



TOXICOLOGIA DE *BACILLUS THURINGIENSIS* AOS INSETOS SOCIAIS



Nas interações com as plantas, as formigas e os cupins podem se tornar pragas e nesse caso faz-se necessário o controle, onde os entomopatógenos assumem um papel importante no controle biológico. Nesse contexto, alguns dados de pesquisa sobre os ensaios de toxicidade de *B. thuringiensis* às formigas cortadeiras e aos cupins de montículo são apresentados nesse artigo.

1.1 Os insetos sociais

Nas sociedades de insetos, o sistema de castas possibilita uma divisão do trabalho, permitindo a execução de múltiplas tarefas, nas quais indivíduos estéreis são responsáveis pela manutenção da colônia (obtenção de alimento, defesa e cuidados com a prole), e os reprodutores limitam-se a reprodução. O Brasil está entre os países que contemplam a maior diversidade de

insetos sociais do mundo.

As formigas estão entre os organismos mais abundantes do planeta, somando, em conjunto, mais de 10% da massa de todos os organismos terrestres, incluindo mamíferos de grande porte (Hölldobler e Wilson, 1990). De acordo com estes autores, em um hectare da Floresta Amazônica vivem mais de oito milhões de formigas.

As formigas cortadeiras são os principais herbívoros dos Neotrópicos. Abundantes nas suas numerosas colônias desfolham a vegetação, sendo consideradas importantes pragas agrícolas no Brasil, com prejuízos estimados em milhões de reais. O gênero *Acromyrmex* representa uma ameaça às plantas cultivadas. Esses insetos também se destacam por atacarem uma ampla variedade de vegetais, incluindo plantas ornamentais, reflorestamento e pastagens. As diferentes espécies deste gênero apresentam ampla distribuição geo-

Raquel de Castilhos-Fortes

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

Aline Olíboni de Azambuja

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Laura Massochin Nunes Pinto

Bióloga (PUCRS) e Mestre e Doutoranda em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Lidia Mariana Fiuza

Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS), Doutora em Ciências Agrônômicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

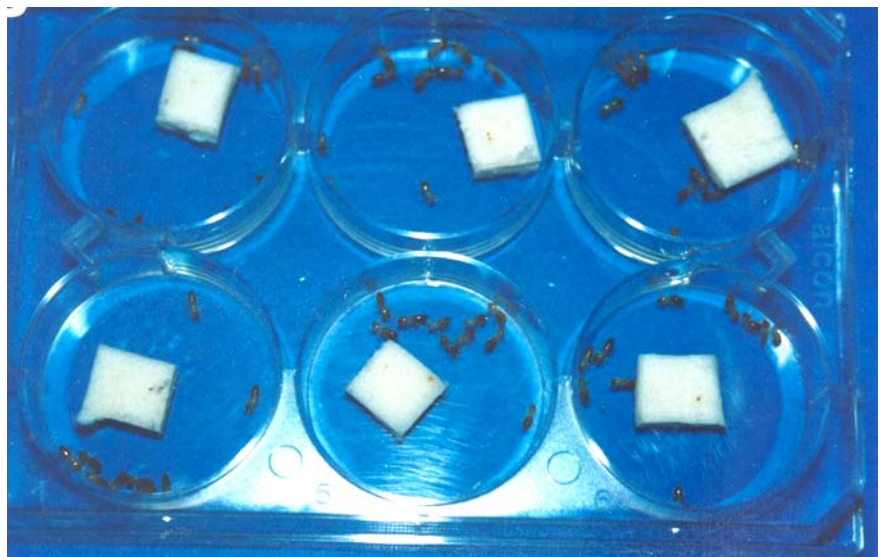


Figura 1. Bioensaios com cepas de *Bacillus thuringiensis* e *Nasutitermes ehrhardti*, em laboratório

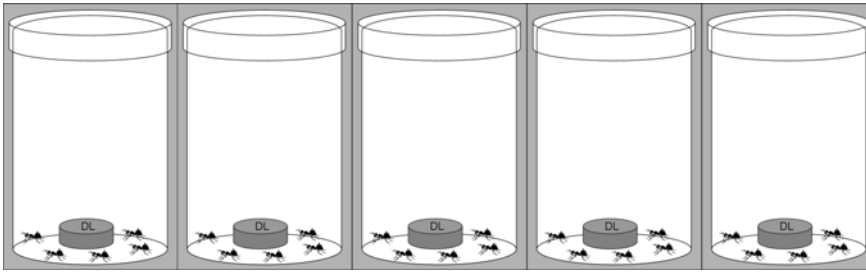


Figura 2. Representação esquemática dos bioensaios com *Acromyrmex lundí* e *Bacillus thuringiensis*

gráfica no Rio Grande do Sul, evidenciando hábitos de forrageamento bastante diversos (Gusmão e Loeck, 1999).

Os cupins estão presentes praticamente em todos os ambientes terrestres ou que sofrerem alguma perturbação antrópica, alimentando-se basicamente de celulose, obtida através desta capacidade de ajustar-se a diversos ecossistemas. Muitas espécies desempenham um papel ecológico significativo, reciclando nutrientes minerais no solo e participando na regeneração de ambientes devastados. Porém, várias outras espécies se destacam como os organismos mais daninhos à cultura agrícola e florestal (Berti-Filho, 1993). No Brasil, além de dificultarem seriamente os tratamentos culturais, os cupins de montículo são considerados importantes pragas de pastagens e culturas de arroz, milho, cana-de-açúcar, amendoim e eucalipto. As principais espécies responsáveis por estes danos pertencem aos gêneros *Cornitermes*, *Syntermes*, *Heterotermes*, *Nasutitermes*, entre outros.

O controle desses insetos vem sen-

do realizado basicamente com a aplicação de inseticidas químicos, sendo um método alternativo as bactérias entomopatogênicas que podem ser isoladas naturalmente do corpo desses insetos, representando mais uma ferramenta de combate ao inseto-praga, sem prejudicar o meio ambiente.

1.2 *B. thuringiensis* isolados de insetos-sociais

Na análise da patogenicidade de *B. thuringiensis* sobre um determinado inseto, o primeiro passo a ser adotado é a correlação da atividade das proteínas Cry no inseto-alvo já descrita. Caso este efeito ainda não tenha sido avaliado, uma das alternativas poderá ser por meio do isolamento do microrganismo de indivíduos da espécie de inseto-alvo. Diversos trabalhos são publicados anualmente descrevendo o isolamento de novas cepas de *B. thuringiensis* de diferentes substratos, inclusive dos próprios insetos (Borm *et al.*, 2002). Nesse sentido, Azambuja *et al.* (2001) obtiveram,

a partir de 80 indivíduos de *Acromyrmex* sp., 35 isolados do gênero *Bacillus*, entre os quais 14 foram identificados como *B. thuringiensis*. Através deste estudo pode-se constatar a elevada ocorrência de *B. thuringiensis* associada a formigas cortadeiras.

Para tanto, os insetos devem ser coletados com pinça e acondicionados em frascos esterilizados a -18°C até o momento de sua utilização. O isolamento é realizado através da maceração de 10 insetos em solução salina, sendo que 1mL desta suspensão é submetida a pasteurização, em seguida a inoculação em Ágar Nutriente e incubação durante 24h a 30°C.

As colônias obtidas devem ser então inoculadas em meio seletivo (Penicilina G) e mantidas a 30°C e 180rpm durante 24 horas. As amostras positivas devem ser avaliadas em microscopia de contraste de fase para identificação das inclusões paraesporais, características de *B. thuringiensis*.

Os isolados de *B. thuringiensis*, oriundos de *A. lundí*, que causaram mortalidade ao referido inseto foram avaliados por PCR quanto a sua constituição de genes *cry* conforme descrito por Pinto *et al.* (2003). Os autores identificaram que sete dos nove isolados que apresentaram toxicidade a *A. lundí* amplificaram fragmentos de DNA correspondentes a pelo menos uma das classes de genes *cry* avaliadas, sendo elas *cry1 e/ou cry9*. Os genes *cry2*, *cry3*, *cry7* e *cry8*, os quais também foram avaliados na pesquisa, não foram detectados nas amostras testadas. Além disso, 22% dos isolados obtidos de *A. lundí* não amplificaram com nenhum dos *primers* avaliados, podendo

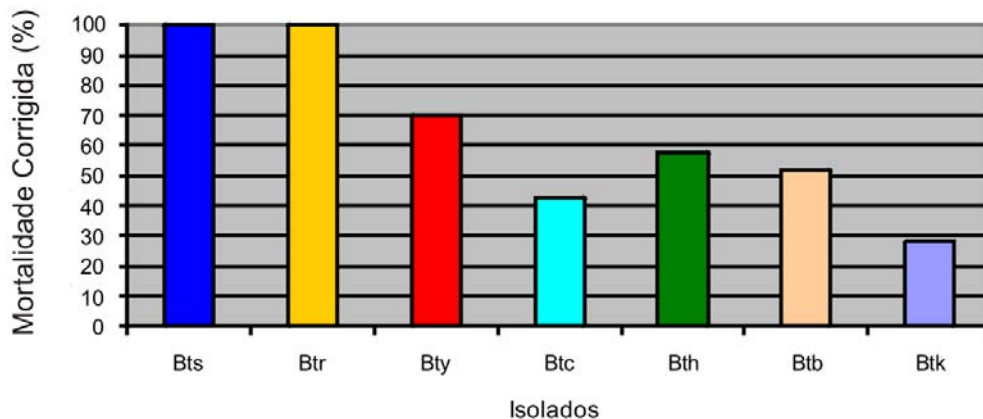


Figura 3. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* à *Nasutitermes ehrhardti*, em ensaios de laboratório; *B. thuringiensis sooncheos* (Bts); *B. thuringiensis roskildiensis* (Btr); *B. thuringiensis yunnanensis* (Bty); *B. thuringiensis huazhongensis* (Bth); *B. thuringiensis brasiliensis* (Btb); *B. thuringiensis colmeri* (Btc) e *B. thuringiensis kurstaki* (Btk)

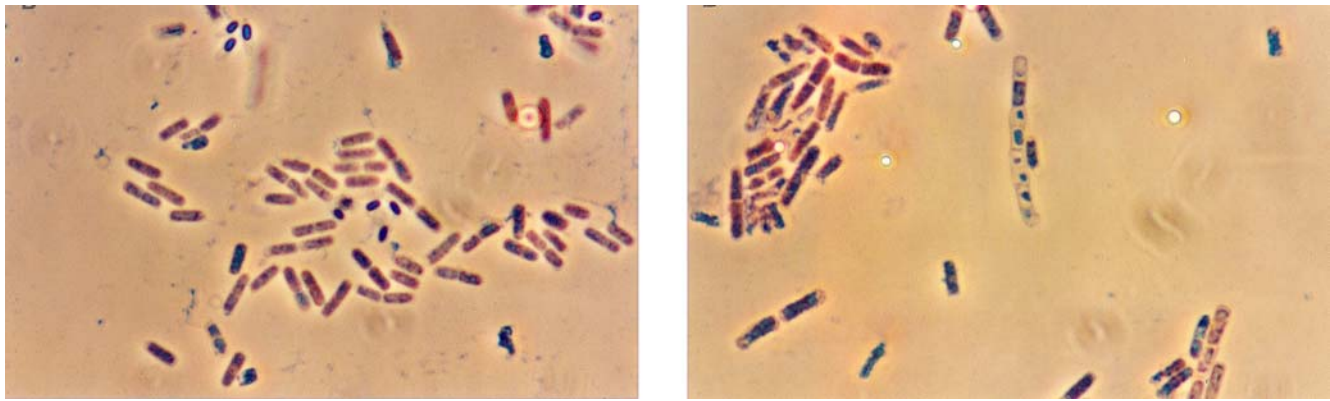


Figura 4. Isolados de *Bacillus thuringiensis* a partir da maceração de *Nasutitermes ehrhardti* infectados; **A-** *Bacillus thuringiensis sooncheon*; **B-** *Bacillus thuringiensis roskildiensis*

representar novos genes *cry*.

1.3 Bioensaios de *B. thuringiensis* com insetos-sociais

Cupins e formigas sofrem ação de diversos tipos de patógenos como: vírus, bactérias, fungos e nematóides, sendo a defesa contra os mesmos pouco conhecida. A complexidade do comportamento e a biologia dificultam o controle destes insetos (Leonardo, 1989; Diehl-Fleig, 1993). Portanto, técnicas de bioensaios evidenciando o efeito desses entomopatógenos sobre os insetos sociais, considerados pragas, são escassos. Nessa linha de pesquisa, Castilhos-Fortes et al. (2002) avaliaram a patogenicidade de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, sobre *Nasutitermes ehrhardti*, onde foram utilizadas suspensões contendo uma mistura de células vegetativas, esporos e cristais. Porções de celulose (1cm²), utilizadas como substrato alimentar, foram mergulhadas nas suspensões de *B. thuringiensis*, as quais foram colocadas em placas de acrílico com seis compartimentos de 5,5 cm de diâmetro. Em cada compartimento, contendo 1cm² de celulose tratada, foram colocados dez insetos (Figura 1).

O condicionamento dos ensaios foi feito em estufa incubadora tipo B.O.D., a 28° C, 70% de umidade relativa, no escuro. A mortalidade dos insetos foi avaliada diariamente até o 7° dia após a instalação dos bioensaios, observando-se os cupins mortos com sintomas característicos de intoxicação por *B. thuringiensis*.

Em 2003, Pinto et al. testaram o efeito de *B. thuringiensis* em formigas cortadeiras, cujo método de bioensaio foi desenvolvido objetivando a sobrevivência dos indivíduos por no mínimo sete dias, tempo suficiente para a avaliação de bioensaios. Esse método foi constitu-

ído de uma dieta líquida composta de peptona bacteriológica, glicose e extrato de levedura, com substituição periódica de 48 horas, previamente acondicionada em pequenos frascos de polipropileno, acrescida de cinco indivíduos de *Acromyrmex lundii* (Figura 2).

Utilizando o referido método de bioensaio de *B. thuringiensis* com *Acromyrmex lundii*, pode-se obter 100% de sobrevivência das formigas por 180 horas (7,5 dias), tempo suficiente para a avaliação dos bioensaios com o entomopatógeno.

1.4 Toxicidade de *B. thuringiensis* aos cupins e formigas cortadeiras

As referências de *B. thuringiensis* contra isópteros são restritas, havendo poucos dados disponíveis, como os de Cowie et al. (1989), que citam algumas cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a várias espécies de térmitas em condições laboratoriais. Khan et al. (1985), também ressaltam a carência de trabalhos desenvolvidos visando testar *B. thuringiensis* em térmitas, embora tenham citado os trabalhos de Smythe & Coppel (1965), os quais constataram que a solução com *B. thuringiensis* mostrou-se tóxica a três espécies de *Reticulitermes*, bem como a *Zootermopsis angusticollis*. Khan et al. (1977) isolaram *B. thuringiensis* a partir de ninfas do isóptero *Bifiditermes beesoni* infectadas, encontradas em campo. Nos testes de toxicidade contra *Microcerotermes champion*, a suspensão de bactérias testada causou alta mortalidade em condições laboratoriais.

Considerando a patogenicidade de *B. thuringiensis* para *N. ehrhardti*, Castilhos-Fortes et al. (2002) testaram 57 cepas desta bactéria, sendo que sete mostraram-se mais efetivas: *B. thuringiensis sooncheon* (Bts) e *B. thuringiensis*

roskildiensis (Btr) com uma mortalidade de 100%; seguidos dos isolados *B. thuringiensis yunnanensis* (Bty) com 71,4%; *B. thuringiensis huazhongensis* (Bth) com 57,1%; *B. thuringiensis brasiliensis* (Btb) com 52,3%; *B. thuringiensis colmeri* (Btc) com 42,85% e *B. thuringiensis kurstaki* (Btk) com 28,57% de mortalidade ao 7° dia após a aplicação dos tratamentos, conforme resultados apresentados na Figura 3.

Para a determinação da CL₅₀ de *B. thuringiensis* os referidos autores utilizaram os isolados *B. thuringiensis sooncheon* e *B. thuringiensis roskildiensis* os quais causaram 100% de mortalidade nos ensaios pré-seletivos. As CL₅₀ de *B. thuringiensis sooncheon* observadas foram 46,98x10⁸, 66,19x10⁶ e 5,14x10⁵ esporos/ml, aos três, cinco e sete dias após os tratamentos, respectivamente. Para *B. thuringiensis roskildiensis* foram 30,78x10⁵, 48,40x10⁶ e 16,80x10⁴ esporos/ml aos três, cinco e sete dias, respectivamente.

A toxicidade de *B. thuringiensis* para *N. ehrhardti* foi confirmada pelos autores através de observações microscópicas de cupins macerados aos três, cinco e sete dias após a aplicação dos tratamentos. As estruturas de *B. thuringiensis* formadas por células em forma de bastonete, cadeias, esporos e inclusões paraesporais podem ser observadas na Figura 4A para *B. thuringiensis sooncheon* e na Figura 4B para *B. thuringiensis roskildiensis*.

A patogenicidade e o desenvolvimento de *B. thuringiensis* foram estudados por Khan et al. (1985) nos isópteros *Microtermes championi* e *Bifiditermes beesoni*, que se mostraram suscetíveis à infecção causada pela bactéria após a aplicação do formulado Thuricide-HP. De acordo com a análise histopatológica, foi constatado que a ação de *B. thu-*

ringiensis é mais rápida em *M. champio- ni* quando comparado a *B. beesoni*, sendo o intestino médio do inseto invadido pela bactéria seis horas após a ingestão, a qual penetra a cavidade corporal, o tecido adiposo e células hipodérmicas 20 a 24 horas após a infecção. Em *B. beesoni*, a bactéria instalou-se próximo à membrana peritrófica depois de 24 horas, atacou o epitélio e células regenerativas após 48 horas e alcançou a membrana basal do intestino médio 72 horas após a infecção.

Nos estudos do efeito patogênico de *B. thuringiensis* contra *A. lundii* foram identificados isolados ativos contra esta formiga cortadeira, sendo que o isolado *Bt*HA48 atingiu 100% de mortalidade (Pinto et al., 2003).

1.5 Perspectivas

Em insetos sociais, aspectos como hábitos comportamentais devem ser considerados, uma vez que a eliminação de uma porção da colônia não é suficiente para a extinção. Os fragmentos restantes têm capacidade de recuperação e nova infestação, portanto há necessidade de eliminação da rainha das colônias (Martins, 1998).

O uso de organoclorados é o método mais utilizado para controlar populações de cupins e formigas e embora, com menos frequência, outros métodos podem ser citados como o controle cultural, ação de predadores e aplicação de extratos vegetais (Wilcken e Raetano, 1995).

O controle biológico é uma alternativa ao controle químico e vem ganhando destaque em pesquisas de manejo de populações de pragas. Os principais organismos utilizados para o controle de formigas e cupins são microrganismos patogênicos, em especial fungos e nematóides, e até o momento poucas pesquisas foram realizadas em laboratório com *B. thuringiensis*.

As pesquisas têm publicado resultados satisfatórios no controle de formigas utilizando os fungos *Beauveria bassiana*, *Metarbizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* (Loureiro e Monteiro, 2005), além do microsporídeo *Thelobania solenopsae* (Williams e Deshazo, 2004). O mesmo ocorre com cupins avaliados frente a fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* (Bao & Yendol, 1971) e *M. anisopliae* (Kramm & West 1981; Hänel 1981 e 1982).

Diferentes estudos visam determinar quais os organismos patogênicos como fungos ou nematóides, que poderiam ser utilizados contra os térmitas. Os resultados, geralmente, têm sido discrepantes. Outras

linhagens ou espécies de patógenos deveriam ser testadas contra os térmitas subterrâneos, mas os testes de campo devem ser precedidos de estudos de laboratório para determinação da patogenicidade dos diferentes patógenos e linhagens. Isto pode ajudar a avaliar o potencial do agente patogênico e fornecer a base para estimar as concentrações requeridas em campo.

Fernandes (1994) relatou que os principais problemas enfrentados na pesquisa sobre controle biológico de cupins são a carência de conhecimentos biológicos, o pequeno número de taxonomistas que trabalha com isópteros e a falta de outros grupos trabalhando em conjunto neste assunto.

Contudo, bactérias entomopatogênicas podem ser consideradas agentes de controle biológico com potencial de patogenicidade e surgem como uma alternativa eficiente, ecológica e econômica para a solução dos danos causados por cupins e formigas.

1.6 Referências

Azambuja, A.O. De; Pinto, L.M.N. & Fiúza, L.M. 2001. *Bacillus thuringiensis* obtido de insetos sociais (*Acromyrmex* sp.) coletados em áreas orizícolas. In: VII Simpósio de Controle Biológico. Junho, Poços de Caldas, MG. 2001.

Bao, L.L.; Yendol, W. G. 1971. Infection of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) with the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Entomophaga, 16(3): 342-352.

Berti Filho, E. Cupins ou térmitas. Manual de pragas em florestas. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993. 56p.

Borm, S.V.; Billen, J.; Boomsma, J.J. 2002. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. BMC Evolutionary Biology. 2:9.

Castilhos-Fortes, R.; Matsumura A. T. S., Diehl E. Fiúza LM. 2002. Susceptibility of *Nasutitermes ebrbardti* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies. Brazilian Journal of Microbiology. 33:219-222

Cowie, R. H.; Logan, J. W. M.; Wood, T. G. 1989. Termite (Isoptera) damage and control in tropical forestry witer special reference to Africa and Indo-Malasya: a review. Bulletin of Entomological Research, 79: 173-184.

Diehl-Fleig, E.; Silva, M. E.; Specht, A. 1993. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera: Formicidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 22(2): 281-285.

Fernandes, P. M. Controle biológico de cupins em pastagens. Brasília, 20 jul. 1994. Palestra proferida no II Curso de Controle Microbiano de Insetos.

Gusmão, L.G.; Loeck, A.E. 1999. Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero *acromyrmex* (hymenoptera:formicidae) na zona sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Agrociência, 5(1): 64-67.

Hänel, H. 1981. A bioassay for mesuring the virulence of the insect pathogenic fungi *Metarbizium anisopliae* against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill). Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie, 94: 237 – 245.

Hänel, H. 1982. Selection of a fungus species, suitable for the biological control of the termite *Nasutitermes exitiosus*. Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie, 92: 9-18.

Khan, K.; Jafri, R. H.; Ahmad, M. 1985. The pathogenicity and development of *Bacillus thuringiensis* in termites. Pakistan Journal of Zoology, 17(3): 201-209.

Khan, K.; Qaisra, F.; Jafri, R. H. 1977. Pathogenicity of locally discovered *Bacillus thuringiensis* strain to the termites *Heterotermes indicola* (Wasmann) and *Microcerotermes championi* (Snyder). Pakistan Journal of Scientific Research, 29: 12-13.

Kramm, K. R.; West, D.F. 1981. Termite pathogens effects of ingested *Metarbizium*, *Beauveria* and *Gliocadium conidia* on workers termites (*Reticulitermes* sp.). Journal of Invertebrate Pathology, 40: 1-6.

Leonardo, A. M. C. 1989. A guerra química dos cupins. Ciência Hoje, 10(56): 26-34.

Loureiro, E.S.; Monteiro, A.C. 2005. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). Árvore, 29(4): 553-561.

Martins, C. 1998. Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). Revista Brasileira de Entomologia, 41(2-4): 179-194.

Pinto, L.M.N.; Azambuja, A.O.; Diehl, E.; Fiúza, L.M. 2003. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolates from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). Brazilian Journal of Biology. 63:301-306.

Williams, D.F.; Deshazo, R.D. 2004. Biological control of fire ants: an update on new techniques. Annual Allergy Asthma Immunology 93:15-22.

Wilcken, C.F.; Raetano, C.F. 1995. Controle de cupins em florestas. In.: Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins. FEALQ: Piracicaba, São Paulo. 🌱