



TOXICOLOGIA DE *BACILLUS THURINGIENSIS* ÀS PRAGAS URBANAS E VETORES

Gabriela Cristina Alles

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

Marcus Hübner

Biólogo (FURG) e Mestre 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).

A utilização de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*, como agente de controle populacional de pragas urbanas e vetores de agentes patogênicos, tem relevância nas pesquisas nacionais e internacionais. Sendo assim, esse trabalho trata do controle desses insetos, utilizando as espécies *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*, onde se destacam as características das espécies do grupo *Bacillus*, sua ocorrência e alguns dados de autores que realizaram pesquisas na área da saúde pública.

1.1 *Bacillus* spp. no controle de vetores de doenças

1.1.1 Insetos vetores de doenças

Algumas espécies dos gêneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* e *Mansonia* podem ser importantes vetores de patógenos humanos responsáveis por enfermidades como malária, febre amarela, encefalite, dengue e filariose. Estas doenças atingem um número significativo de pessoas em diversos

países da Ásia, África e Américas. O *Culex quinquefasciatus* é responsável pela transmissão da *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose bancroftiana no Brasil, além de ser um potencial vetor para o Vírus do Oeste do Nilo (VNO), originado na África, onde as aves são os hospedeiros e reservatórios naturais, podendo acometer o homem, cavalos e outras espécies, causando desde febre, dor de cabeça e mialgias até encefalite severa e meningite. Desde 1999 ocorrem epidemias da doença nos EUA e, até o momento, já foram registrados mais de 19 mil casos de infectados com mais de 750 óbitos (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2006). Recentemente, o vírus passou a circular no Caribe e já foi isolado na Colômbia e em cavalos mortos na Argentina (Berrocal, 2006; Morales, 2006). O Brasil tem um plano de vigilância para detectar a introdução do VNO no país, visto que o *Cx. quinquefasciatus*, potencial vetor, é abundante, além de um contingente considerável de aves migratórias que ocorre no país por ser originário de rotas das Américas e de países vizinhos, onde ocorre a circulação do vírus (Luna *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que há uma grande dificuldade do controle populacional destes mosquitos devido a suas características biológicas como curto ciclo de vida, alta capacidade reprodutiva e de adaptação ao ambiente. O controle, através do uso de inseticidas químicos tem apresentado problemas devido ao seu modo de ação não específico, além da possibilidade de rápida seleção de resistência de insetos a estes compostos. Por estas razões, a procura por agentes mais seletivos aumentou e, com isso, a adoção de métodos de controle biológico cresceu (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2006).

1.1.2 Bactérias entomopatogênicas

A microflora bacteriana dos insetos, confinada no intestino, é rica, diversa e compreende bactérias Gram-positivas e negativas. Entre as bactérias Gram-positivas, algumas auxiliam na digestão dos alimentos, porém outras são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisado-

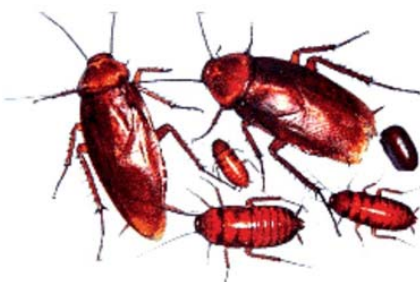
res devido ao seu potencial para o controle de pragas (Priest, 2000; Fiuza, 2001). Entre estes patógenos destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*, com potencial biopesticida que representam cerca de 90% do mercado mundial (Schnepf *et al.*, 1998), sendo amplamente utilizados como uma alternativa aos inseticidas químicos em termos de segurança a organismos não-alvo e quando ocorre o desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos (Rodrigo-Simón *et al.*, 2006).

Duas espécies de bactérias entomopatogênicas se destacam no controle biológico dos insetos vetores: *B. sphaericus* e *B. thuringiensis israelensis*. Estes microrganismos estão sendo comercializados há mais de uma década, pois produzem proteínas inseticidas que, ao serem ingeridas, são letais para as larvas dos mosquitos devido a sua ação no trato digestivo. O *Bti* tem atividade decrescente para os gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Mansonia*, já o *B. sphaericus* é particularmente eficiente para o controle de larvas de *Cx. quinquefasciatus* e produtos comerciais à base desta bactéria estão disponíveis no Brasil.

O principal fator tóxico do *B. sphaericus* para larvas de *Cx. quinquefasciatus* é a toxina binária (Bin) contida em um cristal protéico produzido durante a fase de esporulação da bactéria. Após a ingestão deste cristal pelas larvas, ocorre a sua solubilização em pH intestinal alcalino e a protoxina liberada no lúmen é clivada por serinoproteases para atingir a forma de toxina ativa. A toxina Bin ativa interage com receptores específicos presentes na membrana apical das células do epitélio intestinal das larvas, principalmente nas regiões do ceco gástrico e intestino posterior.

O *B. sphaericus* apresenta uma grande vantagem em relação ao *Bti*: a ótima persistência em criadouros ricos em matéria orgânica, típicos de larvas de *Culex*, além de seus esporos sofrerem reciclagem nos cadáveres das larvas, o que pode ampliar seu período de persistência nos criadouros (Nicolas *et al.*, 1987; Skovmand & Bauduin, 1997).

Populações de larvas de *Culex* podem apresentar resistência ao *B. sphaericus* após



Blatella germanica



Periplaneta americana

Tabela 1. Mortalidade corrigida de *Blatella germanica* e *Periplaneta americana*, submetidas aos tratamentos com sorovares de *Bacillus thuringiensis*

Tratamentos	Mortalidade Corrigida (%)	
	<i>B. germanica</i>	<i>P. americana</i>
<i>B.t.</i> sorovar <i>colmeri</i>	6,65	0,0
<i>B.t.</i> sorovar <i>yunnanensis</i>	14,85	0,0
<i>B.t.</i> sorovar <i>huazhangensis</i>	15,00	0,0
<i>B.t.</i> sorovar <i>roskildiensis</i>	16,65	0,0
<i>B.t.</i> sorovar <i>sooncheon</i>	30,00	0,0

serem submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório (Amorim, 2007; Georghiou, 1992; Pei, 2002; Rodcharoen & Mulla, 1994) ou de campo (Mulla, 2003). Estes resultados apontam para a necessidade de racionalizar o uso do *B. sphaericus*, a fim de evitar a seleção de populações resistentes.

A primeira população resistente obtida sob condições de laboratório, foi submetida à forte pressão de seleção e atingiu um nível de resistência da ordem de 100.000 vezes, em relação à colônia susceptível (Georghiou, 1992). Em outro estudo realizado em laboratório, foram selecionadas duas colônias de *Cx. quinquefasciatus*, no Brasil e na China, que atingiram um alto nível de resistência (>100.000) (Pei, 2002). Também foi demonstrado que é possível selecionar a resistência ao *B. sphaericus* cepa IAB59, sob condições de laboratório, embora, esta seleção tenha ocorrido de forma mais lenta em relação ao *B. sphaericus* 2362. O nível de resistência chegou a mais de 40.000 vezes (Amorim, 2007). Em campo, já foram detectadas populações com níveis de resistência variáveis na França (Chevillon, 2001), Índia (Rao, 1995), China (Yuan, 2000), Tunísia (Nielsen-Leroux, 2002) e na Tailândia (Mulla, 2003). O processo de seleção da resistência em populações de campo é modulado por diversos fatores que incluem o *background* genético da população, bem como fatores ecológicos e ambientais.

1.1.3 Controle integrado de vetores

O conceito do Manejo Integrado de Vetores (MIV) surgiu como resultado de uma mudança de paradigma após o uso intensivo de inseticidas químicos nas décadas de 1940-60. Em outras palavras, o MIV é definido como uma combinação racional de diversos métodos de controle disponíveis, objetivando manter a população de vetores em níveis aceitáveis e da maneira mais efetiva, econômica e segura, incluindo componentes biológicos, químicos, físicos e ambientais, visando interferir o mínimo possível no ecossistema. No MIV, várias ações são empregadas na tentativa

de englobar todas as causas do problema. No âmbito do controle de mosquitos, estas ações podem incluir a melhoria da rede de esgoto e distribuição de água, eliminação física de criadouros, uso de barreiras físicas nas habitações, medidas de proteção individual, uso de larvicidas específicos em criadouros que não podem ser eliminados, além da conscientização e participação da comunidade. Dentre estas ações, o uso de biolarvicidas apresenta vantagens, como a especificidade para o inseto alvo e segurança para o meio ambiente (Georghiou *et al.*, 1992).

O principal objetivo de estratégias de controle integrado de vetores é reduzir a densidade populacional de mosquitos para níveis em que a atividade é minimizada ou a transmissão de doenças reduzidas ou interrompida com o mínimo de efeitos ambientais.

Idealmente, programas de controle integrado devem incluir intervenções mais eficazes e ambientalmente compatíveis. Devido à sua eficácia e aparente especificidade, tanto *Bt israelensis* quanto *B. sphaericus* podem ser ideais para o programa integrado de controle de pragas. (Lacey & Orr, 1994). A combinação de *Bt israelensis* com outros agentes de controle biológico resultou em um excelente controle e, em alguns casos, a supressão prolongada de larvas de mosquitos.

Mulligan & Schaefer (1982) relataram um controle inicial de larvas de *Cx. tarsalis* em uma das zonas úmidas em que o tratamento com *Bt israelensis* foi seguido por abatimento em longo prazo com larvas de insetos predadores. Do mesmo modo, Mulla *et al.* (1993) observaram que as populações de *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. stigmatosoma* e *Cx. tarsalis* não se recuperaram após o tratamento com *Bt israelensis* devido a subsequentes predações de larvas por macroinvertebrados aquáticos e uma redução na oviposição atrativa da pecuária local.

Regis & Nielsen-Leroux (2000) revisando estratégias de manejo de resistência *B. sphaericus* recomendaram o acompanhamento da susceptibilidade das espécies-alvo

de *B. sphaericus* antes e durante o tratamento, alternando o uso de *B. sphaericus* com *Bt israelensis*. Zahiri *et al.* (2004) demonstraram que utilizando suspensões de misturas contendo formulações comerciais de *Bt israelensis* e *B. sphaericus*, não resultou em resistência em colônias de *Cx. quinquefasciatus*, enquanto que somente suspensões de *B. sphaericus* gerou resistência.

1.2 *B. thuringiensis* no controle de baratas

Segundo Wilson (1972), estudos comparativos realizados entre famílias primitivas de térmitas e baratas revelaram a existência de múltiplas características em comum que, segundo o autor, poderiam considerar os térmitas como baratas sociais, cujos diagramas de filogenia, não só reforçam este parentesco, como também, relacionam a evolução da flora microbiana intestinal entre as ordens Isoptera e Blattodea.

Nesse contexto, a partir do trabalho de Castilhos-Fortes *et al.* (2002), Hübner (2004) testou cinco isolados de *B. thuringiensis* em *Blatella germanica* e *Periplaneta americana*: *B. thuringiensis yunnanensis*, *B. thuringiensis colmeri*, *B. thuringiensis huazhangensis*, *B. thuringiensis sooncheon* e *B. thuringiensis rosildiensis*, oriundos do Instituto Pasteur, Paris.

Para o estudo, adultos e ootecas de *B. germanica* e *P. americana* foram coletados em estabelecimentos comerciais e residenciais, no município de Gramado, Rio Grande do Sul. Ambas as espécies permaneceram em caixas de plástico (564 x 385 x 371 mm e 400 x 270 x 362 mm), com as bordas superiores preenchidas com uma mistura de água e talco neutro, para evitar a fuga dos insetos. A umidade foi mantida através de algodão umedecido, trocado a cada 48 horas. Substratos de papelão corugado foram utilizados para mimetizar seu hábitat natural. Na alimentação foi utilizada 0,5 g de ração animal moída *Whiskas*®, sendo os insetos mantidos em condições controladas (30°C, 70% de U.R., 12h fotofase).

Nos bioensaios, baratas adultas de ambas as espécies foram agrupadas em caixas plásticas (262 x 177 x 85 mm), contendo placas de Petri com algodão umedecido em água destilada e outra contendo 0,5g de ração animal moída e 1000µL das suspensões bacterianas a 1.10¹⁰ células/mL. Nas testemunhas, os isolados foram substituídos por água destilada esterilizada. Para cada isolado bacteriano e cada espécie foram utilizados 30 insetos. A mortalidade foi analisada durante 7 dias após a aplicação dos tratamentos e corrigida pela fórmula de Abbott (Alves, 1998).

Os dados de patogenicidade, utilizando os cinco isolados de *Bacillus thuringiensis*, demonstraram uma baixa ação tóxica sobre *B. germanica* (6,65% a 30% de mortalidade), e uma inatividade (0% de

mortalidade) à *P. americana*, levando-se em consideração que os índices de mortalidade corrigida apresentados na Tabela 1.

Apesar de Wilson (1972) ter descrito um parentesco evolutivo entre as famílias primitivas de térmitas e baratas, inclusive quanto a sua flora bacteriana, o presente estudo demonstra que não há uma correlação da ação de *B. thuringiensis* sobre *B. germanica* e *P. americana*, pertencentes às famílias mais evoluídas.

Cavados (2003) cita que o controle biológico com bactérias entomopatogênicas tem como principal vantagem a especificidade. Dependendo da composição de proteínas Cry no cristal bacteriano, os isolados podem apresentar um espectro de ação limitado às ordens de insetos (Fiuza, 2001). Assim, os dados obtidos sugerem que as delta-endotoxinas produzidas pelos cinco isolados de *B. thuringiensis* testados não apresentam proteínas Cry com ação tóxica para a ordem Blattodea, uma vez que causaram uma menor ação sobre os insetos-alvo do trabalho de Hübner (2004).

Lambiase *et al.* (1996) mencionam uma diferenciação na localização dos sítios bacterianos em *B. germanica* e *P. americana*, o que poderia justificar o fato de ter-se obtido uma ação inseticida para a primeira espécie e uma ausência de efeito para a segunda.

Também forma realizados ensaios de toxicidade *in vivo* para verificar a ação de *B. thuringiensis oswaldocruzi* (H-38) e *B. thuringiensis brasiliensis* (H-39) contra *Periplaneta americana* e *Blattella germanica*. Porém, nesses ensaios não houve ação patogênica das cepas avaliadas às duas espécies de baratas utilizadas nos bioensaios (Hübner, 2004).

1.3 Referências

- Amorim, L. B. 2007. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. *Biol. Control*, 42: 155-160.
- Alves, S. B. 1998. Controle Microbiano de Insetos. 2ed. Piracicaba. FEALQ. p. 1163.
- Berrocal, L. 2006. West Nile virus; ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. *Rev. Salud Publica*, 8: 218-228.
- Castilhos-Fortes, R. De.; Matsumura, A. T. S.; Diehl, E.; Fiuza, L. M. 2002. Susceptibility of *Nasutitermes ebrardti* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Braz. J. Microbiol.* 33: 219-222.
- Cavados, C.F.G. 2003. Bactérias entomopatogênicas e controle de vetores, sua contribuição para a preservação ambiental. In: 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro. Livro de Resumos. São Pedro, SP, 2003. p 45.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2006. West Nile Virus. Atlanta, Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/topics/westnile/>>. Acesso em: 8 mar. 2007.
- Chevillon, C. 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. *J. Med. Entomol.*, 38: 657-664.
- Fiuza, L. M. 2001. *Bacillus thuringiensis*: características e o potencial no manejo de insetos. *Acta Biol. Leopoldensia* 23 (2): 141-156.
- Georghiou, G. P. 1992. Characterisation of resistance of *Culex quinquefasciatus* to the insecticidal toxins of *Bacillus sphaericus* (strain 2362). In: Mosquito Control Research. Annals. Berkeley: University of California. p. 34-35.
- Hofte, H. & Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.
- Hübner, M., Fiuza, M. F. 2004. Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre adultos de *Blattella germanica* (L.) (Diptoptera, Blattellidae) In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia. Setembro, Gramado, RS. 2004.
- Hübner, M. 2004. Bioatividade de extratos vegetais e isolados de *Bacillus thuringiensis* nos insetos urbanos *Blattella germanica* (L.) e *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattellidae). Dissertação de Mestrado, PPG em Biologia, Unisinos, São Leopoldo, RS, 72 p.
- Lacey, L.A.; Orr, B.K. 1994. The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control. *Am. J. Trop. Med.*, 50:97-115.
- Lambiase, S.; Grigolo, A.; Laudani, U.; Sacchi, L.; Baccetti, B. 1996. Pattern of bacteriocyte formation in *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blattellidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 26: 9-19.
- Luna, E. J. A.; Pereira, L. E.; Souza, R. P. 2003. Encefalite do Nilo Ocidental: nossa próxima epidemia? *Epidemiol. Serv. Saúde*, 12, 7-19.
- Morales, M. A. 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1559-1561.
- Mulligan, F.S.; Schaefer, C.H. 1982. Integration of a selective mosquito control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H.14, with natural predator populations in pesticide-sensitive habitats. *Proc Pap 49th Ann Conf Calif Mosq Vect Control Assoc.* April 26- 29, 1981, p 19-22.
- Mulla, M.S.; Chaney, J.D.; Rodchareon, J.; 1993. Elevated dosages of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis fail to extend control of *Culex* larvae. *Bull Soc Vect Ecol*, 18:125-132.
- Mulla, M. S. 2003. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19: 39-46.
- Nicolas, L.; Darriet, F.; Hougard, J.-M. 1987. Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. *Med. Vet. Entomol.* 1: 157-162.
- Nielsen-Leroux, C. 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.*, 39: 729-735.
- Pei, G. F. 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):3003-3009.
- Priest, F. G. 2000. Biodiversity o the entomopatogenic, endospore-forming bacteria. In: Charles, J. F.; Delécluse, A.; Nielsen-LeRoux, C. (Ed) Entomopatogenic Bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. P. 1-22
- Rao, D. R. 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11:1-5.
- Regis, L.; Nielsen-LeRoux, C. 2000. Management of resistance to bacterial vector control. In: Charles J-F, Delécluse A, Nielsen-LeRoux C, eds. Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 419-438.
- Rodchareon, J. & Mulla, M. S. 1994. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to the microbial agent *Bacillus sphaericus*. *J. Econ. Entomol.* 87: 1133-1140.
- Rodrigo-Simón, A.; De Maagd, R.A.; Avilla, C.; Bakker, P.L.; Molthoff, J.; González-Zamora, J.E.; Ferré, J. 2006. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Appl Environ Microbiol* 72: 1595-1603.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. 62, n. 3, p. 775-806.
- Skovmand, O.; Bauduin, S. 1997. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African countries. *J Vect Entomol.* 22:43-51.
- Wilson, E.C. 1972. The Termites. In: The Insect Societies, Harvard University Press, Cambridge. pp 103-116.
- Yuan, Z. M. 2001. Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. *Eur. J. Biochem.* 9: 2751-2760.
- Zahiri, N.S.; Federici, B.A.; Mulla, M.S. 2004. Laboratory and field evaluation of a new recombinant of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex mosquito larvae* (Diptera: Culicidae). *J. Med Entomol* 41:423-429.