



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 30**

### **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos**

Daniel Gerheim Souza Dias  
Silvânia Ferreira da Silva  
Erica Soares Martins  
Carlos Marcelo Silveira Soares  
Rosana Falcão  
Ana Cristina Menezes Mendes Gomes  
Lilian Botelho Praça  
José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Rose Gomes Monnerat

Brasília, DF  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e-mail:[sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Felisberto de Almeida

Normalização Bibliográfica: Sérgio Souza Santos

Tratamento de Ilustrações: Jorge Humberto Ribeiro Jr.

Editoração Eletrônica: Jorge Humberto Ribeiro Jr.

Foto da Capa: Cristais de *Bacillus thuringiensis*. Embrapa -

Recursos Genéticos e Biotecnologia

Capa: Jorge Humberto Ribeiro Jr.

**1ª edição**

1ª impressão (2002): tiragem 200

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra mosquitos/ Daniel Gerhein Souza Dias... [et alii] - Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

26 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia , ISSN 1676-1340 ; n. 30)

1. *Bacillus thuringiensis* 2. Controle biológico 3. Mosquitos  
I. Dias, Daniel Gerhein II. Silva, Silvania Ferreira III. Martins, Erica Soares IV. Soares, Carlos Marcelo Silveira V. Falcão, Rosana VI. Gomes, Ana Cristina Menezes Mendes VII. Praça, Lillian Botelho VIII. Dias, Manuel Cabral de Sousa IX. Monnerat, Rose Gomes X. Título XI. Série.

CDD 632.96

---

© Embrapa 2002

# **Autores**

**Daniel Gerheim Souza Dias**

Eng. Agrôn., Bthek Biotecnologia Ltda., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Silvânia Ferreira da Silva**

Bióloga, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Erica Soares Martins**

Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Carlos Marcelo Silveira Soares**

Eng. Agrôn. PhD, Bthek Biotecnologia Ltda.

**Rosana Falcão**

Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Ana Cristina Menezes Mendes Gomes**

Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Lilian Botelho Praça**

Eng. Agrôn., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**José Manuel Cabral de Sousa Dias**

Eng. Químico, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Rose Gomes Monnerat**

Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Sumário

Resumo .....	7
Abstract .....	9
Introdução .....	11
Material e Métodos .....	12
Resultados e Discussão .....	16
Conclusão .....	22
Referências Bibliográficas .....	22

# Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos

---

## Resumo

Neste trabalho foram realizados testes de patogenicidade com 210 de *Bacillus thuringiensis* contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, a fim de se determinar as mais eficazes para a formatação de um bioinseticida brasileiro.

Estas estirpes foram isoladas de diversas regiões do Brasil e estão armazenadas na Coleção de *Bacillus* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As estirpes selecionadas foram caracterizadas por métodos morfológicos (microscopia), bioquímicos (SDS-PAGE 10%) e moleculares (Reação em Cadeia Polimerase).

Foram selecionadas 11 estirpes entomopatogênicas de *Bacillus thuringiensis*. Ainda que todas as estirpes de *Bacillus thuringiensis* fossem tóxicas, nenhuma delas apresentou  $CL_{50}$  inferior ao padrão, *B. thuringiensis israelensis* (Bti), contra *A. aegypti*. Nenhuma das estirpes de *Bacillus thuringiensis* apresentou produtos de PCR esperados para a detecção dos genes *cry4*, *cry11* e *cyt*. A patogenicidade das estirpes não está associada a presença das toxinas Cry4, Cry11 ou Cyt, assim, essas estirpes poderão ser utilizadas para a formatação de um bioinseticida alternativo, caso populações de mosquito desenvolvam resistência ao Bti.

Termos para indexação: *Bacillus thuringiensis*, controle biológico, mosquitos.

# **Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against mosquitoes**

---

## **Abstract**

*In this work, 210 Bacillus thuringiensis strains were evaluated against Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus larvae to select the most effective of them, to be used in a basis of a national product.*

*These strains were isolated from different regions of Brazil and they are stored in a Bacillus spp. Collection at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. The selected strains were characterized by morphological, biochemical methods.*

*Eleven Bt strains were identified after the selective bioassays. Even though strains were pathogenic, none of them showed lower  $LC_{50}$  than Bti against *A. aegypti*. None of these strains produced the expected PCR products for *cry4*, *cry11* and *cyt* genes. These results indicated that the activity of mosquitocidal Brazilian strains are not related with *Cry4*, *Cry11* or *Cy* proteins, so they could be used as an alternative bioinsecticide against Bti resistant mosquitoes populations.*

*Index terms: Bacillus thuringiensis, biological control, mosquitoes.*

## Introdução

No Brasil algumas espécies de insetos pertencentes às famílias Culicidae e Simuliidae têm grande importância na transmissão de agentes etiológicos de doenças humanas e animais. Como exemplo pode ser citado o mosquito *Aedes aegypti*, responsável por mais de 750.000 casos de dengue no último verão (2001/2002) (Vilarinhos, 2002).

Dentre as estratégias empregadas para o controle de vetores de endemias, a Organização Mundial de Saúde recomenda a utilização de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (WHO, 1985). As vantagens da utilização desse bacilo são a especificidade, o efeito não poluente, a inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência de toxicidade às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986). Esta bactéria apresenta alta variabilidade genética, produzindo mais de 40 classes diferentes de proteínas tóxicas contra insetos das ordens Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (Feitelson *et al.*, 1992). Pesquisadores de várias partes do mundo buscam novas estirpes de *B. thuringiensis* capazes de produzir novas toxinas, ou que sejam eficazes para o controle de outros organismos. Estima-se que existam 50.000 estirpes conhecidas.

Produtos à base deste bacilo são comercializados em todo o mundo há mais de cinquenta anos. No Brasil até o momento não existem empresas produzindo nenhum bioinseticida à base dessa bactéria, assim, todo o produto utilizado é de alto custo, inviabilizando, em muitos casos, sua utilização.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui 500 estirpes de *B. thuringiensis* que estão armazenadas no Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos (Monnerat *et al.*, 2001).

Este trabalho teve como objetivo selecionar as estirpes de *B. thuringiensis* mais eficazes para o controle de mosquitos (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*). As estirpes que apresentaram resultado positivo foram caracterizadas através de métodos bioquímicos, moleculares e ultra-estruturais (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

## Material e Métodos

### Estirpes utilizadas

Foram utilizadas 210 estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas estirpes são originárias de amostras de solo e água coletadas em diferentes regiões do país (Monnerat et al., 2001).

### Bioensaios contra mosquitos das espécies *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*

Foram realizados dois tipos de bioensaios: o seletivo, ou discriminante, cujo objetivo foi determinar quais estirpes apresentavam atividade entomopatogênica; e o de dose, cujo objetivo foi determinar quais as estirpes mais tóxicas. Para isso foi calculada a concentração letal necessária para matar 50% da população testada ( $CL_{50}$ ), ou seja, a virulência das estirpes.

**Bioensaios seletivos:** Realizaram-se bioensaios seletivos com os 210 isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> estágio de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*. Para a realização do bioensaio seletivo, 1 ml do caldo bacteriano crescido em meio NYSM (Kalfon et al., 1983) por 48 horas a 28°C e 200 rpm, foi colocado em 2 copos descartáveis de 200 ml contendo 100 ml de água destilada e 25 larvas de 2<sup>o</sup> estágio de *C. quinquefasciatus* ou *A. aegypti*. Um copo sem a cultura foi deixado como controle e após 48 horas fez-se a leitura do número de sobreviventes. Após 24 e 48 horas realizou-se a leitura dos resultados. Eram consideradas patogênicas as estirpes que causassem 50% ou mais de mortalidade às larvas das espécies dos mosquitos, após 48 horas de contato (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

**Bioensaio de dose ( $CL_{50}$ ):** Para determinação da  $CL_{50}$  foram feitas diluições seriadas decimais com a cultura bacteriana cultivada nas mesmas condições descritas no item anterior e liofilizadas. Em seguida, colocou-se 1 ml de cada uma das diluições em copos, em triplicata, como para o bioensaio seletivo. Um copo sem a cultura foi deixado como testemunha. Quarenta e oito horas após o início do teste foi feita a contagem do número de larvas mortas, e determinou-se a  $CL_{50}$  (concentração letal necessária a matar 50% das larvas testadas), através da análise de Probits (Finney, 1971).

Para comparação dos resultados de *B. thuringiensis* fez-se o controle positivo com *B. thuringiensis israelensis* (Bti), IPS-82, a estirpe padrão recomendada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) que vem sendo utilizada em todo o mundo, principalmente para o controle de larvas de *A. aegypti* (WHO, 1985).

#### **Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%)**

A análise das proteínas presentes nas estirpes foi determinada através de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) que permitiu conhecer o perfil e a massa molecular das toxinas produzidas pelas estirpes.

As proteínas de *B. thuringiensis* foram extraídas de acordo com Lecadet et al. (1991). As mesmas foram crescidas em meio NYSM (Kalfon et al., 1983) 30°C por 48 horas em incubador rotativo.

Em seguida, 1 ml do cultivo de cada estirpe foi colocado em eppendorf previamente autoclavado e centrifugado por 5 minutos a 12.800g. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado com 1ml de NaCl 0,15M e centrifugado a 12.800g por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 1ml de PMSF 1mM. Após nova centrifugação (12.800g por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 250µl de PMSF 1mM para estoque em freezer (-20°C).

As amostras foram ressuspensionadas em tampão de proteína 5X (1,5M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol, SDS, 2β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE numa concentração de 10%. O gel foi corado em solução Comassie Blue corante (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por 1 hora e descorado em solução descorante (40% metanol e 10% de ácido acético) até visualização das bandas de proteínas que correspondem as toxinas presentes.

Para comparação dos resultados *B. thuringiensis israelensis* e *B. thuringiensis aizawai* foram utilizados como padrões.

### **Análise da presença de genes de toxinas através da reação em cadeia da polimerase**

Para identificar os genes codificadores das toxinas realizou-se a caracterização molecular através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com as estirpes que se mostraram patogênicas, utilizando diferentes oligonucleotídeos (Carozzi et al., 1991; Céron, et al., 1995; Bravo et al., 1998).

A metodologia de extração de DNA utilizada foi a descrita por Bravo et al., 1998. As estirpes de *B. thuringiensis* foram cultivadas em meio ágar nutritivo a 30°C por 16 horas. Uma pequena quantidade do cultivo (com auxílio de uma alça de platina) foi ressuspensa em 100µl de Água MilliQ estéril em um eppendorf previamente esterilizado. Em seguida a amostra foi congelada no freezer por 1 hora e fervida por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro eppendorf. Preparou-se, então, a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). As reações foram realizadas utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a detecção dos genes *cry4*, *cry11* e *cyt*.

Para a detecção do gene *cry4* (Tabela 1), os primers utilizados foram os descritos por Carozzi et al., (1991), denominados Dip 1A/1B e Dip2A/2B. As condições da reação foram descritas pelos mesmos autores: adicionou-se 15µl do DNA em 50µl do mix da PCR contendo 12.5µM de cada primer, 2.5 U de Taq DNA Polimerase (5.0 U), 100mM de dNTP mix, em termociclador com seguinte programa: 94°C por 45 segundos de desnaturação, 45°C por 45 segundos de anelamento, 72°C por 1 minuto de extensão num total de 35 ciclos.

Analisou-se 20µl de cada produto obtido em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta. *B. thuringiensis israelensis* que apresenta o gene *cry4* foi utilizado como controle positivo. Os primers utilizados para a detecção dos genes *cry11* e *cyt* (Tabela 2) foram descritos por Bravo et al., (1998). As condições da reação foram descritas pelos mesmos autores, adicionou-se 15µl do DNA em 50µl do mix da PCR contendo 12.5µM de cada primer, 2.5 U de Taq DNA Polimerase (5.0 U), 100mM de dNTP mix, em termociclador com seguinte programa: 95°C por 2 minutos de desnaturação inicial, 95°C por 1 minutos de desnaturação, 51°C por 1 minuto de anelamento e 72°C por 5 minutos de extensão num total de 30 ciclos. Analisou-se 20µl de cada produto obtido na PCR em gel de agarose 2% corados com brometo de

etídio e visualizado em luz ultra-violeta. *B. thuringiensis jegathesan* e o *B. thuringiensis medellín*, que apresentam os genes *cry11* e *cyt* foram utilizados como controle positivo.

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos descritos pela Carozzi et al., (1991) correspondentes ao gene *cry4* geral

Primer	Genes	Produto	Sequência 5´-3´
Dip1A	<i>Cry4A</i>	797	CAAGCCGCAAATCTTGTGGA
Dip1B	<i>Cry4B</i>		ATGGCTTGTTTTCGCTACATC
Dip2A	<i>Cry4A</i>	1290	GGTGCTTCCTATTCTTGGC
Dip2B			TGACCAGGTCCCTTGATTAC

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos descritos pela Bravo et al., 1998 dos genes *cry11* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis*

Primer	Genes	Produto (bp)	Sequência 5´-3´
Gral-cry11	<i>cry11A</i>	305	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (d)
	<i>cry11B</i>	305	CATTTGATACTTGAAGTTGTAATCCC (r)
Gral-cyt	<i>cyt1Aa</i>	522	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG (d)
	<i>cyt1Ab</i>	525	GGTACACAATACATAACGCCACC (r)

#### Microscopia eletrônica de varredura

Os cristais de *B. thuringiensis* foram purificados de acordo com o protocolo descrito por Thomas & Ellar (1983). As estirpes de *B. thuringiensis* foram submetidas a purificação do cristal após o cultivo em meio NYSM (Kalfon et al., 1983) a 30°C por 48 horas a 200 rpm ou até completar esporulação total. Esse material foi transferido para tubo Falcon previamente esterilizado e centrifugado a 12.800g por 10 minutos. Observou-se a presença de cristais no sobrenadante, em caso afirmativo guardou-se o mesmo.

O sedimento foi lavado 3 vezes em uma solução contendo água, 0,1mM de PMSF e 0,01% de triton e ressuspensionado em 3 ml de tampão TTN (Triton 1%, Tris HCL 1M pH 8 e NaCl 5M).

Em seguida, cada amostra foi sonicada a 3 pulsos de 1 minuto, com 1 minuto de intervalo entre cada pulso. Durante esse processo as amostras foram mantidas no gelo.

Foi preparado um gradiente de sacarose com as concentrações de 84%, 79%, 72% e 69%, sobre o qual cada uma das amostras foi colocada. O gradiente foi então centrifugado a 47.800g por 20 minutos a 4°C (ultracentrífuga Sorvall, modelo Combi Plus, rotor AH 628). Após a centrifugação as bandas contendo cristais foram recuperadas, diluídas em igual volume de água e centrifugadas a 12.800g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 1 ml de uma solução de triton 0,01%. Esse procedimento foi repetido 2 vezes. O sedimento final foi ressuscitado em 4 ml de solução de PMSF 0,1 mM e armazenado a -20°C.

Para a microscopia de varredura, as amostras foram liofilizadas, depositadas sobre suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

## Resultados e Discussão

### Bioensaios seletivos e de dose (CL<sub>50</sub>)

Dentre as 210 estirpes testadas, quatro apresentaram toxicidade contra *A. aegypti* e duas contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Todas tiveram a CL<sub>50</sub> determinada (Tabelas 3 e 4).

Ainda que todas as estirpes fossem tóxicas, nenhuma delas apresentou CL<sub>50</sub> inferior ao padrão, *B. thuringiensis israelensis* (Bti), contra *A. aegypti*. Cabe destacar que o Bti apresentou CL<sub>50</sub> pelo menos duas vezes inferior à CL<sub>50</sub> da estirpe S479, que foi a mais tóxica dentre as ativas contra este mosquito (Tabela 3).

Os resultados do bioensaio contra *C. quinquefasciatus* mostraram que a estirpe S550 apresentou toxicidade semelhante ao padrão Bti, enquanto que a estirpe S447 foi a menos efetiva (Tabela 4).

**Tabela 3.** Resultado da CL<sub>50</sub> (µg/ml) das estirpes de *Bacillus thuringiensis* contra *Aedes aegypti*

Estirpes	CL <sub>50</sub>	Intervalo de confiança	Homologia
<b>S479</b>	6,77	2,73 - 29,65	B
<b>S1255</b>	9,80	4,24 - 115,04	B
<b>S550</b>	14,79	4,31 - 961,40	B
<b>S447</b>	20,14	4,08 - 842,02	B
<b>S285</b>	23,76	6,61 - 181,16	B
<b>S685</b>	41,59	9,72 - 502,64	B
<b>IPS82 (Bti)</b>	1,06	0,82 - 1,43	A

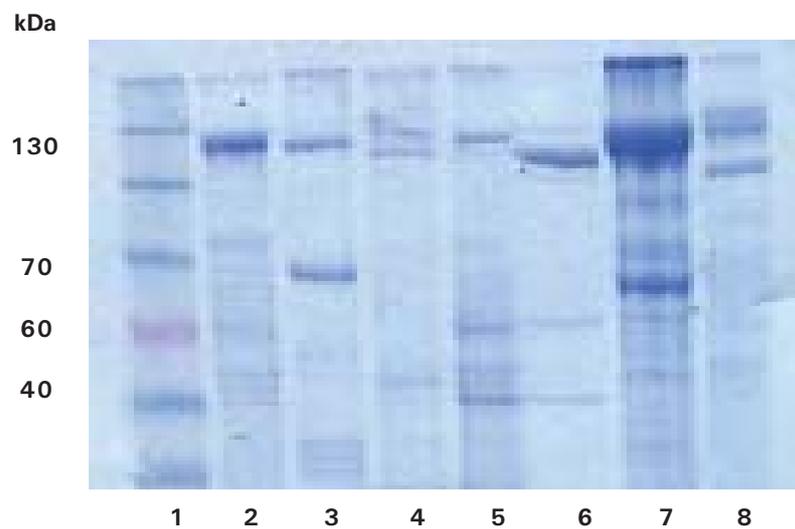
**Tabela 4.** Resultado da CL<sub>50</sub> (µg/ml) das estirpes de *Bacillus thuringiensis* contra *Culex quiquefasciatus*

Estirpes	CL <sub>50</sub>	Intervalo de confiança	Homologia
<b>S550</b>	0,073	0,048 - 0,11	AB
<b>S447</b>	0,089	0,069 - 0,12	B
<b>IPS82 (Bti)</b>	0,034	0,02 - 0,065	A

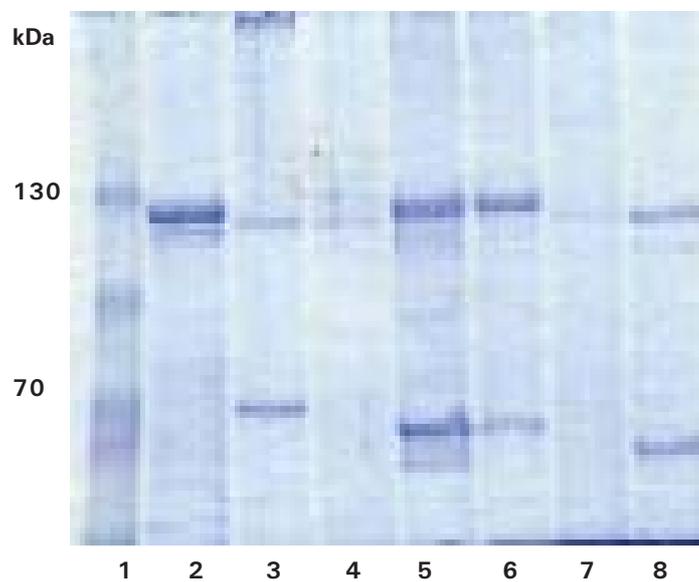
#### Eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) de *Bacillus thuringiensis*

Todas as 11 estirpes apresentaram distintos perfis de proteína, entretanto, em todos os géis foi observada a presença de uma proteína de peso molecular em torno de 130 kDa (Figuras 1 e 2). O peso 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).

Algumas estirpes como a S596 e a S1253 apresentaram apenas a proteína de 130 kDa. As estirpes S550, S685, S764 e S1255 apresentaram uma proteína além da de 130 kDa, respectivamente de 70, 65, 65 e 60 kDa. As estirpes S285, S447 e S479 apresentaram duas proteínas além da de 130 kDa, respectivamente de 125 e 45, 60 e 40, 60 e 40 kDa (Figuras 11 e 12). Cabe salientar que a proteína Cry11, também efetiva contra mosquitos, apresenta peso molecular de 70 kDa (Bravo et al., 1998).



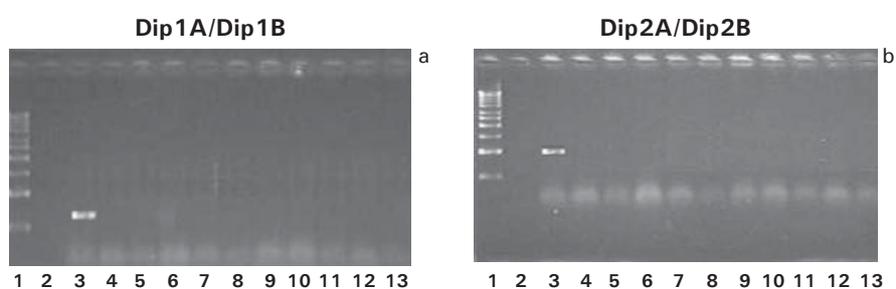
**Fig. 1.** SDS-PAGE 10% das estirpes de *B. thuringiensis*. 1: Marcador de proteína Gibco BRL; 2: *Bta*; 3: *Bti*; 4: S285; 5: S447; 6: S479; 7: 550 e 8: S583



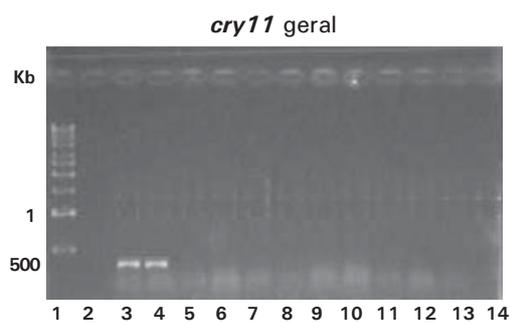
**Fig. 2.** SDS-PAGE 10% das estirpes de *B. thuringiensis*. 1: Marcador de proteína Gibco BRL; 2: *Bta*; 3: *Bti*; 4: S596; 5: S685; 6: S764; 7: 1253 e 8: S1255

### Análise da presença de genes de toxinas através da reação em cadeia da polimerase

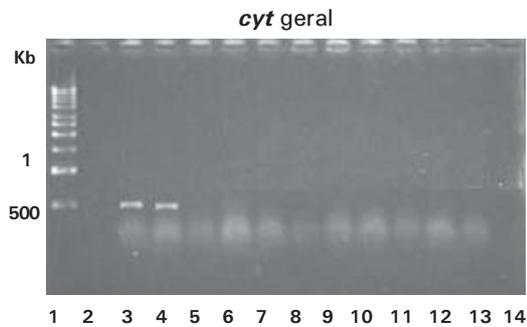
Nenhuma das estirpes testadas apresentou produtos de PCR esperados para a detecção dos genes codificadores das proteínas Cry4 (Figuras 3a e 3b), Cry11 (Figura 4) e Cyt (Figura 5). Esse resultado indica que a toxicidade das estirpes não está ligada a presença dessas proteínas e que as proteínas de pesos moleculares de 130 e 70 kDa., similares a Cry4 e Cry11 presentes nas estirpes estudadas estão sendo codificadas por genes diferentes de *cry4* e *cry11*.



**Fig. 3.** Caracterização molecular através de PCR das estirpes de *B. thuringiensis* com os primers Dip1A/Dip1B (a) e Dip2A/Dip2B (b). 1: Marcador 1Kb da Pharmacia; 2: Controle negativo; 3: *Bti*; 4: S285; 5: S447; 6: S479; 7: S550; 8: S583; 9: S596; 10: S685; 11: S764; 12: S1253 e 13: S1255.



**Fig. 4.** Caracterização molecular através de PCR das estirpes *B. thuringiensis* com o primer geral *cry11*. 1: Marcador 1Kb da Pharmacia,; 2: Controle negativo; 3: JEG; 4: medelin; 5: S285; 6: S447; 7: S479; 8: S550; 9: S583; 10: S596; 11: S685; 12: S764; 13: S1253, 14: S1255.

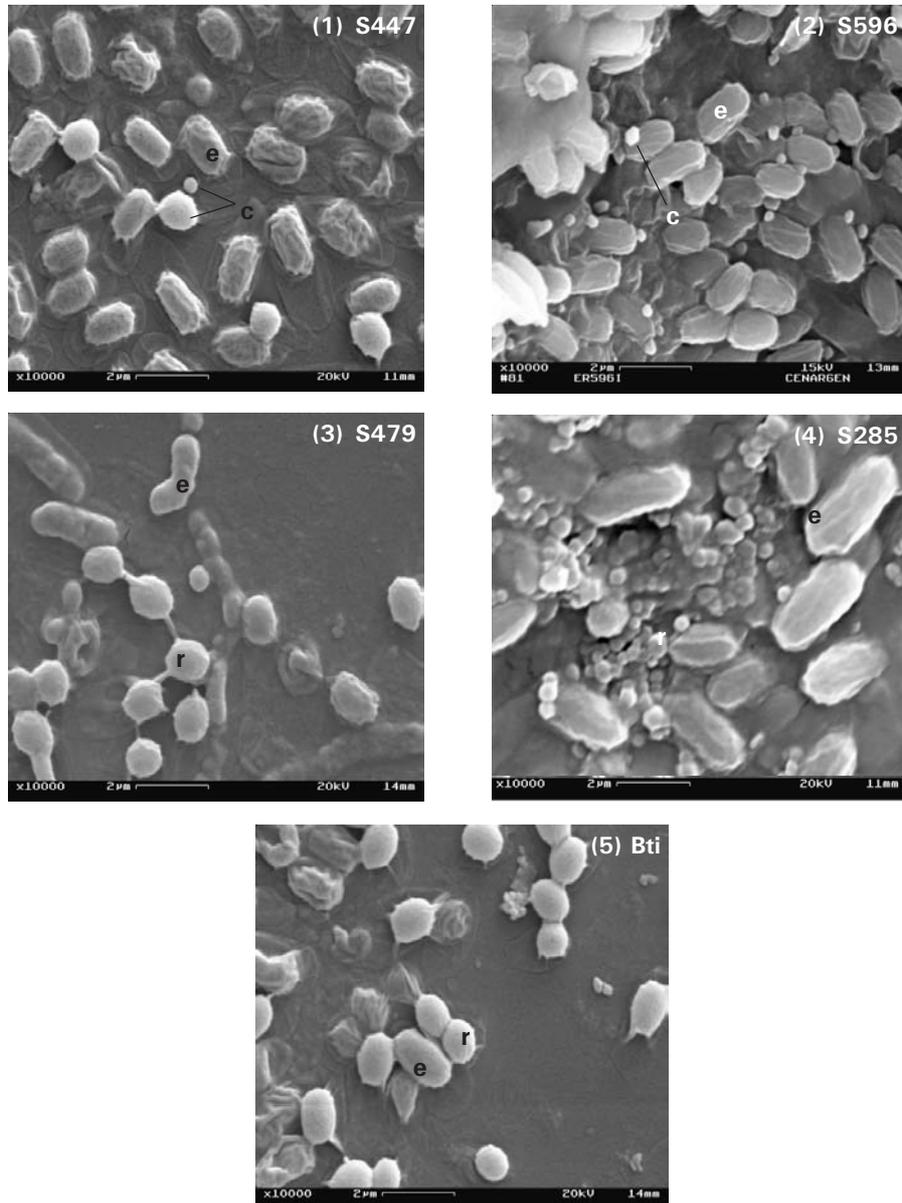


**Fig. 5.** Caracterização molecular através de PCR das estirpes *B. thuringiensis* com o primer geral *cyt*. 1: Marcador 1Kb da Pharmacia,; 2: Controle negativo; 3: JEG; 4: medelin; 5: S285; 6: S447; 7: S479; 8: S550; 9: S583; 10: S596; 11: S685; 12: S764; 13: S1253, 14: S1255

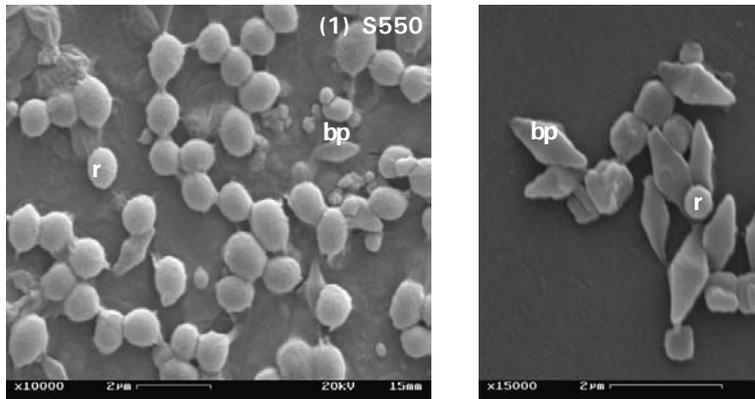
#### Microscopia eletrônica de varredura

As análises efetuadas em microscopia eletrônica de varredura mostraram que as estirpes S447, S479 apresentam cristais redondos semelhantes ao do padrão Bti. Esta forma é típica das proteínas Cry4, que não estão presentes nas duas estirpes mencionadas, entretanto, como a forma do cristal é produto de um arranjo das proteínas, pode ser que as proteínas presentes nessas estirpes possam ser parecidas ao Cry4. A estirpe S447 apresentou ainda um outro cristal redondo de tamanho inferior ao anteriormente mencionado. As estirpes S285 e S596 apresentam cristais redondos, bem pequenos e diferentes dos cristais do Bti (Figura 6).

As estirpes S550 e S764 apresentaram cristais redondos e bipiramidais (Figura 7). É provável que a atividade mosquitocida dessas estirpes esteja ligada à presença dos cristais redondos. Testes de patogenicidade contra lepidópteros deverão ser conduzidos com essas estirpes, pois a presença de cristais bipiramidais pode indicar que as mesmas tenham atividade contra insetos desta ordem (Monnerat & Bravo, 2000).



**Fig. 6.** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais de diferentes estirpes de *Bacillus thuringiensis* (1) estirpe S447, (2) estirpe S596, (3) estirpe S479, (4) estirpe S285, (5) Bti, mostrando (e) esporos, (r) cristais redondos



**Fig. 7.** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais de diferentes estirpes de *Bacillus thuringiensis* (1) estirpe S550, (2) estirpe S764, mostrando (e) esporos, (r) cristais redondos, (bp) cristais bipiramidais

## Conclusão

Ainda que nenhuma das estirpes estudadas tenham apresentado toxicidade mais elevada do que a do *B. thuringiensis israelensis*, pode-se constatar que a patogenicidade das estirpes não está associada a presença das toxinas Cry4, Cry11 ou Cyt, assim, essas estirpes poderão ser utilizadas para a formatação de um bioinseticida alternativo, caso populações de mosquito desenvolvam resistência ao Bti.

Novos estudos deverão ser conduzidos a fim de se conhecer as toxinas responsáveis pela toxicidade aos mosquitos.

## Referências Bibliográficas

Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villa-Lobos, F. J.; Peña, G.; Nuñez-Valdez, M. E.; Soberón, M.; Quintero, R.. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

Carozzi, N. B.; Kramer, V., C.; Warren, G., W.; Evola, E.; Koziel, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase

chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.

Ceron, J.; Ortiz, A.; Quintero, R.; Guereca, L.; Bravo, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

Finney, D. Probit analysis. **Cambridge University Press**, Cambridge, pag. 50-80, 1971.

Kalfon, A.; Larget-Thiery, I.; Charles, J. F.; De Barjac, H. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 168-173, 1983.

Lecadet M. M.; Chaufaux J.; Ribier J. E. Lereclus D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991.

Monnerat, R.G.; Silva, S.F.; Silva-Werneck J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65 p., 2001.

Silva-Werneck, J.O; Monnerat, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Circular Técnica nº 10 - Embrapa 4 p., 2001.

Thomas W.E. & Ellar D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal - endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* 60:181-197, 1983.

Vilarinhos, P. T. R. Dengue transmission and *Aedes aegypti* control in Brazil. VIII International Colloquium on Invertebrate Pathology and microbial Control (ICIPMC), **Documentos 184**, p. 55-57, 2002.

Whiteley, H. R.; Schnepf, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.

World Organization Health (WHO). Informal consultation on the envelopment of *Bacillus spahericus* as a microbial larvicide. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3, 24 p., 1985.



*Impressão*

Gráfica Edicel

Fone: (61) 485.1530

[edicel@edicel.com.br](mailto:edicel@edicel.com.br)