁸	7,72x10 ⁸	4,50x10 ⁸	8,37x10 ⁸	7,36x10 ⁸	8,33x10 ⁸	7,43x10 ⁸

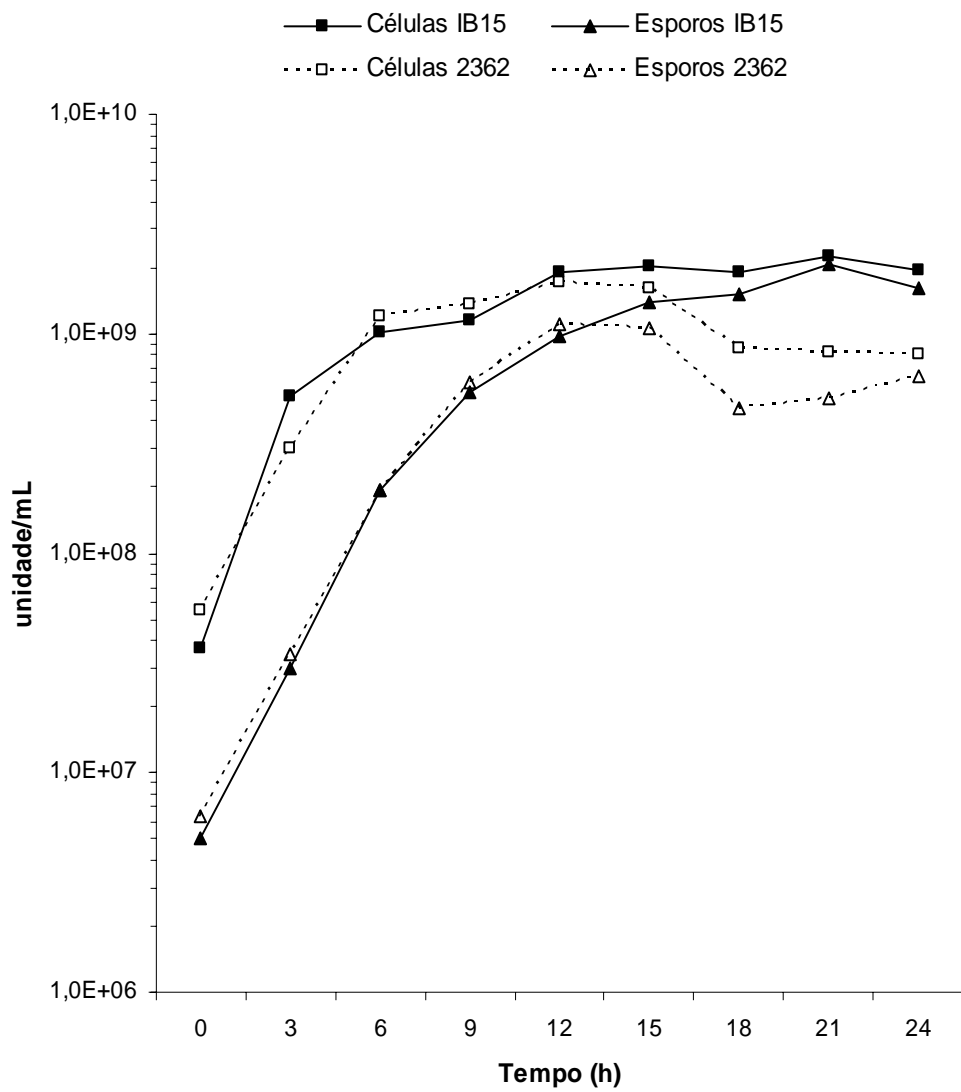


Figura 18. Curva de crescimento celular e produção de esporos de *B. sphaericus* IB15 e 2362 em meio NYSM a 30°C e 200rpm.

III.4.2 pH

Os valores médios do pH do meio de cultura, medidos durante o crescimento microbiano para as duas estirpes de *B. sphaericus* estão representados graficamente na Figura 19. Inicialmente, o valor do pH do meio de cultura mais o inóculo, estavam em torno de 7,0 para IB15 e de 7,11 para 2362. Ao longo da fermentação, o pH foi aumentando gradativamente, chegando ao final de 24 horas de cultivo, a valores de 8,51 e 8,32, respectivamente.

III.4.3 BIOMASSA

Os resultados do crescimento de IB15 e 2362 em biomassa seca, monitoradas a cada três horas ao longo de 24 horas, podem ser visualizados na Figura 20. Observou-se que após quatro ensaios realizados, os valores médios para a estirpe IB15 variaram de 0,14g.L⁻¹ no tempo zero, atingindo o máximo em 12 horas com 1,77g.L⁻¹ e 1,32g.L⁻¹ em 24 horas. Com a 2362, a massa inicial foi de 0,17g.L⁻¹, aumentando até 2,0g.L⁻¹ em 21 horas e ao final do crescimento 1,77g.L⁻¹. Comparando o crescimento em massa das duas estirpes, esses valores não diferiram estatisticamente entre si (P>0,05).

III.4.4 PARÂMETROS DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Na Tabela 16, constam os resultados dos parâmetros de crescimento microbiano de *B. sphaericus* IB15 e 2362 cultivadas em meio NYSM. O tempo médio de geração em células e biomassa seca obtido nos ensaios com IB15 foi menor que o observado com a estirpe 2362. Quanto à velocidade de crescimento celular, produção de esporos e biomassa seca, os resultados apontam semelhança entre as duas estirpes.

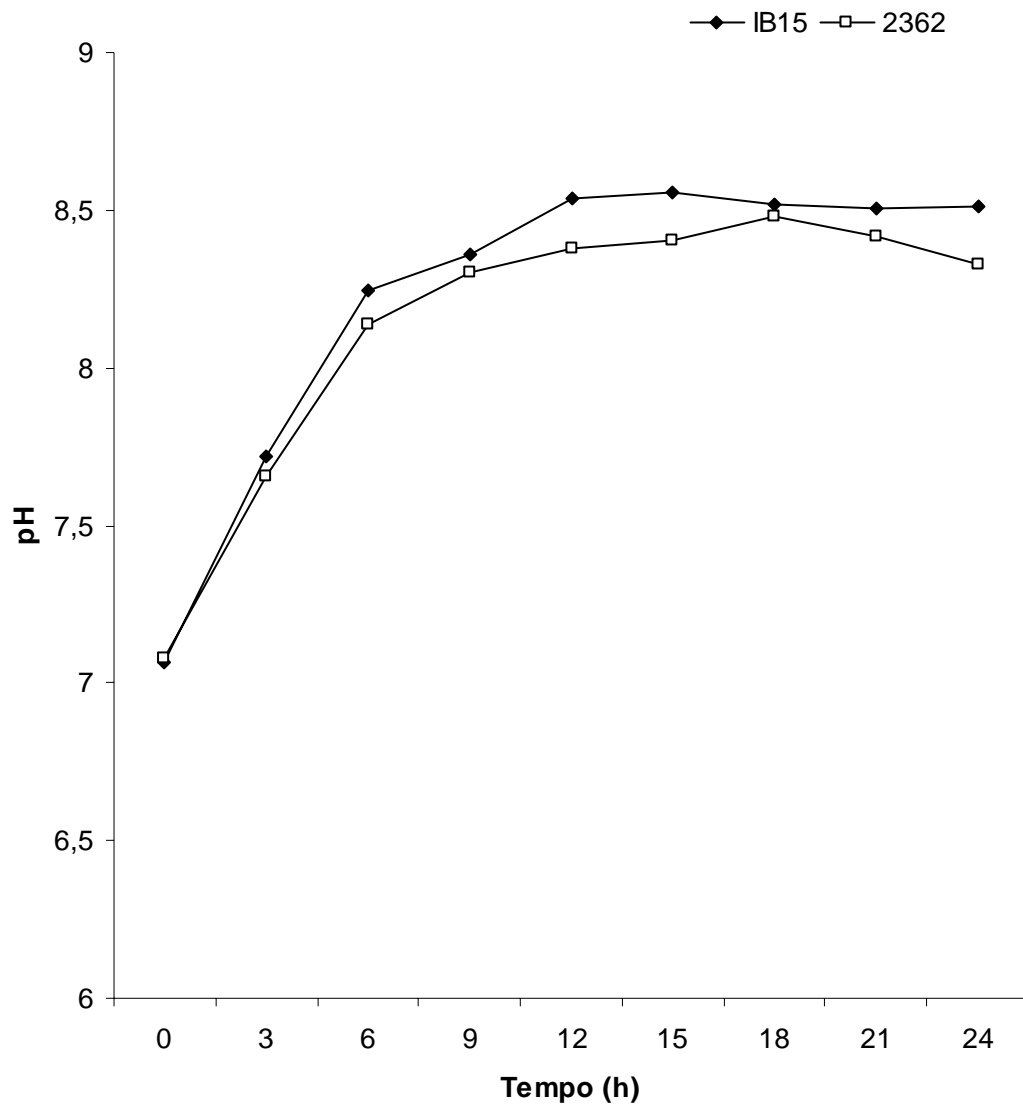


Figura 19. Valores de pH medidos ao longo da fermentação de *B. sphaericus* IB15 e 2362, em meio NYSM a 30°C e 200rpm.

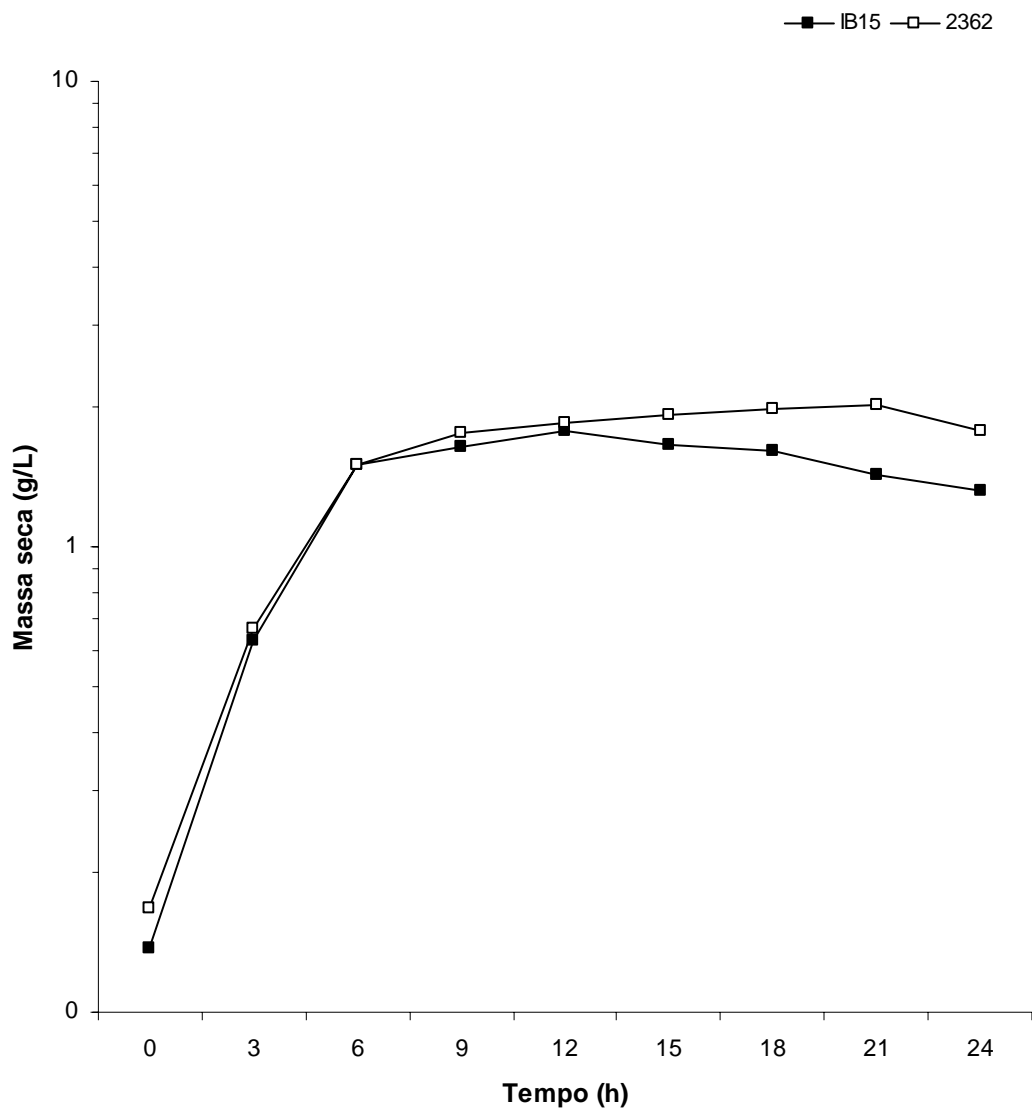


Figura 20. Biomassa produzida durante o crescimento microbiano de *B. sphaericus* IB15 e 2362, em meio NYSM a 30°C e 200rpm.

Considerando o final do tempo de fermentação, IB15 apresentou maior produtividade de células e esporos ($8,07 \times 10^7$ e $6,69 \times 10^7$ un.mL⁻¹.h⁻¹, respectivamente) em relação ao observado para a estirpe padrão 2362 ($3,39 \times 10^7$ e $2,69 \times 10^7$ un.mL⁻¹.h⁻¹). Em biomassa, a produtividade de 2362 foi significativamente menor que em IB15.

III.4.5 ATIVIDADE LARVICIDA

Os resultados da mortalidade observada nos bioensaios com larvas de *C. quinquefasciatus* estão representados na Figura 21. Os resultados com IB15 seguiram distribuição definida pela equação $y = -1,287x^2 + 25,269x - 20,833$ ($R^2 = 0,99$) e com a estirpe 2362 por $y = -1,2502x^2 + 28,04x - 26,424$ ($R^2 = 0,98$).

Os resultados dos bioensaios nos intervalos de crescimento, realizados a cada três horas, constam na Tabela 17. Para *B. sphaericus* IB15 o maior tempo de mortalidade das larvas foi observado com 12,5h nos bioensaios com o caldo de cultura no tempo zero ($5,08 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹), diminuindo no tempo de morte das larvas para 10,5 horas nos bioensaios usando meio de cultura com três horas de cultivo ($3,01 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹) e assim sucessivamente ao longo dos demais bioensaios, até obtenção do TL50 de 2,4 horas no bioensaio em 24horas ($1,61 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹).

Com a 2362, o TL50 observado no bioensaio no tempo zero foi de 14,7 horas ($6,28 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹), diminuindo ao longo do processo de fermentação até o final com TL50 observado de 2,3 horas com 24h ($6,46 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹).

Tabela 16. Parâmetros do crescimento microbiano de *B. sphaericus* IB15 e 2362 cultivados em meio NYSM.

PARÂMETRO	IB15	2362	F	P
Tempo médio de geração em células (min.) ± DP	75,81 ± 10,38	81,0 ± 21,30	0,19	0,68
Tempo médio de geração em massa (min.) ± DP	103,33 ± 48,60	107,25 ± 41,60	0,02	0,91
Velocidade de crescimento em células (células.h ⁻¹) ± DP	0,37 ± 0,05	0,37 ± 0,130	0,00	0,97
Velocidade de crescimento em esporos (esporos.h ⁻¹) ± DP	0,40 ± 0,03	0,41 ± 0,149	0,01	0,94
Velocidade de crescimento em massa (g.l ⁻¹ .h ⁻¹) ± DP	0,31 ± 0,13	0,29 ± 0,11	0,06	0,81
Prudutividade em células (células.mL ⁻¹ .h ⁻¹) ± DP	8,07x10 ⁷ ± 4,60	3,39x10 ⁷ ± 0,12	4,15	0,08
Prudutividade em esporos (esporos.mL ⁻¹ .h ⁻¹) ± DP	6,69x10 ⁷ ± 3,44	2,69x10 ⁷ ± 0,57	5,21	0,06
Prudutividade em massa (g.l ⁻¹ .h ⁻¹) ± DP	0,07 ± 0,005	0,06 ± 0,010	12,00	0,01*

*Estatisticamente significativo (P<0,05).

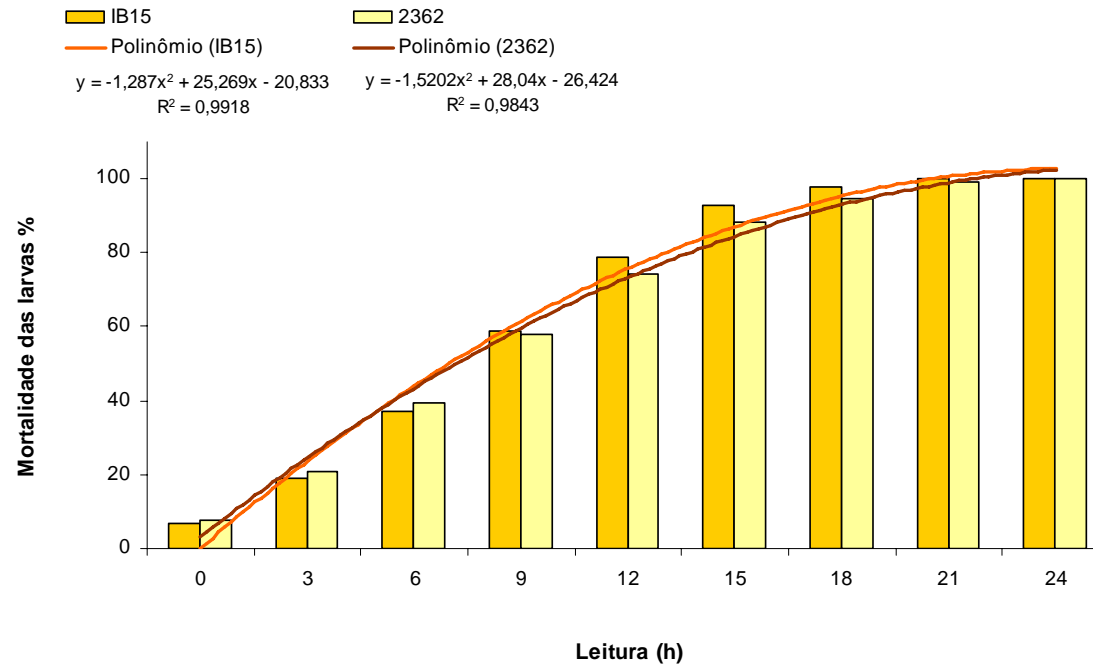


Figura 21. Mortalidade nas larvas de *C. quinquefasciatus* em bioensaios realizados durante o crescimento microbiano de IB15 e 2362.

Tabela 17. Tempo letal mediano nos bioensaios com *C. quinquefasciatus* durante o crescimento microbiano de *B. sphaericus* IB15 e 2362.

FERMENTAÇÃO (h)	TL50 (h)	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO	R ²
IB15			
0	12,5	$y = 1,20 + 0,0051x$	0,951
3	10,5	$y = 1,71 + 0,0050x$	0,963
6	9,8	$y = 2,07 + 0,0052x$	0,962
9	9,3	$y = 2,72 + 0,0045x$	0,933
12	6,8	$y = 3,15 + 0,0050x$	0,901
15	6,0	$y = 3,65 + 0,0042x$	0,915
18	5,7	$y = 3,61 + 0,0042x$	0,912
21	3,9	$y = 4,54 + 0,0036x$	0,832
24	2,4	$y = 5,32 + 0,0031x$	0,705
2362			
0	14,7	$y = 1,30 + 0,268x$	0,951
3	11,3	$y = 1,63 + 0,295x$	0,949
6	10,8	$y = 1,59 + 0,308x$	0,973
9	9,3	$y = 2,71 + 0,252x$	0,971
12	9,5	$y = 3,14 + 0,230x$	0,956
15	9,2	$y = 3,78 + 0,228x$	0,959
18	4,8	$y = 3,90 + 0,236x$	0,913
21	3,0	$y = 4,33 + 0,216x$	0,909
24	2,3	$y = 5,41 + 0,181x$	0,700

III.5 DISCUSSÃO

III.5.1 PRODUÇÃO DE CÉLULAS E ESPOROS

O meio NYSM, que apresenta em sua composição extrato de levedura e peptona de carne é um ótimo meio de cultura para o *B. sphaericus*, uma vez que essa espécie não utiliza carboidratos como fonte de carbono e requer meios proteínáceos para crescimento (DAVIDSON 1985).

Durante a fermentação de *B. sphaericus* IB15 e 2362 em meio NYSM, foram observados perfis semelhantes na produção de células totais, com maior incremento nas primeiras seis horas. A máxima produção ocorreu entre 15 e 18 horas para ambas as estirpes, com aparente estabilização e decréscimo até o término da fermentação em 24 horas.

Como a toxina binária é produzida durante a esporulação, torna-se relevante verificar essa característica entre os novos isolados de *B. sphaericus*, pois é um dos fatores que desperta o interesse industrial na produção de bioinseticidas. A quantidade final de esporos obtida com *B. sphaericus* IB15 foi de $1,61 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹, com taxa de esporulação de 82,84%, e de $6,46 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹ com a estirpe 2362, correspondente a 79,46% de esporos produzidos, porém sem diferença significativa quando comparadas as duas estirpes ao longo do processo de fermentação.

A eficiência de crescimento e esporulação em *B. sphaericus* cultivados em meios complexos confirma prévias observações sobre a eficácia na produção de toxinas inseticidas (WALLIS & YOSTEN 1978). Em meio NYSM, GERMANI (1993) obteve com *B. sphaericus* S2 a produção final de $5,37 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ e $5,90 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ com a padrão 2362. VILARINHOS *et al.* (1996) obtiveram 17×10^9 esporos.mg⁻¹ para S2 cultivadas em meio MBS a base de triptona (KALFON *et al.*, 1983).

A esporulação em bactérias é um mecanismo para sobrevivência em condições

adversas (CORREA & YOUSTEN 1995). No caso de estirpes patogênicas de *B. sphaericus* como os cristais da toxina binária são sintetizados no início da formação dos esporos (HOLT *et al.* 1975, CHARLES & NICOLAS 1986), existe o interesse biotecnológico em indutores de esporulação, como forma de obtenção de toxinas inseticidas em grande escala (DIAS 1992, LUNA 2003). O emprego de fatores estressantes combinados na produção de *B. thuringiensis*, por meio de choque térmico e a adição de NaCl ao meio de cultura, resultaram em melhoria de até 66% na síntese de toxina e economia na produção do bioinseticida em cerca de 30% (GHRIBI *et al.* 2004).

III.5.2 pH

Variações no pH do meio de cultura durante a fermentação dependem da concentração dos reagentes químicos que fazem parte da sua formulação e dos metabólitos produzidos durante a fermentação.

Apesar de não ter sido controlado ao longo da fermentação, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados de pH medidos para *B. sphaericus* IB15 e 2362, as quais demonstram apresentar metabolismo semelhante. No início os valores estavam na faixa da neutralidade, com rápido aumento nas seis primeiras horas, correspondente à fase exponencial do crescimento. Verificou-se estabilização por volta da 15ª hora, com aparente decréscimo até o final da fermentação. A alcalinização do meio foi devido ao consumo da proteína e aumento na concentração de amônia excretada. Porém, não foi verificado se a alcalinização é o fator determinante no aumento de esporos produzidos ou se é devido à exaustão dos nutrientes no meio de cultura.

Não foram observadas alterações significativas na atividade larvicida de *B. sphaericus* IB15 e 2362 em *C. quinquefasciatus* relacionadas às mudanças de pH ao longo da fermentação. A resistência das toxinas de *B. sphaericus* em meios adversos inclusive mudanças de pH é atribuída à presença do exósporo que protege as toxinas de degradações

químicas (CHANG *et al.* 1990). Outros aspectos da atividade larvicida de *B. sphaericus* IB15 serão abordados mais adiante no item 3.5.4.

O controle de pH durante a produção de bioinseticidas é importante, ainda, nas etapas de separação dos esporos, pois a principal dificuldade de recuperação tais suspensões biológicas consiste no fato de possuírem pequena dimensão, baixa densidade e estarem presentes em baixas concentrações no meio de cultura (RIOS 1998). A floculação é uma alternativa que permite a conversão de esporos individuais em grandes agregados e, com isso, maior facilidade de recuperação em escala industrial. A influência do pH e a hidrofobicidade na eficiência de floculação em *B. sphaericus* foram investigadas por LUNA *et al.* (2001). RIOS *et al.* (1997) relatam a eficiência de recuperação em até 99% nas culturas de *B. sphaericus* com pH ajustado para 5 e 9, sem perda na atividade larvicida em testes com *C. quinquefasciatus*.

III.5.3 BIOMASSA

A biomassa obtida ao final da fermentação e os custos devem ser considerados para uma produção em grande escala, pois são fatores que tornam viáveis os investimentos em bioinseticidas (DIAS 1992).

Nos experimentos realizados, o período de maior incremento em biomassa ocorreu entre zero e seis horas. A máxima produção para *B. sphaericus* 2362 foi observada com 21 horas de crescimento com biomassa igual a $2,1\text{g.L}^{-1}$ e em *B. sphaericus* IB15, a máxima produção ocorreu com 12 horas de fermentação obtendo-se $1,77\text{g.L}^{-1}$.

Comparando os resultados dos parâmetros da produção de biomassa em termos de parâmetros de tempo de geração e velocidade de crescimento observou-se que a estirpe IB15 apresentou um crescimento mais rápido que a 2362, porém sem diferenças significativas na contagem de células, esporos e em gramas de massa seca produzidas durante a fermentação.

Além da busca por estirpes com alta atividade larvicida e com potencial para uso em formulações, é imprescindível, ainda, selecionar matérias-primas de baixo custo que propiciem a produção em grande escala e preservem as características tóxicas do bacilo, pois o elevado gasto na produção industrial em *B. sphaericus* é um dos principais fatores que geram obstáculos ao investimento em bioinseticidas (DIAS 1992, MORAES *et al.* 2001).

A produção de *B. sphaericus* em meios de cultura alternativos foi realizada por GERMANI (1993) com o uso de meios formulados à base de soro de queijo, farinha de peixe e proteína de soja. RORBERG (2000) estudou a produção de *B. sphaericus* em meio de resíduos das indústrias de cerveja.

Existe, portanto, a possibilidade de aproveitamento de subprodutos e resíduos de agroindústrias como substratos na produção de bioinseticidas e, respeitadas as limitações nutricionais de *B. sphaericus*, até com produção regionalizada em função da disponibilidade de matérias-primas.

III.5.4 TEMPO LETAL MEDIANO

A toxicidade das estirpes IB15 e 2362 em larvas de *C. quinquefasciatus*, aqui avaliada pelo critério de tempo letal mediano, confirmam a sensibilidade dessa espécie de mosquito ao *B. sphaericus*, já descrita por LACEY & SINGER (1982), MULLA *et al.* (1986). Os resultados obtidos nos experimentos foram equivalentes entre si.

Os valores de TL50 de *B. sphaericus* IB15 e 2362 demonstraram forte correlação entre o intervalo de fermentação e o tempo de mortalidade nas larvas. Porém, quando foi analisada a correlação entre número de esporos/tempo de fermentação e a mortalidade das larvas, esta não se ajustou a um modelo linear, pois a produção de esporos não é contínua.

Poucos são os trabalhos de avaliação larvicida por meio de tempo letal mediano no controle de mosquitos, o que permite pouca comparação. ANDRADE & MODOLO

(1991) avaliaram a eficiência do controle integrado de larvicidas biológico e químico em larvas de *A. aegypti*. Esses autores obtiveram TL50 de 6,2h com *B. thuringiensis* e 4,3h com Temephós. O tempo letal médio com a mistura dos dois inseticidas foi de 3,2h.

4 CONCLUSÕES

4.1 Capítulo I

- Foi observada atividade larvicida em todas as vinte estirpes de *B. sphaericus* da Amazônia, porém em níveis diferenciados de toxicidade.
- Entre as espécies-alvo (mosquito), a maior sensibilidade foi detectada entre as larvas de *C. quinquefasciatus*.
- Foi verificado um potencial biotecnológico com estirpes IB15, IB19, S1116 e IB16, com base nos resultados da atividade larvicida nos bioensaios com *A. darlingi* e *C. quinquefasciatus*.
- Em relação à estirpe padrão 2362 nos testes com *A. darlingi*, foi verificada potência superior nas estirpes IB15, IB19, S1116 e IB16, sendo a IB15 cerca de 50% mais potente. Nos bioensaios contra o *C. quinquefasciatus*, maior potência em relação à padrão foi verificada em 17 estirpes, com destaque para IB16, S1116, S265, IB19 que apresentaram potência entre 300-400% superior.

4.2 CAPÍTULO II

- Os oligonucleotídeos BinB-F e BinA-R descritos neste trabalho, mostraram eficiência para diagnóstico molecular conjunto dos genes da toxina binária (BinB e BinA) de *B. sphaericus* e este foi observado em 100% das estirpes procedentes de diversas localidades da Amazônia;
- O gene da toxina mosquitocida MTX1 foi verificado em 83% das estirpes estudadas, distribuído de forma aleatória entre isolados com alta, média e baixa toxicidade em larvas de *A. darlingi*;
- Foram evidenciados 23 sítios polimórficos nas sequências de 393 nucleotídeos do gene da toxina BinA, porém apenas quatro foram informativos para análise de parcimônia (nt28, nt332, nt333 e nt356);
- Foi verificado uma baixa distância genética média entre as estirpes de *B. sphaericus* (média de 1,2%). A maior distância genética foi observada entre as estirpes BSP224478 (2297) e IB12 com 7,1%.
- Foi encontrada uma alta variabilidade genética nas estirpes amazônicas sendo descritos nove tipos variantes (além dos quatro pré-existentes).
- Não houve correlação entre distância genética, variabilidade nucleotídica/aminocídica e/ou procedência, com a toxicidade das estirpes.

4.3 CAPÍTULO III

- Dentre as estirpes amazônicas analisadas, a IB15, considerada a mais promissora, apresentou resposta de crescimento, produção de células, esporos, variação de pH do meio, concentração de biomassa e TL50 muito similar à estirpe padrão comercial 2362. Isso demonstra o potencial biotecnológico para produção dessa estirpe local como inseticida biológico para uso em programas de controle de vetores na Amazônia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES SB. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª Ed., Piracicaba: FEALQ, 1163p, 1998.

ALVES LFA, ALVES SB, LOPES RB, AUGUSTO NT. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes temperaturas. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 1, p. 21–26. 2001.

ANDRADE CFS, MODOLO M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Rev. Saude publ. São Paulo*, v. 25, n. 3, p. 184 -187. 1991.

AQUINO-DE-MURO M, MITCHELL WJ, PRIEST FG. Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol*, v. 138, p. 1159-1166. 1992.

BARLOY F, Delécluse A, Nicolas L, Lecadet MM. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J Bacteriol.*, v. 78, n. 11, p. 3099–3105. 1996.

BAUMANN L. BROADWELL AH, BAUMANN P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding the 51.4- abd 49.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.*, v. 170, p. 2045-2050. 1989.

BAUMANN L & BAUMANN P. Effects of components of the *Bacillus sphaericus* toxin on mosquito larvae and mosquito-derived tissue culture-grown cells. *Curr. Microbiol.*, v. 23, p. 51-57. 1991.

BAUMANN P, CLARK MA, BAUMANN L, BROADWELL AH. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxin. *Microbiol. Rev*, v. 55, p.425–436, 1991.

BECKER N. Microbial control of mosquitoes: management of the upper Rhine mosquito population as a model programme. *Parasitology Today*, v. 13, n. 12, p. 485–487. 1997.

BECKER N. Implementation and integration of mosquito control measures into routine treatments and resistance management. *Simpósio satellite – mosquito vetores de doenças tropicais e controle biológico*. Proceedings, 25p. 2003.

BERRY C, JACKSON-YAP J, OEI C, HINDLEY J. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: Sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. *Nucleic Acids Res*, v. 17, p. 7616. 1989.

BERRY C, HINDLEY J, EHRHARDT AF, GROUNDS T, DE SOUZA I, DAVIDSON EW. Genetic determinants of the host range of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. *J. Bacteriol*, v. 175, p. 510–518. 1993.

BERTI-FILHO E. *Controle biológico de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 80p. 1999.

BERTI J, ZIMMERMAN R. Métodos para control integrado de los vectores de la malaria en Venezuela. *Bol Dir Malariol San Amb*, v. 38, n.2, p.123-136. 1998.

BHUMIRATANA A. Local production of *Bacillus sphaericus*. In: de BARJAC H, SUTHERLAND DJ (Ed.) *Bacterial control of mosquitoes and blackflies*. New Brunswick: Rutgers University Press. p.272-283. 1990.

BISHOP A. *Bacillus tyhuringiensis* insecticides. In: *Applications and systems of Bacillus and relatives*. Edited by. R. Berkeley. Blackwell Science Inc. Malden Mass. p. 160-175. 2002.

BLANCO-CASTRO S, MARTINEZ A, CANO O, TELLO R, MENDOZA I. 2000. Introducción de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 (GRISELESF) para el control biológico de vectores maláricos en Guatemala. *Rev Cubana Med Trop* 2000. 52(1):37- 43.

BOSGELMEZ A, CAKMAKCI L, YÖRÜKAN S, BOR NM, ÖZER N, ALTEN B, GÜRKAN B, KOÇAK O, KARAYALCIN O, GURKAN F, ALTEN E. Safety tests on mice and Guinea-pigs with *Bacillus sphaericus* isolate. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, v. 2, n. 4, p. 264–271. 1989.

BROADWELL AH, BAUMANN L, BAUMANN P. Larvicidal and properties of the 42

and 51 kilodalton *Bacillus sphaericus* proteins expressed in different bacterial hosts: evidence for a binary toxin. *Current Microbiol.*, v. 21, p. 361 – 366. 1990.

CAPALBO MF, VACILENTE FH, MORAES IO, PELIZER LH. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in maize. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2. 2001.

CASTRO J, GARCÍA I, NEYDRA D. Eficacia del *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales de mosquitos en zonas de alto riesgo de malaria en Perú. *Rev Peruana Epidem*, v. 9, n. 2, p.1-8. 1996.

CHANG MS, HO BC, CHAN KL. Simulated field studies with three formulations of *Bacillus thuringiensis var israelensis* and *Bacillus sphaericus* against larvae of *Mansonia bonneae* (Diptera: Culicidae) in Sarawak, Malaysia. *Bull. Entomol. Res.*, v. 80, p. 195-205. 1990.

CHARLES J-F, NICOLAS L. Recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 in mosquito larvae: a laboratory study. *Ann Inst Pasteur/Microbiol.*, v. 137B, p. 101-111. 1986.

CHARLES J-F, NIELSEN-LEROUX C, DELÉCLUSE A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 41, p. 451-472. 1996.

CHARLES J-F, SILVA-FILHA MH, NIELSEN-LEROUX C, HUMPHREYS MJ, BERRY C. Binding of the 51 – and 42-kDa individual components from the *Bacillus*

sphaericus cristal toxin to mosquito larval midgut membranas from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 156, p. 153-159. 1997.

CLAUS D, BERKELEY RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: P.H.A. SNEATH, N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 1105-1139. 1986.

CONSOLI RAGB, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA RL. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, FIOCRUZ. 228p., 1994.

CONSOLI RAGB, SANTOS BS, LAMOUNIER MA, SECUNDINO NFC, RABINOVITCH L, SILVA CMB, ALVES RSA, CARNEIRO NFF. Efficacy of a new formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 571–573. 1997.

CORREA M, YOUSTEN AA. *Bacillus sphaericus* spore germination and recycling in mosquito larval cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 66, p. 76–81, 1995.

COUCH TL. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: JF Charles, A Delécluse, C Nielsen-LeRoux. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 297-314. 2000.

CRICKMORE N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://epunix.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. 2003.

D'AMATO C, TORRES JPM, MALM O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quim. Nova*, v. 25, n. 6, p. 995–1002. 2002.

DARBOUX I, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F, PAURON D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 31, p. 981-990. 2001.

DAVIDSON EW. Biochemistry and mode of action of the *Bacillus sphaericus* toxins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 90, p. 81-86. 1985.

DAVIDSON EW. Variation on binding of *Bacillus sphaericus* toxin and Wheat Germ Agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. *J. Inv Pathol*, v. 53, p. 251-259. 1989.

DAVIDSON EW, OEI C, MEYER M, BIEBER AL, HINDLEY J, BERRY C. Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin to cultured insect cells. *Can. J. Microbiol.*, v. 33, p. 982-989. 1990.

DAVIDSON EW. Biochemistry and mode of action of the *Bacillus sphaericus* toxins. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 81-86. 1995.

De BARJAC H. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H., *Microbial control of pests and plants diseases 1970-1980*, p. 35-43 Academic Press London, 1980.

De BARJAC H, DUMANOIR VC, HARMON S, THIERRY, I. *Safety tests on mice with Bacillus sphaericus serotype H-5a,5b, strain 2362*. WHO/VBC/87. 948p Geneva. 1987.

De MAAGD RA, BRAVO A, BERRY C, CRICKMORE N, SCHNEPF HE. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, v. 37, p. 409-433. 2003.

DIAS JMCS. Produção e utilização de biolarvicida bacteriano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 59–76. 1992.

DULMAGE HT, YOUSTEN AA, SINGER S, LACEY LA. *Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, Geneva. 59 p, 1990.

DULMAGE HT. Developments of isolates of *Bacillus thuringiensis* and similar aerobic microbes for use in developing countries. *In*: SALAMA HS, MORRIS ON and RACHED E. eds. The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries. Cairo, National Research Center and IDRC, Egypt., p.15-42. 1993.

ELANGOVA N G, SHANMUGAVALU M, RAJAMOHA N F, DEAN DH, JAYARAMAN K. Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593 by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys. Res.*

Commun., v. 276, p. 1048-1055. 2000.

ELLIS RT, STOCKHOFF BA, STAMP L, SCHNEPF HE, SCHWAB GE. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corns rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 1137-1145. 2002.

FEDERICI BA. The future of microbial insecticides as vector control agents. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, v. 11, n. 2, p. 260 – 268. 1995.

FINNEY DJ. *Probit analysis*. 3 ed. S. Chand & Company Ltd, Ram Nagar, New Delhi. 333p, 1981.

FONTES EMG. Controle biológico: um desafio para o país. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 27, p. 1– 4. 1992.

FOWLER H, DI ROMAGNANO LFT. Ecological bases for biological control. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 5–13. 1992.

GERMANI JC. Estudos de produção de *Bacillus sphaericus* S2 com matérias-primas regionais e de avaliação da atividade larvicida. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 182 p. 1993.

GOLDBERG LJ, MARGALIT J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity

against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, v. 37, p. 355-358. 1977.

GHRIBI D, ZOUARI N, JAOUA S. Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. *J. Appl. Microbiol.*, v. 98, p. 823-831. 2004.

HABIB MEM. Utilização de bactérias no controle de dípteras de importância médica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 84, n 3, p. 31-34. 1989.

HABIB MEM, ANDRADE CFS. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. 1986. *Controle Microbiano de Insetos*. Editora Manole Ltda, São Paulo, p. 127-163. 1986.

HABIB MEM. Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against some aquatic dipterous insects. *Z. ang. Entomol.*, v. 95, p. 368-376. 1983.

HABIB MEM, ANDRADE CFS. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, SB. Controle microbiano de insetos. 2^o ed. Editora FEALQ, Piracicaba, p. 383-432, p.1998.

HADDAD ML. Utilização do POLO-PC para análise de Probit, p. 999-1013. In: Alves, SB. *Controle microbiano de insetos*. 2^o ed. Editora FEALQ, Piracicaba, p. 999-1014. 1998.

HALL TA. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98. 1999.

HOLT SC, GAUTHIER JJ, TIPPER DJ. Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.*, v. 122, p. 1322-1338. 1975.

HORNBY JA, HERTLEIN BC, LEVY R, MILLER JR TW. Persistent activity of mosquito larvicidal *Bacillus sphaericus* 1593 in fresh water and sewage. WHO/VBC/81.830, Geneva. 1981.

HOUGARD JM, BACK C. Perspectives on the bacteriological control of vectors in the tropics. *Parasitol Today*, v. 8, p. 364-366. 1992.

HUMPHREYS M, BERRY C. Variants of the *Bacillus sphaericus* binary toxins: implications for differential toxicity of strains. *Journal of Inv. Pathol.*, v. 71, p. 184-185, 1998.

KALFON A, LARGET-THIÉRY, CHARLES J-F, De BARJAC H. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 18, p. 168-173. 1983.

KELLEN WR, MEYERS CM. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 7, p. 442-448. 1964.

KELLEN WR, CLARK TB, LINDEGREN JE, HO BC, ROGOFF MH, SINGER S. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Journ. Invertebr. Pathol.*, v. 7, p.

444 – 448, 1965.

KRIEG A, LANGENBRUCH GA. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H.D. (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London : Academic, 1981. p.837-896.

KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163. 2004.

KRYCH VK, JOHNSON JL, YOSTEN AA. Deoxyribonucleic acid homologies among strains *Bacillus sphaericus*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, v. 30, p. 476-484. 1980.

LACEY LA, SINGER S. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against Anopheline and Culicine mosquitoes. *Mosq. News*, v. 42, n. 4, p. 537-543, 1982.

LACEY LA, ORR BK. The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 50, n. 6, p. 97–115, 1994.

LAMPE KR. Molecular systematics of entomopathogenic bacteria *Bacillus popilliae*, *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus sphaericus*. Tese de Doutorado, Backsburg, Virgínia, 114p. 1998.

LITAIFF EC, RODRIGUES IB, TADEI WP, DIAS JMCS. 2000. Avaliação da atividade

larvicida de diferentes estirpes brasileiras de *B. sphaericus* contra *A. nuneztovari*. XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia (Resumos), p. 283. 2000.

LITAIFF EC. Controle da malária: isolamento, caracterização molecular e avaliação da atividade larvicida contra *Anopheles darlingi* e *Anopheles nuneztovari*, de estirpes de *Bacillus sphaericus*. Dissertação de Mestrado. INPA/UFAM, Manaus, 89p, 2002.

LITAIFF EC, TADEI WP. SELEÇÃO DE *Bacillus sphaericus* DA AMAZÔNIA COMO POTENCIAIS AGENTES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE MOSQUITOS. 3º Simpósio: vetores, viroses emergentes, controle biológico e biotecnologia, Manaus, AM. 3o Simpósio: vetores, viroses emergentes, controle biológico e biotecnologia, 2005.

LIU JW, HINDLEY J, PORTER AG, PRIEST FG. New high-toxicity mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* lacking a 100-Kilodalton toxin gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p. 3470–3473. 1993.

LIU JW, PORTER AG, WEE BY, THANABALU T. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton moquitocidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 2174-2176. 1996.

LUNA CL, LOPES CE, MASSARANI G. Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 25, p. 213-216. 2003.

LUNA CL, RIOS EMM, LOPES CE. On the settling of *Bacillus sphaericus* spore by pH

adjustment. *Biotechnol Lett*, v. 23, p. 1011-1013. 2001.

MERCAN N, ÇÖKMÜŞ, C. Discrimination of *Bacillus sphaericus* strains by filtrate preotein profiles. *African Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 5, p. 281-283. 2004

MIURA T, TAKAHASHI RM, MULLIGAN FS. Effects of the bacterial mosquito larvicide, *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on selected aquatic organisms. *Mosq News*, v. 40, p. 619-622. 1980.

MONNERAT R, SILVA SF, DIAS DS, MARTINS ES, PRAÇA LB, JONES GW, SOARES CM, DIAS JMCS, BERRY C. Screening of brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. 2004. *JEN.*, v. 128, n. 7, p. 469-473. 2004.

MORAES IO, CAPALPO DMF. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S. B. *Controle microbiano de insetos*. Ed. Manole, São Paulo, p. 297 – 309, 1986.

MORAES IO, CAPALPO DMF, ARRUDA ROM. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial*. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.

MORAES FP, SANTOS MAVM, REGIS L, RIOS EMM. Development of a *Bacillus sphaericus* tablet formulation and its evaluation as a larvicide in the biological control of *Culex quinquefasciatus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 4, p. 431-434. 2005.

MULLA MSK, DARWAZEH HA, DAVIDSON EW, DULMAGE HT, SINGER S. Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains mosquito larvae and their safety to nontarget organism. *Mosq. News*, v. 44, n. 3, p. 336-342. 1984.

MULLA MS, DARWAZEH HÁ, ALY C. Laboratory and field studies on new formulations of two microbial control agents against mosquitoes. *Bull Soc Vector Ecol.*, v. 11, p. 255-263. 1986.

MULLA MS. Activity, field efficacy and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. In: de BARJAC H, SUTHERLAND DJ. *Bacteriol control of mosquitoes & black flies: biochemistry, genetics & applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick. p. 134-160. 1990.

MYERS P, YOUSTEN AA. Toxic activity of *Bacillus sphaericus* SSII-I for mosquito larvae. *Infect Immun.*, v. 19, p. 1047-1053. 1978.

NAKAMURA LK. Phylogeny of *Bacillus sphaericus*-like organisms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 1715-1722. 2000.

NAKAMURA LK, SHIDA O, TAKAGI H, KOMAGATA K. *Bacillus pycnus* sp. and *Bacillus neidei* sp., round-spored bacteria from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 52, p. 501–505. 2003.

NAVON A, *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects.

Crop protection, v. 19, n.8/10, p. 669-676. 2000.

NICOLAS L, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F, DÉLECLUSE A. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 106, p. 275-280. 1993.

NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin as a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur J. Biochem.*, v. 210, p. 585-590. 1992.

NOMURA E. Controle biológico de artrópodes urbanos. Rio Claro, 17p. 2003.

OLIVEIRA CD, RODRIGUES IB. Bioensaios de avaliação de estirpes brasileiras de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles nuneztovari* em condições de laboratório. X Jornada Científica PIBIC/INPA. Manaus, AM, p.190-193. 2001

OLIVEIRA CD. Análise da toxicidade, da sintomatologia e da histopatologia em larvas de *Culex* (Linnaeus 1758), *Anopheles* e *Aedes* (Meigen 1818) (Díptera: Culicidae) frente à ação de estirpes de *Bacillus sphaericus* (Neide 1904), em condições de laboratório. Dissertação de Mestrado. INPA/UFAM, Manaus, 125p, 2005.

OMS. Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. *Sér. Rapp. Techn.*, p. 443. 1970.

OMS. Bioassay method for the titration of *Bacillus sphaericus* preparations with RB80

standart. Informal consultations on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. WORLD HEALTH ORGANIZATION, TDR/BVC/SPHAERICUS/ 85.3. 24P.

OMS. Estrategia Mundial de la Lucha Contra el Paludismo. Conferencia Ministerial, Amsterdam: OMS. (Mimeo.). 1992.

OTSUKI K, GUAYCURUS TV, VICENTE ACP. *Bacillus sphaericus* entomocidal potential determined by polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 92, n. 1, p. 107-108, 1997.

PARTRIDGE MR, BERRY C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1toxin against *Choronomus riparus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 79, p. 135-136. 2002.

PETIT L, GIBERT M, GILLET D, LAURENT-WINTER C, BOUQUET P, POPOFF MR. *Clostridium perfringens* ϵ -toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J. Bacteriol.*, v. 179, p. 6480-6487.

PHAM C, RUBER E, CARD J, MONTGOMERY W. Investigating the effects of *Bacillus sphaericus* (Vectolex) on *Aedes* larvae and non-target organisms. *Northeast Mosquito Control Association*. 1988.

PIMENTAL D, ACQUAY H, BILTONEN M, RICE P, SILVA M, NELSON J, LIPNER V, GIORDANO S, HOWRITZ H, AMORE MD. Economic and environmental cost of pesticide used. *Bioscience*, v. 42, p. 750. 1992.

POLANCKYZIC RA. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). Tese de Doutorado. Piracicaba, 145p. 2004.

POOPATHI S, ANUP K, KABILAN L, SEKAR VAITHILINGAM. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *Israelensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n.3, p. 209-216. 1999.

POOPATHI S, KUMAR A, KABILAN L, SEKAR V. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. *World Journal of Microbiology*, v. 18, p. 209-216. 2002.

PORTER AG, DAVIDSON EW, LIU JW. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol Rev.*, 57, n. 4, p. 838–861. 1993.

PRIEST FG, AQUINO DE MURO M, KAJI D. Systematic of insect pathogenic bacilli: uses in strain identification and isolation of novel pathogens, p. 275 – 296. *In*: PRIEST, F.G.; RAMOS-CORMENZANA, A.; TINDALL, B.J. (ed.) *Bacterial diversity and systematics*. Plenum Press, New York, N.Y. 1994.

PRIEST FG, EBDRUP L, ZAHNER V, CARTER PE. Distribution and characterization of

mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 1195-1198. 1997.

REGIS L, SILVA-FILHA MHNL, OLIVEIRA CMF, RIOS EM, SILVA SB, FURTADO AF. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 115 – 120. 1995.

REGIS L, SILVA SB, MELO-SANTOS AV. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 95 p. 207-10. 2000.

REGIS L, SILVA-FILHA MH, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *TRENDS in parasitology*, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

REY L. *Parasitologia*, 2 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 1991.

RIOS EM. Recuperação de esporos de *Bacillus sphaericus* em meio fermentado. Tese de Doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro. 160p. 1997.

RORBERG RAP. Aproveitamento de resíduos Industriais para produção de Biomassa Entomopatogenica de *Bacillus sphaericus*. Dissertação de Mestrado, UFRJ, Rio de Janeiro,

120p. 2000.

RODRIGUES IB. Controle da malária: atividade larvívica de onze estirpes de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles braziliensis*. Dissertação de mestrado, INPA/UFAM, Manaus, AM. 95p. 1996.

RODRIGUES IB, TADEI WP, DIAS JMCS. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvívical activity against maláriol vetor species in Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, n. 93, v 4, p. 441-444. 1998.

RODRIGUES IB, TADEI WP, DIAS JMCS. Larvívical activity of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* and *Anopheles braziliensis* (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 41, n. 2, p. 101-105. 1999.

ROMÃO TPA, CHALEGRE KDM, KEY SG, AYRES CFJ, OLIVEIRA CMF, MELO-NETO OP, SILVA-FILHA MH. 9º Sompósio de Controle Biológico, Recife, 15 a 19 de maio,. 2005.

ROZEN S, SKALETISKY H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.*, v. 132, p. 365-86. 2000.

RUAS-NETO AL. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, como alternativa no controle de

simulídeos no Rio Grande do Sul. Susceptibilidade a campo. *B Saúde*, v. 11, p. 21-26. 1984.

RUAS-NETO AL, SILVEIRA SAM, COLARES ERAC. Mosquito control based on larvicides in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: choice of the control agent. *Cad. Saúde Públ.* v. 10, n. 2, p. 222 – 230. 1994.

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491. 1988.

SAITOU N, NEI M.. 1987 Jul;4(4):406-25. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *NJMol Biol Evol.*, v. 4, n. 4, p. 406-425. 1987.

SANCHES EG. Desenvolvimento de Bioinseticida Bacteriano Específico para o Controle do Vetor da Filariose. Dissertação de Mestrado. UFRJ, Rio de Janeiro, 130p. 2000.

SAMPAIO RTM, RODRIGUES IB, CÁUPER FRM, CASTRO L. Efeitos de *Bacillus sphaericus* 2362 contra entomofauna não alvo em criadouros de anofelinos no Amazonas. 10º Congresso Internacional PIATAM. Ambiente, homem e gás e petróleo. *Anais.* p. 272. 2005.

SAUME F, MALDONADO J. La deltametrina, una ativa fiable y polivalente en el control del vector de malaria, dengue y Chagas. *Segundo Simposium Latino Americano sobre*

Biología y Control de Vectores de Enfermedades en Humanos (Resumos). ROUSSEL, Estado Nueva Esparta, Venezuela. p. 1-5. 1993.

SCARPASSA VM, TADEI WP. Biología de anofelinos amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *A. nuneztovari*. *Acta amaz.*, v. 20, p. 95-118. 1990.

SCHENKEL RGM, NICOLAS L, FRACHON E, HAMON S. Characterization and toxicity to Mosquito Larvae of Four *Bacillus sphaericus* Strains Isolated from Brazilian Soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 60, p. 10-14. 1992.

SCHNEIDER H. *Métodos de análise filogenética*. Ribeirão Preto: Editora Holos, 108p. 2003.

SCHWARTZ J-L, POTVIN L, COUX F, CHARLES J-F, BERRY C, HUMPHREYS MJ, JONES AF, BERNHART I, DALLA SERRA M, MENESTRINA G. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. *J. Membrane Biol.*, v. 184, p. 171-183. 2001.

SHADDUCK JA. *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 Maximum Challenge and Eye Irritation Safety Tests in Mammals. WHO/BVC/80.763. 1980.

SIEGEL JP, SHADDUCK JA. Mammalian safety of *Bacillus sphaericus* in bacterial control of mosquitoes and black flies: biochemistry, genetics and applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*, pp 202-217. Editors: Barjac and

Sutherland. New Brunswick: Rutgers University Press. 1990.

SIEGEL JP. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis* - Based Insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 77, n. 1, p. 13-21. 2001.

SINGER, S. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. *Nature*, n. 224, p. 110-111. 1973.

SINGER, S. *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 22, p. 1335-1355. 1980.

SINGH GJP, GILL SS. An electron microscopic study of toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *Journ. Invert. Pathol.*, v. 52, p. 237-242. 1988.

SILVA, KRA, RABINOVITCH L, SELDIN L. Phenotypic and genetic diversity among *Bacillus sphaericus* isolated in Brazil, potentially useful as biological control agents against mosquito larvae. *Res. Microbiol*, v.150, p. 153-160. 1999.

SILVA SF, DIAS DGS, MARTINS ESM, SOARES CMS, DIAS JMCS, MONNERAT RG. Prospecção de estirpes de *Bacillus sphaericus* tóxicas contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/EMBRAPA*. p. 4-23. 2002.

SILVA-FILHA MH, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F Binding kinetics of *Bacillus*

sphaericus binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.*, v. 247, p. 754-761. 1997.

SILVA-FILHA MH, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F. Identification of the receptor of *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 29, p. 711-721. 1999.

SILVA-FILHA MH. Bactérias patógenas de vetores: modo de ação e resistência, vantagens e limites. 9º Sompósio de Controle Biológico, Recife, 15 a 19 de maio, p.70. 2005.

SILVEIRA AC. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brail. Organização Pan-Americana da Saúde, 120p. 2001.

SKOVAND O, BAUDUIN S. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African. *J Vector Ecol.* v. 22, p. :43-51. 1997.

SOUZA MT, LIMA MI, SILVA-WERNECK JO, DIAS JCS, RIBEIRO BM. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. *Biocell.*, v.23, p.43-49. 1999.

TADEI WP, SANTOS JMM, SCARPASSA VM, RODRIGUES IB. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira. In: FERREIRA, E.J.G.; SANTOS, G.M.; LEÃO,

E.L.M. & OLIVEIRA, L.A. (Eds) (1993) *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*, 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. p. 167-196, 1993.

TADEI WP. Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia. 7ª Reunião Especial da SBPC. *Anais/Resumos* (CD-ROM). Manaus: Sociedade Brasileira para o progresso da Ciência, 1-6. 2001.

TADEI WP, RODRIGUES IB. O controle biológico para anofelinos na Amazônia. Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Entomologia (CD-ROM). Manaus, AM, p. 1-6. 2002.

TAUIL LP. Problemas do controle da malária no Brasil. 7ª Reunião Nacional de Pesquisa em Malária (Resumos), Rio de Janeiro, 26 a 29 de Novembro, p. 31-32. 2000.

THANABALU T, HINDLEY J, JACKSON-YAP J, BERRY C. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 2776-2785. 1991.

THANABALU T, HINDLEY J, BERRY C. Proteolytic processing of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-I. *J. Bacteriol.*, v. 174, p. 5051-5056. 1992

THANABALU T, BERRY C, HINDLEY J, Cytotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-I: possible roles of the 27- and 70-kilodalton peptides. *J. Bacteriol.*, v. 175, p. 2314-2320. 1993.

THANABALU T, PORTER AG. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. *Gene*, v. 170, p. 85-89, 1996.

THOMAS WE, ELLAR DJ. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insects and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science*, v. 60. 181-197. 1983.

THOMPSON JD, GOUY M, HIGGINS DG, GIBSON TJ, JEANMOUGIN. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 23, n. 10, p. 403-405. 1998.

TRAVERS LR, MARTINS PAW, REICHELDERFER CF. Selective process for the efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 1362-1266. 1987.

VALADARES-INGLIS MCC, SHILER W, SOUZA MT. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v.1, p.201-230. 1998.

VILARINHOS PTR, SCHENKEL RGM, HONDA CS, DIAS JMCS. Comparação da potência larvicida de uma cepa de *Bacillus sphaericus* isolada no Distrito Federal com outros inseticidas. Anais I Simpósio Nacional de Controle Biológico (Resumos). CNPDA/EMBRAPA, p. 206. 1988.

VILARINHOS PTR, MARUNIAK JE, HALL DW. Characterization and biological activity of a brazilian isolate of *Bacillus sphaericus* (Neide) highly toxic to mosquito larvae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 6, p. 771-776. 1996.

WATI MR, THANABALU T, PORTER AG. Gene from tropical *Bacillus sphaericus* encoding a protease closely related subtilisins from Antarctic bacilli. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1352, p. 56-62. 1997.

WEISER, J. A mosquito-vilulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. *Zbl. Microbiol.*, v, 139, p. 57-60. 1984.

WICKREMESINGHE RS, MENDIS CI. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. *Mosq. News*, v. 40, p. 387-389. 1980.

WHO: Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: UNDP/World Bank/WHO special programme for rearch and training in tropical diseases (TDR). 1985.

WHO. Malaria. *Trends in Parasitology*. TRD, 1p. 2004.

WHO. Global malaria situation. www.who.Int/globalatlas/autorlogin/malaria_login.asp. 2005.

WOODBURN MA, YOUSTEN AA. Random amplified polymorphism DNA-fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*.

Int. J. Syst. Bacteriol., v. 45, p. 212-217. 1995.

YOUSTEN AA, De BARJAC H, HENDRICH J, DUMANOIR VC, MYERS P. Comparison between bacteriophage typing serotyping for the differentiation of *Bacillus sphaericus* strains. *Ann. Microbiol. (Inst Pasteur)*, v. 131B, p. 297-308. 1980.

YOUSTEN AA *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv Biotechnol Processes*. v.3, p. 315–343. 1984.

YOUSTEN AA, BENFIELD EF, CAMPBELL RP, FOSS SS, GENTHNER FJ. Fate of *Bacillus sphaericus* 2362 spores following ingestion by nontarget invertebrates. *J Invertebr Pathol*. v. 58, n. 3, p. :427-435. 1991.

YUAN Z, RANG C, MAROUN RC, JUÁREZ-PÉRES V, FRUTOS R, PASTEUR N, VENDRELY C, CHARLES J-F, NIELSEN-LEROUX C. Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal toxin. *Eur. J. Biochem.*, v. 268, p. 2751-2760. 2000

ZHANER V, RABINOVITCH L, CAVADOS CFG, MOMEN H. Multilocus enzymes electrophoresis on agarose gel as an aid to the identification of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* strains. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 76, p. 327–335. 1994.

ZHANG J, HODGMAN TC, KRIEGER L, SCHNETTER W, SCHAIRER HU. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*, *J Bacteriol.*, v. 179, n. 13, p. 4336-4341, 1997.