

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE LARVICIDA  
DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1911 DO AMAZONAS EM  
*Aedes aegypti* LINNAEUS 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)**

**JOELMA SOARES DA SILVA**

Manaus / Amazonas

Fevereiro / 2011

**JOELMA SOARES DA SILVA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE LARVICIDA  
DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1911 DO AMAZONAS EM  
*Aedes aegypti* LINNAEUS 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)**

**ORIENTADOR:** Dr. WANDERLI PEDRO TADEI

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional  
de Pesquisa da Amazônia como parte dos  
requisitos para obtenção do título de mestre  
em Entomologia.

Manaus/ Amazonas

Fevereiro/2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586 Silva, Joelma Soares da  
Isolamento, caracterização molecular e atividade larvicida de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 do Amazonas em *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae) / Joelma Soares da Silva. --- Manaus : [s.n.], 2011.  
xvii, 92f. : il. (algumas color.)  
  
Dissertação (Mestrado em Entomologia)--INPA, Manaus, 2011.  
  
Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei  
  
1.*Aedes aegypti* - Controle biológico 2.Dengue 3.*Bacillus thuringiensis* 3.Larvicidas I.Título

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

#### Sinopse:

No estado do Amazonas foram isoladas 57 estirpes de *Bacillus thuringiensis*, destas, cinco mostraram toxicidade às larvas de *Aedes aegypti*, Os isolados não apresentaram os genes das toxinas Cry 4Aa; 4Ba; 10Aa; 11Aa e 11Ba, com exceção da linhagem BtAM-27 que apresentou todos os genes analisados. Os dados da atividade larvicida dos isolados do Amazonas não foram superiores aos obtidos com a estirpe padrão *Bti* IPS-82, entretanto BtAM 27 mostrou toxicidade similar á esta, entre os isolados obtidos neste trabalho, IBt-07 e IBt-28 foram os mais tóxicos.

1. Dengue 2. Mosquito 3.Vetor 4. Controle Biológico 5. Bactéria

## **DEDICATÓRIA**

**À minha família (irmãos, primos e tios) pelo amor e carinho, em especial aos meus queridos pais: Teresinha Conceição e Francisco Soares (*in memoriam*) e as minhas avós (Maria Laura, Francisca e Augusta) que incondicionalmente sempre me apoiaram.**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que ele tem concedido na minha vida, pelos problemas e pela sabedoria em resolvê-los.

Ao curso de Pós-graduação de Entomologia, ao corpo docente, pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA) pela orientação, confiança e oportunidade, o que tornou possível a realização desse trabalho.

À rede Malária e a rede CTPetro pelo financiamento necessário para a realização do projeto.

Ao Dr. Ricardo Antonio Polanczyk (UNESP/Jaboticabal) e Dr<sup>a</sup> Eleiza Litaiff de Abreu pela relevante contribuição para a realização deste trabalho, ensinamentos e discussão que me fizeram crescer.

A Anilton Sousa Filho (*in memoriam*) pela concessão de material biológico.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, amor, carinho e compreensão. À minha família (irmãos, avós, tios e tias) pelo apoio e principalmente pela base familiar que sempre foi muito importante e me deu forças.

À Dr<sup>a</sup> Valéria Cristina Soares Pinheiro, por todo o incentivo, por ter me encaminhado para o mundo da ciência.

À Dr<sup>a</sup> Iléa pelo apoio e palavras de otimismo durante a realização do trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Caroline Dantas (pela ajuda), Hellen Mar (irmã manauara), Adriano Nobre, Augusto Ferreira, Rubem Thiago pelo companheirismo e principalmente pela paciência do convívio do dia-a-dia.

À estagiária Muana Araújo do Laboratório de Malária e Dengue, pela ajuda na realização dos bioensaios.

Ao Mestre Marcos Pessoa, pelos ensinamentos e pela ajuda que foi importante no início da realização desse trabalho.

Aos Colegas de curso da turma de Entomologia 2009, em especial Rafael Boldrini, Edgar Alvim, Priscila Dias e Raimundo Nonato.

À amiga Mery Jouse Holanda pelo companheirismo, amizade, palavras de apoio nas horas difíceis.

Ao Robson Sobral Lima pelo amor, carinho, força, paciência e pela compreensão da distância.

À equipe técnica do laboratório de Malária e Dengue do INPA, pelo auxílio na realização das coletas de solo, em especial Silvano Rocha, Antonio Francisco (catita), Elias Pacheco.

À Maria Adelina e Maria Zilá pela recepção em Manaus, carinho e apoio.

A Ricardo Passos, Elizabeth e Letícia Bridi pelo auxílio prestado e pela disposição em ajudar.

A equipe dos Laboratórios de Biologia e Criação de insetos (LBCI) e Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, UNESP/ Jaboticabal, São Paulo, em especial á Kelly, Cácia, Marina e Rafael, pela excelente hospitalidade, pela recepção em suas casas.

## **EPÍGRAFE**

**“ Você ganha forças, coragem e confiança a cada experiência em que você enfrenta o medo. Você tem que fazer exatamente aquilo que acha que não consegue”.**

**Eleonor Roosevelt**



## RESUMO

Atualmente, o dengue é um grave problema de saúde pública, especialmente no Amazonas, onde face o alto número de infectados e os óbitos confirmados em decorrência da doença vêm acentuando-se como uma epidemia. O controle do dengue exige múltiplas ações, que vão desde o diagnóstico precoce da doença, o tratamento adequado aos enfermos e o controle do mosquito vetor. Neste último aspecto, buscou-se investigar o controle biológico de *Aedes aegypti*, com o uso de *Bacillus thuringiensis* isolados do Amazonas. A partir de 25 amostras de solo coletadas em 9 municípios do estado, obteve-se 484 colônias bacterianas, sendo 11,77% identificadas como *B. thuringiensis*. Deste total, cinco mostraram atividade larvicida (IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28, IBt-30), que juntamente com as estirpes BtAM-27 e *Bti* IPS-82 foram submetidos à caracterização molecular. Os resultados mostraram que, os cinco genes investigados: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba* - associados à toxicidade em Diptera - foram detectados apenas no isolado BtAM-27, estando ausentes nos demais isolados. Quanto ao perfil protéico, BtAM-27 mostrou bandas de 130, 58 e 72 kDa, similar ao observado para *Bti* IPS-82, o que correspondem as toxinas Cry4Ba, Cry10Aa e Cry11Ba. Os demais isolados mostraram perfis diferenciados. Recomenda-se ampliação da caracterização gênica/protéica com os isolados IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28 e IBt-30, para outros genes *cry* e toxinas já descritos ou novos, além de outros fatores associados à toxicidade:  $\beta$ -exotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases. Paralelamente à caracterização molecular realizou-se a avaliação da atividade larvicida. O isolado BtAM-27 ( $8,80 \times 10^8$  UFC/mL) mostrou nível de esporulação superior ao obtido com a linhagem padrão *Bti* IPS-82 ( $6,71 \times 10^7$  UFC/mL). Os isolados IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28 e IBt-30 mostraram níveis de esporulação inferiores ao obtido com a padrão. Os bioensaios realizados com larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* permitiram observar que os menores valores de  $CL_{50}$  foram obtidos com *Bti* IPS-82 ( $CL_{50}$  0,00007 DCT) e BtAM-27 ( $CL_{50}$  0,00026 DCT). Os demais isolados mostraram atividade larvicida inferior. Na comparação da toxicidade dos isolados em relação à atividade larvicida de *Bti* IPS-82, observou-se que todos os seis isolados mostraram atividade larvicida mais baixa que a linhagem padrão, sendo BtAM-27 cerca de quatro vezes inferior. Com IBt-03 e com IBt-30, a linhagem padrão foi cerca de 800 vezes superior. Mesmo os isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas tendo mostrado toxicidade inferior à padrão, ressalta-se que a quantidade de esporos nestes foi inferior. Portanto, devem-se buscar estudos com meios de cultura alternativos que favoreçam a esporulação. Desta forma, conclui-se que os seis isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas mostram-se potenciais para o controle biológico de *A. aegypti*.

**Palavras chaves:** Dengue, Vetor, Mosquito, Controle Biológico, Bactéria



## ABSTRACT

Currently, dengue is a serious public health problem, especially in Amazon, where you face the high number of infected and confirmed deaths from the disease are being accentuated as an epidemic. The control of dengue requires multiple actions, ranging from the early diagnosis, appropriate treatment of the sick to the mosquito vector control. On this latter point, we search to investigate the biological control of *Aedes aegypti*, with the use of *Bacillus thuringiensis* isolated in Amazon. From 25 soil samples that were collected in 10 municipalities of Amazonas, we obtained 484 bacterial colonies, and from these we had 11.77% *B. thuringiensis*. This total, six showed larvicidal activity (IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28, and BtAM IBt-30-27), which were submitted the molecular characterization. The results showed that the five genes tested: *cry4A*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, and *cry11Aa cry11Ba* - associated to toxicity in Diptera - were detected only in isolated BtAM-27, are absent in other strains of the Amazon. As for the protein profile, BtAM-27 showed bands of 125, 130, 58, 70 and 72 kDa, similar to that observed for *Bti* IPS-82. With other strains was obtained different profiles. It is recommended expansion of characterization gene / protein for isolates with IBt-03, IBt-06, IBt-07, and IBt IBt-28-30 to other toxins and genes *cry* already described or new, and other factors associated with toxicity:  $\beta$ -exotoxins,  $\alpha$ -exotoxins, hemolysins, enterotoxins, phospholipases and chitinases. Parallel to the molecular characterization was carried out to evaluate the larvicidal activity. The isolated BtAM-27 ( $8.80 \times 10^8$  CFU / mL) showed higher levels of sporulation to that obtained with the standard strain *Bti* IPS-82 ( $6.71 \times 10^7$  CFU/mL). The Isolates IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28 and IBt-30 showed lower levels sporulation were compared to the standard. Bioassays conducted with third instar larvae of *A. aegypti* allowed to observe that the lowest  $LC_{50}$  values were obtained with *Bti* IPS-82 ( $LC_{50}$  0.00007 DCT) and BtAM-27 ( $LC_{50}$  0.00026 DCT). The other isolates showed larvicidal activity lower. In comparing the toxicity of the isolates in relation to the larvicidal activity of *Bti* IPS-82, it was observed that all six isolates showed larvicidal activity lower than the standard strain, and BtAM-27 about 4 times lower. With IBt-03 and IBt-30, the standard strain was about 800 times higher. Even isolates of *B. thuringiensis* of Amazon with displayed toxicity lower the standard, it is stands that the spores quantity of these isolated was lower. Therefore, studies should be search with alternative culture media that increase sporulation. Thus, we conclude that the six isolates of *B. thuringiensis* Amazon showed potential for biological control of *A. aegypti*.

**Key words:** Dengue, Vector, Mosquito, Biological Control Bacterium

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 DENGUE.....	18
1.2 DINÂMICA DE TRANSMISSÃO .....	18
1.3 DENGUE NO BRASIL .....	19
1.4 <i>Aedes aegypti</i> .....	21
1.4.1 O CONTROLE DO <i>A. aegypti</i> NO BRASIL .....	22
1.4.2 CONTROLE BIOLÓGICO .....	25
1.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	26
1.5.1 MECANISMO DE AÇÃO E PROTEÍNAS Cry .....	28
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 GERAL.....	32
2.2 ESPECÍFICOS.....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 ISOLAMENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	33
3.1.1 COLETAS DE SOLO.....	33
3.1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO .....	35
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	35
3.2.1 CARACTERIZAÇÃO GÊNICA.....	36
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA .....	38
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA.....	41
3.3.1 MANUTENÇÃO DE <i>A. aegypti</i> EM INSETÁRIO .....	41
3.3.2 BIOENSAIOS.....	43
3.3.3 BIOENSAIOS SELETIVOS .....	43
3.3.4 BIOENSAIOS QUANTITATIVOS .....	43
3.4 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA (CL <sub>50</sub> ) .....	46
3.5 ATIVIDADE RELATIVA .....	46

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 ISOLAMENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	47
4.2 BIOENSAIOS SELETIVOS .....	49
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	51
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO GÊNICA .....	51
4.3.2 PERFIL PROTÉICO DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	53
4.4 BIOENSAIO QUANTITATIVO.....	54
4.4.1 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA ( CL <sub>50</sub> ) .....	57
4.4.2 ATIVIDADE RELATIVA .....	60
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	63
5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	67
5.3 ATIVIDADE LARVICIDA .....	71
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação dos municípios, e georreferenciamento das amostras de solo utilizadas no isolamento de <i>B. thuringiensis</i> . .....	34
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR dos genes <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> com ação específica para <i>A. aegypti</i> , com suas respectivas seqüências e tamanho de fragmento esperado.....	37
<b>Tabela 3.</b> Reagentes, utilizados na amplificação dos genes de toxinas Cry de <i>B. thuringiensis</i> . .....	37
<b>Tabela 4.</b> Condições de amplificação dos genes <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> durante a reação de PCR.....	38
<b>Tabela 5.</b> Reagentes utilizados para a confecção dos géis de poliacrilamida.....	40
<b>Tabela 6.</b> Isolados de <i>B. thuringiensis</i> obtidos a partir de amostra de solo de diversos municípios do estado do Amazonas. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Resultado dos bioensaios seletivos com isolados de <i>B. thuringiensis</i> do Amazonas para larvas de <i>A. aegypti</i> .....	50
<b>Tabela 8.</b> Mortalidade em porcentagem por dose das larvas de <i>A. aegypti</i> nos bioensaios com os isolados de <i>B. thuringiensis</i> do Amazonas em três horários de leitura 24, 48 e 72 horas. ..	56
<b>Tabela 9.</b> Mortalidade observada e esperada dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> do Amazonas que não se ajustaram ao modelo de Probit, com seu respectivo valor de $\chi^2$ .....	58
<b>Tabela 10.</b> Concentração Letal Mediana (CL <sub>50</sub> ) dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> para larvas de <i>A. aegypti</i> após 48 horas de aplicação. ....	59

**Tabela 11.** Atividade relativa dos isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas em relação à estirpe padrão *Bti* IPS-82 às larvas de *A. aegypti*. .....61



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem de *B. thuringiensis* em microscopia de contrastes de fase.....27
- Figura 2.** Mecanismo de ação das toxinas inseticidas *B. thuringiensis* em larvas de inseto. .29
- Figura 3.** Estrutura tridimensional da toxina de *B. thuringiensis*, mostrando os domínios.....30
- Figura 4.** Mapa do estado do Amazonas mostrando os locais de coleta do solo utilizados no isolamento de *B. thuringiensis*. Legenda: 1-Itacoatiara; 2- Rio Preto da Eva; 3-Presidente Figueiredo; 4-Manaus; 5-Manauíri; 6-Iranduba; 7-Careiro Castanho, 8-Coari; 9-São Gabriel da Cachoeira. ....33
- Figura 5.** Manutenção de *A. aegypti* em laboratório para realização de bioensaios: A) ovos; B) bacia com ovos; C) larvas; D) pupas e E) Gaiola de manutenção dos adultos.....42
- Figura 6.** Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *A. aegypti* durante a realização de um bioensaio de seletivo.....45
- Figura 7.** Esquema dos copos plásticos contendo larvas de *A. aegypti* durante a realização de um bioensaio quantitativo.....45
- Figura 8.** Produto da amplificação dos genes *cry4Ba* (A) e *cry4Aa* (B) em isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas. MM. Marcador DNA 1kb Ladder, A1: IBt-03, A2:IBt-06, A3:IBt-07, A4:IBt-28, A5:IBt-30, A6:BtAM-27, A7:*Bti* IPS-82 (controle positivo), A8 controle negativo. B1: IBt-03, B2:IBt-06, B3:IBt-07, B4:IBt-28, B5:IBt-30, A6:BtAM-27, B7:*Bti* IPS-82 (controle positivo), B8 controle negativo. ....51



**Figura 9.** Produto da amplificação dos genes *cry10Aa* de *B. thuringiensis* do Amazonas. MM. Marcador DNA 1kb Ladder, 1:IBt-03, 2:IBt-06, 3:IBt-07, 4:IBt-28, 5:IBt-30, 6:BtAM-27, 7:*Bti* IPS-82 (controle positivo), 8:controle negativo.....52

**Figura 10.** Produto da amplificação dos genes *cry11Aa* (A) e *cry11Ba*(B) em isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas. MM-Marcador DNA 1kb Ladder. A1: IBt-03; A2: IBt-06, A3:IBt-07, A4: IBt-28, A5:IBt-30, A6:BtAM-27; A7:*Bti* IPS-82 (controle pos positivo), A8 controle negativo. B1: IBt-03, B2: IBt-06, B3:IBt-07, B4:IBt-28, B5:IBt-30, B6:BtAM-27, B7:*Bti* IPS-82 (controle positivo); B8 controle negativo. ....52

**Figura 11.** Perfil protéico dos isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas, com ação larvicida para *A. aegypti*. ....53

**Figura 12.** Quantidade de larvas de *A. aegypti* mortas em porcentagem nos bioensaios com isolados de *B. thuringiensis*, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas. ....55

**Figura 13.** Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com isolados IBt-28, IBt-30 e *Bti* IPS-82 .....62

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BtAM: *Bacillus thuringiensis* do Amazonas

CaCO<sub>3</sub>: Carbonato de cálcio

CB: Colônia bacteriana

CL<sub>50</sub>: Concentração Letal Mediana

cm<sup>2</sup>: Centímetros cúbico

cry: crystal (genes codificadores de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)

Cry: Crystal (proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)

DCT: Diluição da Cultura Total

DENV: sorotipo viral da dengue

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DP: Desvio padrão

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

kDa: Kilodaltons

LB: Luria Bertani

M: Molar

mL: mililitro

μl: microlitro

MM: Massa Molecular

mM: Milimolar

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: Pares de base

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH: Potencial hidrogeniônico

PNCD: Programa Nacional de Controle do Dengue

PSA: Persulfato de amônio

RPM: Rotação por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS –PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ( Dodecil Sulfato de Sódio Eletroforese em gel de poliacrilamida).

TBE 1 X (Tris/Borato/EDTA)

TEMED: N,N,N',N',- tetrametil etilenodimetilamina

Tris: Tri (hidroximetil) aminometano

UFC: Unidade Formadora de Colônia

V: Volume

WHO: World Health Organization

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico é um vírus pertencente à família Flaviridae, gênero Flavivirus. São conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue causador da forma clássica da doença: DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV - 4 (Forattini 2002; Rocha e Tauil, 2009). Em adição, existe um elevado potencial para casos de letalidade por complicações da dengue clássica, ou seja, o surgimento da forma mais clinicamente complicada, a dengue hemorrágica (WHO 2009).

Em termos gerais, a dengue apresenta um espectro clínico muito amplo em humanos, que varia desde formas oligossintomáticas, até quadros graves com hemorragia e choque, podendo evoluir para o óbito (Tauil 2002; Rocha e Tauil 2009).

Os primeiros registros do dengue datam de 1635. Há relatos de casos na ilha de Java (Indonésia), no ano de 1779. Nas Américas, a dengue tem sido registrada há mais de 290 anos, sendo que as primeiras epidemias nessa região ocorreram no Caribe e no Norte da América do Sul, em 1963-1964 (OMS 2001).

Atualmente, a dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo a segunda arbovirose mais importante em relação ao número de pessoas infectadas (Gluber *et al.* 2001). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que há em torno de 50 a 100 milhões de pessoas infectadas anualmente em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. No mundo, cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência desta arbovirose (WHO 2009).

## 1.2 DINÂMICA DE TRANSMISSÃO

O vírus da dengue é transmitido ao homem através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae), sendo *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) e *Aedes albopictus* Skuse (1894) as duas espécies mais importantes como vetor. O *A. aegypti* é o principal, e talvez, único vetor nas Américas, enquanto que *A. albopictus* é vetor secundário na Ásia e no Pacífico (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994; Gubler 1987; 1989; Gubler *et al.* 2001).

A transmissão da dengue ocorre quando a fêmea da espécie-vetor se contamina ao picar um indivíduo infectado na fase virêmica da doença, tornando-se capaz de transmitir o vírus por toda sua vida através de suas picadas o que ocorre geralmente após um período de 10 a 14 dias. No homem, o período de incubação do vírus do dengue pode durar de 3 a 15 dias (Travassos da Rosa *et al.* 1997; MS 2001).

A dengue revela-se endêmica, essencialmente nos trópicos e sub-trópicos, especialmente na área urbana e peri-urbana. Nas Américas, a infecção tem-se expandido nas últimas décadas do século XX. A endemia estende-se desde ao norte do México, até ao sul da Argentina, recentemente após 40 anos de ausência, tem sido relatada nos Estados Unidos (Forattini 2002; Dantés e Willoquet 2009; WHO 2010).

A proliferação nas Américas, e em particular no Brasil, tem múltiplos condicionantes. O fluxo rural-urbano intenso nos últimos trinta anos resultou numa concentração populacional muito elevada nas grandes cidades. As cidades, pressionadas por essa demanda, não conseguiram oferecer condições satisfatórias de habitação e de saneamento básico a uma fração importante dos seus habitantes. Em torno de 20% vivem em favelas, invasões, mocambos ou cortiços, onde, quando existem, o abastecimento de água e a coleta de dejetos, são irregulares. Essa situação de ocupação desordenada de grandes e médias cidades é extremamente favorável ao surgimento de dengue, pois propiciam o desenvolvimento do seu vetor (Tauil 2002; Texeira *et al.* 2009).

### **1.3 DENGUE NO BRASIL**

No Brasil, os primeiros casos da dengue foram registrados em 1916 no estado de São Paulo e em 1923, em Niterói, no Rio de Janeiro, sem confirmação laboratorial. A primeira epidemia com confirmação laboratorial foi em 1982, na cidade de Boa Vista, Roraima, sendo ocasionado pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4, atingindo cerca de 11.000 pessoas (Osanai *et al.* 1983; Travassos da Rosa *et al.* 1998; MS 2001).

Nos anos de 1986 e 1987, novos registros de dengue ocorreram no país, com epidemias nas regiões Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Bahia, Pernambuco), desta vez, originada apenas pelo sorotipo DENV-1 (Pontes e Ruffino-Neto 1994; Vasconcelos *et al.* 1995; Travassos da Rosa *et al.* 1997). Três



anos mais tarde, os casos de dengue foram registrados no Norte do país, na cidade de Belém (PA), sendo, ocasionada pelo sorotipo DENV-2 (Vasconcelos *et al.* 1992).

Entre 1990 e 1991 ocorreu a primeira epidemia de dengue hemorrágica, no Rio de Janeiro, devido à introdução do sorotipo DENV-2 (Nogueira *et al.* 1990). Posteriormente, houve registros de casos nos estados de Tocantins, Alagoas, e no ano de 1994 no Ceará, ocasionando uma grande epidemia (Vasconcelos *et al.* 1995).

Durante toda a década de 90, ocorreu um aumento significativo da incidência dos casos de dengue, reflexo da ampla dispersão do vetor *A. aegypti* no território nacional (Braga e Valle 2007a). A presença do vetor associada à mobilidade da população levou à disseminação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 para 20 dos 27 estados do país. Desde então, o número de casos aumentou, sendo que entre os anos de 1990 e 2000, várias epidemias foram registradas, sobretudo, nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, responsáveis pela maior parte dos casos notificados (MS 2005).

Em 2000, foi pela primeira vez identificada a circulação do sorotipo 3 do vírus no estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no estado de Roraima em 2001. Com a entrada de mais um sorotipo no Brasil, em 2002, foi registrada a maior incidência de epidemia da dengue da história do país, quando foram notificados aproximadamente 790 mil casos. A partir desta epidemia, houve uma rápida dispersão do sorotipo DENV-3 para outros estados do Brasil, sendo que no primeiro semestre de 2004, por exemplo, 23 dos 27 estados já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus do dengue (Camara *et al.* 2007; MS 2005).

Esta situação fez com que o Brasil se tornasse um dos países com maior registro de casos de dengue, sendo que de 2000 a 2005 foram registrado mais de três milhões de casos, que representou 78% dos casos notificados nas Américas e 61% de todos os casos relatados no mundo (Texeira *et al.* 2009). Em 2007, também foram notificados um número elevado de casos, aproximadamente 500 mil, com registro de 158 mortes (Maciel *et al.* 2008). Nos últimos anos o Brasil ocupou o primeiro lugar no *ranking* mundial de casos reportados da doença (WHO 2000; Texeira *et al.* 2009).

No ano de 2008 novamente foram registrados mais de 500 mil casos de dengue no Brasil, com registro de epidemia no estado do Rio de Janeiro (Texeira *et al.* 2009; MS 2010). Em 2009 houve uma redução no número de casos da doença para 393. 583, com aumento dos



em 2010, atingindo quase 800 mil casos (MS 2010). Ainda em 2010 foi registrada a entrada do sorotipo 4 no Brasil, no estado de Roraima e em janeiro de 2011 no Amazonas. Atualmente o estado do Amazonas passa por um surto epidêmico de dengue, até a 6ª semana epidemiológica, foram notificados cerca 7.107 casos da doença em Manaus, com 3.966 casos confirmados, sendo ainda registrado 5 mortes em Manaus e duas no interior do Amazonas (FVS-AM 2011; MS 2011).

#### 1.4 *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* é o principal vetor do Brasil e nas Américas. Este mosquito pertence à ordem Diptera, família Culicidae, subgênero *Stegomyia*, e ao gênero *Aedes* (Meigen, 1818) (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994).

É originário do Egito, e atualmente encontra-se em várias regiões do planeta, distribuído nas zonas tropicais e subtropicais entre 45° de latitude Norte e 35° de latitude Sul, dentro das zonas isotermiais de 20° C (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994). Entretanto, essa espécie tem sido registrada no Brasil desde o século XVII. Possivelmente, foi introduzida no período colonial, na época do tráfico de escravos (Gadelha e Toda 1985; Dye 1992).

Quanto ao desenvolvimento, *A. aegypti* é holometábolo, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Seu desenvolvimento se completa em 8 a 12 dias em regiões tropicais, em condição de umidade e temperatura ideais (temperatura em torno de 28°C e umidade relativa 80%) e a longevidade de adultos na natureza é, em média, de 30 dias (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994; Forattini 2002).

Os adultos são essencialmente urbanos. As fêmeas do mosquito possuem acentuada antropofilia e após o acasalamento, realiza o repasto sanguíneo no âmbito domiciliar. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas repousam e ao final da digestão procuram recipientes com água ou superfície úmida para realizar oviposição. Os ovos são depositados isoladamente nas paredes internas de recipientes artificiais, tais como: tonéis, caixas d' água, descartáveis, vasos, pneus, e outros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; MS 2001; Pinheiro e Tadei 2002; Pinheiro 2005; Silva e Silva, 1999; Tauil 2002).

O ovo é a forma mais resistente do ciclo biológico do vetor, que possibilita ao mosquito ampla sobrevivência devida à resistência às condições adversas (Silva 1996; Pinheiro 2005). Os ovos ao entrar em contato com água forma completamente o embrião, e

após 48 horas em condições ideais, ocorre à eclosão das larvas, que são filtradoras seletivas e raspadoras de superfície. Nesse estágio, há uma intensa alimentação e crescimento e, em cerca de cinco a seis dias, as larvas sofrem metamorfose e transformam-se em pupas. Durante a fase de pupa o vetor não se alimenta. Esse estágio dura em torno de 1 a 2 dias. Em seguida, emerge o adulto (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini 2002; Tauil 2002). Os adultos possuem um período médio de vida de cerca de 30 dias em condição ambiental, mas no laboratório pode viver em média 45 dias (Forattini 1965; Gadelha e Toda 1985; MS 2001).

A principal forma de infecção do mosquito com o vírus dengue se dá após o repasto sanguíneo das fêmeas adultas de *A. aegypti* em seres humanos contaminados pelo vírus. Uma vez infectados, os mosquitos podem transmitir o vírus durante todo o seu ciclo de vida, inclusive aos seus descendentes por transmissão transovariana (Forratini 2002; Joshi *et al.* 1995).

As condições climáticas, aliada a fatores como: facilidade de reprodução, desenvolvimento dos meios de transporte; grande oferta de recipientes artificiais com água; aumento do uso de descartáveis; concentração populacional em médias e grandes cidades; problemas de abastecimento de água; aliados à capacidade de resistência dos ovos a dessecação, favorecem a sobrevivência do *A. aegypti* no Brasil, sendo que atualmente encontra-se espalhado em todas as unidades federadas do país (MS 2010; Pinheiro 2005; Tauil 2002).

#### **1.4.1 O CONTROLE DO *A. aegypti* NO BRASIL**

Devido à inexistência de vacinas, o controle da dengue sempre foi pautado numa política de combate vetorial (Donalisio e Glasser 2002; Tauil, 2002; Lenzi e Coura 2004).

Os esforços iniciais para o controle do *A. aegypti* no Brasil foi fundamentado na erradicação do vetor do território nacional, sendo iniciado oficialmente no ano de 1947 com a utilização do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloreto), inseticida químico sintético, com o objetivo de controlar a febre amarela urbana (MS 1994; MS 2001; Ferreira *et al.* 2007).

O combate intensivo do vetor no Brasil culminou na erradicação do mesmo no ano 1955. Porém, a falta de manutenção nos métodos preventivos de controle fez com que 1967

fossem encontrados focos de *A. aegypti* no território nacional, mas a continuidade das ações de controle resultou numa nova eliminação no ano 1973 (MS 1994).

Como alguns países vizinhos não tiveram o mesmo êxito nas campanhas de eliminação do *A. aegypti*, ocorreu a reinfestação pelo vetor em vários estados brasileiros na década de 80 (MS 1994; Tauil 2002). Esse processo ocorreu num cenário socioeconômico e bioecológico diferente do corrido no passado, sendo influenciado por vários fatores, tais como, a elevada densidade demográfica nas cidades, aumentando o custo da visita domiciliar realizada pelo agente; maior eficiência dos meios de transporte, possibilitando a dispersão não intencional do vetor de uma localidade para outra; maior produção industrial de materiais descartáveis, aumentando a oferta de criadouros do mosquito transmissor (MS 2001; Braga e Valle 2007a).

A partir de então, vários foram os pontos críticos no controle dessa doença, tanto do ponto de vista ambiental, quanto do social, institucional e biológico, devido à capacidade vetorial e reprodutiva do *A. aegypti*, como também, a sua facilidade de utilizar a grande oferta de recipientes artificiais como criadouro e com isso, de se estabilizar no ambiente domiciliar (Donalisio e Glasser 2002; Tauil, 2002; Lenzi e Coura 2004).

Os fatores citados acima contribuíram para o comprometimento do controle vetorial, uma vez que o principal eixo do programa de controle tem sido a vigilância entomológica, por meio da coleta de larvas para medir a densidade de *A. aegypti* em áreas urbanas. Essa metodologia consiste em vistoriar os depósitos de água e outros recipientes localizados nas residências e outros imóveis. A política adotada priorizava a eliminação dos recipientes potenciais criadouros que podiam ser removidos, ou a utilização de larvicidas em recipientes domésticos que não pode ser retirados (Braga e Valle 2007b).

Desde a década de 60 o temefós tem sido o principal inseticida químico amplamente utilizado no controle larvário de *A. aegypti* no Brasil. Além deste, tem sido utilizados produtos com princípios ativos organoclorados, organofosforados e posteriormente piretróides (Vilarinhos *et al.* 1998).

Durante a década de 90, a incidência da dengue aumentou consideravelmente, como consequência da ampla distribuição do *A. aegypti* no território nacional, o que se intensificou em 1994, tornando cada vez mais evidente a necessidade do melhoramento das ações de



controle do vetor (Braga e Valle 2007b; Ferreira e Chiaravalloti-Neto 2007; Maciel *et al.* 2008).

Neste contexto, o Ministério da Saúde reviu os mecanismos de combate ao *A. aegypti*, e a necessidade de avaliação do *status* de susceptibilidade dos inseticidas utilizados no seu controle. Em 1998, a Fundação Nacional de Saúde, em laboratório, detectou diminuição da persistência dos inseticidas químicos Malation e Fenitrothion usados no combate as formas adultos, e também em condição simulado de campo, resistência das larvas ao temefós (MS 1994; Macoris *et al.* 1995; MS 1996; Macoris *et al.* 1999; MS 2002; Carvalho *et al.* 2004; Braga e Valle 2007b; Ferreira Chiaravalloti-Neto 2007).

Os problemas de resistência desenvolvidos pelo *A. aegypti* ao teméfós resultou do efeito seletivo de exposição a dosagens que matam os indivíduos susceptíveis, sobrevivendo os resistentes, que transferem essa capacidade a seus descendentes (Carvalho e Silva 1999; Donalísio e Glasser 2002; Beltrão 2006).

Com isso, os órgãos de Saúde Pública levantaram a necessidade da utilização de novos métodos de controle eficazes e, principalmente, ecologicamente seguros ao homem (Lima *et al.* 2003; Braga *et al.* 2004; Lima *et al.* 2006), pois os inseticidas químicos apresentam restrições de uso: são tóxicos ao homem, causam desequilíbrio nos ecossistemas em que são utilizados, e podem atuar em espécies não-alvo, e quando são intensivamente utilizados, podem promover o desenvolvimento de populações de mosquitos resistentes (Vilarinhos *et al.* 1998). Aliado isso, existe ainda a preocupação com o meio ambiente, visto que, diante as problemas de resistência há uma tendência no aumento de aplicações dos larvicidas químicos, para garantir um controle satisfatório (Polanczyk *et al.* 2003).

Diante desse cenário, em 2001, O ministério da Saúde criou o Programa Nacional de Controle do Dengue (PNCD) iniciou a utilização de produtos biológicos no controle de *A. aegypti*, juntamente com controle químico, o que vem sendo realizado até os dias atuais (MS 2001; Tauil 2002; Braga e Valle 2007b).

## 1.4.2 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de vetores existe natureza, controlando naturalmente as populações de mosquitos através da predação, do parasitismo, da competição e de agentes patogênicos que produzem enfermidades e toxinas (Funasa 2001). Organismos capazes de parasitar e predação mosquitos em suas várias fases evolutivas vêm sendo estudados há bastante tempo (Consoli e Lourenço- de- Oliveira 1994).

No caso do *A. aegypti*, a problemática da resistência desenvolvida por esse vetor em relação aos inseticidas químicos e a crescente conscientização de problemas de poluição ao meio ambiente, resultou na necessidade de alternativas ao controle químico de vetor (Lima *et al.* 2005a). Neste sentido, o controle biológico e o manejo ambiental têm sido bastante incentivados (MS 2001; Pamplona *et al.* 2004), pois possuem a vantagem de minimizar o danos ambientais que o larvicidas químicos podem causar (Funasa 2001).

Várias pesquisas estão sendo realizadas na busca por alternativas biológicas para o controle *A. aegypti*. A utilização de espécies predadoras (peixes larvófagos, copépodos), que atuam comendo as larvas em reservatórios aquáticos, está entre um dos mais antigos sistemas de controle biológico de mosquitos (Funasa 2001; Pamplona *et al.* 2004; Pamplona *et al.* 2007).

Como controle biológico de *A. aegypti*, cita-se: a utilização de peixes na predação das larvas (Funasa 2001; Pamplona *et al.* 2004); extratos botânicos (Cavalcanti *et al.* 2004; Simas *et al.* 2004; Costa *et al.* 2005; Geris *et al.* 2008; Leite *et al.* 2009); fungos (Habib 1984); e nemátodeos (Braga e Valle 2007b).

Entre os vários exemplos de agentes de controle biológico citados anteriormente para o controle de mosquitos, as bactérias patogênicas ganharam notoriedade no meio científico, sendo atualmente os agentes com maior utilização em todo o mundo. O sucesso das bactérias se dá pela presença de características como persistência e resistência às condições adversas ambientais e de processamento, qualidades que facilitam sua produção em escala industrial (Alves 1998; Braga e Valle 2007b).

As maiorias das espécies bacterianas utilizadas para controle biológico pertencem à família Bacillaceae, destacando-se as do gênero *Bacillus*, sendo *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 e *B. thuringiensis* Berliner, 1915 as duas mais estudadas e utilizadas no controle de

vetores. O *B. sphaericus* é indicado para o controle de mosquitos do gênero *Anopheles* (Meigen, 1818) e *B. thuringiensis* para *Culex*, *Aedes* e outros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; De Barjac 1990; Regis 2000).

A descoberta da variedade *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) sototipo H14 por Goldeberg e Margalit em 1977 em mosquitos mortos, revolucionou o controle mundial de vetores, sendo utilizada no combate de culicídeos e simulídeos (De Barjac, 1990). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* é recomendada pela Organização Mundial de Saúde como padrão para o controle de vetores como *A. aegypti* e *Simulium pertinax* (Kollar, 1832) (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994).

No Brasil, inicialmente essa bactéria foi incorporada no programa de controle de simulídeos, no Rio Grande do Sul (Regis *et al.* 2000). Em 2001, devido ao problema de resistência do *A. aegypti* aos inseticidas rotineiramente utilizados em campo, os biolarvicidas à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foram incorporados ao programa de controle do dengue em São Paulo, mostrando-se efetiva no combate ao *A. aegypti* (Braga *et al.* 2004; Braga e Valle 2007a).

### 1.5 *Bacillus thuringiensis*

Morfologicamente, *B. thuringiensis* é um bastonete de 1 a 1,2µm de largura por 3 a 5 µm de comprimento, geralmente com motilidade. É gram-positiva, aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45°C. Formam esporos, entre elípticos e cilíndricos, em posição central, com esporângio não nitidamente estendido (Figura 1) (Alves 1998; Copalbo *et al.* 2005).

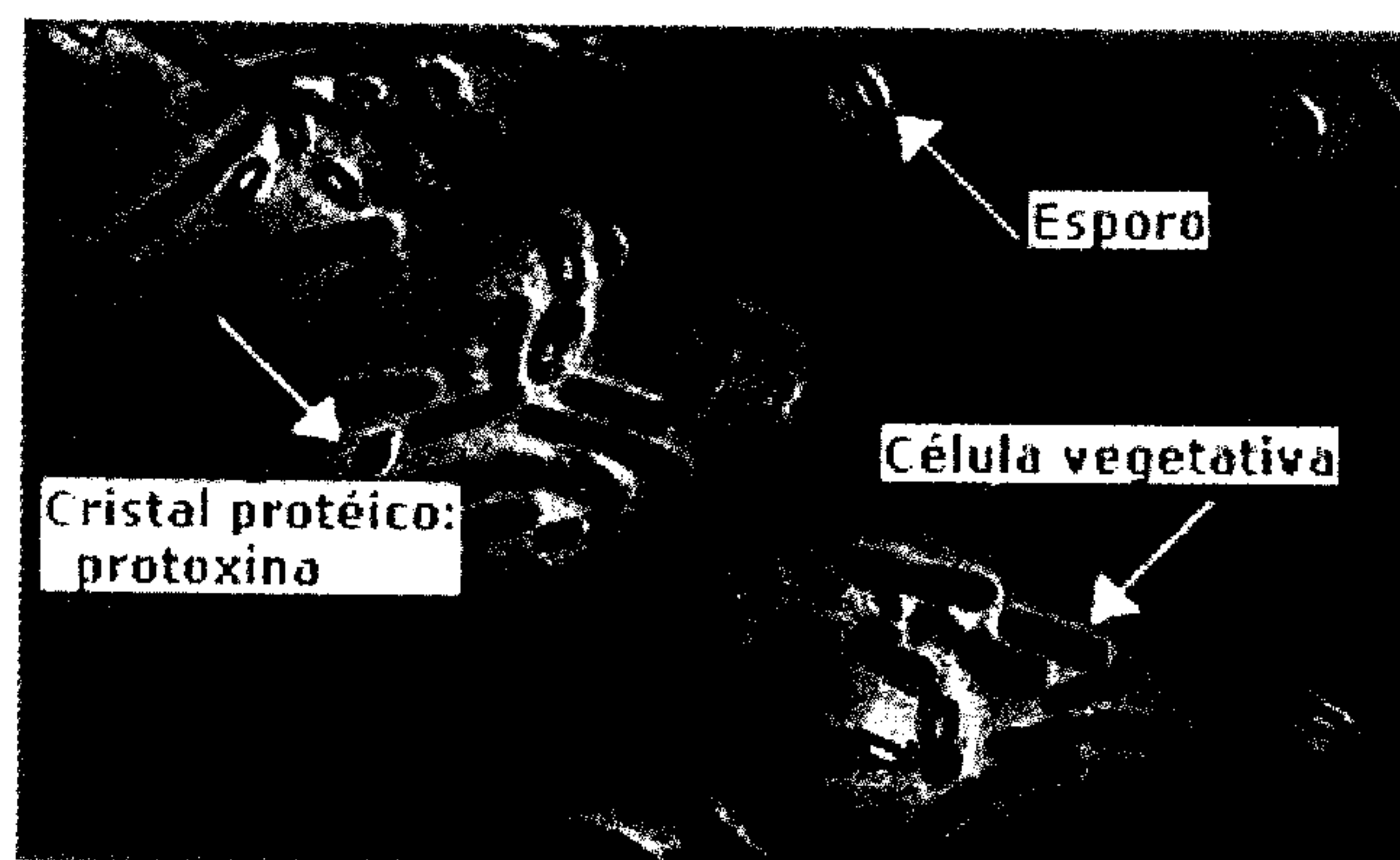
Esta espécie foi primeiramente observada em 1901 por Ishiwata, causando mortalidade em larvas de bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Linnaeus, 1758), sendo inicialmente chamada de *Bacillus sotto*. Mais tarde em 1911, Berliner isolou novamente este bacilo, descrevendo aspectos da sua patogenicidade e denominou-o de *B. thuringiensis* em homenagem a província da Thuringia na Alemanha, local onde foi primeiramente encontrado (Glare e O'callaghan 2000).



Hannay (1953) conseguiu relacionar a patogenicidade dessa bactéria à presença de cristais protéicos, ou corpos paraesporais, o que foi confirmado experimentalmente por Angus em 1956.

Atualmente *B. thuringiensis* é um ingrediente ativo mais utilizado mundialmente na fabricação de biopesticidas, destacando-se entre os vários agentes microbianos que possuem atividade entomopatogênicas. O sucesso desta bactéria como agente de controle biológico é atribuído pela produção no momento de sua esporulação de inclusões protéicas cristalinas que apresenta toxicidade a diversos organismos, principalmente contra insetos (Alves 1998; Glare e O'callaghan 2000).

O *B. thuringiensis* apresenta um série de vantagens tais como: segurança ambiental, pois atua somente nos indivíduos alvos e as sua toxinas não se acumulam no ambiente; boa duração no ambiente, suas formulações comerciais podem apresentar eficácia no campo de até 90 dias em locais protegidos dos raios ultravioletas; capacidade de se reciclar em larvas mortas; ou seja, os esporos podem germinar dentro do cadáver das larvas, desta forma, mantendo-se no ambiente; além disso, apresenta diversidade de toxinas, o que dificulta o desenvolvimento de resistência nos mosquitos, (Habib e Andrade 1998; Polanczyk e Alves 2003).



**Figura 1.** Imagem de *B. thuringiensis* em microscopia de contrastes de fase.

Fonte: <http://agrogreen.blogspot.com/2009/08/bacillus-thuringiensis-bacteria.html>.

A taxonomia de *B. thuringiensis* não está bem definida, sendo hoje a espécie alocada num complexo de espécies chamado *Bacillus cereus*, juntamente com *B. cereus*, *B. antracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weiheinstephanesis* (Helgason *et al.* 2000; Vilas-Boas *et*

al. 2007; Zhong *et al.* 2007). Vários autores consideram que *B. thuringiensis* e *B. cereus* realmente constituem de uma só espécie, pois apresentam características fenotípicas e bioquímicas semelhantes, mas por definição *B. thuringiensis* é identificada por apresentar o cristal de proteínas (Polanczyk e Alves 2003; Zhong *et al.* 2007).

O *B. thuringiensis* possui uma ampla distribuição geográfica, é encontrado em quase todo o planeta, pode ser isolado a partir de diferentes ambientes como: solo, folhas de plantas e algumas vezes em micro habitats favoráveis como, por exemplo, dentro de insetos. Vale ressaltar que, o número de células de *Bt* obtidas a partir do isolamento do solo é maior, variando  $10^2$  e  $10^4$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 UFC/cm<sup>2</sup> por folha (Damgaard 2000). A atividade de isolamento vem sendo continuamente executada em todo o mundo (Tan *et al.* 2009 ).

### 1.5.1 MECANISMO DE AÇÃO E PROTEÍNAS Cry

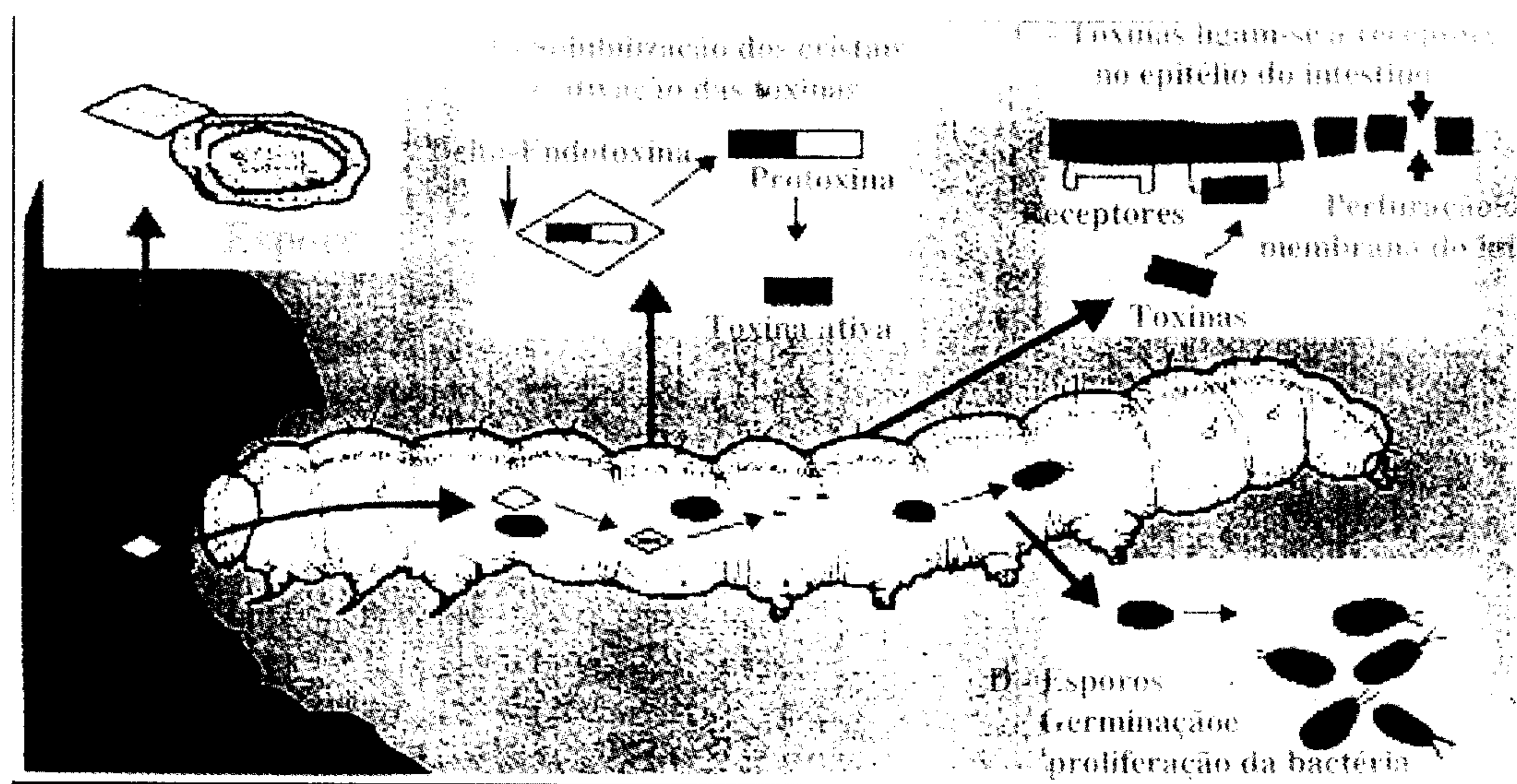
A propriedade inseticida de *B. thuringiensis* é atribuída à produção de um cristal protéico, que contém  $\delta$ -endotoxinas, sendo as proteínas Cry as mais proeminentes. Estas proteínas possuem massa molecular entre 40 e 140 kDa e são sintetizadas sob condições restritas de crescimento, durante o processo de esporulação da bactéria e são codificadas por diferentes genes denominados gene *cry* (Agaisse e Lereclus 1995; Saraswathy e Kumar 2004).

O cristal protéico de *B. thuringiensis* é considerado uma pró-toxina, ou seja, uma forma não ativa e somente quando em contato com meio alcalino ou em solução de enzima proteolítica, ocorre o processo de clivagem da pró-toxina, resultando em moléculas de tamanhos variados, as  $\delta$ -endotoxinas (Kuo e Chank 1996; Yamamoto e Dean 2000; Bravo *et al.* 2005; Zong *et al.* 2007).

As proteínas Cry tornam-se tóxicas para os insetos, quando as larvas ingerem esses cristais. Assim, após a ingestão, os cristais são solubilizados no pH alcalino, que em presença de enzimas digestivas, são convertidas em quatro ou mais polipeptídios tóxicos ( $\delta$ -endotoxinas). As toxinas hidrolisadas cruzam através da membrana peritrófica, ligam-se aos receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico das células da membrana, formando poros, causando lise na célula e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. Conseqüentemente, a larva infectada morre por inanição, uma vez que torna-se



incapaz de absorver os nutrientes (Figura 2) (Hofte e Whiteley 1989; Bravo 1997; Copping e Menn 2000).

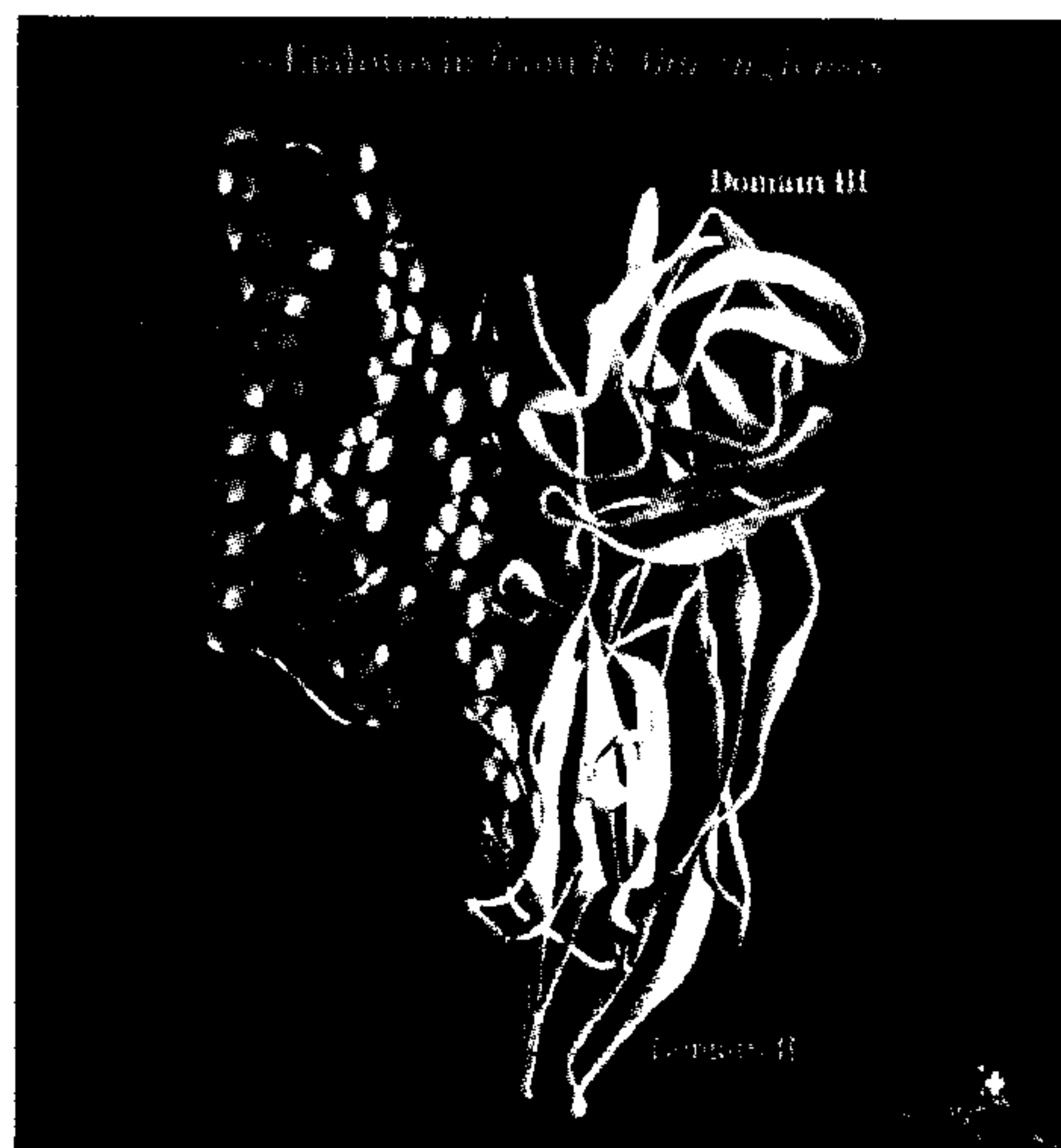


**Figura 2.** Mecanismo de ação das toxinas inseticidas *B. thuringiensis* em larvas de inseto.

A toxicidade de uma estirpe está relacionada aos diferentes tipos de genes *cry* funcionais codificadores das proteínas Cry que a mesma possui, a presença dos genes serve como parâmetro para inferir a efetividade de uma cepa bacteriana contra um determinado grupo de insetos (Bravo 1997; Pinto *et al.* 2003).

Várias ordens de insetos são susceptíveis às estirpes de *B. thuringiensis*, dentre as mais estudadas então, Lepidoptera, Coleoptera por constituírem importantes pragas agrícolas e Diptera, principalmente os transmissores de doença. Além de insetos citam-se ainda nematóides, ácaros entre outros organismos (Kuo e Chank 1996; Yamamoto e Dean 2000; De Maagd *et al.* 2003).

As toxinas de *B. thuringiensis* são formadas por três domínios, I estaria relacionado á inserção e formação de poros na membrana; o domínio II é responsável pelo reconhecimento do receptor e, portanto, pela especificidade da toxina para o inseto-alvo; A função do domínio III ainda não está totalmente elucidada, porém acredita-se que esta região da proteína parece estar envolvida com ambas as funções dos domínios I e II, além da estabilidade da toxina (Figura 3) (Saraswathy e Kumar 2004).



**Figura 3.** Estrutura tridimensional da toxina de *B. thuringiensis*, mostrando os domínios.

Estudos sobre a toxina de *B. thuringiensis*, mostra a agregação e interação dos três domínios para causar a atividade inseticida de *B. thuringiensis*. Saraswathy e Kumar 2004 descreveram a engenharia das diferentes  $\delta$ -endotoxinas o que levou a uma compreensão do seu modo molecular de ação e construção de novas toxinas com maior atividade inseticida e especificidade. A toxicidade das proteínas esta associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (Li *et al.* 1991).

As toxinas Cry 4Aa, Cry 4Ba, Cry 10Aa, Cry 11Aa e Cry 11Ba, apresentaram ação sinérgica que mostram boa efetividade contra mosquitos, especificamente no controle de *A. aegypti*. A alta especificidade destas toxinas é atribuída á íntima interação na ligação das proteínas com receptores da membrana do intestino do vetor (Beltrão 2006; Bravo *et al.* 2007). Essas protoxina apresentam massa molecular de 125, 130, 58, 70 e 72 kDa respectivamente, (Hofte e Whiteley 1989; Crickmore *et al.* 1998; Beltrão 2006; Tokcaer *et al.* 2006). Esses dados mostram a importância da verificação da presença desses genes em linhagens com ação *A. aegypti*.

Os genes das proteínas do cristal protéico de *B. thuringiensis* estão presentes em plasmídeos conjugativos, este tipo de organização, facilita a recombinação e troca destes elementos, fornecendo um importante mecanismo de geração de novas especificidades (Aronson 1993). A busca de novas linhagens de *B.thuringiensis* com potencialidades

diferentes das atualmente conhecidas, a investigação de novas toxinas e conseqüentemente novos genes *cry*, com diferentes efeitos inseticidas apresenta-se como uma das prioridades e metas dos estudos com *B. thuringiensis* nos projetos de pesquisa em diversas regiões do mundo (Schnepf e Whiteley 1981; Barreto 2005).

A variedade de proteínas Cry é o resultado de um contínuo esforço na busca por toxinas com propriedades adequadas para o controle de insetos de importância agrícola e vetores de doenças. Milhares de cepas foram isoladas (Pigott e Ellar 2007). Até dezembro de 2010 foram identificadas 218 holotipos de toxinas Cry, reunidas em 68 grupos. Atualizações constantes estão sendo realizadas por Crickmore e colaboradores, e podem ser obtidas no site [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt).

Com exemplo da importância do esforço de trabalhos de isolamento constante e avaliação larvicida de novos isolados de *B. thuringiensis*, em 2009, na China foi isolada do solo uma nova linhagem de *Bt*, que mostrou atividade inseticida contra *A. aegypti* vinculada à está descoberta, encontrou-se uma nova proteína Cry diferente das atualmente conhecidas com ação para este vetor (Tan *et al.* 2009).

O Brasil como um país que apresenta grandes variedades de ecossistemas, que proporcionam a existência de diversos ambientes ecológicos adequados ao desenvolvimento de microrganismos, constituindo isso fonte natural para o isolamento de novas bactérias (Dias 1992).

Levando em consideração a importância de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico de insetos, faz-se necessária a continuidade das atividades de isolamento desse microrganismo, considerando a biodiversidade do ambiente amazônico. Além disso, a busca por novas estirpes de *B. thuringiensis* dessa região torna-se importante uma vez que possibilita encontrar novas combinações de toxinas do gene *cry*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Investigar o potencial de isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas, enquanto agente de controle biológico de *A. aegypti*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Constituir um banco de *B. thuringiensis* isolados de diversas localidades do Amazonas, relacionando linhagens com ação entomopatogênica;
- Realizar a caracterização molecular, gênica e proteica, de isolados de *B. thuringiensis* com toxicidade em *A. aegypti*;
- Avaliar a atividade larvicida de isolados do Amazonas em condições de laboratório, com a determinação da Concentração Letal Mediana – CL<sub>50</sub>.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento das estirpes de *B. thuringiensis* e os estudos de avaliação de toxicidade e caracterização desses entomopatógenos isolados foram conduzidos no laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

#### 3.1 ISOLAMENTO DE *B. thuringiensis*

##### 3.1.1 COLETAS DE SOLO

Para o isolamento das estirpes de *B. thuringiensis* foi realizada coletas de solo provenientes de nove municípios do Amazonas, que estão geograficamente esquematizadas na Figura 4. As localidades foram referenciadas por meio de aparelho GPS modelo map 76CSX (Garmin).

Para a coleta, em cada localidade foi retirada cerca de 15 gramas de solo com o auxílio de espátula de madeira e colocada em tubos Falcon de 15mL estéreis. O material foi acondicionado em uma caixa de isopor e transportado ao laboratório de Malária e Dengue, no INPA, em Manaus, as quais foram devidamente identificadas (Tabela 1).



**Figura 4.** Mapa do estado do Amazonas mostrando os locais de coleta do solo utilizados no isolamento de *B. thuringiensis*. Legenda: 1-Itacoatiara; 2- Rio Preto da Eva; 3-Presidente Figueiredo; 4-Manaus; 5-Manauquiri; 6-Iranduba; 7-Careiro Castanho, 8-Coari; 9-São Gabriel da Cachoeira.

**Tabela 1.** Relação dos municípios, e georreferenciamento das amostras de solo utilizadas no isolamento de *B. thuringiensis*.

Nº da amostra	Município	Coordenadas	
01	Carreiro Castanho	S=04°07'54.2"	W=60°44'56.3"
02	Coari	S=04°49'27.0"	W=65°14'54.0"
03	Coari	S=04°49'52.1"	W=65°15'31.5"
04	Irاندوبا	S=03°11'05.5"	W=60°26'27.0"
05	Itacoatiara	S=03°08'06.7"	W=58°25'34.2"
06	Manaquiri	S=04°07'18.1"	W=60°44'08.5"
07	Manaquiri	S=04°05'59.5"	W=60°42'22.9"
08	Manaquiri	S=04°03'43.8"	W=60°39'20.4"
09	Manaus	S=02°43'06.3"	W=60°02'49.8"
10	Manaus	S=02°53'28.2"	W=65°02'05.3"
11	Manaus	S=02°37'49.3"	W=60°02'20.0"
12	Manaus	S=02°48'17.6"	W=60°02'10.3"
13	Manaus	S=03°03'09.4"	W=59°53'34.7"
14	Presidente Figueiredo	S=02°10'45.7"	W=60°00'34.3"
15	Presidente Figueiredo	S=02°27'10.8"	W=60°01'28.5"
16	Presidente Figueiredo	S=02°05'42.6"	W=59°59'52.9"
17	Rio preto da Eva	S=02°42'16.1"	W=59°43'09.6"
18	Rio preto da Eva	S=02°44'11.3"	W=59°46'51.6"
19	Rio preto da Eva	S=02°40'34.5"	W=59°42'54.6"
20	São Gabriel da Cachoeira	S=00°07'20.1"	W=67°04'54.9"
21	São Gabriel da Cachoeira	S=00°06'53.2"	W=67°05'28.6"
22	São Gabriel da Cachoeira	S=00°07'21.3"	W=67°04'39.1"
23	Coari	S=04°33'59.5"	W=65°19'19.8"
24	Coari	S=04°53'21.2"	W=65°18'52.3"
25	Coari	S=04°53'10.2"	W=65°20'56.0"

### 3.1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Os procedimentos para o isolamento de *B. thuringiensis* seguiram os métodos descritos em Polanczyk (2004), o qual é uma modificação do método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS 1985). Este procedimento consistiu em misturar 1g de solo à 10 mL de solução de sais (0,006 mM FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 mM CaCO<sub>3</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0,08 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,07 mM MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,006 mM ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente em solução salina. Uma alíquota de 1mL da solução foi homogeneizada e submetida a choque térmico de 80°C por 12 minutos e em gelo por 5 minutos. Após, 100 µl da solução foram transferidas para placas de Petri contendo ágar nutriente, sendo posteriormente espalhadas na placa com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram invertidas e armazenadas para o crescimento das colônias em estufa bacteriológica a 28°C, durante 48 horas.

Após o crescimento, as colônias foram avaliadas quanto à morfologia: elevação, forma, estrutura e borda. As colônias que apresentaram características típicas de *Bacillus* spp. foram inoculadas em caldo nutriente, contendo penicilina G e colocadas em incubador rotativo a 28°C a 180 rpm por cerca de 48 horas (Jung *et al.* 1998). As colônias crescidas no meio com antibiótico foram observadas à fresco em microscópio de contraste de fase (aumento 100x), para verificar a presença de inclusão parasporais (cristais de proteínas).

Após a identificação das colônias realizada segundo Steinhaus (1963), as estirpes de *B. thuringiensis* foram estocadas temporariamente em meio LB (Luria Bertani) sólido, sob temperatura ambiente em média de 28°C, por três dias. Em seguida, foram levadas à geladeira, para cessar o crescimento bacteriano. As estirpes isoladas foram depositadas na coleção de bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Malária e Dengue do INPA.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As estirpes de *B. thuringiensis* isoladas no estado do Amazonas foram caracterizadas para se determinar a presença de genes de ação larvicida em Diptera, especificamente para *A. aegypti* conforme Céron *et al.* (1995) e Bravo *et al.* (1998).



### 3.2.1 CARACTERIZAÇÃO GÊNICA

Para a detecção desses genes utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Foram pesquisados cinco genes: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba*, com ação inseticida para larvas de *A. aegypti*, cuja descrição consta na Tabela 2.

Para a extração do DNA das estirpes de *B. thuringiensis* foi utilizado o protocolo de Starbach *et al.* (1989) e Guaycurus (1999). Para a obtenção do DNA, foi retirada uma alíquota da cultura bacteriana crescida em ágar nutriente a 28° C, durante 18h. Em seguida, com auxílio de uma alça de platina, a amostra bacteriana foi transferida para um microtubo contendo 500µL de H<sub>2</sub>O *MiliQ* autoclavada. A amostra foi homogeneizada em agitador (*Daigger Vortex Genie 2*). Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 13.400 rpm por 10 minutos em minicentrífuga (*miniSpin – Eppendorf*). O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 200 µL de H<sub>2</sub>O *MiliQ*. A solução suspensa foi fervida a 100°C por 10 minutos em banho-maria. Após esse período, a amostra foi congelada à -20° C e descongelada em temperatura ambiente. Este último passo foi realizado duas vezes. Posteriormente, as amostras de DNA foram estocadas a - 4°C.

Para cada isolado de *B. thuringiensis* foi realizada teste de PCR com todos os *primers* específicos citados na tabela 2. Para a realização da reação de amplificação desses genes *cry* foram utilizados os reagentes na concentração discriminada na Tabela 3. A reação seguiu o protocolo de Crump *et al.* (1999).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR dos genes *cry* de *B. thuringiensis* com ação específica para *A. aegypti*, com suas respectivas seqüências e tamanho de fragmento esperado.

Gene	Seqüência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>cry4Aa</i> *	5' – GGGTATGGCACTCAACCCCACTT 3' - GCGTGACATAACCCATTTCAGGTCC	1529	Ward e Ellar 1987
<i>cry4Ba</i> *	5' – GAGAACACACCTAATCAACCAAT 3' - GCGTGACATAACCCATTTCAGGTCC	1951	Yamamoto <i>et al.</i> 1998
<i>cry10Aa</i> #	5' – ATTGTTGGAGTTAGTGCAGG 3' –AATACTTTGGATGTGTCTTGAG	995	Thorne <i>et al.</i> 1986
<i>cry11Aa</i> *	5' – CCGAACCTACTATTGCGCCA 3' – CTCCCTGCTAGGATTCCGTC	470	Donovan <i>et al.</i> 1988
<i>cry11Ba</i> #	5' – TACAGGATGGATAGGGAATGG 3' – TAATACTGCCATCTGTTGCTTG	608	Delecluse <i>et al.</i> 1995

Fonte: \*Primers desenhados por Ben Dov, Universidade de Negev, Israel (apud Guaycurus)  
#Primers desenhados por Costa, 2009

**Tabela 3.** Reagentes, utilizados na amplificação dos genes de toxinas Cry de *B. thuringiensis*.

Reagente	Concentração	Quantidade
Solução tampão	1x	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5 µL
dNTPs	2,5mM	2,5 µL
Primer F	5pMol/ µL	1,0 µL
Primer R	5pMol/ µL	1,0 µL
Taq DNA polimerase	5 U/ µL	0,3 µL
H <sub>2</sub> OMiliQ	-	13, 2 µL
DNA	-	2 µL
<b>TOTAL</b>		<b>25 µL</b>



A reação de amplificação dos genes foi realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). As condições de amplificação foram programadas de acordo com as especificações discriminadas abaixo:

**Tabela 4.** Condições de amplificação dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* durante a reação de PCR.

Desnaturação inicial	94 °C	30s
Desnaturação	94 °C	30s
Anelamento	50 °C	30s
Polimerização	72 °C	2 mim
Extensão final	72 °C	5 mim
Hold	4°C	
Total de Ciclos	30	

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a reação de amplificação, foi retirado 5µL de cada amostra e adicionado em 2µL do corante Loading Buffer. As amostras foram aplicadas no gel de agarose, sendo estes submetidos a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1 X (Tris/Borato/EDTA) em pH alcalino. Em cada reação de eletroforese, foi incluído o DNA *Ladder* 1Kb (Invitrogen) como padrão de peso molecular, o qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em um transiluminador ultravioleta e posteriormente foram fotografados em aparelho *TCL Documentation* (Vilber Lourmat).

### 3.2.2 CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA

A análise do conteúdo protéico das estirpes de *B. thuringiensis* foi realizada a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, em condições desnaturante segundo Laemmli (1970).

Para obtenção de amostras, inicialmente realizou-se o plaqueamento dos isolados em ágar nutriente, posteriormente, de cada isolado foi transferida uma colônia para 12 mL de caldo nutriente mantido à 28°C por 48 horas, em incubador rotativo a 180 rpm. As amostras foram preparadas retirando-se de cada estirpe uma alíquota de 25µl contendo o complexo esporo-cristal, adicionados 25µl de tampão de amostra comercial da *Biorad* (62mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β-mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol), fervidas por 10 min a 100°C e centrifugadas a 10.000 rpm por 30 segundos. Como controle positivo, foi preparada uma amostra da estirpe padrão *Bti* IPS-82, nas mesmas condições anteriormente descritas.

De cada amostra foi retirado 10µl e aplicada no gel de poliacrilamida, e como padrão de massa molecular de proteína foi adicionado o marcador *Broad Range Protein Molecular* (*Promega* de 225 a 10 kDa), como referência para identificação das proteínas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida consiste em um gel composto por duas concentrações: um primeiro gel de malha mais fina 5% o concentrador, cuja função é de compactar a amostra e o separador de 10% de acrilamida, cuja função é separar o complexo SDS-proteína em função da sua massa molecular (Tabela 5). Esses gel foi preparado e colocado em cuba de eletroforese vertical (*Biorad*), preenchida com tampão de corrida 1x (25mM Tris-HCl, 35mM SDS e 1,92mM Glicina) e submetido a um campo elétrico de 90 V por 1 hora.

Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi corado em solução de Comassie Blue (*Biorad*) (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida foi descorado em solução de metanol e ácido acético 4:1, até a visualização das bandas de proteínas que correspondem às toxinas presentes. O gel foi seco em papel celofane, em seguida digitalizado e analisado quanto à presença das proteínas de ação inseticida de interesse, conforme descrição da literatura.

**Tabela 5.** Reagentes utilizados para a confecção dos géis de poliacrilamida.

Géis	Reagentes	Volume
Concentrador	4% Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 mL
	30% Acrilamida	1,3 mL
	H <sub>2</sub> O	6,1mL
	SDS a 10%	100 µl
	Temed	50 µl
	Persulfato de Amônia a 10%	100 µl
Separador	4% Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL
	30% Acrilamida	3,3 mL
	H <sub>2</sub> O	4,1mL
	SDS a 10%	100µl
	Temed	50 µl
	Persulfato de Amônia a 10%	100µl

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

#### 3.3.1 MANUTENÇÃO DE *A. aegypti* EM INSETÁRIO

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*, as quais foram obtidas a partir das desovas de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Malária e Dengue do INPA. As larvas foram criadas sob condições controladas, com temperatura em média de  $28 \pm 2$  °C, umidade relativa em torno de 85% e fotofase de 12 horas.

A criação de *A. aegypti* seguiu o protocolo de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Os ovos de *A. aegypti* armazenados em papel-filtro (Figura 5A) foram colocados para eclosão em bacias esmaltadas contendo 500 mL de água. Após a eclosão, as larvas receberam alimento, sendo este distribuído nas bacias com água (Figura 5B). O alimento consistia na mistura de ração de peixe (*Tetramim*) com pó de fígado bovino em uma proporção 1:1. Três vezes por semana era realizada a limpeza dos recipientes nos quais as larvas eram mantidas, com remoção de 1/3 da água, para evitar a formação de película na superfície, resultado da proliferação de microorganismos. Ao atingir o 3º estágio, as larvas foram selecionadas para o bioensaio, sendo as demais deixadas nas bacias esmaltadas até atingirem o estágio de pupa, sendo então transferidas para gaiolas, teladas, para a emergência dos alados (Figura 5C e D).

Os mosquitos adultos eram mantidos para reprodução e reposição do estoque de ovos do laboratório. Para estes era oferecida alimentação à base de solução açucarada 10%, umedecida em algodão. Adicionalmente, para as fêmeas dos mosquitos foi adicionado o repasto sanguíneo utilizando-se um hamster (*Mesocricetus auratus*).

Após o repasto sanguíneo, copos com água revestidos de papel-filtro (Figura 5E) foram colocados nas gaiolas para as fêmeas desovarem. Após o período de oviposição, que durava em média de três a cinco dias, os copos com as desovas foram retirados das gaiolas e armazenados em local apropriado no insetário mantidos guardadas em um local seco e protegidos. Quando eram necessárias larvas para a realização dos bioensaios, o papel-filtro contendo os ovos foram transferidos para bandejas esmaltadas contendo água potável e alimento, seguindo o mesmo ciclo de atividades mencionado anteriormente.





**Figura 5. Manutenção de *A. aegypti* em laboratório para realização de bioensaios: A) ovos; B) bacia com ovos; C) larvas; D) pupas e E) Gaiola de manutenção dos adultos.**



### 3.3.2 BIOENSAIOS

Foram realizados dois tipos de bioensaios: o bioensaio seletivo, cujo objetivo foi selecionar estirpes com toxicidade às larvas de *A. aegypti* e o bioensaio de quantitativo (dose) com a finalidade de determinar a patogenicidade das estirpes que mostraram atividade entomopatogênica, por meio da estimativa da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>).

### 3.3.3 BIOENSAIOS SELETIVOS

Os bioensaios seletivos foram conduzidos no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, sob temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 80%. Para cada estirpe testada foi preparada réplica de três copos plásticos contendo 10 mL de água potável, 10 larvas de terceiro estágio e 1 mL da cultura total do bacilo, crescido em caldo nutriente à  $28^\circ\text{C}$  e 180 rpm, por 72 horas, até ser verificada pelo menos 90% de esporulação ao microscópio óptico de contraste de fase. Em cada bioensaio foi preparada uma réplica sem inoculação bacilar, servindo assim como controle (Figura 6).

Após a aplicação do bacilo foram realizadas leituras de sobrevivência das larvas em intervalos de tempo de 24 e 48 horas, registrando-se o número de larvas vivas e mortas em cada copo, obtendo desta forma o percentual de mortalidade dos indivíduos. As estirpes que tiveram percentual de mortalidade igual ou superior a 50% foram selecionadas para o bioensaio de quantitativo.

Além dos isolados obtidos neste estudo, avaliou-se a também atividade larvicida do isolado BtAM-27, que pertence a coleção de *B. thuringiensis* da Universidade Federal do Amazonas (Sousa-Filho 2007).

### 3.3.4 BIOENSAIOS QUANTITATIVOS

As estirpes selecionadas foram testadas em bioensaios quantitativos para a determinação da CL<sub>50</sub>. Para tal, cada estirpe foi inoculada em 12 mL de caldo nutriente em

*erlenmeyer* de 50 mL, posteriormente foram colocadas para crescimento em incubador rotativo à 28°C e na agitação de 180 rpm, por um período de 72 horas.

De cada isolado foi realizada a estimativa da quantidade de bactéria na cultura total, por meio do procedimento de quantificação de células viáveis em placas de contagem como descrita por Alves e Moraes (1998), obtendo-se desta forma, a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Posteriormente, de cultura bacteriana foram realizadas diluições seriadas, sendo que, para cada estirpe foi estabelecido inicialmente cinco doses logaritmicamente espaçadas, de forma que fosse possível obter um *ranking* de mortalidade das larvas.

Para cada diluição testada foram montadas réplicas de cinco copos plásticos de 180 mL, contendo 99 mL de água destilada, 20 larvas de 3º estágio e 1 mL da dose do bacilo. Para cada bioensaio foi acrescentado um grupo controle, que consistiu em um copo com larvas sem o tratamento com bacilo. Os bioensaios foram realizados em triplicata, montados em dias alternados, sendo utilizado um total de 300 larvas por dose (Figura 7). Os bioensaios foram realizados segundo os critérios estabelecidos por Dulmage *et al.* (1990).

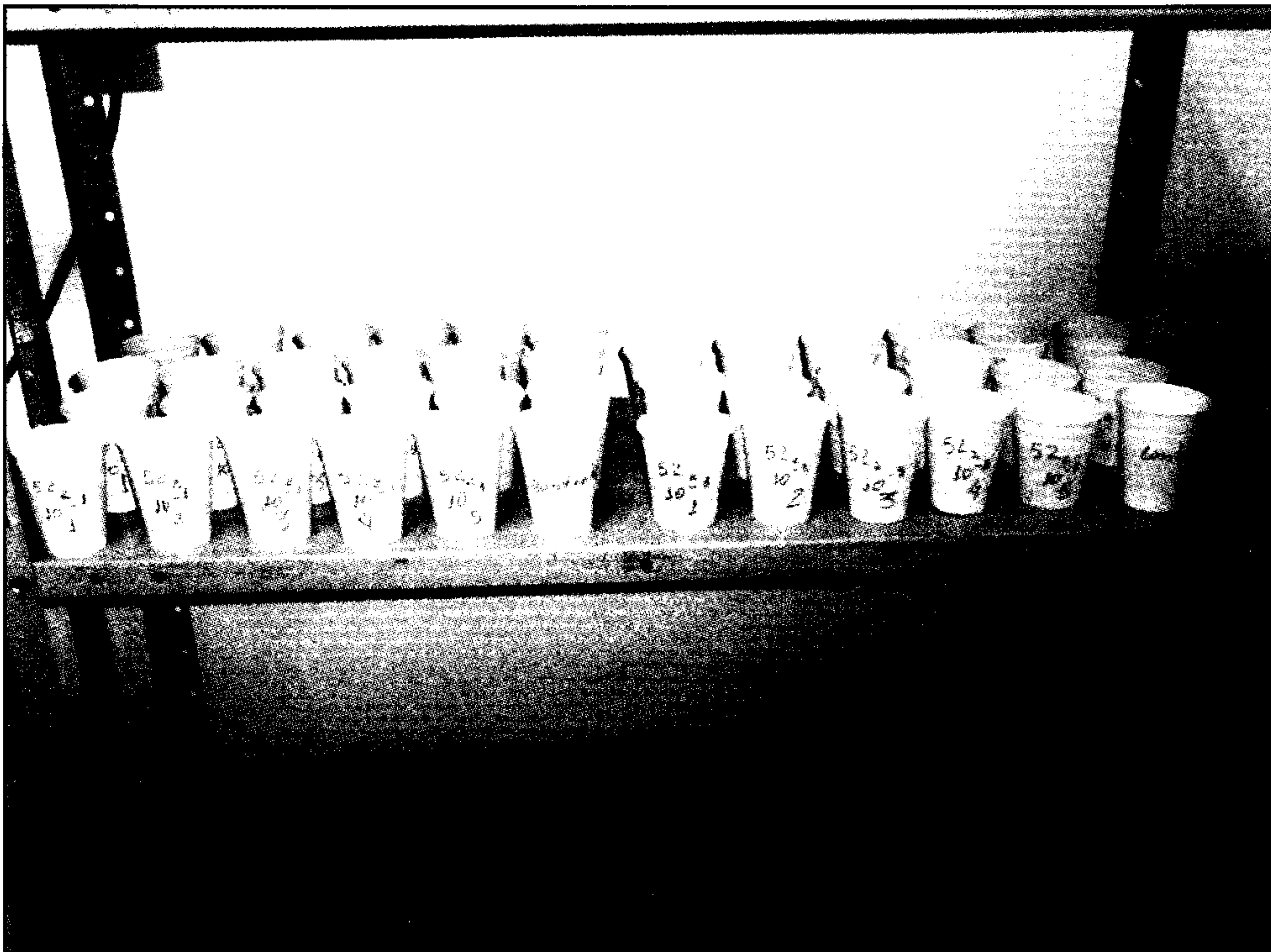
Para comparação da atividade larvicida dos isolados do Amazonas, utilizou-se a linhagem de *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82 (OMS), cedidas pelo Dr. Becker, D. (KABS, Alemanha). Este bioensaio foi realizado nas mesmas condições descritas para as demais estirpes.

O monitoramento dos bioensaios foi realizado em intervalos de 24, 48 e 72 horas após aplicação do bacilo, com a contagem de larvas vivas e mortas. Foram considerados mortos os indivíduos que não responderam com movimentos ao serem tocados por um palito.





**Figura 6.** Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *A. aegypti* durante a realização de um bioensaio de seletivo.



**Figura 7.** Esquema dos copos plásticos contendo larvas de *A. aegypti* durante a realização de um bioensaio quantitativo.

### 3.4 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA (CL<sub>50</sub>)

A determinação da Concentração Letal Mediana, foi realizada com o auxílio do programa POLO-PC (LeOra Software Berkeley, CA), calculada a partir dos dados de mortalidade das larvas nos bioensaios de dose (Finney 1981; Haddad 1998).

### 3.5 ATIVIDADE RELATIVA

As estirpes testadas foram comparadas quanto à patogenicidade em relação à estirpe padrão *Bti* IPS-82. A atividade relativa foi calculada por meio da razão entre os valores da CL<sub>50</sub> de cada isolado obtidas para *A. aegypti* pelo valor de CL<sub>50</sub> obtida com a estirpe padrão *Bti* IPS-82, segundo Rodrigues (1996), por meio da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade relativa} = \frac{\text{CL}_{50 \text{ padrão}}}{\text{CL}_{50 \text{ amostra}}}$$



## 4 RESULTADOS

### 4.1 ISOLAMENTO DE *B. thuringiensis*

Foram analisadas 25 amostras de solo, provenientes de nove municípios do Amazonas. Destas mostras, foram obtidas 484 colônias bacterianas, sendo 57 identificadas como *B. thuringiensis*, o que corresponde a 11,77% (Tabela 6). O maior percentual de isolados obtido por solo analisado ocorreu na amostra 23, proveniente da localidade Urucu, Coari, onde foram obtidos 33,33%; seguido das amostras 7 (Manaquiri) e 19 (Rio Preto da Eva), ambas com 28,57%.

Em termos quantitativos, o maior número de *B. thuringiensis* obtidos em uma única amostra foi sete, observado na amostra 22, procedente de São Gabriel da Cachoeira, seguido de seis isolados na amostra 23, no município de Coari (Tabela 6).

Entre os isolados do Amazonas verificou-se a predominância de 87,72% de *B. thuringiensis* com apenas um cristal protéico, sendo os 12,28% restantes com a presença de mais de um cristal por bactéria. Nos isolados obtidos, o formato do cristal mais freqüente foi arredondado (ovóide e cubóide), os quais puderam ser verificados em mais de 96,5% dos isolados. Ainda em relação à morfologia do cristal, observou-se que em 3,5% dos isolados, o cristal possui formato bipiramidal.

**Tabela 6.** Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos a partir de amostra de solo de diversos municípios do estado do Amazonas.

Amostra	Localidade	Colônias	<i>B. thuringiensis</i>	Isolado
		bacterianas (CB)	Índice de $Bt=n(Bt/CB)*100$	
1	Carreiro Castanho	24	2 (8,33)	IBt- 01 e 02
2	Coari	4	1 (25%)	IBt -03
3	Coari	14	1 (7,1)	IBt- 04
4	Irاندuba	17	1 (5,88)	IBt-05
5	Itacoatiara	18	3 (16,66)	IBt-06, 07 e 08
6	Manaquiri	14	2(14,28)	IBt-09 e 10
7	Manaquiri	7	2 (28,27)	IBt-11 e 12
8	Manaquiri	18	2 (11,11)	IBt-13 e 14
9	Manaus	19	3 (15,79)	IBt-15, 16 e 17
10	Manaus	20	1 (5)	IBt-18
11	Manaus	26	2 (7,69)	IBt-19 e 20
12	Manaus	32	2 (6,25)	IBt-21 e 22
13	Manaus	19	2 (10,52)	IBt-23 e 24
14	Presidente Figueredo	23	1 (4,34)	IBt-25
15	Presidente Figueredo	23	1 (4,34)	IBt-26
16	Presidente Figueredo	25	1 (4)	IBt-27
17	Rio preto da Eva	10	1(10)	IBt-28
18	Rio preto da Eva	29	3 (10,34)	IBt-29, 30 e 31
19	Rio preto da Eva	7	2 (28,57)	IBt-32,33
20	São Gabriel da Cachoeira	24	1(4,17)	IBt-34
21	São Gabriel da Cachoeira	24	4 (16,67)	IBt-35,36,37, 38
22	São Gabriel da Cachoeira	31	7 (22,58)	IBt-39,40,41,42,43,44,45
23	Urucu (Coari)	18	6 (33,33)	IBt- 46,47,48,49,50,51
24	Urucu (Coari)	17	3 (17,65)	IBt-52, 53, 54
25	Urucu (Coari)	21	3 (14,28)	IBt-55,56,57
<b>TOTAL</b>		<b>484</b>	<b>57 (11,78)</b>	

## 4.2 BIOENSAIOS SELETIVOS

Dos 57 isolados de *B. thuringiensis* testados seletivamente em larvas de *A. aegypti*, somente cinco (8,8%) mostraram atividade larvicida, que corresponde aos isolados IBt-03 (Coari); IBt-06 e IBt-07, ambos de Itacoatiara; IBt-28 e IBt-30, do município de Rio Preto da Eva. Nos bioensaios com esses cinco isolados, obteve-se mortalidade em 100% das larvas para quatro isolados testados após 24 horas de aplicação, com exceção de IBt-30, onde a mortalidade máxima foi 83,3% neste mesmo intervalo de leitura, atingindo 86,6% em 48 horas. Os demais isolados não mostraram atividade larvicida (Tabela 7).

Desta forma, os isolados IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28, IBt-30 e BtAM-27 foram selecionados para caracterização molecular e bioensaios quantitativos.

Para o grupo controle só foi registrada mortalidade no bioensaio com o isolado IBt-03, sendo esta inferior de 3% (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultado dos bioensaios seletivos com isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas para larvas de *A. aegypti*

Isolado	Mortalidade %		Controle %	Isolado	Mortalidade%		Controle %
	24 horas	48 horas			24 horas	48 horas	
IBt-01	0	0	0	IBt-31	0	0	0
IBt -02	0	0	0	IBt-32	0	0	0
IBt-03	100	--	0	IBt-33	0	0	0
IBt-04	0	0	0	IBt-34	0	0	0
IBt-05	0	0	0	IBt-35	0	0	0
IBt-06	100	--	0	IBt-36	0	0	0
IBt-07	100	--	3	IBt-37	0	0	0
IBt-08	0	0	0	IBt-38	0	0	0
IBt-09	0	0	0	IBt-39	0	0	0
IBt-10	0	0	0	IBt-40	0	0	0
IBt-11	0	0	0	IBt-41	0	0	0
IBt-12	0	0	0	IBt-42	0	0	0
IBt-13	0	0	0	IBt-43	0	0	0
IBt-14	0	0	0	IBt-44	0	0	0
IBt-15	0	0	0	IBt-45	0	0	0
IBt-16	0	0	0	IBt-46	0	0	0
IBt-17	0	0	0	IBt-47	0	0	0
IBt-18	0	0	0	IBt-48	0	0	0
IBt-19	0	0	0	IBt-49	0	0	0
IBt -20	0	0	0	IBt-50	0	0	0
IBt-21	0	0	0	IBt-51	0	0	0
IBt-22	0	0	0	IBt-52	0	0	0
IBt-23	0	0	0	IBt-53	0	0	0
IBt-24	0	0	0	IBt-54	0	0	0
IBt-25	0	0	0	IBt-55	0	0	0
IBt-26	0	0	0	IBt-56	0	0	0
IBt-27	0	0	0	IBt-57	0	0	0
IBt-28	100	--	0	BtAM27	100	--	0
IBt-29	0	0	0	Bti IPS- 82	100	--	0
IBt-30	83,3	86,6	0				

\*Em cada bioensaio foram testadas 30 larvas  
 -- = 100% de mortalidade na leitura anterior

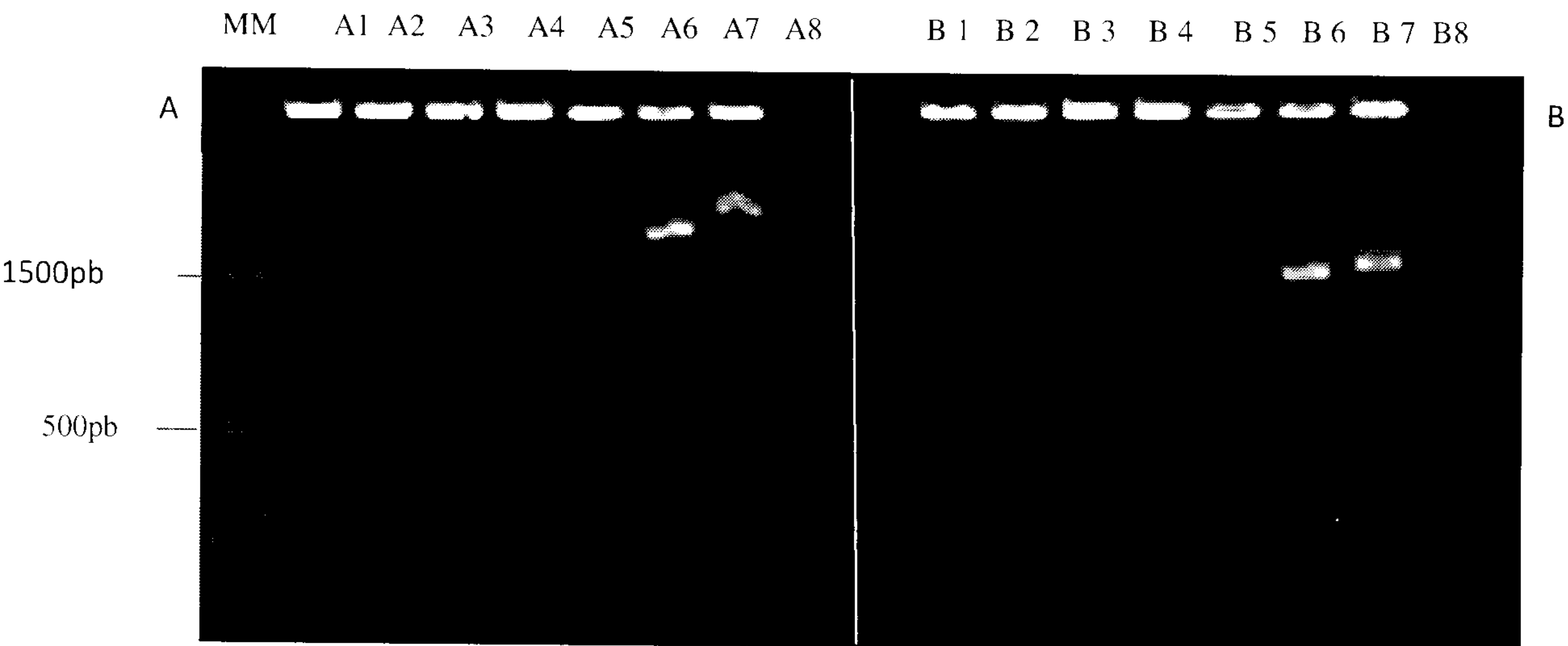


### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

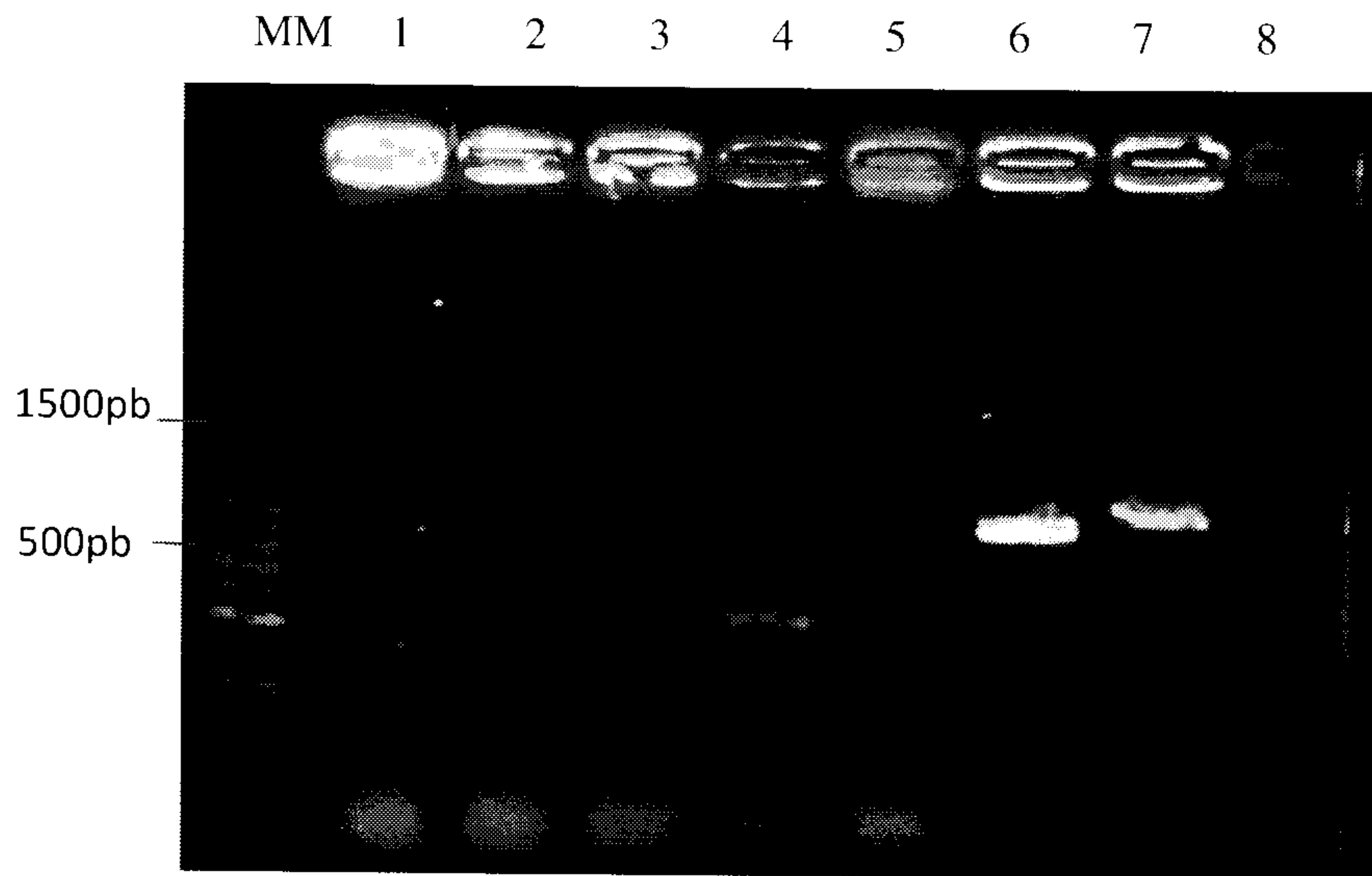
#### 4.3.1 CARACTERIZAÇÃO GÊNICA

Os isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas: IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28, IBt30 e BtAM-27, selecionados previamente por sua ação larvicida em *A. aegypti* (ver item 4.2) foram caracterizados quanto à presença dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba*.

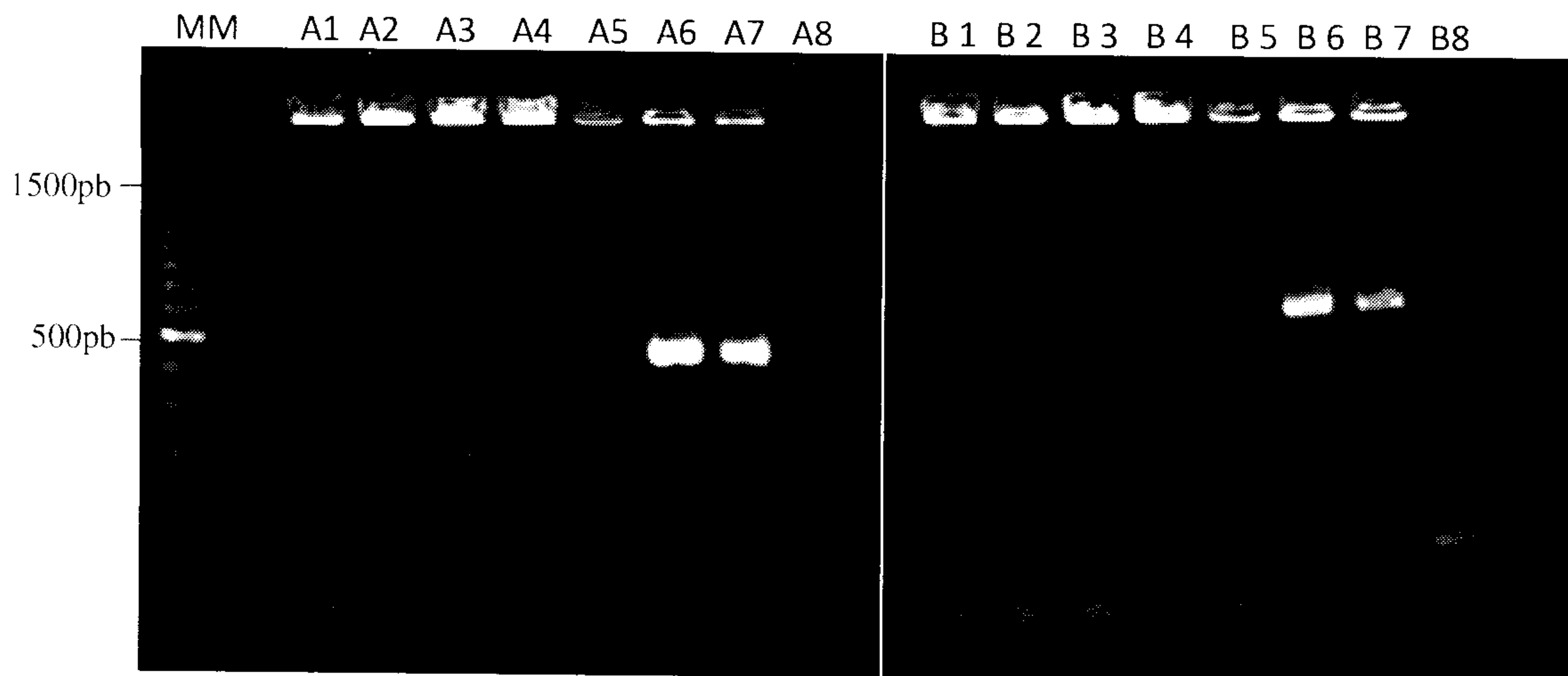
Não foram observados fragmentos de amplificação do DNA para nenhum dos genes testados nos isolados IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28 e IBt-30. Para BtAM-27 as amplificações foram positivas para os cinco genes testados sendo obtidos: fragmentos 1529 pb para o gene *cry4Aa*; 1951 para o gene *cry4Ba*; 995pb para o gene *cry10Aa*; 470 pb para o gene *cry11Aa* e 608 para o gene *cry11Ba*, conforme o esperado. O mesmo resultado foi observado com a estirpe padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82, usada como controle positivo (Figuras 8-10).



**Figura 8.** Produto da amplificação dos genes *cry4Ba* (A) e *cry4Aa* (B) em isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas. MM. Marcador DNA 1kb Ladder, A1: IBt-03, A2:IBt-06, A3:IBt-07, A4:IBt-28, A5:IBt-30, A6:BtAM-27, A7:*Bti* IPS-82 (controle positivo), A8 controle negativo. B1: IBt-03, B2:IBt-06, B3:IBt-07, B4:IBt-28, B5:IBt-30, A6:BtAM-27, B7:*Bti* IPS-82 (controle positivo), B8 controle negativo.



**Figura 9.** Produto da amplificação dos genes *cry10Aa* de *B. thuringiensis* do Amazonas. MM. Marcador DNA 1kb Ladder, 1:IBt-03, 2:IBt-06, 3:IBt-07, 4:IBt-28, 5:IBt-30, 6:BtAM-27, 7:*Bti* IPS-82 (controle positivo), 8:controle negativo.

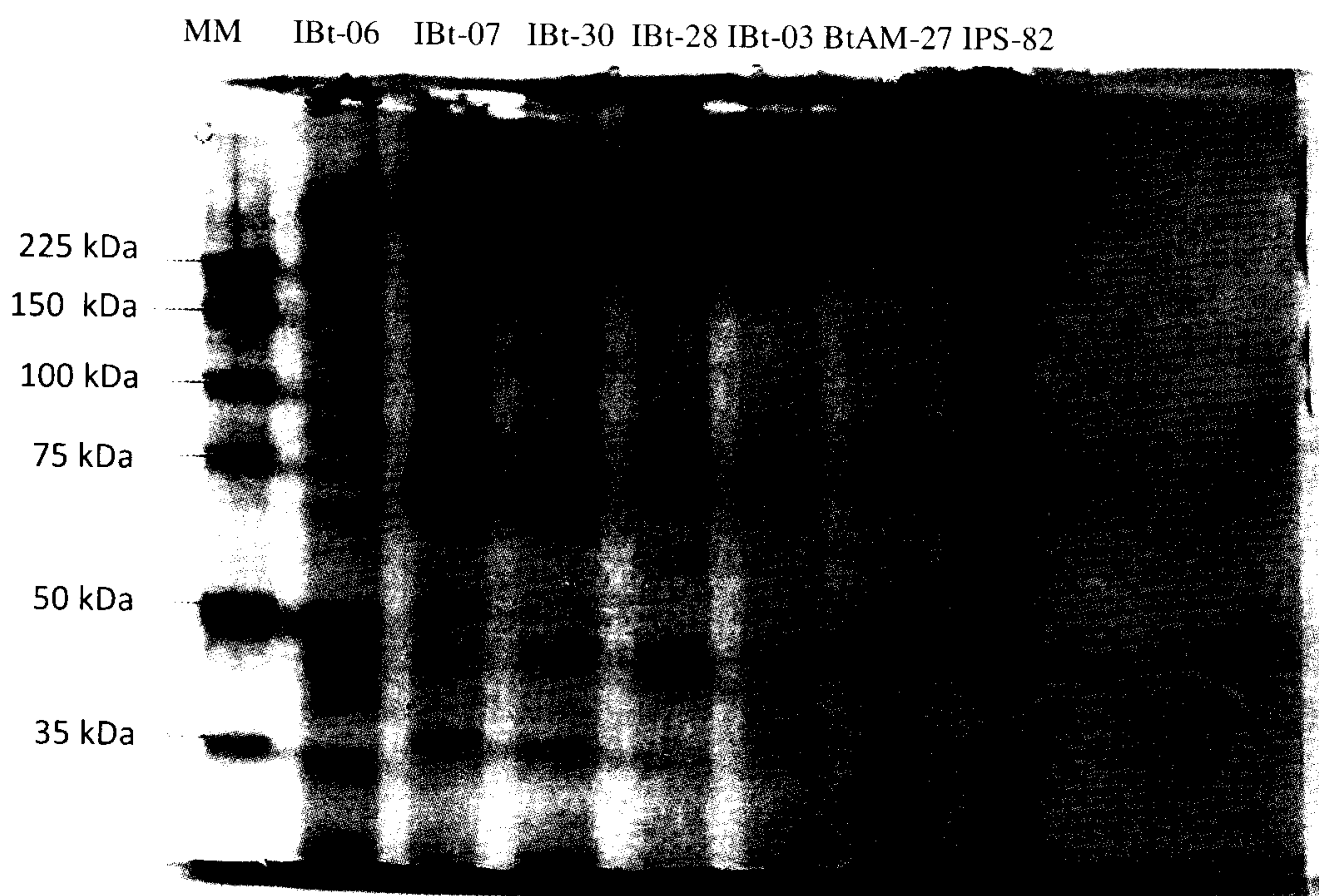


**Figura 10.** Produto da amplificação dos genes *cry11Aa* (A) e *cry11Ba*(B) em isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas. MM-Marcador DNA 1kb Ladder. A1: IBt-03; A2: IBt-06, A3:IBt-07, A4: IBt-28, A5:IBt-30, A6:BtAM-27; A7:*Bti* IPS-82 (controle pos positivo), A8 controle negativo. B1: IBt-03, B2: IBt-06, B3:IBt-07, B4:IBt-28, B5:IBt-30, B6:BtAM-27, B7:*Bti* IPS-82 (controle positivo); B8 controle negativo.

#### 4.3.2 PERFIL PROTÉICO DOS ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*

O perfil protéico dos isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas, juntamente com a estirpe padrão *Bti* IPS-82 estão representada na Figura 11. Todos os isolados mostram perfil de proteínas distintas, entretanto para todos os isolados foi observado proteína em torno de 35 e 50 kDa.

A bactéria BtAM-27 apresentou proteínas de massa molecular de aproximadamente, 130, 72 e 58 kDa, sendo verificado resultado semelhante com a estirpe padrão *Bti* IPS-82 (Figura 11). Essas massas moleculares são compatíveis com das proteínas Cry4Ba, Cry11Ba e Cry10Aa respectivamente. Os isolados IBt-03, IBt-30 e IBt-28 mostraram poucas proteínas e perfis similares, com proteínas de aproximadamente de 70 kDa, sendo para IBt-30 visualizada ainda outra proteína de cerca de 130 kDa. IBt-06 apresentou proteínas de cerca de aproximadamente 70 e 72 kDa e outra maior que 225 kDa, para IBt-07 verificou-se proteína de massa molecular similar ao obtido para IBt-06, de 225 kDa e 70 kDa (Figura 11).



**Figura 11.** Perfil protéico dos isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas, com ação larvicida para *A. aegypti*.



#### 4.4 BIOENSAIO QUANTITATIVO

Os resultados obtidos nos bioensaios quantitativos com as cinco isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas, juntamente com os testes realizados com *B. thuringiensis* var. *israelensis* cepa padrão IPS-82, estão representados na tabela 8.

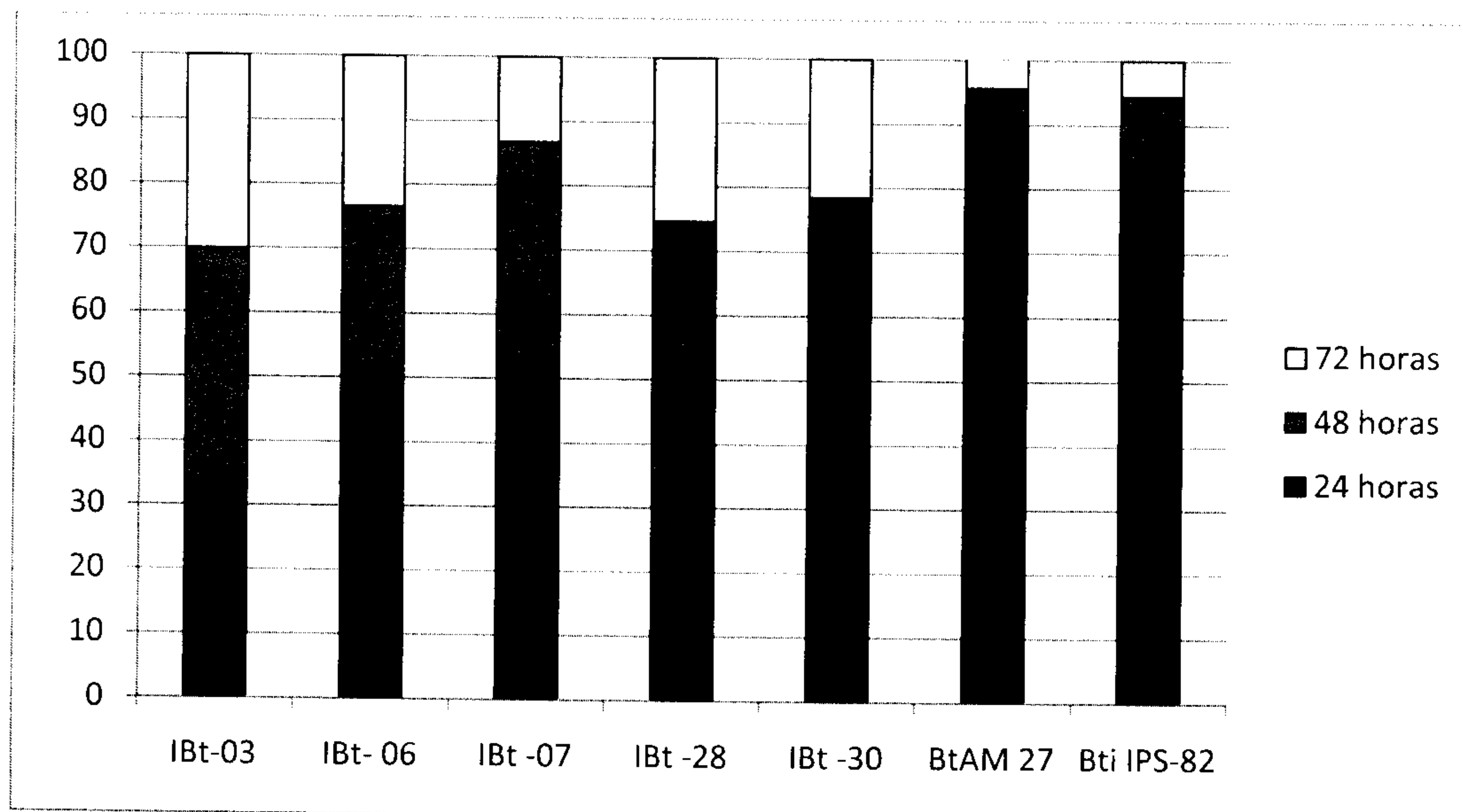
Considerando os intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas, ressalta-se a importância do impacto de mortalidade nas primeiras 24 horas para os isolados IBt-06, IBt-07 e IBt-30, onde os percentuais de mortalidade foram, respectivamente, 51,8%, 51,9% e 59,3%. Bioensaios com a linhagem padrão (IPS-82) e BtAM-27, neste primeiro intervalo de leitura mostraram mortalidade de 83,4 e 87,5%, respectivamente. Entretanto, os isolados IBt-03 e IBt-28 apresentaram maior percentual de mortalidade no intervalo de leitura de 48 horas, 35,6% e 42,1% respectivamente (Figura 12).

Levando-se em conta a leitura de 24 horas após a aplicação do bacilo, observou-se que entre *B. thuringiensis* isolados neste trabalho, com a dose  $10^{-1}$  DCT obteve-se: 80,7% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* nos testes com IBt-06; 56,7% com IBt-07; 52,3% com IBt-03 e 52% com IBt-30. Para a dose  $05.10^{-2}$  DCT: IBt-07 apresentou mortalidade de 54% das larvas; a mortalidade para os demais isolados foi inferior a 50%. Considerando ainda a leitura de 24 horas, os resultados de mortalidade com IPS-82 e BtAM-27 foram de 100% até a dose  $5.10^{-3}$  DCT, atingindo 97,3% na concentração de  $1.10^{-3}$  DCT, para ambas (Tabela 8).

Em 48 horas, o isolado IBt-07 apresentou mortalidade de 95% na concentração  $10^{-1}$  DCT, seguido do isolado IBt-06 com 87,7%. IBt-03, IBt-28 e IBt-30 apresentaram valores similares na concentração  $10^{-1}$  DCT à mortalidade obtida com IBt-07 e IBt-28 e IBt-06 na dose  $5.10^{-2}$  DCT (73,3, 73 e 63,7% respectivamente). Nas demais doses obtiveram-se valores diferenciados de mortalidade entre as estirpes, porém sendo menores que 50%. Com a bactéria padrão e BtAM-27 observou-se mortalidade das larvas de até 64,6% na concentração de  $5.10^{-4}$  e de 60,3% na dose  $10^{-4}$  DCT (Tabela 8).

Na última leitura, 72 horas, o valor de mortalidade ultrapassou 60% até a dose de  $5.10^{-2}$  DCT, sendo que para IBt-28, IBt-06 e IBt-07 a mortalidade chegou a mais de 50% na dose de  $10^{-2}$  DCT. Com a estirpe BtAM-27 observa-se mortalidade das larvas de até 73,3% na dose  $5.10^{-4}$  e para a padrão de 72,7% até a dose de  $10^{-4}$  DCT. Vale ressaltar que apenas com a estirpe padrão obteve-se mortalidade das larvas na dose de  $10^{-6}$  DCT (Tabela 8).





**Figura 12.** Quantidade de larvas de *A. aegypti* mortas em porcentagem nos bioensaios com isolados de *B. thuringiensis*, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.

**Tabela 8.** Mortalidade em porcentagem por dose das larvas de *A. aegypti* nos bioensaios com os isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas em três horários de leitura 24, 48 e 72 horas.

Leitura	Isolado	Dose (DCT)										Total de larvas		
		1.10 <sup>-1</sup>	5.10 <sup>-2</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	5.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-3</sup>	5.10 <sup>-4</sup>	1.10 <sup>-4</sup>	0,5.10 <sup>-5</sup>	1.10 <sup>-5</sup>	0,5.10 <sup>-6</sup>		1.10 <sup>-6</sup>	Controle
24 horas	IBt-03	52,3	28,7	18,0	-	5,0	-	2,0	-	0	-	-	0,1	1800
	IBt-06	80,7	29,3	26,0	-	6,3	-	5,6	-	1,3	-	-	0,05	1800
	IBt-07	56,7	54,0	28,0	14,3	4,0	0	-	-	-	-	-	0,6	1800
	IBt-28	45,3	34,0	24,0	-	9,0	-	3,0	-	1,3	-	-	0,05	1800
	IBt-30	52,0	35,0	9,3	5,3	2,3	-	-	-	-	-	-	0,06	1500
	BtAM-27	100	100	100	100	97,3	43,3	4,3	0,7	0	-	-	0	2400
<i>Bti</i> IPS-82*		100	100	100	100	97,3	-	28,0	-	7,0	-	5,7	0,5	2400
48 horas	IBt-03	77,3	30	29,3	-	11,3	-	5,0	-	3,7	-	-	0,2	1800
	IBt-06	87,7	63,7	29,3	-	11,7	-	9,3	-	1,3	-	-	0,2	1800
	IBt-07	95,0	73,3	48,0	27,7	14,3	4,0	-	-	-	-	-	1,2	1800
	IBt-28	75,7	73,0	46,3	-	22,3	-	5,7	-	3	-	-	0,2	1800
	IBt-30	66,3	44,3	12,7	9,7	4,3	-	-	-	-	-	-	0,5	1500
	BtAM-27	**	**	**	**	98	64,6	18	7,7	1,7	-	-	0,03	2400
<i>Bti</i> IPS-82*		**	**	**	**	99,3	-	60,3	-	13,3	-	7,0	0,8	2400
72 horas	IBt-03	86,3	78,3	47,3	-	9,7	-	5,7	-	4,7	-	-	0,4	1800
	IBt-06	93,0	83,0	61,7	-	18,7	-	18,0	-	16,0	-	-	0,6	1800
	IBt-07	95,7	79,3	57,3	39,3	19,7	11,3	-	-	-	-	-	1,7	1800
	IBt-28	94,3	88,0	63,7	-	29,0	-	9,7	-	6,0	-	-	0,3	1800
	IBt-30	71,3	61,0	18,3	17,7	7,0	-	-	-	-	-	-	0,7	1500
	BtAM-27	**	**	**	**	99,7	73,3	33,3	13	4	-	-	0,04	2400
<i>Bti</i> IPS-82*		**	**	**	**	**	-	72,7	-	21,7	-	9,7	1	2400

\*Utilizada como bactéria padrão. - = Bioensaio não realizado com esta dose. DCT = Diluição da cultura total do bacilo.  
 \*\* = 100% de mortalidade na leitura anterior.

#### 4.4.1 CONCENTRAÇÃO LETAL MEDIANA - CL<sub>50</sub>

Todos os cinco isolados testados nos bioensaios quantitativos se adequaram à análise de regressão linear, apresentando valores significativos a 0,05 para o teste t (>1,96). Entretanto, os isolados IBt-06, IBt-07 e BtAM-27 não mostraram-se adequados para análise de Probit, sendo para estes utilizada a análise de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), pois, os resultados mostraram valores de  $\chi^2$  calculado maior que o  $\chi^2$  esperado ou tabelado (Tabela 9).

Os valores de CL<sub>50</sub> dos isolados de *B. thuringiensis* para as larvas de *A. aegypti* estão representados na tabela 10. Em geral, observou-se diferença entre a quantidade de bactérias no meio de cultura total, sendo maiores em IBt-06 com  $1,12 \times 10^7$  UFC/mL, BtAM-27 com  $8,8 \times 10^8$  UFC/mL e IPS-82 com  $6,71 \times 10^7$  UFC/mL, seguidas por IBt-03 e IBt-30 ( $7,76 \times 10^6$  e  $5,81 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente), por fim com IBt-07 com  $7,16 \times 10^4$  UFC/mL e IBt-28  $3,92 \cdot 10^4$  UFC/mL.

Os menores valores de CL<sub>50</sub> foi obtido com a bactéria padrão *Bti* IPS-82 com 0,00007 (0,00006-0,00009) e BtAM-27 0,00026 (0,00016-0,00040) DCT. Entre os demais isolados testados os menores valores de CL<sub>50</sub> foram obtidos com IBt-07 (0,011 IC 0,006-0,021) DCT e IBt-28 (0,014 IC 0,011-0,019) DCT, os quais similares à IBt-06 com CL<sub>50</sub> (0,027 IC 0,008-0,046) DCT. IBt-03 (CL<sub>50</sub>0,059) mostrou toxicidade similar a IBt-30 que foi de CL<sub>50</sub> 0,061 (0,044-0,089) (Tabela 10).

Considerando os intervalos de confiança da CL<sub>50</sub> dos isolados, observaram-se cinco grupos de homologia: grupo A com a IBt-03; grupo AB com o isolado IBt-30, grupo B composto por IBt-06, IBt-07 e IBt-28; grupo C com BtAM-27 e um grupo D, constituído pela bactéria padrão IPS-82 (Tabela 10).

**Tabela 9.** Mortalidade observada e esperada dos isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas que não se ajustaram ao modelo de Probit, com seu respectivo valor de  $\chi^2$ .

Isolado	Mortalidade Observada	Mortalidade esperada	$\chi^2$ (gl)
IBt-06	236	250	27,2* (4)
	191	207	
	88	87	
	35	24	
	28	21	
	22	21	
	06	21	
IBt-07	285	267	30,9* (3)
	220	239	
	144	141	
	83	96	
	43	28	
	12	15	
	5	5	
BtAM -27	294	274	35* (4)
	194	224	
	54	51	
	23	17	
	5	4	
	3	4	

\*Significativo (p<0,05)



**Tabela 10.** Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) dos isolados de *B. thuringiensis* para larvas de *A. aegypti* após 48 horas de aplicação.

Isolados	Bactérias na cultura total (UFC/mL)**	CL <sub>50</sub> (IC 95%) (DCT)	Homologia	Coefficiente angular ± DP
IBt-03	7,76 x10 <sup>6</sup>	0,059 (NE)	A	-
IBt-06	1,12 x10 <sup>7</sup>	0,027 (0,008-0,046)	B	1,65±0,15
IBt-07	7,16 x10 <sup>4</sup>	0,011 (0,006-0,021)	B	1,32 ± 0,64
IBt-28	3,92 x10 <sup>4</sup>	0,014 (0,011-0,019)	B	0,78 ± 0,50
IBt-30	5,81 x10 <sup>6</sup>	0,061 (0,044-0,089)	AB	1,56 ± 0,12
BtAM-27	8,80 x10 <sup>8</sup>	0,00026 (0,00016-0,00040)	C	2,4 ± 0,12
<i>Bti</i> IPS-82	6,71 x10 <sup>7</sup>	7.10 <sup>-5</sup> (6.10 <sup>-5</sup> -9.10 <sup>-5</sup> )	D	0,85 ± 0,54

NE= não estimado pelo programa POLO-PC. DP = Desvio padrão.

DCT = Diluição da cultura total do bacilo

\*\* UFC = Unidade Formadora de Colônia

#### 4.4.2 ATIVIDADE RELATIVA

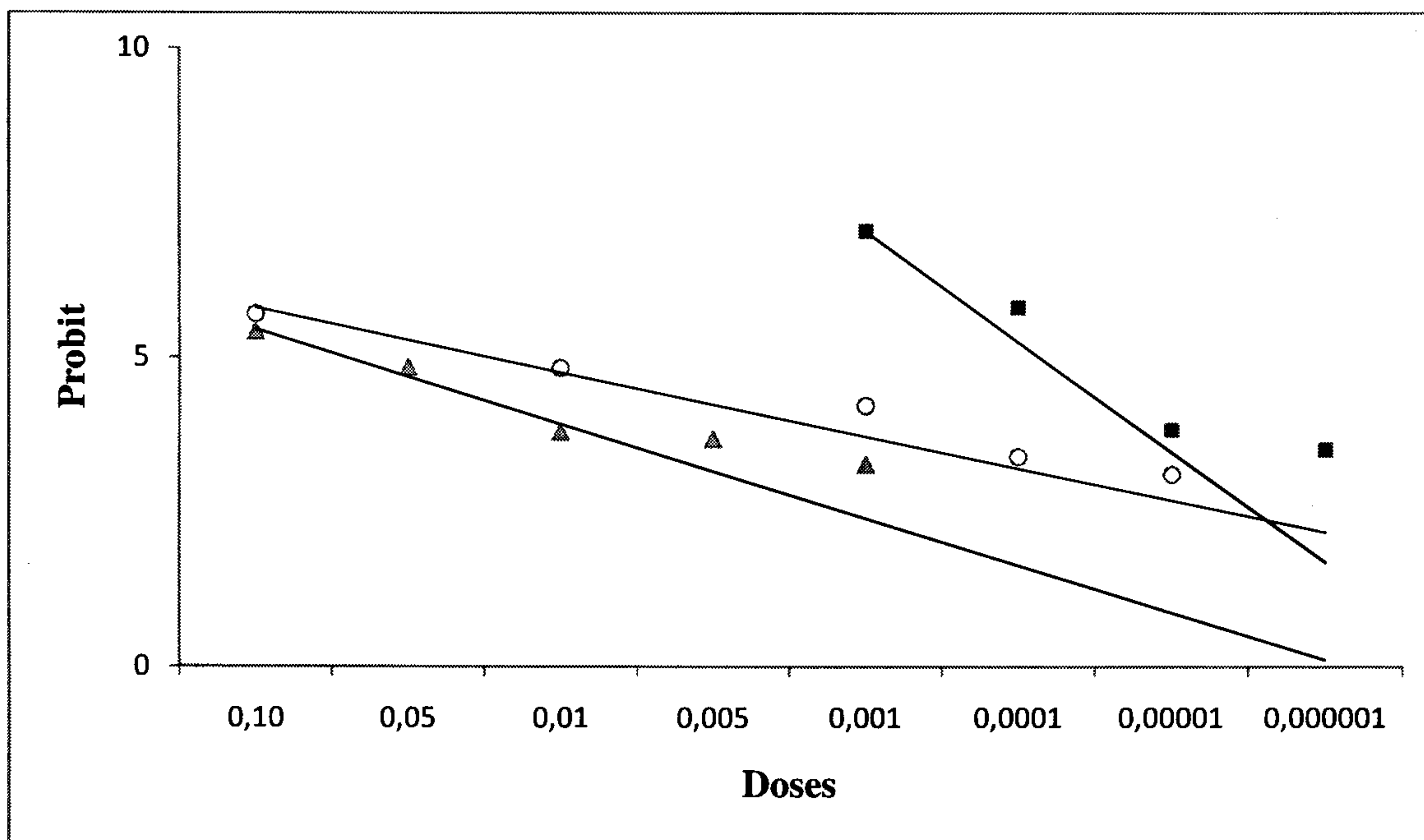
Os resultados da potência dos isolados testados em relação à bactéria padrão *Bti*-IPS 82 constam na tabela 11. Todos os isolados mostraram atividade larvicida para *A. aegypti* inferior que a observada com a estirpe padrão *Bti* IPS-82, sendo que BtAM-27 foi cerca de 4 vezes inferior. O isolado IBt-07 mostrou-se cerca de 157 vezes inferior; para IBt-28 cerca de 200 vezes inferior; IBt-06 385; IBt-03 842 vezes, e a maior diferença de atividade relativa foi obtido em comparação com IBt-30, onde a padrão mostrou potência cerca de 871 vezes superior.

A atividade larvicidas dos isolados IBt-28 e IBt-30 foram comparados por meio da reta de regressão linear, sendo incluída a atividade larvicida da padrão *Bti* IPS-82 (Figura 13). A estirpe padrão apresentou-se qualitativamente e quantitativamente diferente das demais. Entretanto, ao comparar-se os isolados entre si, verificou que IBt-28 e IBt-30 são semelhantes qualitativamente. Ressalta-se que na comparação IBt-30 com a padrão, verifica-se uma inversão de efetividade na menor dose (0,00001 DCT) (Figura 13).

**Tabela 11.** Atividade relativa dos isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas em relação à estirpe padrão *Bti* IPS-82 às larvas de *A. aegypti*.

Isolado	CL <sub>50</sub> (DCT)	Atividade Relativa
IBt-03	0,059	842
IBt-06	0,027	385
IBt-07	0,011	157
IBt-28	0,014	200
IBt-30	0,061	871
BtAM-27	0,00026	3,7
<i>Bti</i> IPS-82	0,00007	-

DCT = Diluição da cultura total do bacilo.



**Figura 13.** Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com isolados IBt-28○ , IBt-30▲ e *Bti* IPS-82■.



## 5 DISCUSSÃO

O controle de mosquitos nocivos ao homem tem sido feito quase que exclusivamente com o emprego de inseticidas químicos. Estes produtos mostram alta eficiência, entretanto, há inúmeros inconvenientes associados, tais como a poluição ambiental e o desequilíbrio na cadeia alimentar, pois estes produtos são altamente tóxicos e não seletivos às populações de um ecossistema (Marcoris 1999). Além destes, o uso indiscriminado dos inseticidas químicos, resultou no surgimento de casos de resistência em algumas espécies de insetos (Marcoris 1999; Braga *et al.* 2004; Braga e Valle 2007a,b). Esta realidade requer continuadas aplicações de inseticidas em campo, em doses cada vez mais altas, mantendo um círculo vicioso.

Diante deste cenário, formas alternativas e/ou complementares aos métodos usuais para o controle de mosquitos tornam-se imprescindíveis. Dentre elas, o manejo integrado de ações vem consolidando-se, com destaque para o controle biológico, o qual consiste na utilização de agentes bióticos, controladores naturais da espécie-alvo. Neste sentido, o uso de bactérias entomopatogênicas para o controle de larvas de mosquitos no Amazonas mostra a eficiência desse método, sendo uma realidade nas campanhas de controle de vetores de malária e dengue em Manaus (FNS 1996; Rodrigues *et al.* 1998; Rodrigues *et al.* 2008 ).

### 5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*

Dentro de um programa de controle biológico, o isolamento de bactérias com ação entomopatogênica constitui-se uma atividade-chave, pois além de estimar a biodiversidade local de microrganismos com ação inseticida, pode constituir-se em uma ferramenta biotecnológica (Litaiff *et al.* 2008). A prospecção de *B. thuringiensis* com efeito tóxico em insetos é uma atividade realizada continuamente em várias partes do mundo (Tan *et al.* 2009).

Nas atividades de isolamento de *B. thuringiensis* desenvolvidas neste estudo em nove municípios do Amazonas, foram encontradas cinco linhagens com ação larvicida. No geral, observou-se um percentual de 11,78% de *B. thuringiensis* em 484 colônias bacterianas obtidas, estando esta espécie presente em todas as amostras analisadas, com variação de 4 a 33%.

Índice semelhante para o isolamento de *B. thuringiensis* foi obtido por Dong *et al.* (2007), a partir de amostras de solo coletadas em florestas primárias, tropicais e subtropicais em províncias da China. De 683 amostras de solo, estes autores obtiveram cerca de 90 isolados de *B. thuringiensis*, o que corresponde a 13,2%.

Em pesquisas realizadas no Brasil, índice inferior ao obtido neste estudo foi encontrado por Silva *et al.* (2002). Estes autores procederam à prospecção de *B. thuringiensis* em amostras de solo em várias regiões brasileiras. Para o norte do país foram analisadas 35 amostras, obtendo-se um total de 212 isolados. Destes, apenas 6,6% foram identificados como *B. thuringiensis*.

Para outras regiões brasileiras, os percentuais do isolamento de *B. thuringiensis* mostram-se bastante diferenciados. Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul por Polanczyk *et al.* (2004), foram analisadas 85 amostras de solo, sendo obtidas 772 colônias bacterianas. Dentre estas, 293 (37,95%) foram identificados como *B. thuringiensis*. Para o estado de São Paulo, Silva *et al.* (2002) descreveram um índice em torno de 40%, enquanto que para o nordeste do país este índice foi cerca de 17%.

Especificamente para o estado do Amazonas, Sousa-filho (2007) coletou 800 amostras oriundas de diversas fontes, tais como: solo seco, lama, areia, água, insetos mortos, folhas, frutos, plantas e raízes, obtendo um índice de 20,6% para *B. thuringiensis*. Vale ressaltar que desse percentual de *B. thuringiensis*, 76,3% foram originados das amostras do solo.

Segundo Meadows (1993), Hossain *et al.* (1997) e Polanczyk e Alves (2003), o solo funciona com o principal reservatório de esporos de *B. thuringiensis* na natureza. Hoje se constitui no substrato preferencialmente utilizado para as atividades de isolamento de *Bacillus* spp.

Há várias teorias que discutem a presença e permanência do *B. thuringiensis* no solo. Hossain *et al.* (1997) admitem que isto se deve pela ocorrência de insetos que lhe servem de substrato para crescimento e dispersão. Polanczyk (2004) sugere que a ampla distribuição desse bacilo pode estar relacionada a fatores abióticos, tais como o vento e a chuva que atuam na dispersão dos esporos do bacilo em vários ambientes.

Outros fatores que podem estar associados à variação de *B. thuringiensis* nas regiões brasileiras são atividades desenvolvidas em cada região, tais como plantações de arroz e soja,

como também das condições climáticas e as próprias características de cada solo (Polanczyk 2004). Polanczyk *et al.* (2009) reportam que a composição química do solo é um fator importante na obtenção desse bacilo. Neste sentido, solos ricos em cobre auxiliariam a resistência dos esporos às condições adversas; cálcio e ferro favoreceriam o desenvolvimento das endotoxinas do bacilo, enquanto que manganês é importante para a patogenicidade. Por outro lado, Polanczyk *et al.* (2009) ressaltam também que a presença de manganês e magnésio em excesso no solo podem inviabilizar a ocorrência de *B. thuringiensis*.

A questão acima é relevante quando se busca nortear locais de possível ocorrência de *B. thuringiensis* com ação entomopatogênica na Amazônia, por exemplo, dada a enorme extensão territorial e as diferenças geológicas e edáficas da região. Entretanto, no presente estudo, não se pode estabelecer qualquer análise neste sentido, devido o pequeno número de amostras nas localidades onde houve coleta. Entretanto, reconhece-se a importância dessas informações, as quais serão incluídas em estudos posteriores com o uso de controle de vetores, realizados pelo laboratório de Malária e Dengue, no Amazonas.

Outro fator que pode influenciar o percentual de *B. thuringiensis* em uma localidade e dificulta a comparação entre estudos, refere-se ao método de isolamento empregado. Estes não são padronizados, havendo uma grande diversidade entre os grupos de pesquisa (Carozzi *et al.* 2001; Silva *et al.* 2002; Polanczyk *et al.* 2009), apesar de haver um método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS 1985). Isto prova que há a necessidade de continuidade nos estudos sobre isolamento e padronização de métodos para diferentes condições de solo.

Portanto, são muitos os fatores que influenciam a eficiência do isolamento de linhagens de *B. thuringiensis*, dos quais sobressai a escolha do substrato, o método de coleta em campo e o processo de identificação da espécie.

Na identificação de *B. thuringiensis*, a análise morfológica dos cristais protéicos constitui de um dado importante. De acordo com Glare e O' Callaghan (2000), o formato dos cristais de toxina, os quais são formados durante o processo de esporulação, são indicadores da especificidade das linhagens, sendo os cristais bipiramidais frequentemente descritos com ação em Lepidoptera, enquanto aqueles com formato ovóide e cubóide possuem toxicidade para Lepidoptera e Diptera. Neste sentido, a descrição quanto ao formato do cristal, requer



muita experiência do identificador, o que torna imprescindível o uso de equipamentos ultrasensíveis e o estudo de métodos de caracterização mais precisos, em nível molecular.

No presente estudo, a predominância de cristais de toxina com formato cubóides/ovóide nos 96,5% isolados do Amazonas, contrasta com a predominância de linhagens com cristal protéico bipiramidal, em linhagens provenientes de São Paulo descritas por Polanczyk *et al.* (2004).

Os bioensaios seletivos *in vitro* com *B. thuringiensis* isolados no Amazonas, obtidos neste trabalho, mostraram ação larvicida para *A. aegypti* em 8,8% dos 57 isolados. Estudos semelhantes realizados por Praça *et al.* (2004), visando à seleção de *B. thuringiensis* com ação em larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, mostrou que, de 300 isolados testados, apenas dois apresentaram toxicidade, o que corresponde a menos de 1%.

Da mesma forma, Dias *et al.* (2002) descreveram atividade de linhagens de *B. thuringiensis* com ação tóxica em larvas de *A. aegypti* em apenas 1,9% dos isolados. Entretanto, Sousa-Filho (2004) também estudando linhagem de *B. thuringiensis* do Amazonas, verificou elevado porcentual de linhagem em bioensaios seletivos, sendo que, de 46 isolados testados, 21,7% mostraram ação larvicida para *A. aegypti*.

Apesar do amplo espectro de ação do *B. thuringiensis* em diversas ordens de insetos, a predominância inseticida desse bacilo é em larvas de Lepidoptera (Silva-Werneck *et al.* 2000; Polanczyk 2004) e Coleoptera (Martins *et al.* 2003; Silva 2008), embora algumas linhagens mostrem efeito tóxico para outras ordens de insetos, tais como Hymenoptera (Pinto *et al.* 2003) e Diptera (Habib 1993; Vilarinhos *et al.* 1998; Cavados *et al.* 2001; Dias *et al.* 2002).

Cavaleiro *et al.* (2005), observaram ação patogênica em Lepidoptera para 13 isolados de 14 estudados. Apenas um isolado mostrou toxicidade para a ordem Diptera. Gobatto *et al.* (2010), em estudos seletivos com *B. thuringiensis*, verificaram ação em Lepidoptera (61%) e Diptera (22,6%). A presença de *B. thuringiensis* com atividade larvicida em mais de uma ordem de insetos num mesmo isolado, está associada à variedade de toxinas do gene *cry* (Sauka e Benintende 2008).

Quanto à importância em Saúde Pública, a frequência de isolados de *B. thuringiensis* com ação em dípteros é relativamente baixa, quando comparada à ação do bacilo em outras ordens de inseto (Dias *et al.* 2002; Silva *et al.* 2002; Costa *et al.* 2010). Neste caso, quase sua



totalidade é para *A. aegypti*, seguido de *Culex pipiens* Linnaeus 1758, *C. quinquefasciatus* mostrando pouca ação sobre larvas de *Anopheles* spp. (Lacey e Singer 1982; Frankenhuzen 2009).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Durante a esporulação, *B. thuringiensis* produz inclusões cristalinas, responsáveis, em grande parte, por sua atividade entomopatogênica. As principais toxinas do cristal são as  $\delta$ -endotoxinas, codificadas pelos genes *cry* (Glare e O' Callaghan 2000). Esta espécie bacteriana apresenta uma grande variedade de genes *cry* e outras toxinas, que conferem amplo espectro de ação para as diferentes ordens de inseto. Em geral, refere-se que a patogenicidade de *B. thuringiensis* em insetos está associada a diversos fatores, sendo as toxinas Cry as mais proeminentes (Pinto *et al.* 2003).

A caracterização molecular das toxinas inseticidas tem sido feita usualmente por técnica de PCR, cujo alcance tem se tornado essencial na caracterização de isolados, a partir de regiões conhecidas dos genes *cry*, sendo ainda utilizadas como parâmetro de potencialidades para controle em isolados não identificados, ou mesmo para a descrição de novos genes/toxinas, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre a ação de *B. thuringiensis* em diferentes ordens de inseto-praga (Bravo *et al.* 1998).

Nas análises realizadas neste estudo, observou-se a presença de genes que codificam as toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry11Ba e Cry10Aa (associadas à toxicidade para *A. aegypti*) na linhagem BtAM-27, resultado similar ao obtido com a estirpe padrão IPS-82. Por outro lado, a não detecção desses genes nos isolados IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28 e IBt-30, entretanto estes mostrando atividade tóxica para *A. aegypti*, corroboram o que Bravo *et al.* (1998) discutem acima, quanto à necessidade de ampliar as descrições dos genes ou outros fatores associados com a toxicidade. Desta forma, na atividade de caracterização de uma linhagem, não se pode desvincular as análises moleculares do comportamento observado nos bioensaios. Com base nisso, torna-se evidente a importância desta atividade como fundamento para elucidar os mecanismos de ação destes isolados sobre as espécies-alvo.

A ausência dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* em *B. thuringiensis* com ação larvicida para *A. aegypti* foi igualmente descrita por Sousa-Filho (2004), nos testes com os

isolados BtAM-134 e BtAM-135. Em adição, este autor descreve 16 isolados com a presença de genes *cry4* (díptero-específico) e ausência de toxicidade em bioensaios com *A. aegypti*, sugerindo este como um gene de baixa expressão ou especificidade para outros dípteros. Dias *et al.* (2002) de forma semelhante, descreveram isolados com ação tóxica para *A. aegypti*, que também não apresentaram os genes *cry4*, *cry11*, mas também descrevem nestes isolados ausência de toxinas Cyt (citólíticas).

Praça *et al.* (2004), reportam dois isolados de *B. thuringiensis* tóxicos para *A. aegypti* com ausência dos genes *cry4* e *cry11*. Entretanto, estas duas linhagens apresentavam o gene *cry2*, para o qual os autores associam a toxicidade em *A. aegypti*. O gene *cry2* tem sido descrito predominantemente com efeito sobre Lepidoptera e em menor ação sobre Diptera.

Continuamente são descritas novas toxinas Cry em *B. thuringiensis* sendo disponibilizadas na *internet*. Até o presente momento são conhecidos cerca de 220 holótipos de toxinas catalogadas (Crickmore *et al.* 2011). Apesar desta variedade, uma revisão realizada por Frankenhuyzen (2009) revelou que apenas 24% destas toxinas foram testadas sobre *A. aegypti*, sendo 20 apenas descritas com ação larvicida à *A. aegypti*.

Em geral, os estudos que envolvem a caracterização de *B. thuringiensis* com ação para *A. aegypti*, têm sido iniciados pela investigação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba* – os mesmos usados neste trabalho. Associados a isto, tem sido sugerido bioensaios para confirmar a expressão das proteínas tóxicas (Costa *et al.* 2010). Estes autores utilizaram a caracterização molecular por meio da PCR com genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry11Ba* e *cyt* (díptero-específicos), como um pré-requisito para os bioensaios em 1073 linhagens de *B. thuringiensis*. Em 45 (4,2%) havia um único gene ou a combinação de mais de um, mas a proporção de genes díptero-específicos foram relativamente baixos.

O potencial das toxinas de *B. thuringiensis* na potogenicidade em *A. aegypti* tem sido alvo de estudos enfocando a contribuição individual de cada uma dessas toxinas na mortalidade das larvas. Crickmore *et al.* (1995), Poncet *et al.* (1995) e Beltrão (2006), associaram maior toxicidade à Cry4Ba, seguida da Cry11Aa e por Cry4Aa. Todos os estudos pressupõem que o cristal nativo ou total (várias toxinas), apresenta toxicidade bem maior do que qualquer uma de suas componentes. Os resultados referentes à caracterização de BtAM-27, realizada neste estudo, direciona-se aos estudos de Crickmore *et al.* (1995), Poncet *et al.* (1995) e Beltrão (2006), pois neste isolado onde se observou a presença de todos os cinco

genes, a toxicidade nos bioensaios foi próxima à observada com a padrão IPS-82, que igualmente possui os cinco genes, ambas muito superiores em relação aos demais isolados que não apresentaram pelo menos um dos cinco genes já citados.

A maior toxicidade do cristal nativo está relacionada com a presença de outras proteínas inseticidas secretadas por esta bactéria, pois o complexo esporo/cristal é constituído por várias toxinas. Desta forma, considerando a toxicidade *B. thuringiensis* para Diptera, além das toxinas Cry, existe outra classe de toxinas com ação específica para estes insetos, as quais somente foram descritas em linhagens de *B. thuringiensis* com ação mosquitocida, também chamadas de toxinas Cyt (Hofte e Whiteley 1989; De Maagd *et al.* 2003; Bravo e Sobéron 2007; Otieno *et al.* 2008).

O mecanismo de ação das toxinas Cyt não está completamente elucidado (Wirth 2000). Entretanto, Schnepf *et al.* (1998) e De Maagd *et al.* (2003) descreveram atividade citolítica dessas toxinas, causando lise em uma variedade de tipos celulares na membrana do epitélio do intestino médio das larvas. Outra característica importante dessas toxinas é a sua ação sinérgica com as toxinas Cry; as toxinas Cyt ligam-se na membrana do epitélio intestinal das larvas, formando poros e inserindo as toxinas Cry. Desta forma, aumenta a toxicidade dos isolados que as possuem (Soberon *et al.* 2007). As proteínas Cry e Cyt são utilizados em todo o mundo para controle de insetos-praga, especialmente mosquitos vetores de doenças em humanos (Perez *et al.* 2007; Soberon *et al.* 2007).

Além das toxinas do cristal, existem outros fatores de virulência em *B. thuringiensis*, tais como as  $\beta$ -exotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hofte e Whiteley 1989; De Maagd *et al.* 2003). Apesar da variada descrição, a exata contribuição de cada fator ainda é desconhecido, tornando difícil determinar o real espectro tóxico de um isolado com mais de um tipo de toxina (Pinto *et al.* 2003).

Nesse contexto, a ausência dos cinco genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry10Aa* e *cry11Ba*, não desvincula a possibilidade da presença de outros genes já descritos e/ou de outras toxinas que também estão associadas ao fator de virulência, mas que sua investigação requer um estudo específico.

Embora os mecanismos de resistência às toxinas de *Bti* não sejam bem esclarecidos em dípteros, resistência a outras toxinas Cry tem sido intensamente estudada em casos de lepidópteros resistentes à plantas transgênicas, produtoras de toxinas Cry de *B. thuringiensis*.



A diminuição na atividade das proteases envolvidas na ativação das toxinas no intestino das larvas e modificações dos receptores de membrana, são os dois principais mecanismos descritos para a resistência das toxinas Cry (Paris *et al.* 2010).

Tendo em vista os casos de resistência ao *B. thuringiensis*, recomenda-se estratégias de manejo no uso de controladores biológicos em campo (Costa *et al.* 2010), onde vê a potencialidade de linhagens com variedade de toxinas em um único cristal, tais como a BtAM-27 avaliada neste trabalho.

Além da BtAM-27, os resultados encontrados neste estudo para os outros cinco isolados do Amazonas, cujos genes de toxinas não estão descritos, apontam para a possibilidade de outros genes ou toxinas. Para tal, há a necessidade de ampliação da investigação molecular dos outros genes, e incluindo o perfil protéico, ou seja, o que de fato é expresso.

Os isolados do Amazonas, inicialmente destacando os resultados do perfil protéico de BtAM-27, mostra esta linhagem com o padrão de proteínas semelhante ao obtido com a padão IPS-82 (Cry4Ba; Cry10Aa; Cry11Ba), confirmando os resultados da PCR onde detectou-se a presença dos genes *cry4Aa*; *cry4Ba*; *cry10Aa*; *cry11Aa*; *cry11Ba* em relação às demais estirpes, observam-se, além de bandas descritas para *B. thuringiensis* var. *israelensis* (130, 58 e 72 kDa), bandas diferenciadas no perfil protéico, reforçando a necessidade de ampliar as atividades de caracterização molecular.

Praça *et al.* (2004) verificaram em dois isolados ativos contra *A. aegypti* bandas de 130 e de 65 kDa no perfil protéico por SDS-PAGE. Estirpes de *B. thuringiensis* com proteína de 130 kDa é considerada padrão para toxinas contra lepidópteros e coleópteros, enquanto que a proteína e 65 kDa está associada às estirpes ativas contra lepidópteros e dípteros, refletindo os bioensaios com as estirpes S234 e S997, realizados pelos autores.

Dias *et al.* (2002) reportam a presença perfil protéico diferenciado para 11 isolados que mostraram ação larvicida para *A. aegypti* e *Culex quiquefasciatus* Say 1823. Entretanto, estes autores verificaram que para todos os isolados testados, uma banda de aproximadamente 130 kDa, a massa molecular desta proteína é compatível com o da proteína Cry4, uma das tóxicas a dípteros, presente na estirpe padrão de *Bti* (Bravo *et al.* 1998). Sendo que para os isolados S550, S685, S764 e S1255, além da proteína de 130 kDa, foi observado proteínas de



70, 65, 65 e 60 kDa. Da mesma forma, as estirpes S285, S447 e S479 apresentaram, além da proteína de 130 kDa, as proteínas de 125 e 45, 60 e 40, 60 e 40 kDa, respectivamente.

Os resultados encontrados neste estudo em relação à caracterização molecular, evidencia o potencial dos isolados do Amazonas para o controle de *A. aegypti*, no entanto é necessário ampliar a descrição de todos os genes associados à produção de toxinas inseticidas, bem como o mecanismo de ação entre os isolados mais potentes.

### 5.3 ATIVIDADE LARVICIDA

Em relação à atividade larvicida, em geral, os bioensaios em condições de laboratório, realizados com os isolados do Amazonas evidenciaram uma ação inferior quando comparados à atividade de *B. thuringiensis* IPS-82 (padrão). Nestes bioensaios, o maior percentual de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas após a ingestão do bacilo pela larva, com exceção dos resultados obtidos com os isolados IBt-03 e IBt-28, onde o maior impacto de mortalidade ocorreu em 48 horas.

Alto impacto nas primeiras 24 horas em experimentos com *B. thuringiensis* foram igualmente relatadas por Costa *et al.* (2010), os quais verificaram 100% de mortalidade das larvas. A ação nas primeiras horas de contato também é relatada em bioensaios com outras espécies de *Bacillus*. Rodrigues *et al.* (1998), Litaiff (2002) e Oliveira (2005) relataram mortalidade em larvas de *Anopheles* spp. e *C. quinquefasciatus* nas primeiras horas de contato. Litaiff *et al.* (2006) Obtiveram TL<sub>50</sub> cerca de 2,5 horas com *B. sphaericus* IB15 sobre larvas de *C. quinquefasciatus*, porém com tempo letal de 10 horas para culturas bacterianas com três horas de fermentação. A forte correlação entre o tempo de fermentação da bactéria e tempo letal foi atribuída por estes autores às condições adversas no meio que induz a esporulação e o intervalo para maturação das toxinas inseticidas.

A rápida mortalidade em larvas aquáticas de diptera testadas com *Bacillus* entomopatogênicos foi discutida por Habib (1983), o qual atribuiu essa mortalidade mais devido ao afogamento das larvas, em virtude da paralisia muscular e a perda da capacidade de flutuação, do que pelos efeitos gradativos da destruição tecidual, como ocorre em lagartas.

A Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) é um parâmetro de avaliação de toxicidade, a qual exige uma série de condições, para que possa ser estimada com maior precisão possível. Um requisito importante é a determinação do número de concentração do bacilo, composto de pelo menos cinco doses (Dulmage 1990; Alves 1998). Esta condição foi considerada para a realização dos bioensaios neste trabalho, onde foram empregadas diluições seriadas a partir da cultura do bacilo. Entretanto, como não se pode determinar com precisão quanto, efetivamente, as larvas ingerem de bacilo em cada dose, optou-se por determinar a quantidade de esporos/toxinas presente na cultura total do bacilo, da mesma forma que Thierry e de Barjac (1989), Vilarinhos *et al.* (1996) e Litaiff (2002).

Nos bioensaios com os isolados ( $\chi^2$  igual a 80,9 gl 3), IBt-06 ( $\chi^2$  igual a 27,2 gl 4), IBt-07 ( $\chi^2$  igual a 30,8 gl 4) e BtAM-27 ( $\chi^2$  igual a 35 gl 3), a análise da mortalidade foi realizada por meio do teste de qui-quadrado, uma vez que os mesmos não se adequaram aos requisitos para a análise de probit (Alves 1998). O qui-quadrado significativo nestes quatro isolados revela “pobreza” de dados, em virtude dos resultados de mortalidade nas doses seriadas não mostrar efeito tóxico distinto, ou seja, em algumas doses (geralmente nas concentrações mais baixas), houve similaridade no percentual de mortalidade observada. No caso em que houve discrepância nos resultados de mortalidade, não foi possível verificar efeito distinto com as doses intermediárias entre duas diluições.

Para a determinação da CL<sub>50</sub> é necessário exatidão nos bioensaios, esta requer uma o amplo número de mortalidade de insetos, para um calculo com mais exatidão é necessário percentuais de mortalidade que mostrem uma curva de mortalidade, a não obtenção destes dados podem comprometer a exatidão da análise (Dulmage *et al.* 1990).

Os resultados da CL<sub>50</sub> dos isolados testados quanto à ação sobre *A. aegypti*, permitiu o agrupamento em cinco grupos de homologia quanto aos valores de CL<sub>50</sub>: um grupo A com o isolado IBt-03; um grupo B (IBt-06, IBt-07 e IBt-28); grupo AB (IBt-30); C com BtAM-27 e um grupo D com a padrão IPS-82.

Ao comparar os valores de CL<sub>50</sub> obtidos com os cinco isolados de *B. thuringiensis* testados neste trabalho, verificou-se que a linhagem padrão, *Bti* IPS-82, apresentou maior toxicidade às larvas (CL<sub>50</sub>= 0,00007 DCT), ou seja, é preciso menor concentração do bacilo para atingir o parâmetro de mortalidade de 50% da população testada. Entre os isolados do Amazonas com maior toxicidade, IBt-07 e IBt-28, os valores de CL<sub>50</sub> variaram de 0,011 e

0,014 DCT, respectivamente. O isolado IBt-30 apresentou a toxicidade mais baixa (CL<sub>50</sub> de 0,061 DCT).

Os resultados acima podem ser sintetizados em relação à atividade de *B. thuringiensis* IPS-82. Esta estirpe mostrou-se cerca de 4 e 150 vezes mais potente do que BtAM-27 e IBt-30 respectivamente. Da mesma forma, a atividade larvicida de IBt-03 e IBt-30 mostraram-se cerca de 800 vezes inferiores.

Entretanto, vale ressaltar que a quantidade de esporos/toxinas presentes na cultura total do bacilo é um parâmetro que pode influenciar diretamente a toxicidade do isolado. Os bioensaios realizados com *B. thuringiensis* isolados no presente estudo, tomaram como base o caldo final da cultura do bacilo. A quantidade da cultura total para IPS-82 foi em média 6,71. 10<sup>7</sup> UFC/mL. BtAM-27 apresentou 8,8.10<sup>-8</sup> UFC/mL e para os isolados IBt-07 e IBt-28 os cultura total obtida foi 7,16.10<sup>4</sup> e 3,92.10<sup>4</sup>UFC/mL, respectivamente, ou seja, quase a metade do que foi observado com a bactéria padrão. Desta forma, não se pode concluir que os valores mais altos de CL<sub>50</sub> para isolados nos quais a quantidade de bacilos no meio de cultura foi inferior, deva-se somente à menor toxicidade do isolado.

O fato acima torna relevante pesquisas continuadas com IBt-07 e IBt-28 isolados de *B. thuringiensis*. Entretanto, enfatizando condições ótimas de crescimento microbiano, que favoreça a produção de toxinas, pois, no caso de linhagens patogênicas dessa espécie, as toxinas inseticidas são sintetizadas no início da esporulação.

Um fator relevante refere-se a outras toxinas ( $\beta$ -exotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases) que são produzidas durante o crescimento bacteriano e que estão presentes no meio de cultura, não fazendo parte do cristal de proteína (Alves 1998). Desta forma, quando são realizados bioensaios, essas toxinas (se presentes) podem influenciar os resultados de mortalidade das larvas, tornando imprecisa a avaliação somente do efeito das toxinas do cristal. Uma forma de minimizar este possível efeito consistiu em centrifugar o meio de cultura, descartando o sobrenadante (Ricardo Polanczyk, com. pessoal), o que foi adotado nos bioensaios neste trabalho.

Gobatto *et al.*(2010), realizaram bioensaios com 31 isolados de *B. thuringiensis* do Rio Grande do Sul contra *C. quiquefaciatus*. No total, 31% dos isolados mostraram atividade



larvicida, sendo que a análise do perfil protéico mostrou fragmento similar ao da toxina Cyt de 27 Kda, desencadeando ação citolítica nas células do intestino médio de dípteros.

Existe um interesse biotecnológico de indutores para a obtenção de toxinas inseticidas em grande escala, a partir do desenvolvimento de tecnologia para baratear os custos de produção (Dias 1992). Neste sentido, o emprego de fatores estressantes combinados na produção de *B. thuringiensis*, como o uso de choque térmico e a adição de sais ao meio de cultura, resultam na melhoria da produção industrial em cerca de 30% (Gribi *et al.* 2004; Gribi *et al.* 2006).

Outros trabalhos relacionando a obtenção da concentração letal mediana de *B. thuringiensis* enfatizam o potencial deste agente biológico no controle de *A. aegypti*. Praça *et al.* (2004) obtiveram CL<sub>50</sub> de 4,9200 e 4,4900 µg/mL para os isolados S234 e S997, respectivamente. Nesse estudo, os resultados com *Bti* IPS-82 foi 1,6 µg/mL. Dias *et al.* (2002) não encontraram linhagens com toxicidade superior à da linhagem padrão, sendo que os valores das estirpes testadas nesse estudo variou entre 6,77 a 41,59 µg/mL. Entretanto, Costa *et al.* (2010) obtiveram cinco isolados mais efetivo que a linhagem padrão após três horas de exposição das larvas ao bacilo, estes apresentaram CL<sub>50</sub> entre 0,01.10<sup>5</sup> e 0,03.10<sup>5</sup> esporos/mL, sendo que *Bti* IPS-82 que nas mesmas condições obteve CL<sub>50</sub>0,04.10<sup>5</sup> esporos/mL.

Há diversos trabalhos no Brasil e em várias partes do mundo sobre a avaliação larvicida de *B. thuringiensis*, entretanto, de acordo com Polanczyk (2004), Litaiff (2006) e Silva *et al.* (2002), a falta de padronização na realização dos bioensaios dificulta comparações entre a toxicidade de estirpes em espécies-alvo.

Quando comparadas as retas de regressão linear obtidas para os isolados IBt-28 e IBt-30 e a estirpe padrão IPS-82, observa-se que em termos qualitativo e quantitativo, a linhagem padrão confirma sua atividade larvicida sobre as demais. Por sua vez, os dois isolados do Amazonas, IBt-28 e IBt-30, ambas procedentes de amostras de solo do município do Rio Preto da Eva, mostraram atividade similar entre si. Observou-se uma inversão de atividade entre o isolado IBt-30 e a bactéria padrão nas menores concentrações testadas. Este quadro permite constatar o quanto a mortalidade das larvas contribui para a determinação da CL<sub>50</sub>, e que esta será mais precisa quanto mais linear for a mortalidade entre as doses testadas, corroborando Alves (1998) e Polanczyk 2004.



Semelhante ao que acontece em outras espécies entomopatogênicas de *Bacillus spp.*, os resultados obtidos com os isolados de *B. thuringiensis* da Amazônia mostram grande potencial para o controle biológico de mosquitos vetores de doença, tais como a dengue, um grave problema de saúde pública no país. Atualmente, o controle biológico é uma alternativa ou complemento viável para as estratégias de controle na região amazônica, que priorize o manejo integrado, reduzindo os inconvenientes de possível desenvolvimento de resistência em mosquitos.

## 6 CONCLUSÃO

Quanto ao isolamento e seleção:

- ✓ *B. thuringiensis* esteve presente em todas as amostras de solo analisadas;
- ✓ O formato do cristal cubóides/ovóide foi o mais freqüente nos isolados do estado do Amazonas.
- ✓ A freqüência do isolados com ação larvicida para *A. aegypti* foi alta em relação à literatura – cinco linhagens detectadas: IBt-03, IBt-06, IBt-07, IBt-28 e IBt-30.

Caracterização molecular:

- ✓ Os cinco isolados tóxicos não demonstraram a presença dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba*.
- ✓ O isolado BtAM-27 apresentou os cinco genes *cry* estudados e perfil protéico 130, 58 e 72 kDa, referente às toxinas Cry4Ba, Cry11Ba e Cry10Aa.
- ✓ Na seleção de isolados de *B. thuringiensis* não se pode desvincular a caracterização molecular do comportamento nos bioensaios de atividades larvicida, para que possam ocorrer registros de isolados tóxicos que não apresentam a série de genes *cry* conhecidas.

Atividade larvicida:

- ✓ Nenhum isolado apresentou atividade larvicida superior a estirpe padrão *Bti* IPS-82.
- ✓ O nível de esporulação influenciou na atividade larvicida dos isolados do Amazonas.
- ✓ O isolado BtAM-27 é o mais promissor para ser utilizado no controle de larvas de *A. aegypti*.

- ✓ Os isolados tóxicos deste trabalho se constituem em um acervo potencial para a busca de novas formulações de inseticidas biológicos no controle de *A. aegypti* e outros vetores.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Agaisse, H.; Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology*, 177: 6027-6032.
- Alves, S.B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 1163pp.
- Aronson, A.I. 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: Insecticidal proteins and post-exponential survival. *Molecular Microbiology*, 7: 489-496.
- Barreto, M.R. 2005. *Prospecção e caracterização de genes de Bacillus thuringiensis com potencial para o controle de insetos praga da cultura da soja*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 107pp.
- Beltrão, H.B.M. 2006. *Interação das toxinas Cry do Bacillus thuringiensis var. israelensis com o mesentério de larvas do vetor Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco. 89pp.
- Bernhard, K.; Jarret, P.; Meadows, M. 1997. Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization and activity against insects pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 59-68.
- Braga, I.A.; Valle, D. 2007a. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol e Serviços de Saúde*, 16: 295-302.
- Braga, I.A.; Lima, J.B.D.; Soares, S. da S.; Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* Resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 199-203.
- Braga, I.A.; Valle, D. 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol e Serviços de Saúde*, 16: 279-293.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *B. thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.*, 179: 2793-2801.
- Bravo, A.; Gill, S.S.; Sobéron, M. 2007. Mode de action of *Bacillus thuringiensis* Cry e Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49:423-435.



- Bravo, A.; Gillb, S.S.; Soberón, M. 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use In: L. Gilbert; K. Iatrou; S. Gill (eds.), *Comprehensive molecular insect science*. Amsterdam, Elsevier BV, p. 175-206.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F. J.; Pena, G.; Nuñez-Valdez, M. E.; Soberón, M.; Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Envir. Microb.* 64:4965-4972.
- Câmara, F.P.; Theophilo, R.L.G.; dos Santos, G.T.; Pereira, S.R.F.G.; Câmara, D.C.P.; Matos R. R. C. de. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop*, 40: 192-196.
- Carozzi, N.B.; Kramer, V.C.; Warren, G.W.; Evola, S.; Koziel, M.G. 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3057-3061.
- Carvalho, L.A.F.; Silva, I.G. 1999. Atividade larvicida do Temefos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762), em diferentes criadouros artificiais. *Rev. Pat. Trop.*, 28:211-232.
- Carvalho, M.S.L.; Caldas, E.D.; Degallier, N.; Vilarinhos, P.T.R.; Sousa, L.C.K.R.; Yoshizawa, M.A.C.; Knox, M.B.; Oliveira, C. 2004. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Rev. Saúde Pública*, 38: 623-629.
- Cavados, C.F.G.; Fonseca, R.N.; Chaves, J.Q.; Rabinovitch, L.; Araújo- Coutinho, C.J.P. 2001. Identification of Entomopathogenic *Bacillus* Isolated from Simullium (Diptera, Simuliidae) Larvae and Adults. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 1017-1021.
- Cavalcanti, E.S.B.; Morais. S.M. de; Lima, M.A.A.; Santana, E.W.P. 2004. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, 99: 541-544.
- Cavaleiro, H.; Praça, L.B.; Martins, E.S.; Medeiros, P.T.; Gomes, A.A.M.M.; Monnerat, R. G. 2005. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, Brasília, 87: 1-22.
- Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 228p.

- Copalbo, D. M. F.; Vilas-Bôas, G. T.; Arantes, O.M.N.; Suzuki, M.T. 2005. *Bacillus thuringiensis*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. nº 24.
- Copping, L.G.; Menn, J.J. Review biopesticides. 2000. A review of the raction, application sandeficacy. *Pest management science Sussex*, 56: 651-676.
- Costa, J.G.M.; Rodrigues, F.F.G.; Angélico, E.C.; Silva, M.R.; Mota, M. L.; Santos, N.K.A.; Cardoso, A.L.H. Lemos, T.L.G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15: 304-309.
- Costa, J.R.V.; Rossi, J.R.; Marucci, S.C.; Alves, E.C da C.; Volpe, H.X.L.; Ferraudo, A.S.; Lemos, V.F.M.; Desidério J.A. 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (l.) (Diptera: culicidae). *Neotropical Entomology* 39:757-766.
- Crickmore, V.; Bone, E.J.; Williams, J. A.; Ellar, D.J. 1995. Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 13: 249-254.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, V.R.J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 807-813.
- Crickmore, 2011: //www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\_Crickmore/Bt>. Acesso em 11/01/2011.
- Crump, N.S.; Cother, E.J.; Ash, G.J. 1999. Clarifying the nomenclature in microbial weed control. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 89-97.
- Damgaard, P.H. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in environment. In: Charles, J.F.; Delécluse, A.; Nielsen-Le Roux, C. Entomopathogenic bacteria; from Laboratory to field application. *Netherlands Klumer Academic Publishers*. p:23-40.
- Dantés, H.G.; Willoquet, J.R. 2009. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad. Saúde Pública*, 25: S19-S31.

- De Barjac H.; Franchon, E. 1990. *Classification of Bacillus thuringiensis strains: Biochemistry, Genetics & Applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick. p. 134-160.
- Delecluse, A.; Rosso, M.L.; and Ragni, A. 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. *Appl. Environ. Microbiol*, 61: 4230-4235.
- De Barjac H.; Sutherland D.J. 1990. *Bacteriol control of mosquitoes & black flies: Biochemistry, Genetics & Applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick. p. 134-160.
- De Maggad, R.A.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, V.; Schnepf, H.E. Structure, 2003. Diversity, and Evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 37: 409-433.
- Dias, D.G.S.; Silva, S.F. da.; Martins, E.S.; Soares, C.M.S.; Falcão, R.; Gomes, A.C.M.M.; Praça, L.B. Dias, J.M.C. de S.; Monnerat, R. G. 2002. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 1676-1340.
- Dias, J.M.C.S. 1992. Produção e utilização da biodiversidade bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27: 59-76.
- Dolanisio, M.R.; Glasser, C.M. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Rev. Bras. Entomologia*, 5: 373-382.
- Dong, S.X; Chang-long, S.; Jie, Z.; Da-fang, H.; Jian-xin, T. Fu-ping, S. 2007. Identification and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Primeval Forests in Yunnan and Hainan Provinces and Northeast Region of China. *Agricultural Sciences in Chinado*, 6: 1343-1351.
- Donovan, W.P.; Dankocsik, C.C. and Gilbert, M.P. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*, *Jounal Bacterial*, 170: 4732-4738.
- Dulmage, H.T.; Yousten, A.A.; Singer, S.; Lacey, L.A. 1990. *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.

- Dye, C. 1992. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *An. Review Entomology*, 37: 1-19.
- Ferreira, A.C.; Chiaravalloti-Neto, F. 2007. Infestação de área urbana por *Aedes aegypti* e relação com os níveis socioeconômicos. *Revista Saúde Pública*, 41: 915-922.
- Finney, D.J. 1981. *Probit analysis*. 3 ed. S. Chand e Company Ltd, Ram Nagar, New Del, 333p.
- Forattini, O.P. 1965. *Entomologia Médica*. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São paulo. Usp, São Paulo, Brasil. 662pp.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 860pp.
- Frankenhuyzen, K.V. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, doi:10.1016.
- Funasa, Fundação Nacional de Saúde. 2001. Controle biológico e manejo ambiental.
- Gadelha, D.P.; Toda, A. T. 1985. Biologia e comportamento de *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Doenças. Trop.* 37: 376-396.
- Geris, R.; Silva, I.G.; Silva, H.H.G.; Barison, A.; Rodrigues-Filho, E.; Ferreira, A.G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* DUCKE with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 50: 25-28.
- Ghribi, D.; Zouari, N.; Jaoua, S. 2004. Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 823-831.
- Ghribi, D.; Zouari, N.; Trigui, W. Jaoua, S. 2007. Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochemistry*, 42: 374-378.
- Glare, T.R.; O'callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: John Wiley, 350p.
- Gobatto, V.; Giani, S.G.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Specht, A.; Barros, N.M. 2010. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera:



Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. Jounal. Biol*, 70: 1039-1046.

Guaycurus, T.V. 1999. Controle biológico de mosquitos com *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, modelo alemão, e pesquisa de genes *cry* em linhagens auto-aglutinantes. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília. 123pp.

Gubler, D.J. 1989. Vigilancia activa Del dengue y la fiebre hemorragica del dengue. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 107: 22-30.

Gubler, D.J. 1997. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 480–496.

Gubler, D.J.; Reiter, P.; Ebi, K.L.; Yap, W.; Nasci, R.; Patz, J.A. 2001. Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Vectorand. *Environm. Health Perspectives*, 109: 223–233.

Habib, M.E.M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância de médica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 31-34.

Habib, M.E.M.; Andrade, C. F. S. 1998. Bactérias Entomopatogênicas, p.383-432. In: Alves, S. B. (Ed). *Controle Microbiano de Insetos*. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

Haddad, M.L. 1998. Utilização do POLO-PC para análise de Probit, p.999-1012. In: Alves, S. B. (Ed). *Controle Microbiano de Insetos*. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

Helgason, E.; Økstad, O.; Caugant, H.A.D.A. Johansen, E.A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I.; Kolstø, A. A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2627–2630.

Höfte, H.; Whiteley, H.R. 1989 Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.

Hannay, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporofoming bacteria. *Nature*, 172:1004, doi:10.1038.

- Hossain, M.A.; Ahmed, S.; Hoque, S. 1997. Abundance and Distribution of the *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural soil of Bangladesh. *Journal Invertebrate Pathology*, 70: 221-225.
- Joshi, V.; Singh, M.; Chaudhary, R.C. 1995. Transovarian transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am. Journ. Trop. Med. Hyg*, 3: 590-594.
- Jung, Y.C.; Kim, S.U.; Côte, J.C.; Lecadet, M.M; Chung, Y.S.; Bok, S.H. 1998. Characterization of new *Bacillus thuringiensis* subsp *higo* strain isolated from rice bran in korea. *Journal Invertebrate Pathology*, 71: 95-96.
- Kuo, W.S.; Chak, K.F. 1996. Identification of Novel Cry-Type Genes from *B. thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction of Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 1369-1377.
- Lacey, L.A.; Singer, S.1982. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against Anopheline and Culicinae mosquitoes. *Mosq. News*, 42: 537-543.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London*, 227: 680-685.
- Leite, J.J.G.; Brito, E.H.S.; Cordeiro, R.A.; Brilhante, R.S.N.; Sidrim, J.J.C.; Bertini, L.M.; Morais, S.M. Rocha, M.F.G. 2009. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.*, 42: 110-113.
- Lenzi, M.F.; Coura, L.C. 2004. Prevenção da dengue: a informação em foco. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.*, 37: 343-350.
- Li, Carrel, J.J.; Ellar, D.J.1991. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature*, 353:815-821.
- Lima, E.P., Filho, A.M.O.; Lima, A.N.R.J.; Cavalcanti, L.P.G.; Pontes, R.J.R. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.*, 39: 259-263.
- Lima, J.B.; Cunha, P.M.; Silva, da R.C. da.; Galardo, A.K.; Soares, S.S.; Braga, I.A.; Ramos, R.P.; Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several

- municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 329-33.
- Lima, J.B.P.; Melo N.V.; Valle, D. 2005. Persistence of vectobac WDG and Metoprag S-2G against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 47: 7-12.
- Litaiff, E.C. 2002. *Controle da malária: Isolamento, Caracterização molecular e avaliação da atividade larvicida contra Anopheles darlingi e Anopheles nuneztovari, de estirpes de Bacillus sphaericus da Amazônia*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade do Amazonas, Manaus, Amazônia. 89pp.
- Litaiff, E. de C.; Tadei, W.P.; Porto, J.I.R.; Oliveira, I.M.A. 2008. Analysis of toxicity on *Bacillus sphaericus* from amazonian soils to *Anopheles darlingi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Acta Amazônica*, 38: 255-262.
- Litaiff, E.C. 2006. *Toxicidade, Caracterização molecular de Bacillus sphaericus da Amazônia e parâmetros do crescimento microbiano para a produção de bioinseticida*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal da Amazônia, Manaus, Amazonas. 145pp.
- Maciel, I.J.; Júnior, J.B.S.; Martelli, C.M.T. 2008. Epidemiologia e desafios no controle de dengue. *Rev. Pat. Trop*, 37: 111-130.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M.; Takaku, 1995. Salinidade da água como fator limitante á oviposição de fêmea de *Aedes aegypti*. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop*, 28:209.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M.; Takaku, L.; Glasser, C.M. Garbeloto, V.C. 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Publica*. 35: 521-522.
- Martins, E.S.; Sone, E.H.; Falcão, R.; Gomes, A.C.; Monnerat, R.G. 2003. Análise funcional e ultra estrutural de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). *Microbiol*, 98: 823-831.
- Meadows, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and the risk assessment, p. 193-220. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S. Bailey, M.J.; Higgs, S. (Ed). *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester: John Wiley.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 1994. Controle de Vetores da Febre Amarela e Dengue. Instruções para pessoal de operação (Normas técnicas). Brasília. 95p.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2005. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília DF. ISBN 85-334-1047-6.

MS - Fundação Nacional de Saúde. Manual de Dengue. 1996. Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente. Brasília. Deope, 79p.

MS- Ministério da Saúde. Dengue-instruções para o pessoal de Combate ao vetor-Manual de normas técnicas. 2001.

MS- Ministério da Saúde. 2010. SVS-Secretaria de Vigilância em Saúde, Informe Epidemiológico da Dengue, Análise de situação e tendências.

MS- Ministério da Saúde. SVS-Secretaria de vigilância em Saúde. Isolamento do sorotipo DENV 4 em Manaus/AM. Note técnica nº 3 Cgpncd/Devep/SVS/MS, FVS/SES-AM.

Nogueira, R.M.R.; Miagostovich, M.P.; Schatzmayr, H.G. 1990. Isolation of dengue vírus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 253.

Oliveira, C. D. 2005. *Análise da toxicidade, da sintomatologia e da histopatologia em larvas de Culex (Linnaeus, 1758), Anopheles e Aedes (Meigen, 1818) (Diptera, Culicidae) frente á ação de estirpes de Bacillus sphaericus (Neide, 1904), em condições de laboratório*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas. 108pp.

OMS- Dengue Hemorrágica: Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001.

Osanai, C.H.; Rosa, A.P.; Tang, A.T.; Amaral, R.S. do.; Passos, A. D.; Tauil, P.L. 1983. Surto de dengue em Boa Vista. *Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo*, 25: 53-4.

Otieno-Ayayo, Z.N.; Zaritsky, A.; Wirth, M.C.; Manasherob, R.; Khasdan, V. Cahan, R.; Ben-Dov, E. 2008. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environmental Microbiology*, 10: 2191–2199.



- Pamplona, L.G.C.; Pontes, R.J.S.; Regazzi, A.C.F.; Júnior, F.J.P.; Frutuoso, R.L, Sousa E.P, Filho, F.F.D.; Lima, J.W.O. 2007. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. *Rev. Saúde Pública*, 41:638-44.
- Pamplona, L.G.C.; Lima, J.W.O.; Cunha, J.C.L.; Santana, E.W.P. 2004. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de alvenaria do município de Canindé, Ceará, Brasil após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop*, 37: 400-404.
- Paris, M.; Tetreau, G.; Laurent, F.; Lelu, M.; Despres, L.; David, J.P. 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistancetomultiple *Bti* toxins in mosquitoes. *Pest. Manag Sci*, 67: 122–128.
- Pérez, C.; Fernandez, L.E.; Sun, J.; Folch, J.L.; Soberón, M.; Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, 102: 18303-18308.
- Pigott, C.R.; Ellar, D.J. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microb and Mol Biology Reviews*, 71: 255–281.
- Pinheiro V.C.S.; Tadei W.P. 2002. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 44: 245-250.
- Pinheiro, V.C.S. 2005. *Controle do Dengue em Manaus-Am: Estudo da positividade/produtividade larvária, viabilidade dos ovos e investigação por RT-PCR dos sorotipos do vírus dengue em Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)*. Tese de Doutorado em Ciências Biológica - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade da Amazônia, Manaus, Amazonas. 164pp.
- Pinto, L.M.N.; Bertiz, D.L.; Castilhos-Fortes, R.; Fiuza, L.M. 2003. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Nº 38.
- Polanczyk, R.A.; Silva, R.F.P.; Fiuza, L.M. 2004. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Lepidoptera: Noctuidae. *Rev. Bras. Agrociência*, 10: 209-214.

- Polanczyk, R.A. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). 2004. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Piracicaba/São Paulo. 158pp.
- Polanczyk, R.A.; Alves, S.B. 2003. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociência*, 2: 1-10.
- Polanczyk, R.A.; Garcia, M.O.; Alves, S.B. 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Publica*, 37: 813-6
- Polanczyk, R.A.; Zanúncio, J.C.; Alves, S.B. 2009. Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. *Cienc. Rural*, 39: 0103-8478.
- Poncet, S.; Delécluse, A.; Klier, A.; Rapoport, G. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Inverteb. Pathology*, 66: 131-135.
- Pontes, R. J.S.; Ruffino-Netto, A. 1994. A dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev. Saúde. Publica*, 28: 218-227.
- Praça, L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B.; Dias, D.G.S.; Gomes, A.C.M.; Falcão, R.; Monnerat, R.G. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq. Agropec. Bras.* 1:11-16.
- Regis, L.; Silva, S.B.; Melo-Santos, M.A. 2000. The use of Bacterial Larvicides and Mosquitos and Black Fly Control Programmes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 207-210.
- Rocha, L.A.; Tauil, P.L. 2009. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.*, 42: 18-22.
- Rodrigues, I. B. 1996. *Controle da Malária: Atividade larvicida de onze estirpes de Bacillus sphaericus contra Anopheles nuneztovari, Anopheles darlingi e Anopheles braziliensis*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 95pp.
- Rodrigues, I.B.; Tadei, W.P.; Dias, J.M.C.S. 1998. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 441-444.

- Rodrigues, I. B.; Tadei, W.P.; Santos, R.L.C. Santos, S.; Baggio, J.B. 2008. Controle da malária: Eficácia de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de Anopheles em criadouros artificiais-tanques de piscicultura e criadouros de olaria. *Rev. Patologia Tropical*, 37: 161-176.
- Santos, R.L.C. 2003.Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997- 2002). *Revista de Saúde Pública*, 37 (5).
- Saraswathy, N.; Kumar, P.A. 2004. Protein engineering of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7: 0717-3458.
- Sauka, D.H.; Benintende, G.B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. an approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural Pests. *Rev Argent Microbiol*, 40: 124-140.
- Schnepf., H.E.; Whiteley, H.R. 1981. Cloning and Expression of the *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene Crystal Protein Gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 78: 893-2897.
- Silva, H.H.G.; Silva, I.G. 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32: 349-355.
- Silva, N. 2008. *Caracterização e seleção de isolados de Bacillus thuringiensis efetivos contra Sitophilus oryzae* L., 1763. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista/ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo 50p.
- Silva, S.F.; Dias, J.M.C. de S.; Monnerat, R.G. 2002. Isolamento, Identificação e caracterização entomopatogênica de Bacilos de diferentes regiões brasileiras. Brasília: Embrapa 4p (EMBRAPA- Cenargen, Comunicado técnico).
- Silva-Werneck, J.O.; Neto, A.J.R.M.V.; Tostes, A.N.; Faria, L. O.; Dias, J.M.C. de S. 2000. Novo isolado de bacillus thuringiensis efetivo contra a lagarta-do-cartucho. *Pesq. Agropec. Bras.*, 35: 221-227.
- Simas, N.K.; Lima, E. da C.; Conceição, S. da R.; Kuster, R.M.; Martins, A. de O.F. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova*, 27: 46-49.

- Soberón, M.; Fernandez, L.E.; Perez, C.; Gill, S.S.; Bravo, A. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, 49: 597–600.
- Sousa-Filho, A. 2007. *Isolamento e Caracterização Molecular de Bacillus thuringiensis do Estado do Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas/ Escola Superior de Ciências da Saúde. Manaus, Amazonas. 48pp.
- Starnbach, M.N.; Falkow, S.; Tompkins, L. S. 1989. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 27:1257-1261.
- Steinhaus, E.A. 1963. *Insect Pathology: an advanced treatise*. Academic Press, New York, 661pp.
- Tadei, W.P.; Thartcher, B.D.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. 1996. Malária em Manaus: Fatores entomológicos envolvidos na dinâmica de transmissão e densidade populacional, caracterização dos criadouros e sazonalidade. Relatório INPA/PCMAM, 64pp.
- Tan, F.; Zhu, J.; Tang, J.; Tang, X.; Wang, S.; Zheng, A.; Li, P. 2009. Cloning and Characterization of Two Novel Crystal Protein Genes, cry54Aa1 and cry30Fa1, from *Bacillus thuringiensis* Strain BtMC28. *Curr Microbiol*, 58:654–659.
- Tauil, P.L. 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. de Saúde Pública*, 18: 867-871.
- Texeira, M. G.; Costa, M. C. N.; Barreto, F.; Barreto, M. L. 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 25: S7-S18.
- Thiery, I.; de Barjac, H. 1989. Selection of the most potent *Bacillus sphaericus* strains based on activity ratios determined on three mosquito species. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 31: 577-581.
- Thorne, L.; Garduno, F.; Thompson, T.; Decker, D. Zounes, M.; Wild, M.; Walfield, A. M.; and Pollock, T.J. 1986. Structural similarity between the lepidoptera and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Bacteriol*, 166: 801-811.



- Tokcaer, Z.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U.; Ozcengiz, G.; Alaeddinoglu, N.G. 2006. Response surface optimization of anti-dipteran delta-endotoxin production by *B. thuringiensis* sub *israelensis* HD 500. *Process Biochemistry* 41: 350-355.
- Travassos da Rosa A.P.A.; Travassos da Rosa J.F.S.; Nakauth C.; Travassos da Rosa, E.S.; Hervé J.P.; Vasconcelos P.F.C. 1998. The first laboratory confirmed cases of dengue fever in Brazil: virus isolation and serological results. In: APA Travassos da Rosa, PFC Vasconcelos, JFS Travassos da Rosa, *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*, Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 164-167.
- Travassos da Rosa, A.P.A.; Travassos da Rosa, J.F.S.; Nakauth, C.; Travassos da Rosa, E.S.; Hervé, J.P.; Vasconcelos, P.F.C. 1997. The first laboratory confirmed cases of dengue fever in Brazil: virus isolation and serological results. *Inst. Evand. Chagas*, 164-167.
- Vasconcelos, P.F.; Meneses, D.B.; Melo, L.P.; Pessoa, E.T. F.; Rodrigues, S.G.; Travassos-da-Rosa, E.S.; Timbó, M.J.; Coelho, I.C.B.; Montenegro, F.; Travassos-da-Rosa, J.F.S.; Andrade, F.M.O.; Travassos-da-Rosa, A.P.A. 1995. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State. *Brasil. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 37: 253-255.
- Vasconcelos, P.F.C.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Degallier, N.; Travassos da Rosa, J.F.S.; Pinheiro, F.P. 1992. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Journal of the Braz Assoc. for the Adv. of Scienc*, 44: 117-24.
- Vilarinhos P.T.R.; Maruniak, J.E.; Hall, D.W. 1996. Characterization and biological activity of a Brazilian isolate of *Bacillus sphaericus* (Neide) highly toxic to mosquito larvae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91: 771-776.
- Vilarinhos, P.T.R.; Dias, J.M.C. S.; Andrade, C.F.S.; Araújo-Coutinho, C.J.P.C. 1998. Use de bactérias para o controle de culicídeos e simuliídeos. In: Alves, S. B. (Ed). *Controle Microbiano de Insetos*. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. P 383-432.
- Vilas-Bôas, G.T.; Peruca, A.P.S.; Arantes, O.M.N. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol*, 53: 673-687.
- Ward, E.S.; Ellar, D.J. 1988. Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. *J. Bacteriol*, 170:727-735.

- WHO- World Health Organization. 1985. Informal consultation the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva : UNDP/ World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 24p.
- WHO- World Health Organization. 2009. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire , 11/12, 84, 85–96.
- WHO-World Health Organization. 2000. Strengthening the implementation of the global strategy for dengue fever/dengue hemorrhagic fever prevention and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO-World Health Organization. 2010. Situation update of dengue in the SEA Region. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Yamamoto, T.; Watkinson, I.A.; Kim, L.Sage, M.V.; Stratton, R.; Akanda, N.; Li, Y.; Ma, D.P.; and Poe, B.A. 1988. Nucleotide sequence of the gene coding for a 130-kDa mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Gene, 66:107-120.
- Yamamoto. T.; Dean, D.H. 2000. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In:Charles, J. F.; Delécluse. A.; Nielsen-Ieroux, C. (Ed).*Etmopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: kluwer AcademicPublisher*, p.81-100.
- Zhong, W.; Shou, Y.; Yoshida, T.M.; Marrone, B. 2007. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Amer Soc For Microb*, 73: 3446–3449.