



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II – AREIA-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANTONIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA

Isolamento e caracterização de *Bacillus* e *Lysinibacillus* com potencial para controle de pragas agrícolas e insetos vetores

AREIA
2020

ANTONIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA

Isolamento e caracterização de *Bacillus* e *Lysinibacillus* com potencial para controle de pragas agrícolas e insetos vetores

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito

Coorientadora: Dra. Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes

AREIA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383i Ferreira, Antonia Débora Camila de Lima.
Isolamento e caracterização de Bacillus e
Lysinibacillus com potencial para controle de pragas
agrícolas e insetos vetores / Antonia Débora Camila de
Lima Ferreira. - Areia:UFPB/CCA, 2020.
142 f. : il.

Orientação: Carlos Henrique de Brito Brito.
Coorientação: Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes.
Tese (Doutorado) - UFPB/Agronomia.

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. Controle biológico.
3. Lepidoptera. 4. Coleoptera. 5. Diptera. I. Brito,
Carlos Henrique de Brito. II. Pontes, Rose Gomes
Monnerat Solon de. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

AUTORA: ANTONIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA

ANTONIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA

Isolamento e caracterização de *Bacillus* e *Lysinibacillus* com potencial para controle de pragas agrícolas e insetos vetores

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Aprovado em: 28/08/2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Carlos Henrique de Brito
UFPB - CCA
SIAPE 17163109

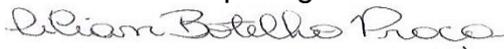
Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB



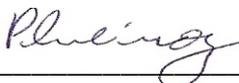
Prof^ª. Dr. Jacinto de Luna Batista
Universidade Federal da Paraíba – UFPB



Dr. José Ednilson Miranda
Embrapa Algodão



Dra. Líllan Botelho Praça
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz
Centro Universitário de Brasília – CEUB

Quanto tempo dura o para sempre...? Uma vida interia? Todo o tempo? A eternidade? Às vezes ele pode durar só um momento, um momento que por mais breve que seja, ficará para sempre guardado dentro de nós. **Vocês** serão o nosso eterno “para sempre” e dedico a conclusão dessa a tese a vocês, meus queridos primos. **Danilo** (*in memorian*), lembro das suas felicitações quando passei no doutorado e sentirei falta de recebê-las novamente após a conclusão. E **Erik** (*in memorian*), pelas brincadeiras quando criança e bons momentos compartilhados. Nossa família não é a mesma sem vocês! Estejam bem, onde estiverem.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fortaleza espiritual, por seu amor e cuidado. Até mesmo nas tantas vezes que cheguei a duvidar da sua existência, o Sr. sempre esteve ali, ouvindo minhas preces e me dando o conforto que ninguém mais poderia dar.

À minha Co-orientadora Dra. Rose Monnerat, por abrir as portas de seu laboratório e a partir disso, me oferecer uma das experiências mais enriquecedoras que tive na minha vida acadêmica. Lhe tenho muito respeito e admiração. Obrigada pelas contribuições a este trabalho e ao meu crescimento profissional, aprendi muito aqui, e com você!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Brito, pelo que aprendi durante o período que estive em Areia e pela disponibilidade em ajudar sempre que eu precisei.

Ao Dr. Ednilson Miranda, pelo apoio para instalação em Goiânia e em Brasília e, principalmente, por sua solicitude e disponibilidade em sempre me atender.

Ao Dr. Paulo Queiroz, por toda contribuição no processamento dos dados do sequenciamento e também, pela paciência e alegria que tem em ensinar, conseguindo extrair facilmente um sorriso até mesmo nos momentos de maior desespero.

À Dra. Lílian Praça, que ao longo desses três anos, se tornou muito mais que uma colega de trabalho. Agradeço por aquele abraço no meu primeiro dia no LBE e principalmente pela amizade que construímos. Obrigada pelas sugestões dadas, pelo esclarecimento de todas as dúvidas e pelo olhar atento e zeloso ao laboratório. Seu esforço beneficia a nós todos!

Aos amigos que fiz no LBE, os que continuam (Janaína, Amanda, Ester, Gabi, Berçot, Sandro, Marcel, Aline, Rafael, Andréa, Mateus e Jônatas) e os que já seguiram outros caminhos (Érica, Cris, Thaís, Rafael e Zô). Agradeço por tudo que pude aprender com vocês, pelas discussões sobre o trabalho e sobre a vida e, também, por tantos momentos bons compartilhados ao longo desses anos, seja nas bancadas do laboratório, na sala dos estudantes, no campo, nas festas de confraternização e também na mesa do Bar dos Cunhados. De coração, obrigada a todos!

Ao funcionário José Alves, pela amizade e por todo suporte que dá aos trabalhos no LBE, saiba que é um privilégio contar com seu apoio.

Aos colegas da Plataforma de Criação de Plantas e Insetos. Os que ainda estão, Chico, Giovanna, Albert e Steffany, e os que já se foram, Pollyana e Erik, que desempenham tão bem, essa difícil missão que é cuidar dos insetos.

À funcionária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Ana Cristina, por viabilizar as fotos de microscopia eletrônica.

À equipe da Embrapa Arroz e Feijão, Gideon, Bruna, Willian, Sergio e Williana pelo acolhimento e pelo que pude aprender com vocês durante o tempo que estive em Goiânia.

A todos os envolvidos com as coletas de solo em cada um dos estados, em especial ao meu amigo Ademir por parte das coletas no Ceará e também por sua inestimável amizade. Obrigada por emprestar seus ouvidos para meus desabafos e suas opiniões sensatas sobre os estudos e sobre a vida.

Ao meu ex-orientador, Dr. Ervino Bleicher, que até hoje continua me ensinando muito mais que entomologia. Minha admiração e respeito pelo Sr. são inestimáveis.

À minha família. Meus pais Luiz e Eliana, obrigada pelo suporte emocional e pela segurança que sempre me passaram. A caminhada da graduação até o doutorado foi muito longa e cheia de altos e baixos, mas poder contar com o apoio de vocês, em todos esses momentos, fizeram toda diferença. Aos meus queridos irmãos. Daywerson, pelos seus conselhos. Obrigada por fazer tão bem o seu papel de irmão mais velho. A Dyemann, que compensa toda sua rebeldia com muitos momentos de alegria para nossa família. A minha capitã Dayara, que mesmo de longe, cuida tão bem de mim e de todos, e também, a Jamielle, “nossa Jami”, que nos completa com seu amor, companheirismo e lealdade. A todos vocês muito obrigada! Foi muito mais fácil terminar o doutorado sabendo que sempre tive para onde voltar, independentemente de onde eu estivesse.

À extensão da minha família, de sangue ou não. Meus tios Eneide, Carminha e Tonho, aos meus primos Eniedja, MacDavid e Rodrigo, meus avós, Neci e João Jacinto (*in memoriam*), e aqueles que são da família de coração, Laete, Ygna, Aldeniza e Antônio. Obrigada não só pela torcida, mas também por tudo que temos e construímos. É lindo ver todos juntos, seja nos bons ou maus momentos.

Aos meus pequenos, Emmanuel, Helô e Matias. Basta uma foto, uma chamada de vídeo, ou apenas ficar sabendo de alguma travessura de vocês para deixar meu dia mais alegre. E aos que não são mais tão pequenos assim, meus sobrinhos, D. Júnior, Pollyana e Mateus por me darem tanto orgulho.

À minha amiga Izabela Thaís. Talvez você seja a pessoa que mais entenda o que a conclusão desse ciclo representa para mim. Aqui, dividimos muito mais que as contas do fim do mês. Dividimos nossas angústias, nossos medos e inseguranças do novo, mas também dividimos muitos momentos de conquistas, alegrias e cumplicidade, e eu serei sempre grata por estar ao meu lado em todos eles. Tenho certeza que ganhei uma grande amiga.

Ao casal de amigos Izabela Nunes e Jefferson, pela presteza em me ajudar todas as vezes que precisei, pela boa companhia e tantos momentos alegres nos almoços de domingo. A energia e entusiasmo de vocês são contagiantes

À minha amiga Ronimeire, que desde o mestrado, empresta seus ouvidos para meus desabaços, e pelo companheirismo de sempre...nos estudos, nas mudanças de cidades, organizando os currículos, correndo atrás do futuro e etc...

Aos amigos que a UFPB me deu de presente. Hélio, Fábio, Kdson, Joelma, Crys e Fátima. Foi um prazer dividir o primeiro ano do doutorado com vocês. Obrigada pelas noites de estudo, discussões e cumplicidade.

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho. Em especial ao Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por toda sua infra-estrutura e por proporcionar excelentes condições para o desenvolvimento deste trabalho, e a Embrapa Algodão por viabilizar as coletas de solo em todos os estados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

Os insetos-praga são responsáveis por causarem sérios prejuízos econômicos e sociais a população, seja por danos à produção agrícola ou pela transmissão de doenças a pessoas e animais. As bactérias *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) são amplamente estudadas devido o potencial inseticida que apresenta a diferentes ordens. O objetivo desta pesquisa foi realizar a prospecção de novas cepas de *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* com ação inseticida a pragas de importância agrícola e a vetores de doenças. 159 amostras de solo foram processadas e originaram 125 isolados que foram armazenados no Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estes isolados foram avaliados quanto a sua toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera* e *Anticarsia gemmatalis*), Coleoptera (*Anthonomus grandis*) e Diptera (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*). As estirpes mais patogênicas foram selecionadas e caracterizadas morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo perfil proteico e molecular. Após realização dos bioensaios, foi possível selecionar pelos menos uma estirpe com alta atividade inseticida para cada uma das seis espécies de insetos testados. Entre as estirpes selecionadas, estão S2728 e S2744 que apresentaram atividade inseticida para *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis* e inclusões cristalinas evidenciadas por MEV. A análise de genes clássicos para *Bt*, via reação em cadeia da polimerase (PCR), não apresentou nenhuma amplificação, sugerindo que outros fatores poderiam estar associados a toxicidade dessas estirpes. Com o sequenciamento do genoma dessas bactérias verificou-se que as mesmas pertencem ao complexo do grupo *B. cereus lato sensu*, sem revelar com exatidão as suas espécies. A análise das sequências por BLASTn dos ORFs mostrou a presença de um gene responsável por codificar uma proteína do grupo de Proteínas Indutoras de Necrose e etileno (NEP Like Proteins - NLP). Este estudo também contribuiu para o enriquecimento da Coleção de Bactérias de Invertebrados, incluindo em seu acervo dois importantes recursos genéticos que poderão ter suas outras características exploradas além de seus potenciais inseticidas.

Palavras-chave: Bactérias entomopatogênicas. Controle biológico. Lepidoptera. Coleoptera. Diptera.

GENERAL ABSTRACT

Pest insects are responsible for causing serious economic and social damage to the population, be it damage to agricultural production or the transmission of diseases to people and animals. *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Lisynibacillus sphaericus* (Ls) bacteria are widely studied for pest control due to the insecticidal potential they present to different orders, being exploited mainly for the formulation of bioinsecticides, or as genes donor agents for the construction of transgenic plants. The objective of this research was to prospect new strains of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* with insecticidal activity against pests of agricultural importance and vectors diseases. 159 soil samples were processed, giving rise to 125 isolates that were stored in the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa . These isolates were evaluated for their toxicity to insects of Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera* and *Anticarsia gemmatalis*, Coleoptera (*Anthonomus grandis*) and Diptera (*Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*) orders. The most pathogenic strains were selected and characterized morphologically by scanning electron microscopy (SEM) and by the protein and molecular profile. After performing the bioassays, was selected at least one strain with high insecticidal activity for each of insects tested. Among the selected strains, S2728 and S2744 showed insecticidal activity for *Spodoptera frugiperda* and *Anthonomus grandis*, and presentes crystalline inclusions evidenced by SEM, leading to believe that there were *B. thuringiensis*. However, the analysis of classical genes for Bt, via polymerase chain reaction (PCR), did not generate any amplification, suggesting that other factors could be associated with the toxicity of these strains, and that is why the genome sequencing of these materials was performed using the Novaseq sequencing system. The analyzes concluded that the strains belong to the complex of *B. cereus* lato sense group, without revealing exactly the specie. Analysis of ORFs' BLASTn sequences showed the presence of a gene responsible for encoding a protein in the group of Necrosis-Inducing Proteins and ethylene (NEP Like Proteins - NLP). This study also contributed to the enrichment of the EMBRAPA Bacteria Invertebrate Collection, constituting an important genetic resource that can be exploited for other skills besides the insecticidal potential.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Biological control. Lepidoptera. Coleoptera. Diptera

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 IMPACTOS CAUSADOS POR INSETOS-PRAGA	12
2.1.1. Lepidópteros desfolhadores: <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Erebidae), <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae) e <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	12
2.1.2. O bicudo-do-algodoeiro: <i>Anthonomus grandis</i> Boheman (Coleoptera: Curculionidae)	14
2.1.3. Vetores de doenças: <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	15
2.3. CONTROLE BIOLÓGICO MICROBIANO	16
2.4. O GÊNERO BACILLUS E OUTRAS BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS... 17	
2.4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner, 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae)	20
2.4.2. <i>Lysinibacillus sphaericus</i>: Toxinas inseticidas e modo de ação	26
2.4.3. Isolamento e caracterização de <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	28
2.5. APLICAÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	30
2.5.1. Bioinseticidas	30
2.5.2. Plantas Bt	32
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	50
2. OBJETIVOS.....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. COLETA E ISOLAMENTO DE <i>Bacillus</i> sp. E <i>Lysinibacillus</i> A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO	51
3.2. PRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS	54
3.3. BIOENSAIOS SELETIVOS	54
3.3.1. Preparo das amostras para bioensaios seletivos	54
3.3.2. Procedência dos insetos	55
3.3.3. Bioensaios Seletivos para <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> ..	55
3.3.4. Bioensaios seletivos para <i>Anticarsia gemmatalis</i>	57
3.3.5. Bioensaios seletivos para <i>Anthonomus grandis</i>	57
3.4. BIOENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL ₅₀) .58	
3.4.1. Determinação da CL₅₀ para <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Helicoverpa armigera</i> 58	
3.4.2. Determinação da Cl₅₀ para <i>Anthonomus grandis</i>	59
3.5. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	60
3.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÕES	77

6. REFERÊNCIAS.....	78
----------------------------	-----------

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO	86
2. OBJETIVOS.....	88
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	88
3. MATERIAL E MÉTODOS	88
3.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA BIOENSAIOS SELETIVOS.....	88
3.2. PROCEDÊNCIA DOS INSETOS.....	88
3.2. BIOENSAIOS SELETIVOS	89
3.4. ENSAIOS SELETIVOS COM DIFERENTES FRAÇÕES DO CALDO BACTERIANO E DIFERENTES TEMPOS DE CRESCIMENTO	90
3.5. BIOENSAIOS DE CL ₅₀	90
3.6. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	92
3.7. ANÁLISE DA PRESENÇA DE GENES DE TOXINAS VIA PCR	93
3.8. CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL POR MEV	95
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	95
5. CONCLUSÃO	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

CAPÍTULO III

1. INTRODUÇÃO	113
2. MATERIAL E MÉTODOS	114
2.1. ISOLADOS BACTERIANOS	114
2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E DOS GENES DE TOXINAS PRESENTES NAS BACTÉRIAS.....	114
2.2.1. Extração do DNA	114
2.2.2. Sequenciamento do genoma.....	115
2.2.3. Montagem de novo.....	115
2.2.4. Anotação e análise de genoma.....	115
2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA PORÇÃO INTRACELULAR E SOLÚVEL.....	116
2.3.1. Extração de proteínas	116
2.3.2 Análise do perfil proteico (SDS-PAGE)	117
2.4 BIOENSAIOS DAS PROTEÍNAS DAS ESTIRPES COM <i>Spodoptera frugiperda</i>	118
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
4. CONCLUSÕES.....	137
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	142

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Classe Insecta compreende uma das mais populosas e diversas a habitarem a Terra, com quase um milhão de espécies conhecidas. Destas, cerca de 15.000 espécies são consideradas pragas, que podem ser genericamente classificadas em pragas de importância agrícola, médica, veterinária e civil, sendo elas responsáveis por causarem sérios prejuízos econômicos e sociais para população (CHATTOPADHYAY; SEN, 2012).

No que se refere a pragas agrícolas, em países de clima tropical como o Brasil, as chances de surtos populacionais desses insetos podem ser aumentadas em função das elevadas taxas de umidade e temperatura, que favorecem não apenas o rápido desenvolvimento dos insetos, mas também, o plantio contínuo de culturas como grãos, hortaliças e frutíferas que servem como fonte de alimento e contribuem para manutenção desses insetos geração após geração.

Por outro lado, além de pragas que atacam plantas, essa condição climática associada ao crescimento populacional desorganizado, juntamente com a falta de saneamento básico e infraestrutura, tanto nos centros urbanos quanto em comunidades rurais, contribuem para ocorrência de surtos populacionais de insetos vetores de doenças, como os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*, responsáveis por transmitir doenças como a dengue, malária, febre amarela e filariose linfática (ANGELO et al., 2010; MINISTERIO DA SAÚDE, 2019).

Com o intuito de mitigar os efeitos causados por esses artrópodes-praga, algumas estratégias de controle vêm sendo utilizadas e, apesar de diferentes métodos de controle disponíveis, o químico ainda é a principal forma utilizada e este, mesmo sendo eficaz, tem causado impactos ao homem e ao ambiente.

Devido aos riscos, é importante reduzir o número de pulverizações de inseticidas sintéticos, e a integração entre os diferentes métodos de controle, pode apresentar um importante avanço nas táticas de manejo. Entre as opções disponíveis, o controle biológico surge como estratégia para reduzir o impacto causado por insetos-praga, e conseqüentemente diminuir os prejuízos econômicos por eles causados.

Entre os agentes biológicos de controle, as bactérias *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner, 1915) e *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) (Meyer; Neide 1904) vem sendo amplamente estudadas para controle de pragas por apresentarem alto potencial inseticida.

Ambos os microrganismos são de ocorrência natural em diferentes substratos, incluindo solo, água, resíduos de grãos, poeiras, materiais vegetais e insetos que apresentam como principal característica a formação intracelular de um cristal proteico durante a fase vegetativa que é liberado juntamente com os esporos durante a fase de esporulação (LAMBERT; PEFFEROEN, 1992).

As bactérias *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* vêm sendo principalmente exploradas para formulação de bioinseticidas, que contém como princípio ativo o complexo esporo/cristal com alta especificidade para seus alvos, inocuidade para o homem e ao ambiente. E ainda, no caso de *B. thuringiensis*, outra forma de exploração se dá pela construção de eventos transgênicos contendo genes *cry* ou *vip* (De MAAGD et al., 1999).

Vale ressaltar, que além das toxinas inseticidas, outros compostos produzidos por *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* têm sido relatados para diferentes finalidades, como produção de fito-hormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; CHERIF et al., 2003) ação citotóxica contra células tumorais de câncer humano (OHBA et al., 2009; SABIÁ JUNIOR, 2015), produção de agentes antimicrobianos e biorremediação de áreas contaminadas (BUSTOS, IBARRA, DUSSÁN, 2018; GAUR et al, 2019).

Ciente da versatilidade que esses microrganismos apresentam, a prospecção de novos isolados, a partir de recursos naturais como água, planta e solo, é de extrema importância, pois fornece subsídios para o desenvolvimento de ativos biotecnológicos que podem conduzir a descoberta de novos produtos.

Diante do exposto, essa tese foi composta de quatro capítulos, sendo o Capítulo I uma revisão bibliográfica abordando alguns dos aspectos mais relevantes sobre o estilo de vida, mecanismo de ação e proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* e outras bactérias entomopatogênicas. O Capítulo II traz os resultados obtidos do isolamento de novas cepas de *Bacillus* e *Lysinibacillus* e a caracterização dessas estirpes tóxicas a algumas pragas de importância agrícola: *Anticarsia gemmatalis*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*, quanto a sua, atividade inseticida (bioensaios) e quanto ao perfil bioquímico (SDS-PAGE), molecular (PCR) e morfológico (MEV). O Capítulo III abordará a caracterização de estirpes de *B. thuringiensis*, *Bacillus* sp e *L. sphaericus* ativas aos insetos vetores *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* e o Capítulo IV abordará a

montagem e análise parcial do genoma das estirpes de *Bacillus* sp. S2728 e S2744 com atividade inseticida a *S. frugiperda* e *A. grandis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPACTOS CAUSADOS POR INSETOS-PRAGA

2.1.1 Lepidópteros desfolhadores: *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

O atual sistema agrícola é marcado pelo cultivo em larga escala e a frequente sucessão de culturas, como soja, milho e algodão, que podem hospedar espécies pragas em comum, como as lagartas desfolhadoras *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae), *Spodoptera frugiperda* Smith, 1979 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidae).

Anticarsia gemmatalis é considerada praga primária da soja, *Glycine max* L., responsável por sérios prejuízos devido sua ocorrência e abundância em quase todas as regiões produtoras desta cultura. Seus ataques podem ser detectados em praticamente todo ciclo fenológico da planta, desde a emergência até a maturação fisiológica dos grãos (MOSCARDI et al., 2012). Inicialmente, as lagartas mais novas raspam as folhas, produzindo pequenos danos, porém, à medida que crescem, ficam mais vorazes, destruindo as folhas e até hastes mais finas, podendo cada lagarta consumir em média de 100 a 150 cm² de área foliar (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000). Em alguns casos, sob altos níveis de infestação, esse consumo pode provocar até 100% de desfolha na planta (LOURENÇÃO et al., 2010).

A lagarta *H. armigera* apresenta ampla distribuição geográfica no mundo, como na Europa, Ásia, África e Oceania (ZALUCKI et al. 1986, GUO 1997). No Brasil, foi detectada pela primeira vez em 2013, atacando os cultivos de soja e algodão nos Estados da Bahia, Goiás e Mato Grosso (CZEPAK et al., 2013a, 2013b). Em plantas de algodão, estima-se que uma lagarta (em um ciclo de vida) pode consumir em média 9,7 estruturas reprodutivas, causando uma redução na produtividade do algodoeiro em aproximadamente 14% (PAPA et al., 2016). Para se ter ideia do impacto causado por essa praga estima-se que anualmente são perdidos mais de US\$ 2 bilhões em

todo mundo devido aos danos causados por *H. armigera*, em diversas culturas (TAY et al., 2013).

Atualmente, devido as suas características biológicas e comportamentais como alta fecundidade, alta capacidade de dispersão, polifagia e diapausa facultativa, acredita-se que *H. armigera* esteja amplamente disseminada por todo território Brasileiro, atacando vários sistemas de cultivos agrícolas, como grãos, cereais, hortaliças, frutíferas e até mesmo plantas daninhas (ÁVILA et al., 2013; BUENO et al., 2014).

Spodoptera frugiperda ou lagarta-do-cartucho-milho é considerada praga primária na cultura do milho. É uma mariposa de hábitos noturnos e migratórios, que apresenta alta mobilidade (GALLO et al., 2002). As fêmeas adultas podem depositar mais de 1000 ovos e, após a eclosão, as lagartas de primeiro ínstar tendem a migrar tanto para folhas adjacentes como também para plantas vizinhas. Considerando sua capacidade de dispersão, estima-se que apenas uma postura seja suficiente para infestar até cinco plantas (BOREGAS et al., 2013).

Embora tenha preferência por plantas da família Poaceae, como milho e arroz, *S. frugiperda* também tem sido relatada como praga em espécies de folhas largas, como nas culturas do algodão e soja, principalmente quando são cultivadas após o milho. Aliado a isto, *S. frugiperda* é uma praga de ocorrência sazonal, e, nas áreas de clima temperado onde não apresenta diapausa, pode chegar a ter até 13 gerações por ano (AFONSO et al., 2009).

Tendo em vista os prejuízos causados por essa espécie, estima-se que somente no Brasil sejam gastos cerca de US\$ 600 milhões a cada ano para controle de infestações (AFONSO et al., 2009) e, ainda assim, o controle dessa praga tem se tornado um grande desafio para os produtores, sendo relatados com frequência, casos de evolução de resistência a alguns grupos químicos, como também a culturas transgênicas expressando proteínas de *B. thuringiensis* (MORILLO; NOTZ, 2001; WAQUIL; FERREIRA; FOSTER, 2002; BLANCO et al., 2010, MONNERAT et al., 2015).

2.1.2. O bicudo-do-algodoeiro: *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae)

A cotonicultura destaca-se como uma das atividades agrícolas mais importantes da atualidade, movimentando cerca de 12 bilhões de dólares por ano com mais de 30 milhões de hectares plantados em todo mundo (USDA, 2018).

Durante o processo produtivo a ocorrência de pragas e doenças caracteriza-se como um dos fatores que mais comprometem o seu rendimento em campo, depreciando o produto e aumentando os custos de produção. Entre as pragas que atacam o algodoeiro, *A. grandis* também conhecido como bicudo-do-algodoeiro, destaca-se pelo seu alto poder de destruição, com danos causados por adultos e principalmente pelas larvas (PAPA; CELOTO, 2015; SILVA, 2012).

Ao atingirem a fase adulta, no início do período reprodutivo, as fêmeas fazem suas posturas de forma isolada, em botões florais, flores e maçãs do algodoeiro (SANTOS, et al., 1999), podendo cada fêmea ovipositar em média 200 ovos durante um período de 10 a 12 dias (STADLER; BUTELER, 2007). As larvas irão se desenvolver até atingirem a fase adulta, no interior das estruturas reprodutivas, em um processo que dura aproximadamente 20 dias (GREENBERG et al., 2003; SILVA et al., 2015).

Para controle do *A. grandis*, diferentes métodos têm sido utilizados, como controle cultural, mecânico, comportamental e principalmente o químico (MIRANDA, 2006). Porém, apesar de mais utilizado, o controle químico ainda apresenta algumas restrições, isto porque, como mencionado, *A. grandis* apresenta hábito de postura endofítica, e o desenvolvimento inicial do inseto ocorre no interior dos botões florais e maçãs que servem de abrigo contra a ação direta tanto dos inseticidas, quanto de inimigos naturais (BRAGA SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983; GALLO et al., 2002).

Além das fases imaturas, o controle dos indivíduos adultos também não é considerado uma tarefa simples, uma vez que os adultos permanecem a maior parte do tempo na parte mediana do dossel das plantas ou sob as brácteas dos botões florais para alimentação e postura, restringindo a exposição ao inseticida e requerendo um maior número de aplicações para controle (PAPA; CELOTO, 2015). Considerando o impacto causado por esta praga, estima-se que 50% dos custos com inseticidas na cultura do algodão esteja relacionado ao controle de *A. grandis* (SPECHT et al., 2013).

2.1.3. Vetores de doenças: *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Algumas espécies de insetos são responsáveis pela transmissão de agentes como vírus, bactérias e protozoários que causam doenças aos seres humanos e animais. Dentre estas, pode-se destacar os culicídeos *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* que estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo. Devido aos danos provocados, estima-se que apenas para saúde pública, os insetos invasores causem prejuízos em torno de 6,9 US\$ bilhões por ano e, deste total, cerca de 80% é investido em tecnologias para controle da dengue, seguidos de 15% para o vírus do Nilo Ocidental transmitido por *Culex* spp. (COREY et al., 2016).

O mosquito *A. aegypti* é originário do Continente Africano e acredita-se que tenha sido introduzido em território brasileiro no período colonial, entre os séculos XVI e XIX, durante o comércio de escravos (CONSOLI et al., 1994). É facilmente encontrado em áreas urbanas de regiões endêmicas, mas também há registros de sua ocorrência na zona rural de muitos países (OLANO, 2016). São capazes de depositar seus ovos em qualquer estrutura de origem artificial ou natural, que contenha água limpa que quando presentes em ambientes de convívio com o homem, apresentam rápida proliferação da espécie, devido às condições ideais para reprodução e também pela presença de fontes de alimentação.

Tal díptero é um dos principais responsáveis pela transmissão do vírus da dengue (DENV I, II, III e IV), febre amarela (YFV) e mais recentemente os vírus causadores da Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). O vírus CHIKV foi documentado pela primeira vez no Brasil em 2014 (NUNES et al., 2015), seguido pelo ZIKV em 2015 (ZANLUCA et al., 2015) e, desde então, tem gerado uma grande preocupação a saúde humana, principalmente, por estarem associados a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré, que consiste em uma inflamação grave no sistema nervoso (SCOTT et al., 2018).

Das doenças listadas acima, só se dispõe de uma vacina preventiva para febre amarela e mesmo assim essa doença é responsável por cerca de 200.000 casos e 30.000 mortes em todo o mundo a cada ano (WHO, 2014). Para o vírus da dengue, a vacina Dengvaxia® da empresa francesa Sanofi Pasteur, foi liberada para testes em alguns países da América Latina, inclusive no Brasil (FERGUSON et al., 2016). No

entanto, estima-se uma eficácia de 65,6% para pessoas com mais de nove anos de idade e 44,6% para crianças com menos (HADINEGORO, et al., 2015). Além disto, tal vacina é recomendada apenas para pessoas que foram anteriormente infectadas com alguns dos vírus da dengue (GODÓI, 2018).

Assim como *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* também é antropofílico com ampla distribuição mundial. Tem o hábito de depositar seus ovos preferencialmente em água parada com alta concentração de material orgânico, e, por isso, tem sido constantemente associado a ambientes em condições inadequadas de saneamento básico (CORREIA, 2012).

Os principais danos relacionados a esta espécie, incluem a transmissão de nematóides filariais como *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* que causam doenças em humanos. No Brasil, o agente etiológico *Wuchereria bancrofti* é responsável pela filariose linfática, doença também conhecida como elefantíase, considerada uma das maiores causas de incapacidades físicas permanentes ou de longo prazo, e acometendo mais de 100 milhões de pessoas em diferentes países do mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Haja vista que não há terapias específicas para tratamento das doenças listadas acima, a abordagem mais eficaz para controle dessas infecções continua sendo a eliminação do contato humano/vetor, que pode ser conseguido com redução das populações de mosquitos. Para isso, diferentes alternativas estão disponíveis, como métodos químicos, físicos, mecânicos e biológicos (SCOTT et al., 2018).

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO MICROBIANO

O controle biológico pode ser definido como um fenômeno natural que consiste na regulação populacional de plantas e animais por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica do ecossistema. Já o controle microbiano, é um segmento do controle biológico que trata da utilização racional de patógenos como vírus, fungos e bactérias, visando a manutenção das populações de pragas abaixo dos níveis de dano econômico (PARRA et al., 2002).

Uma das principais vantagens do uso de microrganismos para o controle de pragas está relacionada à especificidade e seletividade, bem como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais, baixo impacto ao meio ambiente e ao homem, assim como a outros organismos não alvos. Nos últimos anos,

estima-se que o uso de microrganismos para produção de bioinseticidas cresceu mais de 70%, chegando a movimentar cerca de R\$ 464,5 milhões, apresentando um crescimento de aproximadamente 17% (MAPA, 2019).

Apesar de sua eficácia, a comercialização bem-sucedida de um bioproduto depende de muitos fatores, entre os quais pode-se destacar a disponibilidade e isolamento dos microrganismos alvo. Para isto, o processo de triagem envolve todo um trabalho de isolamento e testes iniciais de caracterização do microrganismo e da sua capacidade de controle, sendo este muitas vezes considerado um serviço laborioso e sem garantias de sucesso, mas ainda assim fundamental (BARRATT et al., 2018).

Estima-se que apenas 1% dos microrganismos avaliados dão origem a produtos de sucesso (BAILEY;FALK, 2011), fato que reflete a importância das coleções de microrganismos, como a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, responsável pelo fornecimento de materiais que deram origem a diferentes biolarvicidas, como Bt-horus® e o Inova-Bti®, ambos usados para controle de mosquitos.

É válido lembrar que muitos fatores estão envolvidos no sucesso de um produto biológico incluem não apenas a sua eficácia técnica, mas também a estabilidade genética da cepa e o impacto de mutações, variações durante o ciclo de produção em biorreatores, tempo de prateleira, persistência em campo, espectro de ação e outros. E, além das características do produto em si, deve-se dar atenção também as interações ecológicas entre os agentes de controle introduzidos e os organismos que já se encontram no ambiente (TAKORS, 2012).

2.4. O GÊNERO *Bacillus* E OUTRAS BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS

O gênero *Bacillus* é formado por um grupo heterogêneo de bactérias móveis Gram-positivas ou Gram-variáveis, que apresentam forma de bastonete e podem crescer isoladas, em pares ou em cadeias (WHITMAN et al., 2001). Uma de suas características mais marcantes é que após a diferenciação celular, tem capacidade de sintetizar os endósporos (quando internos à célula) ou esporos (quando livres no meio), que se caracterizam como estruturas metabolicamente dormentes e extremamente resistentes que são produzidas em decorrência de estresses

ambientais, provocados por fatores como temperatura, pH, aeração e esgotamento nutricional do meio (MILLER; BASSLER, 2001; HOON et al., 2010; CAVALCANTE, 2018).

O solo se caracteriza como o principal reservatório de esporos e à partir dele, muitas espécies de *Bacillus* podem interagir com diferentes componentes de um dado ecossistema, tais como plantas, animais, outras bactérias, fungos, insetos e nematoides, sendo este fato possível, pelo menos em parte, dada a grande variedade de compostos biológicos secretados por esses organismos (DE VOS, 2011; VERBAENDERT; DE VOS, 2011).

Entre os compostos produzidos, alguns podem apresentar diferentes potencialidades de uso como farmacêutico, ambiental e agrícola. No que se refere à área agrícola, uma das aptidões exploradas é a utilização desses organismos como agentes de controle de insetos-praga. Neste sentido, estima-se que cerca de 100 espécies de bactérias já tiveram sua atividade entomocida relatada para alguma espécie alvo (THACKER; 2002). No caso de agentes entomopatogênicos, as bactérias do gênero *Bacillus* e *Lysinibacillus*, notadamente as espécies *B. thuringiensis* e *L. sphaericus*, são amplamente utilizadas devido a sua eficácia e segurança, estando sua ação inseticida associada principalmente a inclusões cristalinas paraesporais de origem proteica do tipo Cry e Cyt (no caso de *Bt*) e Bin A/B (para *Ls*).

Entretanto, vale destacar que outras espécies bacterianas podem apresentar potencial uso como agentes de controle a ser explorado, e que a produção de um para-esporo cristalino não é única para essas espécies, havendo registros para *Lysinibacillus fusiformis*, *Paenibacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus* e algumas linhagens do *Paenibacillus lentimorbus* (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

A espécie *Bacillus cereus strictu sensu*, por exemplo, apresenta esporos cilíndricos e elípticos, geralmente em posição central, é considerada não-cristalífera, sendo essa a principal característica que o distingue de *B. thuringiensis*. Apesar de não apresentar um cristal proteico, a atividade inseticida de *B. cereus* já foi relatada em algumas espécies, especialmente aquelas cujo líquido intestinal médio esteja próximo a neutralidade, com pH entre 6,6 e 7,4 (HABIB; ANDRADE, 1998). Sabe-se que diferentes linhagens de *B. cereus*, podem sintetizar uma gama de metabólitos extracelulares, como a fosfolipase C e outras enzimas proteolíticas, que tem sido o principal fator responsável pela virulência dessa bactéria (HEIMPEL, 1955; RAHMET-

ALLA; ROWLEY, 1989). Além de enzimas, já foi relatado que o esporo dessa bactéria pode apresentar uma proteína tóxica de baixa atividade específica e estruturalmente semelhante ao cristal de *B. thuringiensis* (COSTA et al., 2010).

Brevibacillus laterosporus, também, é considerada uma espécie entomopatogênica, caracterizada pela produção de um corpo parasporal em forma de canoa, no qual se encontra ligado a uma extremidade do esporo, e em algumas linhagens, já foi detectado a produção de inclusões citoplasmáticas contendo proteínas cristalinas inseticidas (ZUBASHEVA et al., 2010). Sua atividade inseticida já foi relatada para insetos pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera e ao molusco *Biomphalaria glabrata*. Entre os alvos testados, *B. glabrata* demonstrou o maior grau de sensibilidade a *B. laterosporus*, com algumas cepas induzindo mortalidade de 90 a 100%, e para larvas do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, causando mortalidade entre 33 e 63%. Contudo, vale salientar que o cristal não é uma característica condicionante a atividade inseticida dessa espécie, uma vez que já foi relatado a atividade entomopatogênica de cepas acristalíferas (OLIVEIRA et al., 2004; CARRAMASCHI et al., 2017; PEREIRA et al., 2018). Alguns autores também sugerem que parte da patogenicidade exercida por *B. laterosporus* seja proveniente de compostos altamente conservados presentes na superfície dos esporos (MARCHE et al., 2017).

Bacillus pumilus é uma espécie ubíqua e esporulante, e seus esporos são considerados mais resistentes ao calor, a dessecação e radiação ultravioleta (UV), quando comparado aos esporos de outros *Bacillus* (GIOIA et al., 2007). Algumas linhagens têm sido usadas no controle biológico de fungos patogênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MUNIMBAZI; BULLERMAN, 1998) e como indutor de resistência em plantas (BARGABUS et al., 2004; CHOUDHARY; JOHRI, 2009). *B. pumilus* também tem sido relatado como agente entomopatogênico contra o coleóptero praga da batata *Leptinotarsa decemlineata*, causando mortalidade tanto para larvas (95,7%) quanto para adultos (26,7%) (ERTÜRK; YAMAN; ASLAN, 2008), assim como para *Dendroctonus micans*, coleóptero praga de espécies florestais (95,7% para larvas e 40,9% adultos) (ERTÜRK; YAMAN; ASLAN, 2008). Além de coleópteros, o efeito de *B. pumilus* tem sido relatado para a mosca-das-frutas, *Ceratitis capitata*, causando mortalidade larval de 94% (MOLINA et al, 2010; RAMÓN, 2015).

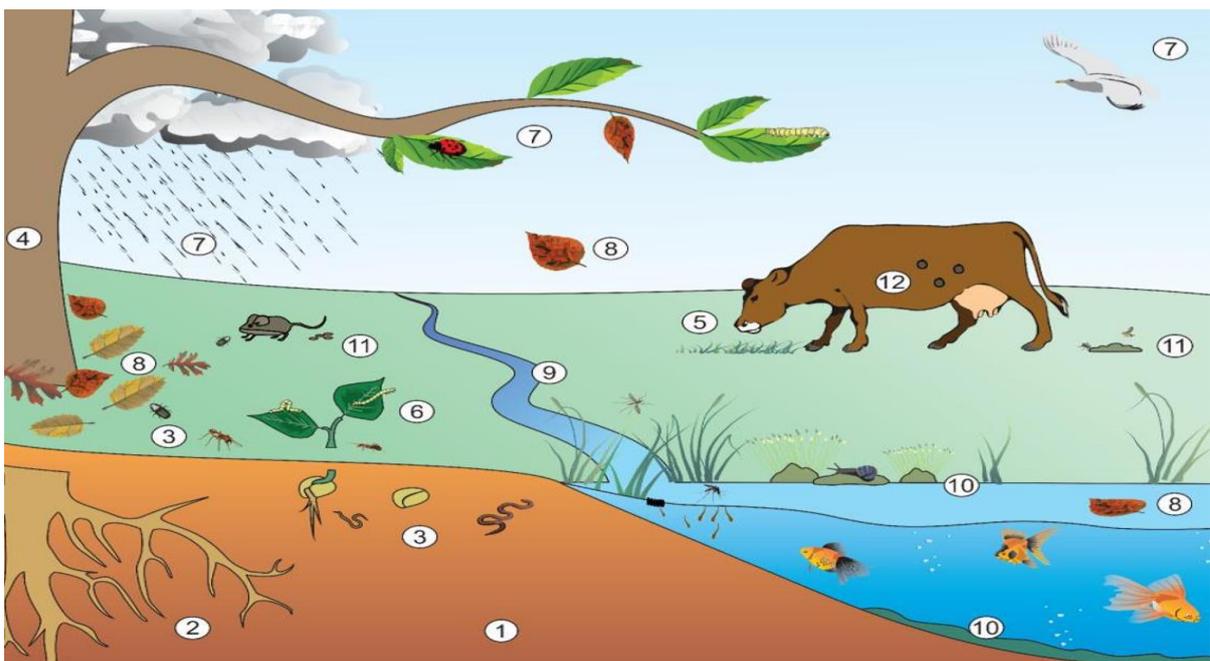
Também foi relatado que a bactéria anaeróbica *Clostridium bifermentans* produz uma série de proteínas com atividade mosquitocida (SELEENA et al., 1997; LENNOX et al. 2016), apresentando toxinas diferentes daquelas expressas por genes da família *cry* (QURESHI et al., 2014).

2.4.1 *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Eubacteriales: *Bacillaceae*)

2.4.1.1 Aspectos ecológicos de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é um organismo ubíquo que pode ser isolado a partir de diferentes substratos como solo, planta, insetos, água e poeira presentes em diferentes ambientes (Figura 1).

Figura 01. Representação de diferentes nichos ocupados por *Bacillus thuringiensis*. O solo (1) é considerado um dos principais reservatórios de esporos de Bt, já que recebe a maior quantidade de propágulos advindos de outros ambientes. A partir do solo, Bt pode colonizar as raízes das plantas (2), nutrindo-se dos exsudatos radiculares. Também podem ser ingeridos por vermes e insetos presentes no solo (3). A colonização da rizosfera favorece a colonização endofítica (4), podendo a bactéria se proliferar nos tecidos das plantas e infectar os herbívoros de maneira paratênica (sem matar os hospedeiros) (5) ou patogênica (6). Além do endofitismo, o Bt pode atingir a superfície das plantas a partir do solo devido ao processo de germinação, por ação da água da chuva e pelas fezes dos animais que o transportam, como insetos e aves (7). Bt também pode ser reintroduzido no solo ou na água a partir das folhas contaminadas que caem das plantas, (8) ou ainda, os esporos podem ser transportados pela água da chuva (9). Na água, Bt pode infectar e proliferar em vertebrados ou invertebrados e persistir nesse ambiente, associando-se a substratos como plantas aquáticas e sedimentos (10). As fezes de animais que se alimentam de plantas ou insetos contaminados também podem servir como fonte de nutrientes para o crescimento de Bt (11). Sabe-se que carrapatos e ácaros também são hospedeiros do Bt (12), mas o mecanismo natural da infecção é desconhecido.



Fonte: Adaptado de Argôlo-Filho e Loguercio (2014).

Durante o desenvolvimento, *B. thuringiensis* apresenta duas fases principais de desenvolvimento: a fase de crescimento vegetativo e a fase estacionária. A fase vegetativa é marcada pelo crescimento exponencial das células bacterianas, que só irá ocorrer mediante a disponibilidade de nutrientes no meio. Por outro lado, na fase estacionária, quando há o esgotamento nutricional e mediante mecanismos genéticos, a bactéria interrompe o seu processo de divisão celular. Neste período, o endósporo torna-se maduro e é liberado para fora da célula durante a esporulação (PINTO; FIUZA, 2008).

O esporo é a principal forma que Bt é encontrado na natureza, estando depositado principalmente no solo, onde pode permanecer viável por meses ou anos (De MAAGD et al., 2003; VAN CUYK et al., 2011). Estima-se que o número de células viáveis varia de 10^2 a 10^4 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de solo (DAMGAARD, 2000), porém muitos fatores podem atuar de forma positiva ou negativa na sobrevivência, germinação, crescimento, esporulação e até mesmo na produção de proteínas nesse substrato, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes, microbiota nativa, pH, umidade, teor de material mineral e orgânico (WEST; BURGESS; DIXON, 1985; POLANCZYK; ZANÚNCIO; ALVES, 2009; AKIBA et al., 1977). Juntamente com o esporo, Bt também pode produzir inclusões cristalinas de origem proteica que são liberadas durante a esporulação e tendem a ficar retidas a ácidos húmicos ou partículas do solo, que as protegem da degradação podendo inclusive manter a sua atividade inseticida (POLANCZYK; ALVES, 2003).

No solo, os esporos também podem infectar outros organismos como insetos e nematoides de maneira paratênica, ou seja, colonizando o intestino desses invertebrados sem necessariamente causar mortalidade, e por isso consegue retornar ao ambiente pelos seus excrementos. Bt também pode colonizar os seus hospedeiros de maneira patogênica neste caso, matando e multiplicando-se em seus cadáveres (ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014).

A partir do solo, Bt é capaz de colonizar a rizosfera das plantas nutrindo-se de seus exsudatos e então, coloniza-las endofiticamente, absorvendo os nutrientes necessários da planta para sobreviver, ao mesmo tempo que induz a proteção da planta por estímulo e produção direta de toxinas e pela produção de agentes antimicrobianos e enzimas (BACON, 2002; BENHAMOU; KLOEPPER; TUZUN, 1998)

Além da via endofítica, Bt pode atingir a superfície das plantas a partir do solo devido ao processo de germinação das sementes, por respingos de água da chuva

ou irrigação e pelos excrementos de animais que o transportam, como insetos e aves (ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014).

Na planta, a permanência de Bt pode ser afetada principalmente pela presença de exsudatos foliares que podem conter inibidores de germinação de esporos de *Bt* (BULLA JR et al., 1980; ALEKSEEV; KARABANOVA; SHEVTSOV, 1982), pela predação por microrganismos epífitos nativos (ERCOLANI, 1978; BLAKEMAN, 1991) e, também, pela radiação solar incidente. Em geral, acredita-se que os esporos bacterianos são 10 a 50 vezes mais resistentes aos raios UV do que as células vegetativas, porém menos resistentes que os cristais proteicos (NICHOLSON et al., 2000). Em estudos realizados por Cohen et al. (1991) com uma estirpe de *Bacillus thuringiensis kurstaki*, a meia-vida de esporos expostos à luz solar variou de 0,5 horas e cerca de 4 horas para a endotoxina, porém, notou-se uma redução no seu potencial entomocida para larvas de *H. armigera* após três horas de exposição a luz UV. Já para *L. sphaericus*, a viabilidade foi perdida e a toxicidade foi prejudicada após 6 horas de exposição a luz UV (HADAPAD et al., 2009).

Bacillus thuringiensis está bem consolidado como um entomopatógeno, porém, deve-se considerar que nem sempre esporula em insetos vivos ou mortos (POLANSKY, 2004), e este é um dos principais motivos pelo qual dificilmente estão associados à ocorrência de epizootias naturais, havendo diferentes fatores que interferem na relação patógeno/hospedeiro (ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014). Estando de um lado, os insetos, que apresentam diferentes mecanismos de defesa para impedir que o patógeno invada ou cause danos ao seu corpo, como uma cutícula externa, a microbiota intestinal concorrente, pH do trato gastrointestinal, sistema imunológico, proteases, peptídeos antimicrobianos e receptores celulares. E do outro, os microrganismos como Bt, que podem produzir toxinas, enzimas degradantes de agentes antimicrobianos do hospedeiro, facilitando a colonização intestinal e a produção de substâncias antimicrobianas, que diminuem a competição com a microbiota do hospedeiro otimizando o aproveitamento por espaço e nutrientes (ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014).

2.4.1.2 Toxinas inseticidas e modo de ação de *Bacillus thuringiensis*

A principal atividade inseticida atribuída a Bt está relacionada a inclusões cristalinas formadas por uma classe de proteínas denominadas δ -endotoxinas, que são produzidas durante o processo de esporulação, na fase estacionária do seu ciclo de desenvolvimento e estão divididas em duas principais famílias, as proteínas Cry (Crystal) e Cyt (Cytolytic) (SCHNEPF et al., 1998).

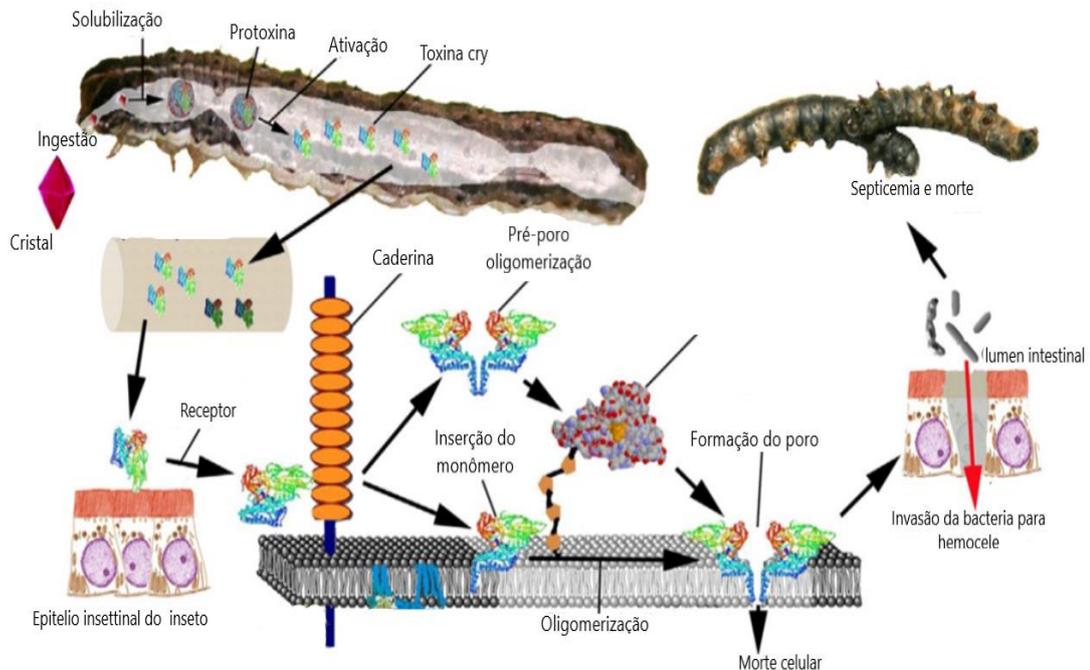
Essas toxinas produzidas podem assumir formas morfológicas distintas, que são evidenciadas por meio da caracterização por microscopia eletrônica, com a observação de cristais piramidais, bipiramidais, cuboidais, esféricos ou, ainda, sem forma definida. Em alguns casos, a forma em que os cristais se apresentam, indica a sua atividade tóxica e, conseqüentemente, a ligação dessa toxicidade aos diferentes tipos de genes *cry* (De MAAGD et al., 2003).

Atualmente, as proteínas Cry constituem o maior grupo de proteínas inseticidas produzidas por espécies do gênero *Bacillus*, sendo atualmente classificadas em 78 diferentes tipos (Cry1 à Cry78) em função do grau de identidade das sequências de aminoácidos que apresentam (CRICKMORE, 2019).

Trata-se de proteínas que são codificadas principalmente por genes plasmidiais associados a elementos de transposição, os quais facilitam a amplificação, transferência horizontal e o conseqüente aumento de toda variabilidade genética encontrada nessa classe (BERRY et al., 2002).

Pelo mecanismo de ação clássico, inicialmente, ocorre a ingestão do complexo esporo-cristal pela larva do inseto suscetível, seguindo até o intestino médio, onde os cristais são solubilizados devido à ação do pH alcalino. Este processo dará origem às protoxinas que se tornarão ativas devido a ação das proteases presentes no intestino do inseto. Acredita-se que a protease digestiva de lepidópteros e dípteros é do tipo serino-protease, enquanto em coleópteros são cisteíno-proteases e aspártico-proteases (MONNERAT; BRAVO, 2000). Após ativação, a protoxina é capaz de se ligar a receptores localizados nas microvilosidades do epitélio intestinal, onde formarão os poros aumentando a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana. O aumento na absorção de água causará lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando conseqüentemente morte da lagarta (BRAVO et al., 2005; BRAVO, 2017) (Figura 2).

Figura 2. Representação do modo de ação das proteínas Cry de *B.thuringiensis*. Após ingestão do cristal paraesporal, ocorre a solubilização no meio alcalino presente no intestino médio do inseto, tornando a protoxina em toxina ativa pela ação de proteases. A toxina monomérica ativa se liga a um receptor primário do tipo caderina (CADR), presente na membrana das células epiteliais do intestino médio, provocando uma clivagem e mudança conformacional dessa toxina, facilitando a formação de um oligômero, que irá se ligar a um segundo receptor do tipo aminopeptidase (APN) ou alcalinofosfatase (ALP) promovendo a inserção dessa estrutura oligomérica na membrana celular e formação do poro levando o inseto a morte.



Fonte: Adaptado de Adang; Crickmore; Jurat-Fuentes (2014)

As proteínas Cyt (codificadas pelos genes *cyt*) também são endotoxinas sintetizadas na fase de esporulação, e apresentam baixo peso molecular (25-28 kDa). Ao todo são conhecidos três grupos de proteínas Cyt que compreendem 40 genes conhecidos (CRICKMORE et al., 2019). Apresentam atividade bem reconhecida para insetos da ordem Diptera, e geralmente são encontradas em linhagens que também possuem genes *cry* de mesma especificidade, possuindo ação sinérgica na toxicidade a larvas desses insetos. Por outro lado, diferentemente do que ocorre com as toxinas Cry, as Cyt não se ligam a receptores específicos, mas sim, interagem diretamente com a membrana lipídica dos insetos, formando poros ou destruindo-os através de ação detergente (BUTKO, 2003).

Além das endotoxinas, Bt também é capaz de sintetizar proteínas durante a fase vegetativa, como as famílias das proteínas Vip (proteínas inseticidas vegetativas) e Sip (proteínas inseticidas secretadas) que são solúveis e não formam cristais, podendo apresentar toxicidade na mesma magnitude que as proteínas Cry (BRAVO, 2017).

A família Vip não apresenta homologia de sequência ou estrutura com as δ -endotoxinas, o que pode ser visto como algo extremamente positivo, especialmente em termos de manejo e evolução da resistência de insetos (FANG et al., 2007). A atividade inseticida das Vips, já foi descrita para algumas ordens de insetos, inclusive, para espécies que são insensíveis à ação das proteínas Cry. As subfamílias Vip1 (100 KDa) e Vip2 (52 KDa) que formam uma toxina binária já foram descritas para larvas de coleópteros (WARREN, 1997) e alguns hemipteros (SAMPURNA; MAITI, 2011) e a sub família Vip3 para lepidópteros (CHEN et al., 2003; SHI et al., 2004). Ainda não se tem relatos para atividade da Vip4.

Na família Sip, apenas Sip1Aa aparece com representante e sua atividade é descrita como tóxica a larvas de coleópteros. Esta proteína foi inicialmente obtida de sobrenadantes da cultura da cepa Bt EG2158 e codifica uma proteína de aproximadamente 41kDa (DONOVAN, et al., 2006).

2.4.1.3 Outros fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*

Embora o cristal proteico seja o principal fator da patogenicidade de Bt, essa bactéria também é capaz de sintetizar genes que codificam outros fatores de virulência, como do tipo quitinases e proteases, que atuam diretamente na membrana peritrófica do inseto, promovendo a sua ruptura e favorecendo o acesso das δ -endotoxinas ao epitélio intestinal (ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014). Além dessas, há a β -exotoxina, que além de possuir atividade inseticida, também possui atividade comprovada sobre mamíferos, e por isso, são imprescindíveis os estudos para sua detecção, principalmente se o objetivo for a formulação de um bioinseticida (REDDY et al., 1998; SAMPSON; GOODAY, 1998).

Também há relatos do efeito dos próprios esporos sobre a toxicidade de algumas linhagens de Bt, e têm-se indícios que a sua presença aumenta a atividade entomopatogênica da bactéria ou mesmo ser a causa principal da mortalidade (VILAS-BOAS et al., 2012). Este fato foi observado por Liu e colaboradores (1998) que investigaram a ação sinérgica entre esporos e cristais de *B. thuringiensis* para larvas de *Plutella xylostella*. Nesta pesquisa os autores sugerem que o sinergismo entre as duas porções, depende da linhagem do inseto, da linhagem bacteriana, do conjunto de proteínas Cry e de outros fatores, tais como ingredientes da formulação e das concentrações de esporos e proteínas Cry.

Outro fator de toxicidade associado aos esporos é a formação de uma membrana superficial denominada de proteína capa ou proteínas “*S-layer*”. Somerville (1971) mostrou que, durante a sua formação, o cristal pode estar intimamente associado a essa membrana, sugerindo inclusive, que ambas as porções tenham propriedades bioquímicas semelhantes (DELAFIELD; SOMERVILLE; RITTENBERG, 1968). Proteínas *S-layer* foram encontradas em algumas espécies de *Bacillus*, inclusive com ação patogênica a insetos, como o coleóptero *Epilachna varivestis* (PEÑA et al., 2006). Também há relatos da atividade dessa proteína em uma cepa de *L. sphaericus* com ação tóxica a *C. quinquefasciatus* (LOZANO; AYALA; DUSSÁN, 2011).

2.4.2 *Lysinibacillus sphaericus*: Toxinas inseticidas e modo de ação

A bactéria *Lysinibacillus sphaericus* (Ls), anteriormente denominada de *Bacillus sphaericus*, foi renomeada devido à presença de lisina e ácido aspártico na composição de seu peptidoglicano (AHMED et al., 2007). É caracterizada como um bacilo Gram positivo cosmopolita, capaz de produzir esporos com formato esférico que deforma a porção terminal do seu esporângio, dando a aparência de uma raquete. Apresenta atividade tóxica bem reconhecida para dípteros, em especial para culicídeos como espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Mansonia* e *Psorophora* (LACEY, 2007), e por isso tem sido utilizado na produção de alguns biolarvicidas para controle dessas espécies (MITTAL, 2003; REGIS et al., 2001.)

A atividade inseticida dessa bactéria está relacionada basicamente a produção de quatro classes de toxinas: toxina binária (Bin), toxinas mosquitocidas (Mtx), toxina binária Cry48Aa e Cry49Aa e as Sphaericolisinas (BERRY, 2012). Além destas, mais recentemente as proteínas *S-layer* presentes na camada superficial dos esporos tem sido relacionada a atividade larvicida para mosquitos (LOZANO; AYALA; DUSSÁN, 2011; ALLIEVI et al., 2014).

A toxina Bin é um heterodímero composto por dois polipeptídeos sintetizados de forma equimolar denominados de BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa) (BAUMANN, 1985; BAUMANN et al., 1988). Essa toxina é considerada o principal fator inseticida de Ls e o princípio ativo básico utilizado nos produtos comerciais atualmente disponíveis (BERRY, 2012). Assim como Bt, a toxina também é produzida durante a fase estacionária, formando cristais que são liberados durante a fase de esporulação ou,

então, permanecerem aderidos ao esporo. As espécies do complexo *Culex pipiens*, como *Culex quinquefasciatus*, são mais susceptíveis a essas protoxinas quando comparada ao *Aedes aegypti*, que é considerado mais refratário já que não apresenta alguns receptores específicos (FERREIRA et al., 2010). Estima-se que a dose necessária para matar *A. aegypti* seja de 100 a 1000 vezes superior a dose letal para *C. quinquefasciatus* (NIELSEN-LEROUX; CHALES, 1992).

Quando o complexo esporo-cristal é ingerido por larvas de insetos suscetíveis, ocorre a sua dissolução no lúmen estomacal pela ação combinada de um elevado pH (~10) e de serino proteases. Após a ingestão, as protoxinas são convertidas em toxinas ativas onde os polipeptídeos de 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB) são clivados em componentes menores de 39 e 43 kDa, respectivamente (CHARLES et al., 1997). Estudos demonstram que as duas subunidades formadas agem em sinergia, e que BinB é responsável por reconhecer e se ligar a receptores específicos do epitélio intestinal das larvas, enquanto a BinA é responsável pela toxicidade nas células (NICOLAS et al., 1993; CHARLES et al., 1997). Alguns trabalhos mostram que subunidade BinB é semelhante às estruturas das toxinas formadoras de poro, sugerindo que essa toxina penetra nas células através da formação de poros na membrana dos efeitos citopatológicos que resultam na morte das larvas (DE MELO et al., 2008).

As toxinas Mosquitocidas (Mtx) pertencem a outra classe de toxinas produzidas por Ls durante a fase vegetativa e estão agrupadas em duas famílias: a família Mtx1, Mtx2, Mtx3 e Mtx4 (THANABALU et al., 1991; THANABALU; POTER, 1996) e podem estar presentes em estirpes de baixa, média e alta toxicidade (CHARLES et al., 1996). Já foi demonstrado que cepas de baixa atividade inseticida não produzem proteínas Bin, somente proteínas Mtx. Por outro lado, as proteínas Mtx podem apresentar sinergismo e aumentar a toxicidade quando associadas a proteínas Cry, inclusive em larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes as toxinas binárias (WIRTH et al., 2007; WIRTH et al., 2014). Este fato é relevante para o desenvolvimento de novos inseticidas biológicos e também no manejo da resistência de populações de mosquitos.

A toxina sphaericolisina é uma citolisina de 53 kDa descoberta na cepa A3-2 de Ls. Também é secretada no meio de cultivo e acredita se tratar de uma toxina formadora de poros, pertencente as citolisinas. Alguns estudos realizados não indicam

ação dessa toxina em dípteros, entretanto sua atividade já foi relatada para *Blatella germanica* e *Spodoptera litura* (NISHIWAKI et al., 2007).

A presença de outra toxina mosquitocida (além das toxinas Bin e Mtx) foi detectada em estirpes de Ls que se mostraram tóxicas para uma população de mosquitos resistentes à toxina Bin e que eram incapazes de produzir qualquer uma das toxinas Mtx, sugerindo que essas linhagens poderiam produzir um tipo de toxina com um modo de ação diferente da toxina Bin (PEI et al., 2002; YUAN et al., 2001; NIELSEN-LEROUX et al., 2001). Posteriormente, descobriu-se que se tratava de uma nova toxina com dois componentes de 135 kDa e 49 kDa que foram designados como Cry48 e Cry49, respectivamente (JONES et al., 2007). Estudos tem mostrado que essa toxina também é produzida durante a fase estacionária de algumas cepas de Ls, e assim como a toxina Bin, formam cristais sem forma definida para Cry48, e um cristal bipiramidal para Cry49, que ficam depositados fora do esporo (JONES et al., 2007).

As proteínas *S-layer* correspondem a uma porção superficial paracristalina, formada por moléculas de proteínas ou glicoproteínas com diferentes funções, mas que estão associadas a interação entre as células e ao ambiente. Pode estar presente em algumas arqueas e bactérias, como as do gênero *Bacillus*, inclusive estão associadas a atividade patogênica, como relatado para cepa GP1 de *B. thuringiensis*, que demonstrou atividade inseticida contra o coleóptero *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) (PEÑA et al. 2006).

A ação inseticida de proteínas *S-layer* também vem sendo associada a algumas cepas de *L. sphaericus*, podendo ser produzidas tanto na fase vegetativa, quanto na fase de esporulação. Trata-se de proteínas com alto peso molecular (120-130 kDa) com domínios de ligação hemolítica e quitinolítica. Também já foi relatado o efeito sinérgico dessas proteínas com esporos sem essa camada superficial (LOZANO; AYALA; DUSSAN, 2011; ALLIEVI et al., 2014).

2.4.3. Isolamento e caracterização de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus*

Um dos primeiros passos para estabelecimento de um programa de controle microbiano de insetos consiste no isolamento de agentes entomopatogênicos que podem estar presentes em recursos naturais como solo, água e plantas. Após

isolamento, as etapas seguintes devem estar relacionadas a atividades de identificação das espécies e sua caracterização.

No que se refere às bactérias entomopatogênicas *B. thuringiensis* e *L. sphaericus*, diferentes metodologias de isolamento já foram descritas. A mais utilizada é a proposta pela Organização Mundial da Saúde, que se baseia no tratamento por choque térmico, no qual é utilizado aquecimento da amostra por 12 minutos a 80°C e 5 minutos no gelo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985) e também o isolamento por acetato de sódio (TRAVERS et al., 1987).

Após isolamento, todos os organismos devem ser armazenados de acordo com as características de cada espécie. Pelo que consta nas Diretrizes e Requisitos Corporativos de Qualidade para Coleções de Microrganismos proposto pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), é recomendável que cada linhagem seja mantida em, pelo menos, dois métodos diferentes de preservação, pelo menos um deles deve ser o ultracongelamento ou a liofilização, por serem considerados métodos de preservação a longo prazo (CASTRO et al., 2015; PONTES et al., 2015).

Por se tratar de organismos de ampla variabilidade, a caracterização do material armazenado é imprescindível, podendo ser feita a caracterização morfológica, molecular, bioquímica e de toxicidade a pragas alvo. A caracterização morfológica pode se dar através da microscopia óptica em contraste de fases, que permite a visualização das inclusões cristalinas dentro e fora do esporângio, sendo esse um dos passos determinantes para diferenciação entre as estirpes de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. De modo complementar, também pode ser realizado por microscopia eletrônica de varredura, que permite ver não só os cristais, mas também a sua forma, que nem sempre é distinguível pela microscopia óptica.

Após microscopia óptica, Bt e Ls também podem ser caracterizados por métodos moleculares, via Reação da Cadeia Polimerase (PCR), uma técnica que consiste na reação de polimerização de DNA em cadeia, e promove o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial, que se dá pelo anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) (SILVA-PEREIRA, 2003). Através da PCR é evidenciada a presença dos genes responsáveis pela produção das proteínas específicas, podendo até prever parcialmente a atividade tóxica de um determinado isolado. Já a caracterização do complexo esporo cristal de *B. thuringiensis*, pode ser realizada pela

análise proteica via SDS-PAGE, cujo princípio consiste basicamente na separação de macromoléculas ou migração de colóides em campo elétrico (SARGENT; GEORGE, 1975).

Embora as técnicas de caracterização morfológica, bioquímica e molecular possam dar uma previsão da atividade inseticida, a real confirmação do potencial de uma nova linhagem precisa ser corroborada por meio de bioensaios, que em linhas gerais, consiste em um teste onde seres vivos são expostos a uma determinada substância sob condições controladas. Esta ação é necessária porque, apesar de alguns isolados apresentarem genes com atividade já reconhecida, os mesmos podem estar inativos, sob o controle de um promotor ineficiente ou em uma baixa razão para expressar completamente sua ação (FERRANDIS et al., 1999; MASSON et al., 1998).

Para Bt e Ls, os ensaios são realizados preferencialmente com insetos nos primeiros estágios, devido a atividade/densidade dos receptores presentes na parede intestinal dos insetos. No bioensaio, geralmente a bactéria é oferecida oralmente aos insetos por meio de uma dieta natural ou artificial, e a eficácia do material testado é comprovada quase sempre pela taxa de mortalidade.

Vale lembrar que muitos fatores podem influenciar no sucesso de um bioensaio, podendo-se destacar a habilidade do responsável pela execução do ensaio; qualidade da amostra testada (boa taxa de esporulação, ausência de contaminações, concentração); inseto utilizado (sanidade, vigor e instar); material usado como fonte de alimento (dietas que atendam exigências nutricionais das espécies alvo); qualidade da água (principalmente para ensaios com mosquitos); assepsia das condições de execução e dos materiais utilizados (diminuir a chances de contaminações) e condições de acondicionamento do bioensaio (temperatura, fotoperíodo, umidade) e é crucial a padronização de todos os requisitos.

2.5. APLICAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* E *Lysinibacillus sphaericus*

2.5.1 Bioinseticidas

Nos últimos anos, os inseticidas biológicos têm despertado um crescente interesse como método alternativo para o controle de pragas. Para se ter ideia da

magnitude desse novo mercado, estima-se que mais de 700 biopesticidas estão registrados em todo o mundo (KACHHAWA, 2017).

Os bioinseticidas à base de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* são importantes agentes de controle, e entre outras qualidades, são considerados seguros ao meio ambiente, apresentam modo de ação específico e por serem bactérias esporulantes, apresentam vantagens de produção em larga escala, favorecendo a utilização em programas de controle.

No que se refere à produção de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, atualmente existem 24 produtos registrados para controle de pragas agrícolas no Brasil, e são derivados de apenas duas subespécies, Bt aizawai e Bt kurstaki, com atividade principalmente para lepidópteros (AGROFIT, 2019). No controle de vetores, existem os biolarvicidas à base de *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti). Para Ls, foram identificados quatro tipos de toxinas inseticidas, a toxina binária (Bin), as toxinas mosquitocidas (Mtx); toxina binária Cry48Aa e Cry49Aa e as sphaericolisinas, que não ocorrem simultaneamente em todas as linhagens (BERRY, 2012). No caso do Bti, os cristais contêm quatro toxinas (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa) que atuam em sinergia com diferentes receptores, apresentando uma vantagem em relação à evolução de populações resistentes (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013).

Para desenvolvimento de um novo bioinseticida, um dos primeiros requisitos a serem atendidos é a determinação da linhagem a ser trabalhada, que deve ser geneticamente estável, de elevada toxicidade e que não seja nutricionalmente exigente, para não vir a encarecer os custos da produção (ANGELO, et al., 2010).

Depois de produzidos, os bioinseticidas podem conter como princípio ativo a mistura espora/cristal e serem classificados como produtos de primeira geração, quando o ingrediente ativo é originário de uma cepa nativa de Bt ou Ls. Essa é a principal forma que se encontra a maior parte dos produtos comerciais. Os bioinseticidas também podem ser classificados como de segunda geração. Neste caso, a mistura espora/cristal é proveniente de uma determinada estirpe no qual se introduziu (por conjugação ou transformação) os genes que codificam as δ -endotoxinas, presentes em cepas nativas, aumentando o seu espectro de ação. Já nos bioinseticidas de terceira geração, a formulação contém bactérias recombinantes, como, por exemplo, *Pseudomonas fluorescens* que foram transformadas com genes que codificam δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (CERÓN, 2001).

2.5.2. Plantas Bt

O desenvolvimento de plantas transgênicas expressando toxinas Cry, pode ser considerado um dos maiores avanços do uso de Bt na agricultura. Tal fato teve início na década de 80, quando foram obtidas as primeiras plantas transgênicas de fumo (BARTON et al. 1987) e tomate (FISCHHOFF et al. 1987). No Brasil, essa tecnologia chegou em 2005, tendo sido o algodoeiro Bollgard evento MON531 primeira planta transgênica a ser liberada para exploração comercial.

Poucos anos após liberação, já em 2009, o Brasil passou a ser o segundo maior produtor de plantas transgênicas do mundo, posto que mantém até hoje com mais de 50 milhões de hectares plantados, um total que corresponde a 26,4% de toda área cultivada com transgênicos no mundo (CIB, 2019).

A expressividade desses dados pode estar relacionada, entre outros fatores, à diminuição dos efeitos ambientais sobre a atividade inseticida exercida por essas plantas, já que a toxina é produzida durante todo ciclo da cultura, sem sofrer degradação dos raios UV ou ser lavado pela ação da chuva ou água de irrigação, como acontece com os produtos formulados. Além do mais, há uma redução no número de aplicação de inseticidas químicos, o que favorece a manutenção de inimigos naturais que auxiliam no controle de outras pragas e contribui para retardar a evolução da resistência (NAVON, 2000; BOBROWSKI et al. 2003).

Por outro lado, apesar das inúmeras vantagens dessa tecnologia, o seu uso inadequado tem gerado sérias consequências, incluindo a evolução de populações de insetos resistentes, como já reportado para *S. frugiperda* a tecnologias de milho Bt com as proteínas Cry1F e Cry1Ab (OMOTO et al., 2016; MONNERAT et al., 2015; FARIAS et al., 2016).

Com intuito de reduzir os efeitos de populações resistentes, diferentes estratégias podem ser utilizadas, como a adoção de áreas de refúgio, utilização de materiais genéticos que possuam elevada expressão de proteínas Cry, piramidamento de genes de toxinas Bt que não compartilhem os mesmos sítios de ligação e principalmente o isolamento de novas estirpes com atividade associada a outras toxinas entomocida. (TABASHNIK, 1994; GOULD, 1998).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A.P.S.; WREGGE, M.; MARTINS, J.F. da S.; NAVA, D.E. Simulação do zoneamento ecológico da lagarta-do-cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n. 4, p. 607-612, 2009.

AHMED, I.; YOKOTA, A.; YAMAZOE, A.; FUJIWARA, TORU. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1117-1125, 2007.

AKIBA, Y.; SEKIJIMA, Y.; AIZAWA, K.; FUJIYOSHI, N. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. II. Dynamics of *Bacillus thuringiensis* in sterilized soil. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 21, n. 1, p. 41- 46, 1977.

ALEKSEEV, A.N.; KARABANOVA, L.N.; SHEVTSOV, V.V. Initiators and inhibitors of *Bacillus thuringiensis* spore germination. **Mikrobiologiya**, v. 51, n. 5, p. 780-783, 1982.

ALLIEVI, M. C.; PALOMINO, M. M.; ACOSTA, M. P.; LANATI, L.; RUZAL, S. M. Contribution of S-Layer proteins to the mosquitocidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e 111114, 2014.

ANGELO, A.; VILAS-BÔAS, E. T.; CASTRO-GÓMEZ, G.; HERNAN, R. J. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n.4, p. 945-958, 2010.

ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. *Bacillus thuringiensis* is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. **Insects**, v.5, n. 1, p. 62-91, 2014.

AGROFIT. SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento–Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA.. < [http:// extranet.agricultura.gov.br/agrofit _cons/principal_agrofit_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) >. Acesso em: 20 maio 2019.

ÁVILA, C.J.; VIVAN, L.M.; TOMQUELSKI, G.V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

BACON, C. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological control**, v. 23, n. 3, p. 274-284. 2002.

BAILEY, K. L.; FALK, S. Turning Research on Microbial Bioherbicides into Commercial Products: A Phoma Story. **Pest Technology**, v. 5, n. 1, p. 73-79, 2011.

BARGABUS, R.L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. **Biological Control**, v.30, n.2, p.342-350, 2004.

BARRATT, B.I.P.; MORAN, V.C.; BIGLER, F.; VAN LENTEREN, J. C. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 155-167, 2018.

BARTON, K.; WHITELEY, H.; YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 85, n. 4, p. 1103-1109, 1987.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal genes encoding 51.4- and 41.9-Kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal Bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, 1988.

BAUMANN, P.; UNTERMAN, B.M.; BAUMANN, L.; BROADWELL, A.H.; ABBENE, S.J.; BOWDITCH, R.D. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 163, n.2, p. 738-747, 1985.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: Ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v. 204, n.1, p. 153-168. 1998.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 1, p. 1-10, 2012

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEM, D.E.; JONES, A.F.; MURPHY, L.; QUAIL, M.A.; HOLDEN, M.T.G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.

BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; JURAT-FUENTES, J. L.; SÁNCHEZ, J. F.; VITERI, D.; VEGA-AQUINO, P.; TERÁN-VARGAS, A.P.; AZUARA-DOMÍNGUEZ, A.; LÓPEZ JR, J.D.; ARIAS, R.; ZHU, Y.C.; LUGO-BARRERA, D.; JACKSON, R. 1 October 2010. Susceptibility of Isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, v 35, n. 3, p. 409-415, 2010.

BLAKEMAN, J.P. Foliar bacterial pathogens: Epiphytic growth and interactions on leaves. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v.70, p. 49-59, 1991.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. p. 343-350, 2001.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 1-9, 2003.

BOREGAS, K. G. B.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES G. W. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v.72, n.1, p.61-70, 2013.

BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M.J. A. **Bicudo (*Anthonomus grandis* Boheman): nova ameaça á cotonicultura brasileira – biologia e controle**. Campina Grande: Embrapa-Centro Cacional de Pesquisa do Algodão, 1983, 32p. (Embrapa-Centro Cacional de Pesquisa do Algodão, Documento 22)

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n.4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A. PACHECOS, S.; GÓMEZ, I. GARCIA-GÓMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERÓN, M. **Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action**. In: FIUZA, L.; POLANCZYK, R.; CRICKMORE, N. (Ed.). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and Use in the Field of Biocontrol. Cham, Springer, 2005. p. 53-66.

BUENO, R. C. O. F., YAMAMOTO, P. T., CARVALHO, M. M., BUENO, N. M. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) on citrus in the state of Sao Paulo, Brazil. Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 520-523, 2014.

BULLA JR., L.A.; BECHTE, D.B.; KRAMER, K.J.; SHETHNA, Y.I.; ARONSON, A.I.; FITZ-JAMES, P.C. Ultra-structure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 147-204, 1980.

BUSTOS, M. C.; IBARRA, H.; DUSSÁN, J. The Golden Activity of *Lysinibacillus sphaericus*: New Insights on Gold Accumulation and Possible Nanoparticles Biosynthesis. **Materials**. v.11, n. 9, p. 2-13, 2018.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.

CARRAMASCHI, I.N.; PEREIRA, L. A. SANTOS, B. V.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. ZAHNER, V. Laboratory evaluation of *Brevibacillus laterosporus* strains as biocidal agents against *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 146, p. 69-72, 2017

CASTRO, C. S. P.; COUTINHO, M. V.; SILVA, F. A. da; SILVA, G. A. da; LIMA, L. H. C.; BRITO, M. A. V. de P. e; HUNGRIA, M.; AVIDOS, M. F. D.; BURLE, M. L.; AQUINO, M. de; LOPES, R. B.; PONTES, R. G. M. S. de; COSTA, S. de P. P.; CASTRO, C. S. P. **Diretrizes de gestão para coleções de microrganismos da Embrapa**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 23 p.

CAVALCANTE, D. de A. **Ultraestrutura e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal**, 2018. 104f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2018.

CERÓN, J. A. **Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis***. In: CABALLERO, P. FERRÉ, J. (Ed.). *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas*. Espanha, Phytoma- España, 2001, p. 153-168.

CHARLES, J.F.; SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; HUMPHREYS, M.; BERRY, C. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin on mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, n. 1, p. 153-159, 1997.

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

CHARLES, J.F. Ultrastructural midgut events in culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, v. 138, n. 4, p. 471-484, 1987.

CHATTOPADHYAY, P. SEM, S.K. Development of bacterial biopesticide: isolation to product formulation. 1ed. Germany: **LAP Lambert Academic Publishing**, 104p. 2012.

CHEN, J.; YU, J.; TANG, L.; TANG, M.; SHI, Y; PANG, Y. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* fulllength and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 310-316, 2003.

CHERIF, A.; CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD9. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 990-1000, 2003.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v.164, n.5, p. 493-513, 2009.

CIB (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA) **Top 5: área cultivada com transgênicos no mundo**. Disponível em: <https://cib.org.br/top-5-area-cultivadacom-transgenicos-no-mundo/>. Acesso em 04 nov. 2019.

COHEN, E. Photoprotection of *B.t. kurstaki* from ultravioleta irradiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, n. 3, p. 343- 351, 1991.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p. 1994.

COSTA; E. L.N.A; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L; FIUZA, L. M. Artrópodes e bactérias Entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 38, n. 9, p.4-14, 2010.

COREY, J.; BRADSHAW, A.; LEROY, B.; BELLARD, C.; ROIZ, D.; ALBERT, C.; FOURNIER, A.; BARBET-MASSIN, M.; SALLES, J.; SIMARD, F.; COURCHAMP, F. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. **Nature Communications**, v.7, Article number: 12986, 2016.

CORREIA, J.C.; BARBOSA, R. M. R.; OLIVEIRA, C.M.F.; ALBUQUERQUE, C.M.R. Residential characteristics aggravating infestation by *Culex quinquefasciatus* in a region of Northeastern Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 46, n.6, p. 935-41, 2012;

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em: 23 setembro 2019.

CZEPAK, C; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n. 1, p.110-113, 2013a.

CZEPAK, C; VIVAN, L. M; ALBERNAZ, K. C. Praga da vez. Cultivar: grandes culturas, v. 167, p- 20-27, 2013b.

DAFFONCHIO, BOUDABOUS, D. A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD9. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 990-1000, 2003.

DAMGAARD, P.H. **Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment**. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (eds.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 23-40.

DELAFIELD, F.P.; SOMERVILLE, H.J.; RITTENBERG, S.C.; Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, v.96, n. 3, p. 713-720, 1968.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.37, p. 409-33, 2003

DE MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, v.4, p.9-13, 1999.

- DE MELO, J.;V.; JONES, G.; W.; BERRY, C.; VASCONCELOS, R. H.T.; OLIVEIRA, C. M. F.; FURTADO, A. F.; PEIXOTO, C. A.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4782-4789, 2008.
- DE VOS, P. **Studying the Bacterial Diversity of the Soil by Culture-Independent Approaches**. In: LOGAN N., VOS P. (eds.) Endospore-forming Soil Bacteria. Soil Biology, vol 27. Heidelberg, Springer, 2011. p. 61-72.
- DONOVAN, W.P., ENGLEMAN, J.T., DONOVAN, J.C., BAUM, J.A., BUNKERS, G.J., CHI, D.J., CLINTON, W.P., ENGLISH, L., HECK, G.R., ILAGAN, O.M., KRASOMIL-OSTERFELD, K.C., PITKIN, J.W., ROBERTS, J.K., WALTERS, M.R., Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 713-719, 2006.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 1-6, 2017.
- ERCOLANI, G.L. Pseudomonas savastoni and other bacteria colonizing the surfaces of olive leaves in the field. **The Journal of General Microbiology**, v. 109, n.2, p. 245-257, 1978.
- ERTÜRK, Ö.; YAMAN, M.; ASLAN, İ. Effects of four Bacillus spp. of soil origin on the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Entomological Research**, v.38, n. 2, p. 135-138, 2008.
- FANG, J.; XU, X.; WANG, P.; ZHAO, J.Z.; SHELTON, A.M.; CHENG, J.; FENG, M.G.; SHEN, Z. Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 956-961, 2007.
- FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. S.; NASCIMENTO, A. R. B.; SANTOS, A. C.; OMOTO C. Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n.12, p. 2295-2302, 2016.
- FERGUSON, N.M.; RODRÍGUEZ-BARRAQUER, I.; DORIGATTI, I.; MIER-Y-TERAN-ROMERO, L.; LAYDON, D.J.; CUMMINGS, D.A.T. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. **Science**. v. 353, n. 6303, p. 1033-1036. 2016.
- FERREIRA, L.M; SILVA-FILHA, M.H. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 10, p.1137-1168, 2013.
- FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T.P.; MELO-NETO, O.P.; SILVA-FILHA, M.H. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut

GPI6 anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 8, p. 604-610, 2010.

FERRANDIS, M.D.; JUÁREZ-PÉREZ, V.M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of cryI, cryII and cryV genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, n.2, p.179-185, 1999.

FISCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MAR-RONE, P. G.; MCCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANOKRETZMER, K.; MAYER, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGRES, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v. 5, n. 8, p. 807-813, 1987.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; 29 VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**, Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GAUR, V. K.; BAJAJ, A.; REGAR, R. K.; KAMTHAN, M.; JHA, R. R.; SRIVASTAVA, J. K.; MANICKAM, N. Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. **Bioresource Technology**, v. 272, n. p. 19-25, 2019.

GIOIA, J.; YERRAPRAGADA, S.; QIN, X.; JIANG, H.; IGBOELI, O.C.; MUZNY, D.; DUGAN-ROCHA, S.; DING, Y.; HAWES, U.; LIU, W.; PEREZ, G.; KOVAR, C.; DINH, H.; LEE, S.; NAZARÉ, G.; BLYTH, P.; TITULAR, M.; BUHAY, C.; TIRUMALAI, M.R.; LIU, Y.; DASGUPTA, I.; BOKHETACHE, L.; FUJITA, M.; KAROUIA, F.; ESWARA MOORTHY, P.; SIEFERT, J.; UZMAN, U.; BUZUMBO, P.; VERMA, U.; ZWIYA, H.; MCWILLIAMS, B.D.; OLOWU, U.; CLINKENBEARD, K.D.; NEWCOMBE, D.; GOLEBIEWSKI, G.; PETROSINO, J.F.; NICHOLSON, W.L.; FOX, G.E.; VENKATESWARAN, K.; HIGHLANDER, S.K.; WEINSTOCK, G.M. Paradoxical DNA repair and peroxide resistance gene conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. *PLoS One*, v. 26, n. 2, p. 2007

GODÓI, I. P. **Avaliação econômica de uma vacina da dengue no Brasil baseado em seu valor terapêutico no sistema único de saúde**, 2018. 190f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Assistência Farmacêutica). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2018.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review Entomology**, v. 43, n. 1 p.701-726, 1998.

GREENBERG, S. M.; SAPPINGTON, T. W.; SPURGEON, D. W.; SETAMOU, M. Boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and reproduction as functions of cotton square availability. **Environmental Entomology**, v. 32. n.3, p. 698-704, 2003.

GUO, Y. Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. **Acta Entomologica Sinica**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1997.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. **Bactérias entomopatogênica**. In: ALVES, S.B. (ed) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 383-446, 1998.

HADAPAD, A.B.; HIRE, R.; VIJAYALAKSHMI, N.; DONGRE, T. UV protectants for the biopesticide based on *Bacillus sphaericus* Neide and their role in protecting the binary toxins from UV radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.100, n. 3, p. 47- 52, 2009.

HADINEGORO, S. R.; ARREDONDO-GARCIA, J. L.; CAPEDING, M. R.; DESEDA, C.; CHOTPITAYASUNONDH, T.; DIETZE, R.; MUHAMMAD ISMAIL, H. I.; REYNALES, H.; LIMKITTIKUL, K.; RIVERA-MEDINA, D. M.; TRAN, H. N.; BOUCKENOOGHE, A.; CHANSINGHAKUL, D.; CORTÉS, M.; FANOUILLE, K.; FORRAT, R.; FRAGO, C.; GAILHARDOU, S.; JACKSON, N.; NORIEGA, F.; PLENNEVAUX, E.; WARTEL, T. A.; ZAMBRANO, B.; SAVILLE, MELANIE. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n.13, p. 1195-1206, 2015.

HEIMPEL, A. M. Investigation of the mode of action of strains of *Bacillus cereus* Frankland & Frankland pathogenic for the larch sawfly *Pristiphora richsonii* (Htg). **Canadian Journal of Zoology**, v. 33, p. 311-316, 1955.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: **Embrapa Soja**, 2000. 70p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 30).

HOON, M. J.L., EICHENBERGER, P.; VITKUP, D. Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. **Current Biology**, n. 20, n.17, p.735- 745, 2010.

JONES, G. W.; NIELSEN-LEROUX, C.; YANG, Y.; YUAN, Z.; DUMAS, V. F.; MONNERAT, R. G.; BERRY, C. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*, **ASEB Journal**, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.

KACHHAWA, D. Microorganisms as biopesticides. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 3, p. 468-473, 2017.

LACEY, L.A. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, p. n.2, p. 133-163, 2007

LAMBERT, B.; PEFFEROEN, M.; Promessa inseticida de *Bacillus thuringiensis*: fatos e mistérios sobre um biopesticida bem-sucedido. **BioScience**, v. 42, n. 2, p. 112-122, 1992.

LENNOX, J.A.; KALU, O.; EGBE, J.G. Screening of bacteria isolated from the environment for the capability to control mosquito larva. **African Journal Bacteriol**, v. 8, n.4, p. 29-34, 2016.

LOURENÇÃO, A. L. RECO, P. C.; BRAGA, N. R.; VALLE, G. E.; PINHEIRO, J. B. Produtividade de genótipos de soja sob a infestação da lagarta-da-soja e percevejos. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 275-281, 2010.

LOZANO, L.C.; AYALA, J.A.; DUSSÁN, J.; *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 10, p. 2037-2041, 2011.

LIU, Y.; TABASHNIK, B.; MOAR, W.; SMITH, R. Synergism between *Bacillus thuringiensis* Spores and Toxins against Resistant and Susceptible Diamondback Moths (*Plutella xylostella*). **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n.4, p. 1385-1389. 1998.

MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUAREZ-PEREZ, V.; FRUTOS, R. A holistic approach for determining the, entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied Environment Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4782-4788, 1998.

MARCHE, M. G.; MURA, M.E.; FALCHI, G.; RUIU, L. Spore surface proteins of *Brevibacillus laterosporus* are involved in insect pathogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 43805, p. 1-10, 2017.

MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 40, n. 2, p. 20-32, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Ministério publica novas especificações para registro de defensivos biológicos, 2019. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/ministerio-publica-novas-especificacoes-para-registro-de-defensivos-biologicos>> acesso em 14 out. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Boletim Epidemiológico**, 2019, 154p. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática. Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2009, 80 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_filariose_linfatica.pdf>. Acesso em 14 nov. 2019.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bactéria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 165-99, 2001.

MIRANDA, J.E. **Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Cerrado brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 23p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 131).

MOLINA, A.C.; CAÑA-ROCA, J.F.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p.1320-1327, 2010.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; SOARES, M.S.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERÓN, M. BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt containing expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **Polos One**, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 163-200, 2000.

MORILLO, F.; NOTZ, A. Resistance of *Spodoptera frugiperda* check for this species in other resources (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to lambda-cyhalothrin and methomyl. **Entomotropica**, v. 16, n. 2, p. 79-87, 2001.

MOSCARDI F.; BUENO A.F.; SOSA-GÓMEZ D.R.; ROGGIA S.; HOFFMAN-CAMPO C.B.; POMARI A.F.; CORSO I.V.; YANO S.A.C. **Artrópodes que atacam as folhas da soja**. In: HOFFMAN-CAMPO, C.B; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (eds). Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes praga. Londrina: Embrapa Soja, p. 213-334

MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L. B. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 959-968, 1998.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**, v. 19, n.8, p. 669-676, 2000.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J. Setlow P Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology**, v.64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NICOLAS, L.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, n. 3, p. 275-280, 1993.

NIELSEN-LEROUX, CHRISTINA; RAO, D. R.; MURPHY, J.R.; CARRON, A.; MANI, T. R. HAMON, S.; MULLA, MIR. S. Various Levels of Cross-Resistance to *Bacillus sphaericus* Strains in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Colonies Resistant to *B. sphaericus* Strain 2362. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5049-5054, 2001.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.

NISHIWAKI H, NAKASHIMA K, ISHIDA C, KAWAMURA T, MATSUDA K. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, Sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3404–3411. 2007.

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, J. M.; GOLDING, N. K.; MORITZ, U. G.; OLIVEIRA, L. F.; AZEVEDO, R. S. S.; SILVA, D. E. A.; SILVA, E. V. P.; SILVA, S. P.; CARVALHO, V. L.; COELHO, G. E. CRUZ; RIBEIRO, A. C.; RODRIGUES, S. G.; VIANEZ JR, J.; GONÇALVES, L. S.; NUNES, B.; DINIZ, T.; CARDOSO, J. F.; TESH, R. B.; HAY, S. I.; PYBUS, O. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 102, p. 1-10, 2015.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**, v. 29, n.1, p. 427-433, 2009.

OLANO, V.A. *Aedes aegypti* en el área rural: implicaciones en salud pública. **Biomédica**, v. 36, n. 2, p. 2-5, 2016

OLIVEIRA, E. J.; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R.G.; PASSOS, L.K.J.; ZAHNER, V. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potential Use in Biological Control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6657–6664, 2004.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n.9, p. 1727-1736, 2016.

PAPA, G.; SILVA, R.; CELOTO, F. J.; ZANARDI JUNIOR, J. A. Exército nefasto. **Cultivar: Grandes Culturas**, v. 27, p. 32-35, 2016.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. **Controle químico do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*, Boheman (Coleoptera: Curculionidae)**. In: BELOT, J. B. (Org.). O Bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* boh, 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Cuiabá: IMAMT, p. 143-154. 2015.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. 2002. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole, São Paulo. 609p.

PEI, G. F.; OLIVEIRA C. M.F.; ZHIMING, Y.; NIELSEN-LEROUX, C.; SILVA-FILHA, M. H.; YAN, J.; REGIS, L. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, 2002.

PEÑA, G.; MIRANDA-RIOS, J.; DE LA RIVA, G.; PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.353-360, 2006.

PEREIRA, L. de A.; JUNQUEIRA, R.M.; CARRAMASCHI, I.N.; QUEIROZ, M.M.C.; ZAHNER, V. Bioactivity under laboratory conditions of *Brevibacillus laterosporus*

towards larvae and adults of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 158, p. 52-54, 2018.

PINTO, L.M.N.; FIUZA L.M. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology & Conservation**, v.3, n.3, p. 159-168, 2008.

POLANCZYK, R.A.; ZANÚNCIO, J.C.; ALVES, S.B. Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. **Ciência Rural**, v. 39, n.1, p. 1-5, 2009.

POLANCZYK, R.A **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**, 2004. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2004.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, v. 7, n.2, p.1-10, 2003.

PONTES, R. G. M. S. de; CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V.; LIMA, L. H. C. **Requisitos corporativos de qualidade para coleções de microrganismos da Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 15p.

QURESHI, N.; CHAWLA, S. LIKITVIVATANAVONG, S.; LEE, H; L; GILL, S.S. The Cry toxin operon of *Clostridium bifementans* subsp. malaysia Is highly toxic to Aedes larval mosquitoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.18, p. 5689-5697, 2014.

REDDY, S.T., KUMAR, N.S. & VENKATESWERLU, G. Comparative analysis of intracellular proteases in sporulates *Bacillus thuringiensis* strains. **Biotechnology Letter**, v. 20, p. 279-281,1998.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES. J. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

RAHMET-ALLA, M.; ROWLEY. A. F. Studies on the pathogenicity of different strains of *Bacillus cereus* for the cock-roach, *Leucophaea maderae*. **Journal Invertebrate Pathology**, v 53, n.2, p.190-196, 1989

RAMÓN, D.C.G. **Caracterización genética y molecular de una cepa entomopatógena activa frente a la mosca de la fruta del Mediterráneo *Ceratitis capitata* para la búsqueda de factores de virulência**, 2015. 244f. Tese (Doctorado em Biología Fundamental y de Sistema). Universidad de Granada, Granada, ES, 2015.

SABIÁ JUNIOR. E. F. **Deteção e caracterização de proteínas parasporinas em *Bacillus thuringiensis***. 2015, 94f. DiSSERTAÇÃO (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

SAMPSON, M.N.; GOODAY, G.W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**, v. 144, p. 2189-2194. 1998.

SAMPURNA, S.; MAITI, M. K. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 937-946, 2011.

SANTOS, W.J. 1999. **Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro**. In: FREIRE, E.C.; SANTOS, W. J.; CIA, E. (eds.). *Cultura do algodoeiro*. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 133-179, 1999.

SARGENT, J. R., GEORGE, S. G. **Methods in zone eletrophoresis**. England, BDH Chemicals Ltd. 1975, 219 p.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SCOTT, C.; TECELÃO, C. C.; NIKOS, V.; MARC, L. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 69, n. 1, p. 395-408, 2018.

SELEENA, P.; LEE, H. L.; LECADET, M.M. A novel insecticidal serotype of *Clostridium bifermentans*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.13, n.4, p.395-397, 1997.

SHI, Y.; XU, W.; YUAN, M.; TANG, M.; CHEN, J.; PANG, Y. Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, v.4, p. 757-765, 2004.

SILVA, J. B.; SILVA-TORRES, C. S. A.; MORAES, M. C. B.; TORRES, J. B.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Interaction of *Anthonomus grandis* and cotton genotypes: biological and behavioral responses. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n.3, 238-253. 2015.

SILVA, C. A. Supressão do bicudo do algodoeiro. **Cultivar: Grandes Culturas**, v. 154, p. 8-9, 2012.

SILVA-PEREIRA, I. **Amplificação de DNA pela técnica de PCR**. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*, Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 99-110. 2003.

SOMERVILLE, H. Formation of the Parasporal Inclusion of *Bacillus thuringiensis*. **European journal of biochemistry**, v.18, n. 2, p. 226-37, 1971.

SPECHT, A.; SOZA-GÓMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V.; YANO, S. A. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera):

Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.6, p.689-692, 2013.

STADLER, T.; BUTELER, M. Migration and dispersal of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) in South America. **Sociedad Entomológica Argentina**, v. 66, n.3-4, p. 205-217, 2007.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 47-79, 1994.

THACKER, J.R.M. **An introduction to arthropod pest control**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 343 p.

THANABALU, T.; PORTER, A.G.; A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. **Gene**, v. 170, n. 1, p. 85-89, 1996.

THANABALU, T.; HINDLEY, J.; JACKSON-YAP, J.; BERRY, C. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100- kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **Journal Bacteriology**, v. 173, n.9, p. 2776-2785, 1991.

TAKORS, R. Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions. **Journal Biotechnology**. v.160, n.2, p. 3-9, 2012.

TRIVERS, R.S.; MARTIN, P. A.; W., REICHELDERFER, C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1263–1266, 1987

TAY, W.T., M.F. SORIA, T. WALSH, D. THOMAZONI, P. SILVIE, G.T. BEHERE, C. ANDERSON & S. DOWNES. A brave new world for an Old World pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLOS One**, v. 8, e80134, 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Agricultural Projections**. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/94005/2018/usda-ag-projections-2018.pdf>>. Acesso em: maio 2018

VAN CUYK, S.; DESHPANDE, A.; HOLLANDER, A.; DUVAL, N.; TICKNOR, L.; LAYSHOCK, J.; GALLEGOS-GRAVES, L.; OMBERG, K.M. Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki in urban environments following spraying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7954–7961, 2011.

VERBAENDERT, I.; DE VOS, P. **Studying Denitrification by Aerobic Endosporeforming Bacteria in Soil**. In: LOGAN N., VOS P. (eds.) Endospore-forming Soil Bacteria. Soil Biology, v. 27, Heidelberg: Springer, 2011. p. 271-285.

VILAS-BÔAS, G.T.; ALVAREZ, R.C.; SANTOS, C.A.; VILAS-BOAS, L.A. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? **EntomoBrasilis**, v.5, n.1, p.1-10, 2012.

WARREN, G.W. **Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests**. In: CAROZZI, N.B.; KOZIEL, M. (eds.). *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. London: Taylors and Francis, 1997. p.109-121.

WAQUIL, J.M.; FERREIRA, F.; M.; FOSTER, J.E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n.3, p. 1-11, 2002.

WEST, A.W.; BURGESS, H.D.; DIXON, T.J. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: Effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 17, n.5, p. 657-665, 1985.

WHITMAN, WILLIAM B.; BOONE, David R.; CASTENHOLZ, Richard W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2001. 949p.

WIRTH, M.C.; BERRY, C.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A. Mtx toxins from *Lysinibacillus sphaericus* enhance mosquitocidal cry-toxin activity and suppress cry-resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.115, p. 62-67, 2014

WIRTH, M.C.; YANG, Y.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A.; BERRY, C. Mtx toxins synergize *B. sphaericus* and Cry11A against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 19, p.6066-6071, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A global brief on vector-borne diseases**. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111008/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf>. Acesso em:12/09/2019, 56p. 2014.

YUAN, Z.; RANG, C.; MARON, R.C.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; FRUTOS, R.; PASTEUR, N.; VENDRELY, C.; CHARLES, F.; NIELSEN-LEROUX, C. Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 9, p. 2751-2760, 2001.

ZALUCKI, M. P. et al. The biology and ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? **Australian Journal of Zoology**, v. 34, n. 6, p. 779-814, 1986.

ZANLUCA, C.; MELO, V.C.; MOSIMANN, A.L.; SANTOS, G.I.; SANTOS, C.N.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n.4, p. 569-572, 2015.

ZUBASHEVA, M.V.; GANUSHKINA, L. A; SMIRNOVA, T.A.; AZIZBEKYAN, R.R. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus* **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46 p. 755-762, 2010.

CAPÍTULO I: ISOLAMENTO DE ESTIRPES DA FAMÍLIA Bacillacea E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus* sp. COM ATIVIDADE ENTOMOCIDA A INSETOS DA ORDEM Lepidoptera E Coleoptera

RESUMO: O ataque de insetos-praga é considerado um dos fatores que mais comprometem o rendimento e a qualidade das culturas em campo. Com intuito de mitigar os danos causados por essas espécies, diferentes tecnologias vêm sendo exploradas dentre elas o controle microbiano através de entomopatógenos como bactérias do gênero *Bacillus*. O objetivo desta pesquisa foi realizar a prospecção de novas estirpes bacterianas da família Bacillacea e caracterizar as estirpes de *Bacillus* sp. que apresentar atividade inseticida para insetos-praga das ordens Coleoptera (*Anthonomus grandis*) e Lepidoptera (*Anticarsia gemmatalis*, *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda*). Ao todo foram processadas 159 amostras de solo provenientes de seis diferentes estados, a partir destas, 125 isolados foram armazenados na Coleção de Bactérias de Invertebrados da EMBRAPA, sendo 81 classificadas como *Bacillus thuringiensis* (64,8%), 26 como *Lysinibacillus sphaericus* (20,8%) e 18 (14,4%) como *Bacillus* sp. Das estirpes armazenadas, cinco apresentaram mortalidade \geq a 85% para *Spodoptera frugiperda*; cinco para *Helicoverpa armigera* e três para *Anthonomus grandis*. As estirpes mais patogênicas foram caracterizadas morfolologicamente por MEV e tiveram seu perfil proteico e molecular determinado. A análise SDS-PAGE demonstrou perfil com múltiplas bandas com polipeptídeos variando 140 a 10 kDa, porém não houve amplificação dos genes *cry1* e *cry3*, sugerindo que outros genes ou outros fatores de virulência pudessem estar associados a mortalidade dessas cepas. Na microscopia eletrônica, todos os cristais detectados apresentaram forma esférica com tamanho inferior a 1,0 μm de diâmetro. Para cada uma das espécies de insetos-praga testados, selecionou pelo menos uma estirpe com mortalidade superior a 85%, demonstrando potencial de exploração no controle biológico de pragas.

PALAVRAS-CHAVE: *Anticarsia gemmatalis*. *Helicoverpa armigera*. *Spodoptera frugiperda*. *Anthonomus grandis*. *Bacillus thuringiensis*. Caracterização.

CHAPTER I: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NEW BACILLUS AND LYSINIBACILLUS STRIPS WITH ENTOMOCIDE ACTIVITY.

ABSTRACT: Insect-pest attack is considered one of the factors that most compromise the yield and quality of field crops. In order to mitigate the damage caused by these species, different technologies have been explored, including microbial control through entomopathogens such as bacteria of the *Bacillus* genus. The objective of this research was to search for new bacterial strains of the Bacillaceae family and to characterize the strains of *Bacillus* sp. that show insecticidal activity for insect pests of the orders. Altogether 159 soil samples were processed from six different states: Goiás (74), Paraíba (9), Bahia (33), Mato Grosso do Sul (15), Mato Grosso (9) and Ceará (19). From these, 125 isolates were stored in the EMBRAPA-CENARGEN Entomopathogenic Bacteria Bank, 81 of which were classified as *Bacillus thuringiensis* (64.8%), 26 as *Lysinibacillus sphaericus* (20.8%) and 18 (14.4%) as *Bacillus* sp. Of the stored strains, five mortality $\geq 85\%$ for *Spodoptera frugiperda*, being: 2651 (85.7%); 2690 (86.4%); 2728 (85%); 2878 (86.4%) and 2744 (100%); for *Helicoverpa armigera*, five strains with mortality $\geq 85\%$ were found: 2,651 (91%); 2667 (100%); 2669 (100%); 2721 (100%); 2724 (100%); For *Anticarsia gemmatalis* six: 2660 (95%); 2678 (88.9%); 2699 (85%); 2713 (88.9%); 2731 (90%); 2,744 (85%) and for *Anthonomus grandis* three, 2,720 (96.7%); 2728 (96%) and 2744 (81.7%). Among the most pathogenic strains, some were morphologically characterized by SEM and had their protein and molecular profile determined. The SDS-PAGE analysis showed a multiple band profile with polypeptides ranging from 140 to ~ 10 kDa, however there was no amplification of the cry1 and cry3 genes via PCR, suggesting that other genes or other virulence factors could be associated with the mortality of these strains. In electron microscopy, all the crystals detected were spherical or almost spherical in shape with a size less than 1.0 μm in diameter. For each of the pest insect species tested, at least one strain with a mortality of more than 85% was selected, demonstrating the potential for exploitation in biological pest control.

KEY-WORDS: *Anticarsia gemmatalis*. *Helicoverpa armigera*. *Spodoptera frugiperda*. *Anthonomus grandis*. *Bacillus thuringiensis*. Characterization.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio representa uma importante atividade para a economia brasileira e é responsável por mais de 20% do Produto Interno Bruto (PIB) e por metade das exportações do país (OLIVEIRA; CARRARO, 2019). Durante o processo produtivo, o ataque de insetos-pragas é considerado um dos fatores que mais comprometem o rendimento e a qualidade das culturas em campo. Entre os quais se destacam os lepidópteros desfolhadores *Anticarsia gemmatalis*, *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda* e o curculionídeo *Anthonomus grandis* (Boh.), devido aos danos que provocam às principais “comodities” agrícolas, como soja, milho e algodão.

Com intuito de mitigar os danos causados por essas espécies, diferentes tecnologias vêm sendo exploradas com destaque para o controle químico e o uso de cultivares geneticamente modificadas. Porém, embora usuais, essas tecnologias vêm ao longo do tempo, perdendo eficiência, o que pode ser observado pela evolução da resistência de algumas espécies como *S. frugiperda* tanto para inseticidas, como para culturas transgênicas (OMOTO et al., 2016; MONNERAT, et al., 2015; FARIAS et al., 2014).

Diante dos fatos, fica claro não apenas a necessidade de uma melhor utilização dos recursos já disponíveis, mas também a busca de novos insumos que venham incrementar as técnicas já empregadas, devendo se considerar os anseios sociais por tecnologias eficazes que tenham menor impacto ao homem e ao ambiente. O controle microbiano, através fungos, vírus e bactérias, vem assumindo uma posição de destaque no combate de insetos-praga. Boa parte desse sucesso pode estar relacionada à variabilidade genética desses organismos que fornecem uma ampla gama de insumos para o desenvolvimento de produtos cada vez mais eficazes.

Entre os agentes microbianos com potencial de controle, destaca-se *Bacillus thuringiensis* (Bt), que se configura como um dos principais agentes de controle biológico, responsável por mais de 90% do total das vendas de biopesticidas e a única bactéria fornecedora dos genes para os transgênicos comerciais que conferem resistência à pragas no mundo (GLARE; OCALLAGHAM, 2000). Entretanto, mesmo sendo amplamente estudado, ainda hoje há necessidade de prospecção de novas estirpes de *B. thuringiensis* que possam ser utilizados tanto na produção de bioinseticidas e no fornecimento de genes de resistência para construções transgênicas.

2. OBJETIVOS

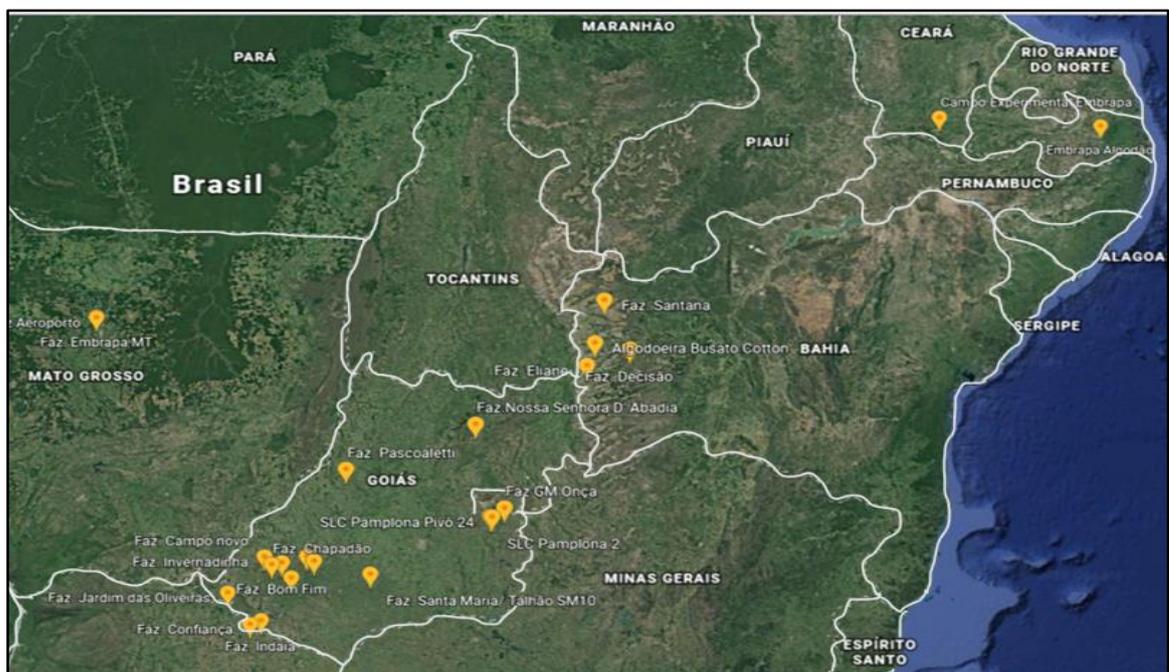
Esta pesquisa teve como objetivo isolar e identificar estirpes dos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* a partir de amostras de solo de áreas de produção agrícola e verificar o potencial de patogenicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus* sp. para controle das pragas de importância agrícola *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera* e *Anticarsia gemmatalis* caracterizá-las através de métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA E ISOLAMENTO DE *Bacillus* sp. E *Lysinibacillus* A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO

Os isolados foram obtidos pelo processamento de amostras de solo oriundas de áreas de produção agrícola, sob sistemas de produção orgânica e convencional e também de áreas comuns sem histórico de cultivo, em diferentes regiões do Brasil (Figura 01).

Figura 01. Locais de coleta de amostras de solo para prospecção de estirpes de bactérias entomopatogênicas nos estados da BA, CE, PB, GO, MT e MS.



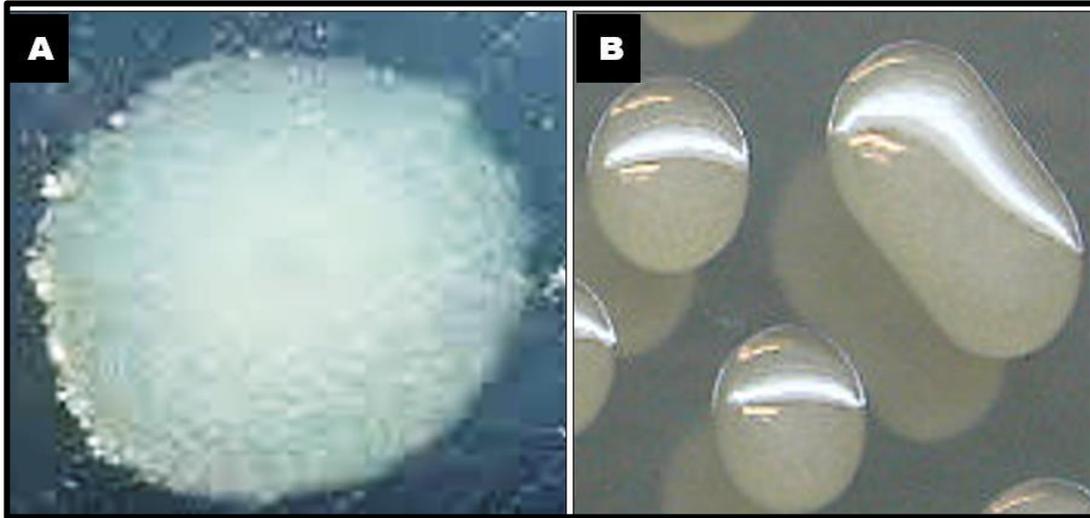
Fonte: Google Maps

Para coleta das amostras, removeu-se inicialmente a serrapilheira da superfície e retirou-se uma porção de aproximadamente 50g de solo com auxílio de uma espátula, a uma profundidade máxima de 10 cm. O material coletado foi acondicionado em recipientes limpos, identificados com a localização, data e responsável pelas coletas. Em seguida, o material foi levado para o Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Para obtenção das colônias, 0,1g de solo foi diluído em 1 mL de solução salina [0,85%] em um microtubo de 1,5 mL. A amostra foi submetida a choque térmico (80° C por 12 minutos, seguido de 5 minutos em banho de gelo) e em seguida inoculadas em placas de Petri descartáveis e estéreis contendo Meio Embrapa (ME) sólido, ME suplementado de Penicilina [10g/L] (ME+PENIC) e ME suplementado de Estreptomicina (ME+ESTREP) [2,5g/L]. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C. O crescimento das colônias em placa foi acompanhado a partir das 24 horas de incubação por no máximo 96 horas. O intuito dos meios com antibióticos nas respectivas concentrações utilizadas foi selecionar *B. thuringiensis* ou *B. cereus* em penicilina, *L. sphaericus* em estreptomicina e o meio Embrapa sem adição de antibióticos, foi usado para seleção de possíveis variantes sensíveis aos antibióticos usados.

Após 24 horas, foi verificado o crescimento e observada as características morfológicas das colônias, com relação ao: número, tempo de crescimento, coloração, formato e formato das bordas das colônias. Durante essa avaliação procurou-se isolar, sempre que possível, pelo menos uma colônia que apresentasse aspectos semelhantes às colônias de Bt, como: coloração branco opaco, formato circular ou irregular e bordas irregulares; ou com aspecto semelhante a colônias de Ls, que apresentavam colônias com aspecto aquoso amarelado, em formato circular ou irregular com bordas regulares, crescidas em Meio Embrapa e Meio Embrapa com os antibióticos (Figura 02).

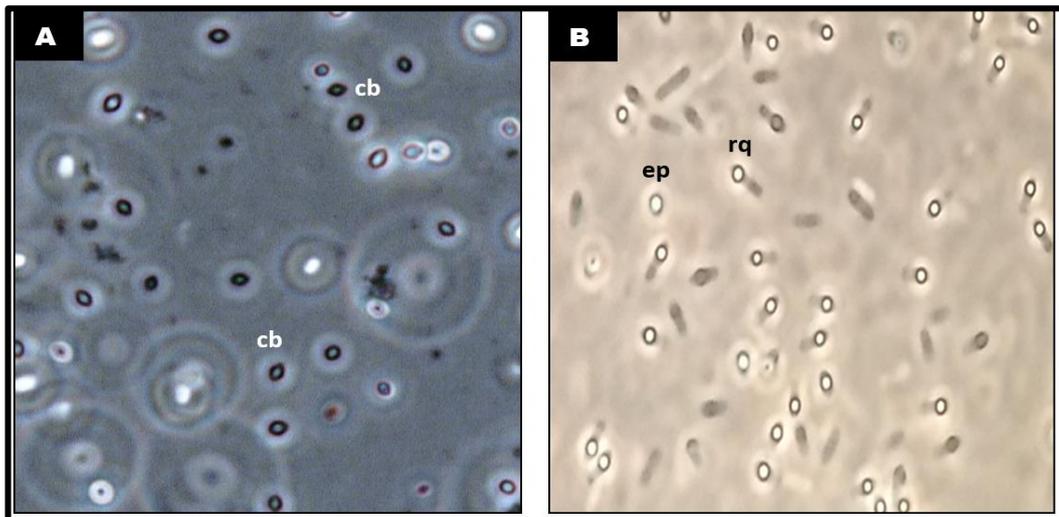
Figura 02. Aspectos morfológicos de possíveis colônias de *Bacillus thuringiensis* (A) e *Lysinibacillus sphaericus* (B)



Fonte: A autora

Para confirmação da espécie, as colônias que apresentaram as características descritas, foram coletadas com auxílio de uma alça estéril e inoculadas em Erlenmeyer de 50mL contendo 15 mL de Meio Embrapa líquido, que foi mantido sob agitação em incubador rotativo durante 72 horas a 200 rpm e $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, foi retirada uma gotado cultivo final para visualização em microscópio óptico com contraste de fases sob aumento de 1000X, para observação de esporos e inclusões cristalinas (Figura 03) (SILVA-WERNECK; MONNERAT, 2001).

Figura 03. Microscopia óptica (1000X) de (A) *Bacillus thuringiensis*, (cb) cristal bi-piramidal e (B) *Lysinibacillus sphaericus*, (ep) esporo, (rq) esporo na porção terminal do esporângio se assemelhando a uma “raquete” (rq).



Fonte: A autora

3.2. PRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS

O armazenamento em papel filtro e liofilizado seguiu a metodologia descrita no Procedimento de identificação, teste de viabilidade e pureza e preservação por papel filtro de *Bacillus* para manutenção da coleção de bactérias de invertebrados (Procedimento - código: 038.11.02.3.025) e Procedimento de identificação, teste de viabilidade e pureza e preservação por liofilização de *Bacillus* para manutenção da coleção de bactérias de invertebrados (Procedimento - código: 038.11.02.3.027)

Para armazenamento em papel filtro, foram preparadas tiras de papel estéreis de aproximadamente 2cm x 0,5cm. Essas tiras foram imersas na mistura esporo cristal por 30 min. Posteriormente, as tirinhas embebidas na suspensão bacteriana foram retiradas e colocadas em placas de Petri de vidro estéreis para secagem no interior da câmara de fluxo laminar por 6 horas ou até a secagem completa. Em seguida armazenadas em tubos criogênicos estéreis.

Para armazenamento por liofilização, 40 mL da cultura esporulada em Meio Embrapa, foi centrifugada a 12.800 rpm por 30 minutos a 4°C. Em seguida o pellet foi ressuspenso com 500 microlitros de água destilada estéril e transferido frascos criogênicos de 2 mL, que foram congeladas “overnight” e, em seguidas, secas por em liofilizador.

Após secagem, todos os materiais foram registrados na base de dados AleloMicro e guardadas na Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.3. BIOENSAIOS SELETIVOS

Foram realizados dois tipos de bioensaios sendo um seletivo, realizado para determinar a ação patogênica das amostras isoladas, e um ensaio de dose, para quantificar a concentração letal das estirpes com melhor desempenho nos ensaios seletivos.

3.3.1. Preparo das amostras para bioensaios seletivos

As amostras utilizadas nesses ensaios foram provenientes do material armazenado em papel filtro. Para isso, as tirinhas impregnadas com a mistura

esporo/cristal foram inoculadas em meio Embrapa líquido a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas sob agitação contínua de 200 rpm (MONNERAT et al., 2007). Após esse período, uma gota do cultivo final foi visualizada em microscópio óptico sob aumento de 1000X para verificar a presença de esporos e cristais e avaliar a pureza das amostras. Quando as amostras atendiam a todos os critérios, eram submetidas aos bioensaios seletivos.

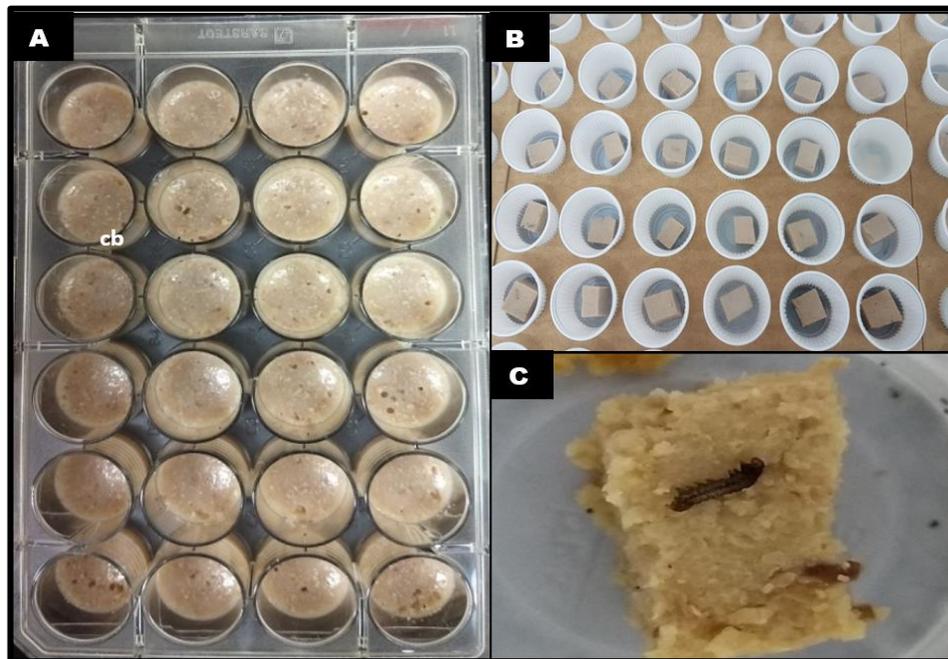
3.3.2. Procedência dos insetos

Todos os insetos utilizados nos ensaios foram provenientes da Plataforma de Criação de Plantas e Insetos (PCPI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em todos os casos, os indivíduos foram criados à base dieta artificial e sob condições controladas de temperatura, e fotoperíodo, seguindo as metodologias descritas por Monnerat et al. (2000) e Schmidt et al. (2001).

3.3.3. Bioensaios Seletivos para *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*

Para os ensaios com *S. frugiperda*, utilizou-se dieta a base de feijão cru triturado (140,4g); levedo de cerveja (42,9g); gérmen de trigo (67,4g); ágar (17,0g); água destilada (1.000 mL) e ácido ascórbico (4,3g). Para *H. armigera* a base de feijão cru triturado (37,5g); gérmen de trigo (30g); farelo de soja (15,0g); leite integral em pó (15,0g); levedo de cerveja (18,75g); ágar (15,0g); água destilada (750 mL); ácido ascórbico (1,8g) e solução vitamínica (4,5mL). Com exceção do ácido ascórbico e da solução vitamínica, todos os ingredientes de cada uma das dietas foram colocados em um béquer, homogeneizados com auxílio de uma espátula, fechados com papel alumínio e autoclavados por 20 min a 120°C . Após este processo, a dieta foi levada para câmara de fluxo laminar e distribuída em placas de cultivo de células de 24 poços. Após distribuição, deixou-se a dieta secando nas placas durante 20 min sob luz UV (Figura 04).

Figura 04. **A.** Placa de cultivo de células de 24 poços utilizada para bioensaios de *S. frugiperda* e *H. armigera*; **B.** Copos descartáveis utilizados na troca contendo dieta livre de bactérias e **C.** Lagarta morta.



Fonte: A autora

Em seguida, 35 μ l da cultura bacteriana foi distribuída em cada um dos poços e, quando, o cultivo foi totalmente absorvido pela dieta, colocou-se uma lagarta de 2^o instar de *S. frugiperda* ou de *H. armigera* em cada poço. As placas foram fechadas com tampas de acrílico, presas com ligas elásticas e posteriormente acondicionadas na sala de bioensaios sob condições controladas de temperatura (25 ± 3 °C) e fotoperíodo (12h fotofase).

Após 48h do bioensaio, foi realizada a primeira avaliação, que consistia na contagem dos indivíduos sobreviventes. A mortalidade das lagartas foi verificada pela ausência de locomoção após um leve toque com pincel e também pela coloração escurecida do tegumento dos insetos, um sintoma clássico de bacteriose. Na primeira avaliação, os indivíduos vivos foram transferidos para copos de 50 mL contendo dieta livre de bactéria e ao 7^o dia do ensaio, foi realizada uma última avaliação e nova contagem dos insetos (Figura 04), calculando o percentual de mortalidade em cada tratamento. Como controle de qualidade, os ensaios que apresentassem testemunha com mortalidade superior a 15 %, eram descartados e as amostras submetidas a novos testes (MONNERAT et al, 2007).

3.3.4. Bioensaios seletivos para *Anticarsia gemmatalis*

Os ensaios com *A. gemmatalis* foram realizados com dieta a base de feijão cru triturado (31,2g); levedo de cerveja (15,6g); gérmen de trigo (25,0g); proteína de soja (25,0g); ágar (10,0g); caseína (12,5g); água destilada (450 mL); ácido ascórbico (2,2g) e solução vitamínica (2,5mL), sendo adotado o mesmo procedimento para confecção das dietas de *H. armigera* e *S. frugiperda*.

Após autoclavagem a dieta foi distribuída em copos de 50 ml em quantidade suficiente apenas para cobrir o fundo do recipiente, que foi posto para secar sob luz UV durante 20 min. Em seguida foram adicionados 150 µl da cultura bacteriana em cada um dos copos, sendo dois para cada estirpe testada. Após absorção da bactéria, foram adicionadas 10 larvas de 2º ínstar em cada um dos copos, que foram fechados com tampa de acrílico e posteriormente acondicionados na sala de bioensaios nas mesmas condições já descritas. A avaliação da mortalidade foi feita de modo semelhante aos ensaios anteriores, com exceção da última leitura que foi realizada no 5º dia após o ensaio (MONNERAT et al, 2007).

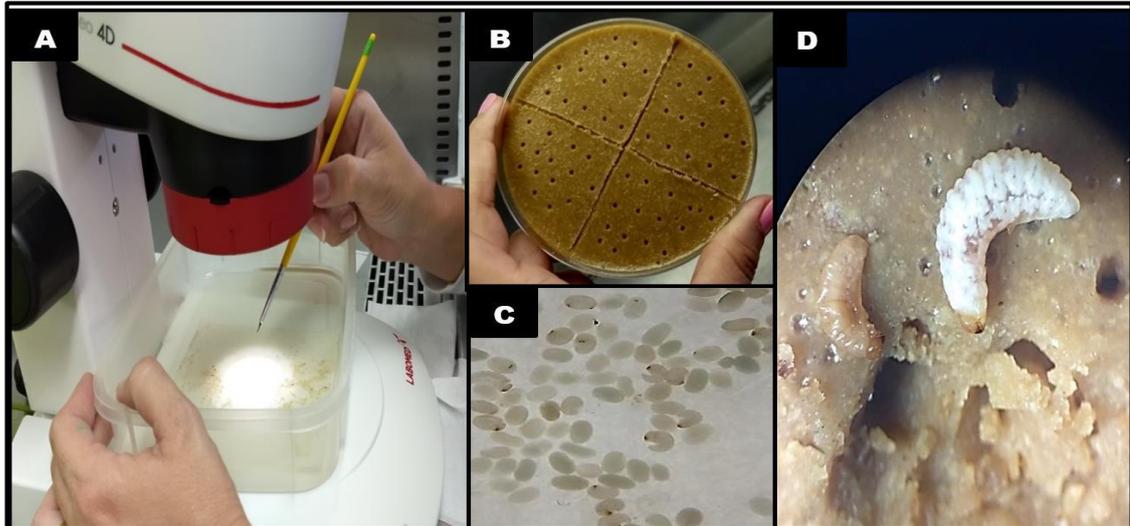
3.3.5. Bioensaios seletivos para *Anthonomus grandis*

Este ensaio foi realizado utilizando 10mL do caldo bacteriano em 30 mL de dieta artificial composta por uma parte autoclavável, que foi pesada individualmente em bequers de 50 mL contendo ágar (0,8g), levedo de cerveja (1,2g), gérmen de trigo (1,2g), pharmamédia (0,8g), proteína de soja (2,0g) e sacarose (1,2g) e uma parte não autoclavada, composta por sais minerais (0,2g); ácido ascórbico (0,4g); ácido sórbico (0,05g); nipagin (0,04g) e solução vitamínica (200 µL).

Todo procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar utilizando somente materiais estéreis. Após autoclavagem, a dieta foi acondicionada em banho Maria a aproximadamente 60°C para manutenção de sua temperatura. No interior da capela e com a dieta ainda líquida (aproximadamente 50°C), foi incorporado a parte autoclavada, 200 µL de solução vitamínica e 10 mL da cultura bacteriana com auxílio de espátula esteril, e depois de homogeneizada, a mistura foi vertida em placas de Petri estereis. Uma placa foi deixada como testemunha, porém no lugar da bactéria, completou-se o volume com água destilada (PRAÇA et al., 2004). Após solidificação da dieta, dividiu-se a placa em 4 quadrantes e em cada um deles, foram feitos 15 furos de aproximadamente 2 mm de diâmetro com auxílio de uma haste de cobre

previamente flambada. Posteriormente, em cada um dos furos, foi colocado uma larva neonata com auxílio de uma lupa e pincel de cerdas macias (Figura 05).

Figura 05. Bioensaio com *Anthonomus grandis*. **A.** Lupa e pincel utilizados para colocação das larvas neonatas de *A. grandis* em placa de Petri contendo dieta; **B.** Placa de bioensaio contendo dieta com a mistura esporo cristal subdividida em quatro quadrantes; **C.** Ovos e larvas neonatas utilizadas no bioensaio; **D.** Larva morta com sintomas de bacteriose e larva viva.



Fonte: A autora

Após o ensaio, as placas foram acondicionadas na sala de bioensaio onde permaneceram por sete dias. Decorrido esse período foi feita avaliação do ensaio, contabilizando o número de indivíduos vivos e mortos e calculada a porcentagem de mortalidade. Como controle de qualidade, caso os indivíduos da testemunha apresentassem mais que 20% de mortalidade, o bioensaio era repetido.

3.4. BIOENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL₅₀)

As estirpes que causaram mortalidade acima de 80% para *H. armigera*, *S. frugiperda* e *A. grandis*, foram escolhidas para os bioensaios de dose-resposta para estimativa da CL₅₀. Os ensaios com as estirpes ativas a *A. gemmatalis* e as outras amostras que apresentaram mortalidade superior a 90% para *H. armigera* serão realizados em outro momento.

3.4.1 Determinação da CL₅₀ para *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*

Para esses ensaios foram utilizadas as estirpes liofilizadas. Com o material liofilizado, foram preparadas 10 suspensões a partir de diluições da Tabela 1. Os

ensaios foram realizados em triplicata com ensaios independentes realizados em dias alternados. Após o preparo das diluições, os ensaios para as três espécies foram realizados de forma semelhante aos ensaios seletivos já descritos, ou seja, foram utilizadas as mesmas placas com uma placa 24 insetos para cada concentração. Após leitura final, e com os dados de mortalidade, a CL_{50} foi determinada mediante análise de Probit (ROBERTSON; PREISLER; RUSSELL, 2002).

Tabela 1. Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra Lepidópteros.

	Bactéria (mg)	Água (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Suspensão I (μL)	1	1000	1000
Suspensão I (μL)	Suspensão I (μL)	Água (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Suspensão II (μg)	571,4	428,6	571,4
Diluição	Suspensão II (μL)	Água (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	200	800,0	2000
2	120	880,0	1200
3	72	928,0	720
4	43,2	956,8	432
5	25,9	974,1	259
6	15,5	984,5	155
7	9,3	990,7	93
8	5,6	994,4	56
9	3,4	996,6	34
10	2,0	998,0	20

3.4.2. Determinação da CI_{50} para *Anthonomus grandis*

Nesse ensaio também foi utilizado material liofilizado, que foi pesado a fim de se obter as 5 doses (Tabela 2). As doses foram preparadas em 5,0 mL de solução de tween⁸⁰ a 0,01% e incorporada a 35 mL de dieta. O restante do bioensaio ocorreu de forma semelhante ao ensaio seletivo. Este ensaio também foi realizado em triplicata para cada amostra testada e a CL_{50} foi determinada pela análise de probits (ROBERTSON; PREISLER; RUSSELL, 2002).

Tabela 2. Concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose para *Anthonomus grandis*

Diluição	Mistura esporo/cristal liofilizada (mg)	Twenn ⁸⁰ 0,01% (mL)	Dieta (mL)	Concentração (mg.mL ⁻¹)
1	60,0	5,0	35,0	1,5
2	40,0	5,0	35,0	1,0
3	20,0	5,0	35,0	0,5
4	10,0	5,0	35,0	0,25
5	4,0	5,0	35,0	0,1

3.5. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

O procedimento foi realizado com base no protocolo de extração de proteínas descrito por Lecadet et al. (1991) com algumas modificações. Para a extração foram utilizados 6,0 mL do caldo bacteriano cultivado por 72h com no mínimo 90% de esporulação. O material foi transferido para tubos estéreis de polipropileno de 10mL e em seguida centrifugado a 14000 rpm a 4°C, por 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspense em 5mL de uma solução de NaCl [0,5M], novamente centrifugado por 15 min e posterior descarte do sobrenadante. Após o descarte as paredes do tubo foram cuidadosamente secas com auxílio de papel absorvente, os sedimentos suspensos com 1,5mL de solução de inibidores (EDTA 100 mM + PMSF 1 mM) e centrifugados por 15 minutos, sendo esse procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o complexo esporo-cristal foi ressuspense em 200 µL da solução de inibidores e armazenados a -20 °C até análise dos perfis proteicos.

A análise das proteínas foi feita em gel de Poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE). Para isto, adicionou-se uma alíquota de 20 µL da solução tampão de proteína 5X (1,6 mL de SDS 10%, 0,4 mL 2-β-mercaptoetanol, 1 mL de 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 0,2 mL de azul de bromofenol 0,05%, 4 mL de água destilada e 0,8 mL de glicerol) em 20 µl do material extraído, homogeneizou-se bem, e o preparo foi colocado sob aquecimento a 100 °C e 5 minutos. Decorrido esse tempo 20 µl de cada uma das amostras foi aplicada em gel de poliacrilamida. Para efeito de comparação também foi utilizado 8 µl de marcador de proteína (TrueColor High Range Protein Marker Sinapse S260[®]). A eletroforese foi realizada em um aparelho de eletroforese vertical (Biorad), contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), sob voltagem constante de 120 V por aproximadamente 2 horas.

Ao final da corrida, o gel foi transferido para um recipiente de acrílico onde foi incubado em solução de fixação (40% de metanol, 10% ácido acético e 50% água destilada) por 12h. Após esse período, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50% por 20 minutos sob agitação moderada, e depois da última lavagem, adicionou-se tiosulfato de sódio (20 mg para 100 ml de água destilada) por um minuto e lavou-se o gel com água destilada três por mais 3 vezes por 20 segundos. Retirou-se água, e colocou-se a solução de nitrato de prata (200 mg AgNO_3 + 74 μl de formaldeído em 100 ml de água destilada) em quantidade suficiente para cobrir o gel, que ficou sob agitação de 20 minutos. Em seguida o gel foi lavado com água destilada três vezes por 20 segundos e depois, foi colocado em solução reveladora (6 g de Na_2CO_3 + 50 μl de formaldeído + 2 ml da solução de tiosulfato de sódio em 100 ml de água destilada). O gel foi agitado manualmente até começar a revelação das bandas. O processo de revelação foi interrompido pela lavagem do gel com solução de parada (45 ml de metanol + 10 ml ácido acético em 45 ml de água destilada).

3.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As estirpes foram submetidas a caracterização molecular através da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes *cry* presentes. A extração do DNA total foi realizada com Kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega) específico para o aparelho Maxwell[®], que consiste em um sistema automatizado de purificação de ácidos nucleicos utilizando partículas paramagnéticas. Cada estirpe foi semeada em placa de Petri, com meio LB (Luria Bertani) durante 16h em estufa (Temp $28^\circ \pm 2^\circ$). Após esse período, o material cultivado foi retirado com auxílio de alça descartável estéril e adicionado a um tubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 200 μL de água deionizada. Nessa mistura foi adicionado 1 μL de lisozima (25mg/mL) e em seguida incubou-se em banho Maria por 2 horas a 37°C . Posteriormente, o volume total homogeneizado foi colocado no kit conforme o protocolo descrito pelos fabricantes. Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando o protocolo e o kit QuantiFluor[®] ONE dsDNA System desenvolvido para o equipamento Quantus[™] Fluorometer.

As reações de PCR foram realizadas para amplificação dos genes *cry1* e *cry3* geral sendo preparado um mix composto por 0,6 μL de dNTP mix (10 mM), 1,0 μL (10 μM) para cada iniciador, 2,5 U da Taq DNA polimerase. Para *cry1* a amplificação foi

processada nas seguintes condições: 94°C/1min de desnaturação, 52°C/1 min para anelamento, 72°C/min de extensão e uma extensão final de 72 °C / 5 min, perfazendo um total de 30 ciclos. Para *cry3*, foi utilizado 95°C/1 min de desnaturação, 48°C/1 min de anelamento, 72°C/1min de extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos num total de 30 ciclos. As características dos iniciadores utilizados e os perfis esperados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos primers utilizados para a detecção dos genes *cry*

Primer	Sequência dos iniciadores ¹	Possíveis genes relacionados	Fragmento esperado (pb)	Referência
Cry1 Geral	5'AAAGATCTGGAACACCTTT 3' (d) ¹ 5'CAAACCTCTAAATCCTTTTAC 3' (r) ²	<i>cry1Aa</i>	272	Ceron et.al., 1994
		<i>cry1Ab</i>	284	
		<i>cry1Ac</i>	272	
		<i>cry1B</i>	290	
		<i>cry1C</i>	284	
		<i>cry1D</i>	284	
		<i>cry1Ea</i>	275	
		<i>cry1Eb</i>	290	
Cry3 Geral	5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA3' (d) 5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG 3'(r)	<i>cry1Fa</i>	284	Ceron et.al., 1995
		<i>cry3B</i> ,	703	
		<i>cry3C</i>	709	
		<i>cry3Cb</i>	694	
		<i>cry3Cc</i>	718	
		<i>cry3D</i>	652	
<i>cry3F</i>	733			

^{1,2} Sequências nucleotídicas dos pares de primers: d: direto e r: reverso

3.7. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As estirpes selecionadas foram visualizadas através de microscopia eletrônica de varredura, a fim de se confirmar a presença e o formato dos cristais proteicos. Para isso, as estirpes foram cultivadas por 72h em meio Embrapa a 28±2 °C e 200 rpm, visualizadas através da microscopia óptica de contrastes de fases para observação dos esporos e cristais e então centrifugadas e liofilizadas. Depois de liofilizadas as amostras foram depositadas sobre suporte metálico tipo “*stubs*” previamente preparados com fita de carbono, e então cobertas com ouro por 180 segundos utilizando-se metalizador Emitec Modelo K55O e observados em microscopio eletrônico de varredura modelo Zeiss DMS962.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram processadas 159 amostras de solo provenientes de seis diferentes estados do Brasil: Goiás (74), Paraíba (9), Bahia (33), Mato Grosso do Sul (15), Mato Grosso (9) e Ceará (19) (Tabela 04).

Tabela 4. Estado, Local de coleta, Número de coleta, Sistema de produção, Cultivos associados e Número de colônias isoladas a partir do meio Embrapa (ME), meio Embrapa suplementado de penicilina (ME/PENIC) e meio Embrapa suplementado de estreptomicina (ME/ESTREP).

Estado	Local de coleta	Nº coletas	Sistema de produção	Cultivos Associados	ME	ME/PENIC	ME/ESTREP
GO	Montevidiu	11	C ¹	Soja e milho (anterior), algodão (coleta)	5	7	2
	Turvelândia	15	C	Soja e milho (anterior), algodão (coleta)	9	4	4
	Cristalina	26	C	Soja e milho (anterior), algodão (coleta)	22	3	15
	Rio Verde	3	C	Milho	0	3	2
	Perolândia	8	C	Soja e milho (anterior), algodão (coleta)	13	5	11
	Caiapônia	2	C	*	2	1	2
	Mineiros	3	C	*	2	2	1
	Jataí	1	C	Soja e milho (anterior), algodão (coleta)	1	1	3
	Matrinã	5	C	* ¹	1	1	5
PB	Campina Grande	9	AC ²	vegetação local	9	2	10
BA	Luiz Eduardo Magalhães	20	C	Soja, milho (anterior, café, feijão gurgutuba) algodão (coleta)	12	9	17
	São Desidério	13	C	Soja e milho (anterior), algodão (coleta)	0	7	13
MS	Chapadão do Sul	10	C	Soja, feijão e milho (anterior), algodão (coleta)	2	7	10
	Costa Rica	5	C	Soja, feijão e milho (anterior), algodão (coleta)	0	5	5
MT	Sinop	6	C	Soja e algodão	1	4	1
	Ipiranga do Norte	3	C	* ¹	5	2	2
CE	Carnaubal	15	O ³	Hortaliças	15	6	13
	Barbalha	4	AC	Algodão	4	5	0
TOTAL		159			103	74	116

¹ C – convencional; ² AC – área comum sem histórico de cultivo; ³ Orgânico

Após a fase de isolamento em placa com meio sólido, quando foi selecionado sempre que possível, pelo menos uma colônia de cada localidade, foram obtidas 293 colônias bacterianas com aspecto semelhante a *B. thuringiensis* ou a *L. sphaericus*; 103 a partir do meio Embrapa; 74 com meio Embrapa suplementado com penicilina e 116 com meio Embrapa suplementado de estreptomicina (Tabela 4).

Nota-se que para uma mesma amostra, nem sempre as colônias de Bt ou Ls se desenvolveram em meio suplementado com penicilina ou estreptomicina, mesmo que em alguns casos, tenha sido observado o crescimento de colônias em placa sem antibiótico. Devido à ampla variabilidade genética das comunidades bacterianas, este fato evidencia a importância da utilização de meio de cultivo sem solução antibiótica para o isolamento de um maior número de espécies, pois mesmo que os antibióticos tenham sido utilizados em concentrações recomendadas, é de se supor. que pelos menos para algumas estirpes, os antibióticos podem agir como agente bacteriostático, impedindo o crescimento e mantendo as células em uma fase estacionária ou, ainda, como um bactericida, levando a morte celular das estirpes (GOODMAN; GILMAN'S, 2008; KATZUNG, 2007; BAPTISTA, 2013).

Vale ressaltar também que o método de isolamento empregado pode interferir nos resultados (TRAVERS et al. 1987, POLANCZYK, 2004; FERREIRA et al. 2017, WHO, 1987) e que, em alguns casos, o uso de antibióticos nem sempre se mostra eficiente para isolamento de Bt ou Ls, principalmente em situações onde a microbiota local esteja condicionada a características ambientais muito singulares como, por exemplo, em ambientes muito frios, com na Antártica. Os autores desse trabalho verificaram que uma das estirpes obtidas se mostrou sensível a penicilina (PRABHAKAR; BISHOP, 2011; FORSYTH; LOGAN, 2000). Neste ponto, vale destacar a sensibilidade do pesquisador para adequação do método, e de medidas complementares que levem a um resultado preciso.

Na segunda etapa de isolamento, que consistiu no cultivo em meio Embrapa líquido seguido da microscopia óptica de contraste de fases, apenas amostras que apresentaram esporos característicos de Bt ou Ls, livres de contaminações, boa taxa de esporulação em até 72h e presença de cristal foram selecionadas e enviadas para o responsável técnico da Coleção de Bactérias de Invertebrados para incorporação na coleção com base na confirmação da espécie e pureza das amostras. Após essa etapa, das 293 colônias selecionadas no cultivo em meio líquido, 125 amostras foram

armazenadas na Coleção, consistindo em um aproveitamento de 42% do total do material isolado.

Das 125 amostras armazenadas, 81 foram classificadas como *B. thuringiensis* (64,8%), 26 como *L. sphaericus* (20,8%) e 18 (14,4%) como *Bacillus* spp. As amostras classificadas como *Bacillus* spp. foram selecionadas por apresentarem estruturas semelhantes a cristais, porém, outras características como tamanho e formato do esporo não eram compatíveis com o padrão de Bt e serão posteriormente investigadas (Tabela 5).

Tabela 05. Localização, número de isolados por amostra e número de isolados armazenados.

Estado	Local de coleta	Isolados/amostra	Número de isolados armazenados		
			<i>B. thuringiensis</i>	<i>L. sphaericus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
GO	Montevidiu	14	5	0	2
	Turvelândia	17	1	0	0
	Cristalina	40	10	2	3
	Rio Verde	5	2	0	0
	Perolandia	29	7	2	3
	Caiaponia	5	3	0	0
	Mineiros	5	1	1	0
	Jataí	5	2	0	0
	Matrinã	7	1	1	0
PB	Campina Grande	21	2	1	0
BA	Luiz Eduardo Magalhães	38	13	4	5
	São Desidério	20	1	1	1
MS	Chapadão do Sul	19	8	2	1
	Costa Rica	10	4	1	0
MT	Sinop	6	5	3	0
	Ipiranga do Norte	9	0	0	0
CE	Carnaubal	34	9	4	2
	Barbalha	9	7	4	1
TOTAL		293	81	26	18

Notou-se que em todas as regiões, Bt foi o isolado que apareceu em maior proporção, ou pelo menos, na mesma proporção que as demais espécies obtidas. Verifica-se que em muitos trabalhos de prospecção, têm-se isolado estirpes de Bt e Ls em diferentes proporções, normalmente esses resultados estão associados às características do local de origem do material coletado e ao método de isolamento

utilizado. Silva, Dias e Monnerat (2002), por exemplo, encontraram proporções diferentes para isolados de Bt e Ls, originários de solos brasileiros das regiões Norte (6,6% de Bt e 5,6% de Ls); Nordeste (16,9% Bt e 2,4% Ls); Centro-Oeste (2,5% de Bt e 3,7% de Ls), Sudeste (7,2% Bt e 8,4% Ls) e Sul (4,6% Bt e 10,1 % Ls). Yu et al. (2015), em trabalho de isolamento de Bt a partir de amostras de solo em áreas de floresta na China, utilizando o acetato de sódio e penicilina para isolamento, selecionaram 593 colônias a partir de 857 amostras de solo., e Das colônias isoladas, apenas 122 foram classificadas como Bt.

Depois que as amostras foram preservadas e inseridas na Coleção, deu-se continuidade aos estudos de caracterização. Através dos bioensaios seletivos, observou-se o potencial patogênico dos isolados para todos os insetos. Das 125 amostras armazenadas no banco, 99 foram testadas para *S. frugiperda*, *H. armigera* e *A. grandis* e 85 amostras testadas para *A. gemmatalis* (Tabela 6). Destas, quatro estirpes apresentaram mortalidade \geq a 85% para *S. frugiperda*: S2651 (85,7%); S2878 (86,4%); S2690 (86,4%) e S2744 (100%); cinco com mortalidade \geq a 85% para *H. armigera*: S2651 (91%); S2667 (100%); S2669 (100%); S2721 (100%); S2724 (100%) e seis amostras para *A. gemmatalis*: S2660 (95%); S2678 (88,9 %); S2699 (85%); S2713 (88,9%); S2731 (90%); S2744 (85%). Para *A. grandis*, três amostras apresentaram mortalidade \geq a 80%: S2720 (96,7%); S2728 (96,7%) e S2744 (81,7%).

Com base nos dados obtidos, alguns pontos se destacam: a diversidade e especificidade dos isolados, que podem ser observadas em diferentes situações: estirpes com baixos ou moderados índices de mortalidade a pelo menos uma das espécies testadas como S2736 com 4% de mortalidade para *S. frugiperda* e 16% para *A. gemmatalis*; estirpes apresentando altos níveis de mortalidade para uma só espécie, como S2728 para *A. grandis*; S2667, S2668, S2669; S2670, S2721 e S2724 para *H. armigera*, S2690 para *S. frugiperda* e S2713 e S2731 para *A. gemmatalis* e também, estirpes com altos níveis de mortalidade para espécies de mesma ordem ou espécies de ordem diferentes simultaneamente, como S2744, que apresentou 100% de mortalidade *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis* .

Sobre os baixos índices de mortalidade encontrados, vale ressaltar que a falta de atividade inseticida, não quer dizer que esses isolados não apresentem atividade para outros insetos-praga ou mesmo outras funções importantes como controle de fitopatógenos, produção de antibióticos, promoção de crescimento, entre outros, por

isso a importância de serem mantidos em Coleções como importante patrimônio genético nacional.

Tabela 6. Mortalidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus* sp. contra *H. armigera* (Ha), *S. frugiperda* (Sf), *A. gemmatalis* (Ag) e *A. grandis* (Agr)

% Mortalidade em bioensaios seletivos						% Mortalidade em bioensaios seletivos					
Estirpe	Spp.	Lepidoptera			Coleoptera	Estirpe	Spp.	Lepidoptera			Coleoptera
		Ha	Sf	Ag	Agr			há	Sf	Ag	Agr
S2645	Bt	50	33	15	58,3	S2678	Bsp	37,5	86,4	88,9	53,3
S2646	Bt	48	58	* ¹	55	S2679	Bt	30,4	34,8	55,6	70
S2647	Bt	38	33	5	45	S2680	Bt	30,4	45,5	5	31,7
S2648	Bt	46	25	32	53,3	S2681	Ls	*	*	*	*
S2649	Ls	*	*	*	*	S2682	Ls	*	*	*	*
S2650	Bt	46	13	20	55	S2683	Bsp	16,7	41,7	10	51,7
S2651	Bt	91	86	80	56,7	S2684	Bt	50	58,3	10	60
S2652	Bt	52	13	15	51,7	S2685	Ls	*	*	*	*
S2653	Ls	*	*	*	*	S2686	Bt	45,5	45,5	38,9	43,3
S2654	Ls	*	*	*	*	S2687	Bt	*	34,8	0	43,3
S2655	Ls	*	*	*	*	S2688	Bt	54,2	60,9	63,3	60
S2656	Bt	50	36	15	25	S2689	Bt	16,7	45,5	68,9	55
S2657	Bt	*	*	*	*	S2690	Bt	21,7	86,4	47,8	63,3
S2658	Bt	*	*	*	*	S2691	Bt	25	47,8	16,7	76,7
S2659	Bt	35	36	15	48,3	S2692	Ls	*	*	*	*
S2660	Bt	25	44	95	46,7	S2693	Bt	54,2	83,3	73,9	58,3
S2661	Bsp	21	57	45	40	S2694	Bt	54,2	47,8	72,2	36,7
S2662	Bt	68	50	15	41,7	S2695	Bt	*	0	50	23,3
S2663	Bsp	13	4	34	45	S2696	Bt	25	29,2	80,6	41,7
S2664	Bt	58	36	10	53,3	S2697	Bt	40,9	50	45,8	41,7
S2665	Bsp	67	37	32	33,3	S2698	Bt	70,8	37,5	11,3	38,3
S2666	Ls	*	*	*	*	S2699	Bt	45,5	4,2	85	35
S2667	Bt	100	57	20	58,3	S2700	Bt	69,6	20,8	79,4	73,3
S2668	Bt	87	26	0	30	S2701	Bsp	33,3	56	68,8	61,7
S2669	Bt	100	57	83	53,3	S2702	Bt	52,4	16,7	5	61,7
S2670	Bt	91	26	69	43,3	S2703	Ls	*	*	*	*
S2671	Bt	55	17	42	51,7	S2704	Bsp	45,8	4,5	0	60
S2672	Ls	*	*	*	*	S2705	Ls	*	*	*	*
S2673	Bt	57	48	58	51,7	S2706	Bt	33,3	26,9	5	36,7
S2674	Bt	57	35	0	*	S2707	Bt	48	30,4	41	68,3
S2675	Ls	*	*	*	*	S2708	Bt	54,5	16,7	70	70
S2676	Bt	*	50	20	43,3	S2709	Bt	58,3	20	22,2	60
S2677	Bt	48	78	58	70	S2710	Ls	*	*	*	*

¹ Os resultados dessas amostras serão tratados no capítulo II referente aos dípteros.

...continuação tabela 6

% Mortalidade em bioensaios seletivos						% Mortalidade em bioensaios seletivos					
Estirpe	Spp.	Lepidoptera			Coleoptera	Estirpe	Spp.	Lepidoptera			Coleoptera
		Ha	Sf	Ag	Agr			Ha	Sf	Ag	Agr
S2711	Bt	*	*	*	*	S2741	Ls	*	*	*	*
S2712	Bt	61,9	42,9	38,9	53,3	S2742	Bt	45,8	70	27	46,7
S2713	Bt	29,2	43,8	88,9	68,3	S2743	Bt	76,2	54,5	74	51,7
S2714	Ls	*	*	*	*	S2744	Bt	79,2	100	100	81,7
S2715	Bt	43,5	52,4	59,7	45	S2745	Bt	33,3	27,3	28	51,7
S2716	Bsp	34,6	12,5	5	41,7	S2746	Ls	*	*	*	*
S2717	Bt	70,8	41,7	25	56,7	S2747	Bt	68	55	50	43,3
S2718	Bt	*	50	10	63,3	S2753	Bt	75	75	*	61,7
S2719	Bt	82,6	37,5	52,8	58,3	S2754	Bt	33,3	58,3	*	31,7
S2720	Bt	81,8	62,5	23,6	96,7	S2755	Bt	79,2	50	*	51,7
S2721	Bt	100	45,8	32,2	51,7	S2756	Bt	66,7	45,8	*	48,3
S2722	Bt	39,1	54,2	15	*	S2757	Bt	66,7	58,3	*	38,3
S2723	Bt	52	62,5	35	41,7	S2758	Bt	56,5	52,2	*	28,3
S2724	Bt	100	4,2	60	56,7	S2759	Bt	66,7	41,7	*	18,3
S2725	Bt	62,5	45,8	30	48,3	S2760	Bt	56,5	39,1	*	50
S2726	Bt	76,2	45,8	66,7	60	S2761	Bsp.	29,2	50	*	40
S2727	Bt	62,5	45,8	35,7	75	S2762	Bsp.	54,2	25	*	45
S2728	Bt	*	85	62,8	96,7	S2763	Ls	*	*	*	*
S2729	Ls	*	*	*	*	S2764	Ls	*	*	*	*
S2730	Bt	50	33,3	61,1	51,7	S2765	Ls	*	*	*	*
S2731	Bt	*	54,5	90	50	S2766	Bt	54,2	54,2	*	33,3
S2732	Ls	*	*	*	*	S2767	Bsp.	36,4	54,2	*	35
S2733	Bt	62,5	72,7	44,4	45	S2768	Bt	54,2	41,7	*	40
S2734	Ls	*	*	*	*	S2769	Bt	50	54,2	*	55
S2735	Bsp	44	50	0	46,7	S2770	Bt	50	62,5	*	66,7
S2736	Bt	37,5	4,3	16,1	48,3	S2771	Bsp.	41,7	62,5	*	61,7
S2737	Bsp	37,5	22,7	0	45	S2772	Ls	*	*	*	*
S2738	Bsp	44	55	0	45	S2773	Bsp.	4,2	41,7	*	48,3
S2739	Ls	*	*	*	*	S2774	Bt	66,7	45,8	*	55
S2740	Ls	*	*	*	*						

Nota-se a presença de uma maior proporção de cepas ativas para *H. armigera* e *A. gemmatalis*, em relação a *S. frugiperda*, no qual quatro isolados, provocaram mortalidade maior ou igual a 85%. A dificuldade de encontrar cepas nativas para essa espécie já foi relatada por Polanczyk (2004) que ao estudar a atividade de diferentes isolados de Bt, chegou à mortalidade máxima de 45% para Sf. Já Loguercio et al. (2001) testaram 3.408 isolados nativos e somente 3,3% causaram mortalidade acima de 75% para Sf, e mais da metade dos isolados apresentaram atividade de 52%, ou seja, mostrou-se pouco ativo, causando de 0 a 10% de mortalidade. Silva-Werneck et al. (2000) estudaram o efeito de 205 isolados de Bt e, destes, apenas um causou mortalidade de 100% para Sf.

Mesmo se tratando de insetos de mesma ordem, que apresentam hábitos e exigências nutricionais semelhantes, muitos fatores podem estar associados a essas diferenças de resultados, entre os quais podemos citar a existência de diferentes sítios de ligação ou diferentes receptores no intestino dos lepidópteros que variam em cada uma das espécies, portanto é fundamental conhecer a interação toxina/receptor para determinação da atividade inseticida das proteínas Cry contra lagartas de espécies suscetíveis (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Outro ponto importante, diz respeito às diferenças existentes entre microbiota intestinal de cada um dos lepidópteros utilizados, que podem ser influenciados por fatores como o habitat onde se encontram, fonte de alimento e estágio de desenvolvimento, que irão interferir diretamente em suas funções fisiológicas básicas, inclusive no fortalecimento de respostas imunes para proteção contra patógenos (SHAO et al., 2017). Neste sentido, o papel do potencial das bactérias intestinais já foi avaliado em *H. armigera*, no qual foi observado uma redução na mortalidade larval ao longo de sucessivas gerações expostas a Bt, indicando um aumento da resistência dessa população, e o mesmo efeito não foi observado quando as lagartas foram alimentadas com dieta contendo antibióticos que causaram a remoção de parte de sua microbiota intestinal (PARAMASIVA et al., 2014).

Ainda no intestino médio, também encontra-se as proteinases responsáveis pela clivagem das protoxinas Cry, liberadas após dissolução dos cristais de Bt por ação do pH alcalino. Sob condições naturais, a diversidade de isoformas das serino-proteases, como tripsina e quimotripsina, presentes nos extratos intestinais das larvas de lepidópteros pode contribuir para proteção dos efeitos nocivos de proteínas com atividade inseticida (De MAAGD et al., 2001). No que diz respeito a Bt, estudos

demonstram que algumas espécies de insetos têm habilidade reduzir a atividade dessas proteinases, promovendo um atraso no processamento da protoxina em toxinas ativas, e com isso conferindo algum grau de resistência aos cristais de Bt (KRUMBALIAH et al., 2007). Em *Plodia interpunctella*, por exemplo, a perda de tripsina específica do intestino médio, foi responsável pela resistência parcial às toxinas Cry1A (OPPERT et al., 1997).

Para *A. grandis*, apenas três estirpes causaram mortalidade acima de 80%. Um número reduzido de estirpes com atividade para *A. grandis* também tem sido reportada por outros autores. Martins et al. (2007), detectou apenas cinco isolados causando mortalidade acima de 80% entre as 215 estirpes avaliadas e Praça et al. (2005), entre 300 estirpes avaliadas, apenas quatro apresentaram mortalidade elevada. Entre outros fatores, sabe-se que a solubilização das proteínas no intestino médio depende principalmente do pH alcalino assim como ocorre na maioria dos insetos, das ordens Lepidoptera e Diptera. Desta forma, uma menor efetividade destas proteínas em coleópteros pode ser devido ao pH levemente ácido ($5 \pm 0,1$) na porção anterior do intestino médio e neutro ($7 \pm 0,1$) na porção posterior do intestino médio, tanto para larvas quanto para adultos (MACEDO et al., 2017; De MAAGD et al., 2001; SCHNEPF et al., 1998).

Outro ponto que vale ressaltar é a toxicidade cruzada que pode ser causada em insetos de ordens distintas, como ocorreu com a estirpe S2744. Fato semelhante também já foi demonstrado por outros autores. Frankenhuyzen (2013), estima que entre as 148 classes de proteínas estudadas, pelo menos 23 afetaram entre duas e até seis ordens de insetos simultaneamente. O mesmo fato foi constatado por Praça et al. (2004) que relatam a seleção de duas estirpes de *B.thuringiensis* simultaneamente tóxicas para lepidópteros (*Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*), coleópteros (*Anthonomus grandis*) e dípteros (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*) e que apresentaram peso molecular variando entre 130 e 65 kDa e os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2* e *cry1B*.

Também vale destacar que todas as amostras com maiores índices de mortalidade foram originárias de áreas sob sistema convencional, que apresentavam no seu histórico de plantio, culturas como soja, milho e algodão, que são hospedeiras do mesmo complexo de pragas avaliadas neste estudo, diferentemente do que aconteceu nas áreas produção orgânica, onde eram explorados principalmente hortaliças, a mortalidade máxima obtida foi de 79% para *H. armigera*. Embora não

seja possível uma afirmação categórica, este fato pode refletir a função ecológica de Bt em um dado ecossistema. Isto porque, em ambiente natural, a infecção por Bt em um determinado hospedeiro como as espécies de lepidópteros testados, poderia levar a um processo de seleção e reciclagem de estirpes que contenham genes entomocidas específicos as pragas mais comuns nas áreas, contribuindo para manutenção desses microrganismos, já que o inseto morto parece ser o ambiente ideal para germinação e multiplicação dos esporos e solo o principal reservatório (LAMBERT et al. 1992). Casos semelhantes, foram observados por Fatoretto et al. (2007) no qual relatam um maior número de isolados com atividade inseticida a *S. frugiperda* originários das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, consideradas regiões com altos índices populacionais de *S. frugiperda*.

Entre as estirpes que apresentaram maior taxa de mortalidade nos ensaios seletivos, algumas foram submetidas a bioensaios de dose para estimar a CL_{50} . Para *S. frugiperda* foram selecionadas as estirpes S2744, S2651, S2678, para *H. armigera* as estirpes S2651 e S2744 e para *A. grandis* as estirpes S2728 e S2444 (Tabela 06).

A análise de comparação utilizada pelo método de Probit foi o teste de Chi-quadrado ao nível de significância de 5% de probabilidade, no qual verificou se os dados estimados se aproximam dos observados (Tabela 7).

Com exceção da repetição 3 para a estirpe 2728 em *S. frugiperda*, 2651 para *H. armigera* e também os valores obtidos para *A. grandis*, todos os valores de χ^2 estão dentro dos limites requeridos, ou seja, foram inferiores aos valores χ^2 tabelados, indicando que os dados analisados se adequaram ao modelo de Probit. Alguns fatores podem justificar estes resultados, como a variação de potência entre as estirpes.

Neste caso, para se obter concentrações semelhantes para as demais, talvez o mais adequado seria aumentar as concentrações utilizadas. Entretanto, por questões práticas, doses muito superiores as pré-estabelecidas nessa pesquisa poderiam não ser economicamente viáveis para utilização dessas estirpes como bioinsetidas, pois haveria necessidade de utilizar concentrações muito altas do produto. Contudo, essas estirpes ainda assim podem representar um importante recurso genético a ser explorado na construção de eventos transgênicos piramidados, principalmente se o seu conteúdo genético apresentar genes que codifiquem toxinas inseticidas, diferentes das que já são utilizadas, como as proteínas Cry1A, Cry1F, o qual já não se mostram tão eficazes para algumas populações de insetos resistentes.

Tabela 7. Estirpes, Repetição, Número de indivíduos testados (N), Inclinação da curva (Slope), teste de Qui-quadrado (χ^2), graus de liberdade (GL), concentração letal com os respectivos intervalos de confiança (CL₅₀)

<i>Spodoptera frugiperda</i>					
Estirpe	Repetição	N	CL ₅₀ (IC 95%)	χ^2	GL
2744	R1	168	34,11 (12,53 - 61,77)	4,11	5
	R2	168	58,65 (5,26 - 146,22)	1,19	5
	R3	168	65,04 (9,09 - 136,78)	3,97	5
2651	R1	168	30,65 (0,34 - 100,14)	0,36	5
	R2	144	47,38 (13,23 - 101,49)	1,72	4
	R3	144	160,56 (62,45 - 457,03)	0,77	4
2678	R1	192	352,886 (164,29 - 949,25)	5,07	6
	R2	168	292,320 (94,98 - 1662,42)	3,04	5
	R3	240	NC	7,23	8
<i>Helicoverpa armigera</i>					
Estirpe	Repetição	N	CL ₅₀ (IC 95%)	χ^2	GL
2744	R1	192	137,177 (42,623 -287,011)	16,67	6
	R2	168	71,827 (16,282 -146,054)	5,31	5
	R3	144	49,814 (3.869 - 110.425)	3,18	4
2651	R1	192	101.442 (42,728-193,262)	3,18	6
	R2	168	136, 598 (25,858 - 600,598)	6,72	5
	R3	144	NC ¹	1,75	4
<i>Anthonomus grandis</i>					
Estirpe	Repetição	N	CL ₅₀ (IC 95%)	χ^2	GL
2728	R1	60	NC	6,49	4
	R2	60	NC	3,92	4
	R3	60	NC	5,99	4
2744	R1	60	NC	0,83	4
	R2	60	NC	2,12	4
	R3	60	NC	1,30	4

¹ NC: Valores não calculados pelo Probit

Além da caracterização da toxicidade por meio de bioensaios, também foi realizada a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura e caracterização do perfil proteico e molecular. Para essas análises, foram selecionadas as estirpes que apresentaram mortalidade \geq a 85% para *S. frugiperda* (S2651, S2678, S2690 e S2744) e 100% de mortalidade para *H. armigera* (S2667, S2669, S2721, S2724) e *A. gemmatalis* (S2744). Para *A. grandis* foram selecionadas as que apresentaram mortalidade \geq a 80%, (S2720, S2728, S2744).

Durante o isolamento, nem sempre foi possível observar por microscopia óptica de contraste de fase sob aumento de 1000X, a forma das inclusões cristalinas produzidas, devido seus tamanhos reduzidos. Fato que ocorreu com a maioria das amostras avaliadas, incluindo todas as que foram selecionadas a partir dos bioensaios seletivos, que apresentavam cristais semelhantes a pequenas partículas mais eletrodensas dispersas no meio com movimento browniano.

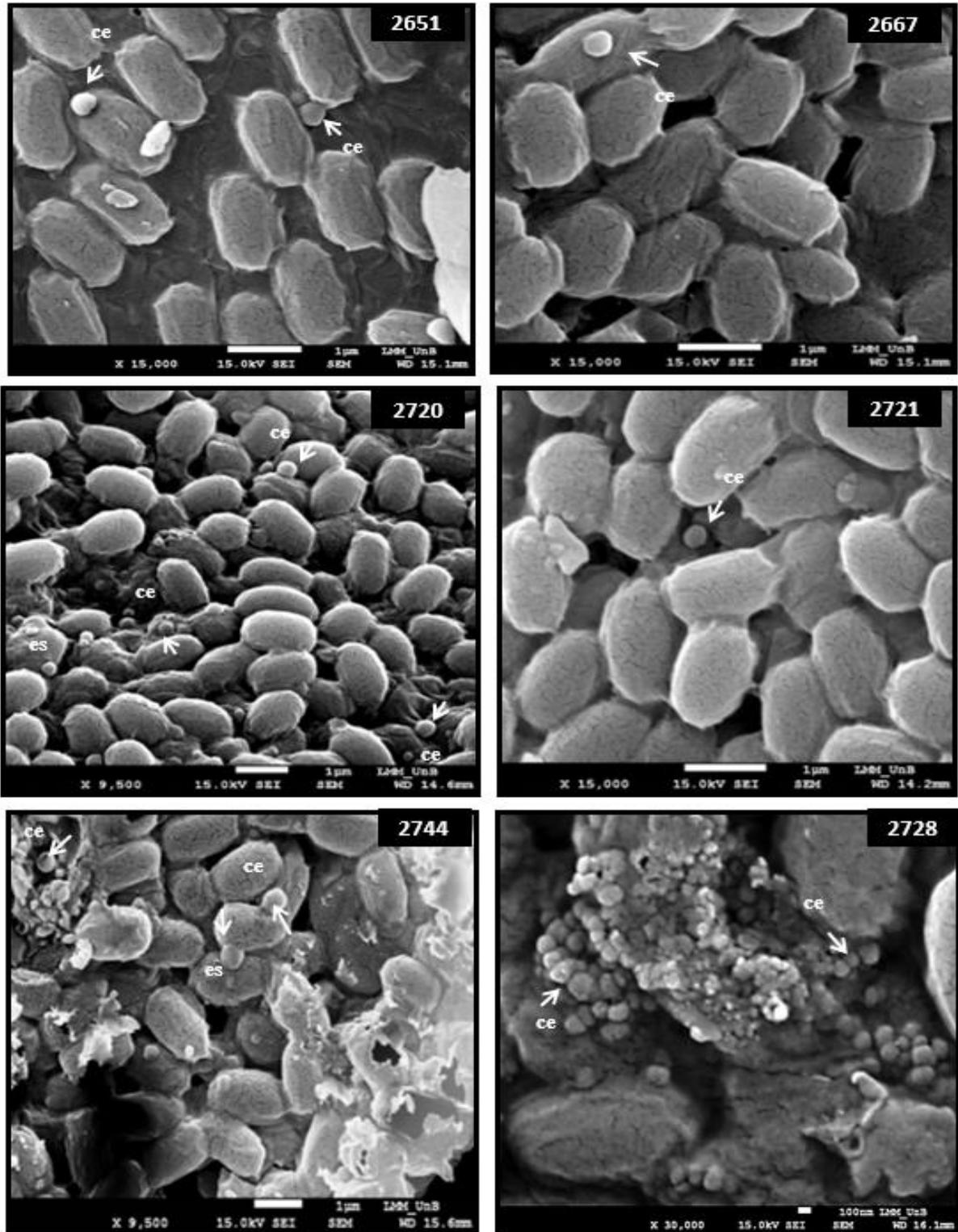
Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se que as estirpes S2651, S2667, S2721 e S2744 apresentaram cristais soltos, esféricos ou quase esféricos com tamanho inferior a 1,0 μm de diâmetro. Já as estirpes S2728 e S2744 também apresentaram cristais com aspecto semelhante aos anteriores, porém, estes se encontravam aglomerados. Cristais com o mesmo aspecto já foram relatados por Bernharr et al., (1997), que os descreviam como “pontos” ou “cristais secundários” que poderiam estar associados a cristais principais maiores, como os bipiramidais, ou mesmo aparecerem isoladamente sem associação com outros cristais. Tal fato foi relatado por Djenane e colaboradores (2017) em trabalho de isolamento na região da Argélia, no qual verificaram que, entre os 137 isolados analisados por MEV, a forma esférica foi predominante em 88 isolados, estando associados com outros cristais (58) ou como forma única (30). Iriate et al. (2000) também observaram cristais pequenos irregulares e quase esférico em uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* subsp. *navarrensis*. Suzuki (2006), em trabalho de isolamento de bactérias endofíticas da mandioca, relata a predominância de cristais pontuais ou secundários entre todas as amostras caracterizadas como Bt, entre os isolados, apenas 1 apresentou cristais grandes ($> 1,0 \mu\text{m}$). A autora também destaca que ainda há poucos estudos sobre esses cristais secundários e que ainda não foi verificada nenhuma relação entre sua morfologia e atividade inseticida (SUZUKI, 2006).

Em alguns casos, a formação de cristais pode se associar a algum tipo de proteína Cry como também aos seus genes *cry*, dando indícios de sua respectiva atividade inseticida (TAYLOR et al., 1992; LERECLUS et al., 1993; HABIB; ANDRADE, 1998). Cristais esféricos já tiveram sua atividade inseticida associada tanto a coleópteros (SILVA, 2008) quanto a lepidópteros (CONSTANSKI et al., 2015).

Para as estirpes S2690 e S2678 não foi possível a visualização de cristais por MEV, nas condições testadas, devendo este fato estar relacionado à qualidade da amostra utilizada. Nesse caso, para uma melhor visualização dessas estruturas,

provavelmente seria mais indicado a purificação dos cristais para a repetição da microscopia das amostras.

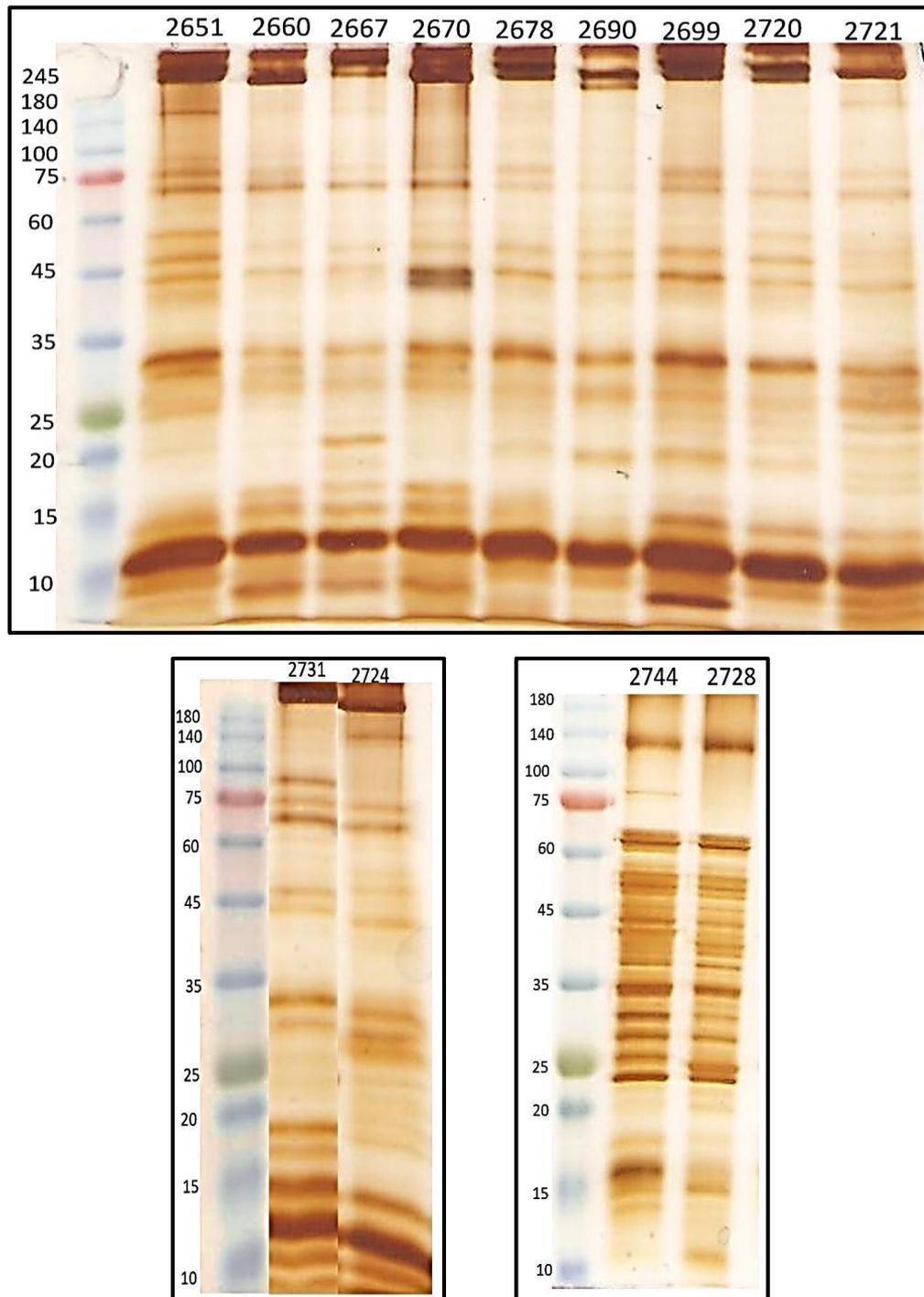
Figura 05. Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporo-cristal das estirpes S2651, S2667, S2720, S2721, S2744 e S2728. Esporo (es) e Cristal esférico (ce).



Fonte: a autora

Embora tenha um tipo de cristal esférico predominante, o perfil proteico (SDS-PAGE) apresentou diferentes padrões de banda para cada uma das estirpes (Figura 6).

Figura 06. Gel de SDS-PAGE (10%) representando o perfil eletroforético das proteínas extraídas das estirpes de *Bacillus* sp com atividade inseticida *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *H. armigera* e *A. grandis*.



Fonte: a autora

Sabe-se que parte das estirpes de Bt podem sintetizar mais de um tipo de cristal e estes podem ser formados por até cinco toxinas, com massa molecular variando principalmente de 30 a 142 kDa (MONNERAT; BRAVO 2000).

A diversidade de massas moleculares observadas sugere que algumas famílias podem estar relacionadas às respectivas mortalidades. Por exemplo a família de proteínas Cry5, que apresenta massa molecular em torno 135-152 kDa (CRICKMORE et al., 2019). Um peptídeo correspondendo a uma massa molecular próxima pode ser visualizado nas estirpes 2651, 2721, 2728 e 2744. Proteínas da família Cry5 foram descritas como ativas contra nematóides, ácaros e formigas e, ainda, mostram atividade contra coleópteros e lepidópteros (CRICKMORE et al., 2019; PRAÇA et al., 2007).

O peptídeo com massa molecular próxima a 75kDa, que aparece na maioria das amostras analisadas (2651, 2670, 2667, 2670, 2678, 2699, 2720, 2721, 2731, 2724 e 2744) já foi relacionado com as famílias Cry2 (70-71kDa) (LERECLUS et al., 1989), Cry3 (73-75 kDa) (LAMBERT et al., 1992); Cry10 (78kDa) (THORNE et al., 1986); Cry11 (72kDa) (DELECLUSE et al., 1995); Cry18 (79kDa) (CRICKMORE et al., 2019), Cry19 (75kDa) (ROSSO; DELECLUSE, 1997) e outros, estando sua atividade inseticida relacionada a insetos de diferentes ordens, inclusive em Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Fiuza et al. (2012) relata a ocorrência do isolado Bt3146-4, selecionado por sua alta atividade a *A. gemmatalis*, que apresentou cristais esféricos e sintetizaram fragmentos proteicos de 70 a 38 kDa (FIUZA et al., 2012).

Já o peptídeo ~45kDa pode ser visualizado no perfil de todas as amostras. Yu et al. (2015) em trabalho de isolamento obtiveram 122 estirpes de Bt, as quais apresentaram padrões múltiplos de bandas, inclusive de 45 kDa. Nessas estirpes, também foi observado a presença de cristais esféricos e a presença de diferentes genes *cry* (*cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry5*, *cry9*, *cry15*, *cry18*, *cry26*, *cry28*, *cry30*, *cry32*, *cry50*, *cry54* e *cry56*) porém, 40 cepas, das 122 isoladas, não amplificaram nenhum desses genes testados, mesmo que algumas delas tivessem apresentado atividade inseticida para o larvas do lepidóptero *Ostrinia furnacalis* (YU et al. (2015). Sugerindo que outros genes (*cry* ou não) pudessem estar relacionados a essa atividade

Uma outra banda de aproximadamente 35 kDa também pode ser visualizada em todas os perfis. Brown e Whiteley (1992) já relataram a ocorrência de uma proteína de 34kDa associada ao gene *cry15* com atividade inseticida a lepidópteros. Konecka et al. (2012) também observaram a atividade inseticida cepa MPUB63 contra *Cydia*

pomonella (Lepidoptera:Tortricidae) e relatam a ocorrência dos genes *cry1b* e *cry15* nesse isolado.

Apenas nas estirpes 2728 e 2744 pode-se observar um polipeptídeo com sinal mais forte com massa molecular próxima a 25 kDa, valor próximo ao encontrado para estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, o qual já foi relatado causando mortalidade para insetos das ordens Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (KUTASI et al., 2016). Em muitos trabalhos de caracterização, os polipeptídeos com massa de 25 a 28 kDa também têm sido associados a proteínas Cyt.

Também é possível a visualização de bandas com peso moleculares mais baixos, situadas nos intervalos entre 15-10kDa. Ellis et al. (2002) relatam a ocorrência de três isolados de *B. thuringiensis* (PS80JJ1, PS167H2 e PS149B1) produziram inclusões parasporais compostas principalmente por proteínas cujas massas moleculares eram de aproximadamente 13 a 14 e 44 kDa e descritas como novas proteínas ativas as larvas do crisomelídeo *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae)

Apesar da diversidade de perfis proteicos encontrados, não houve amplificação por PCR, para os genes *cry1* e *cry3*, que são reconhecidos por sua atividade inseticida a ordem Lepidoptera (PRAÇA et al., 2004) e Coleoptera (MARTINS et al., 2007), inclusive para as mesmas espécies testadas nesse estudo. É de extrema importância que novos trabalhos com outros primers sejam realizados para melhor elucidação dos fatores associados a mortalidade dessas estirpes.

5. CONCLUSÕES

1. O número de isolados de cada espécie é variável entre as regiões, havendo predominância de *B. thuringiensis* em relação a *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus* spp.
2. Após bioensaios seletivos, foi possível eleger pelo menos uma estirpe tóxica a cada uma das espécies de insetos testadas.
3. Na caracterização por microscopia eletrônica de varredura é observado um mesmo tipo de cristal pequeno e esférico, embora as amostras selecionadas tenham exibido perfil proteico variável.
4. Não houve amplificação por PCR para os genes *cry1* e *cry3*, sugerindo que outros genes possam estar associados a mortalidade provocada por essas cepas.

6. REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, M. G.F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013, 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D.J.; ROBERTS, G.M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H.D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, n.1, p. 59-68, 1997.
- BRAVO, A.; GILL, S. S; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n.4, p. 423-435, 2007.
- CASTRO, C. S. P.; COUTINHO, M. V.; SILVA, F. A. da; SILVA, G. A. da; LIMA, L. H. C.; BRITO, M. A. V. de P. e; HUNGRIA, M.; AVIDOS, M. F. D.; BURLE, M. L.; AQUINO, M. de; LOPES, R. B.; PONTES, R. G. M. S. de; COSTA, S. de P. P.; CASTRO, C. S. P. de **Diretrizes de gestão para coleções de microrganismos da Embrapa**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 23 p.
- 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, n.11, p. 3826-3831, 1995.
- CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p. 353-356, 1994.
- CONSTANSKI, K. C.; ZORZETTI, J. B.; GISLAYNE, T. V.; RICIETO, A. P. S.; FAZION, FERNANDA, A. P.; BOAS, L. V.; MONNERAT, R. G.; NEVES, P. M. O. J. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.50, n.8, p.730-733, 2015.
- DELECLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression. Of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4230-4235, 1995.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.
- DJENANE, Z.; NATECHE, F.; AMZIANE, M.; GOMIS-CEBOLLA, J.; EL- AICHAR, F.; KHORF, H. FERRÉ, J. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. **Toxins**, v. , n. 4, p. 139-158, 2017.

- ELLIS, R. T.; STOCKHOFF, B. A.; STAMP, L.; SCHNEPF, H. E.; SCHWAB, G. E.; KNUTH, M.; RUSSELL, J.; CARDINEAU, G. A.; NARVA, K. E. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1137–1145, 2002.
- FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. S.; NASCIMENTO, A. R. B.; SANTOS, A. C.; OMOTO C. Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n.12, p. 2295-2302, 2016.
- FATORETTO, J. C.; SENA, J. A.D.; BARRETO, M. R.; LEMOS, M.; V.F.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 737-745, 2007.
- FERREIRA, M. E. P.; LEITE, L. G.; POLANCZYK, R. A.; SUZUKI, M. T.; FREITAS, R. P.; BUENO, R. N.; SILVA, R. S. ABE. Two methods for isolation of endophytic and edaphic *Bacillus* spp. from sugarcane fields. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, p. 1-7, 2017.
- FIUZA, L.M.; SCHÜENEMANN, R.; PINTO, L.M.N.; ZANETTINI, M.H.B. Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.72, n.2, p.363-369, 2012.
- FORSYTH, G.; LOGAN, N.A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from northern Victoria Land, Antarctica. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 263-266, 2000.
- FRANKENHUYZEN, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 114, n. 1, p. 76-85, 2013.
- GITAHY, P.M.; SOUZA, M.T.; MONNERAT, R.G.; ARRIGONI, E.B.; BALDANI, J.I.A. Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.531-537, 2007.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety***. New York; John Wiley and Sons, 350, 2000.
- GOODMAN; GILMAN'S. **Manual of pharmacology and therapeutics**. Nova Iorque: McGraw Hill, 2008. 1216p.
- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. **Bactérias entomopatogênicas**. In: ALVES, S.B. (ed) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 383-446, 1998.

IRIARTE, J.; PORCAR, M.; LECADET, M. M.; CABALLERO, P. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic Environments in Spain. **Current Microbiology**. v. 40, p. 402-408, 2000.

KATZUNG, B. **Farmacologia básica e clínica**. Brasil: McGraw Hill, 2007. 1216p.

KONECKA, E.; BARANEK, J.; HRYCAK, A.; KAZNOWSKI, A. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. **The Scientific World Journal**. n. ID 710501, p.5, 2012.

KRUMBIAH, L. OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J.L. ADANG, M. J. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 1, p. 139-146, 2007.

KUTASI, J.; KOVACS, R.; PUSPAN, I.; MAKK, J.; TAKACS, K.; ERDELYI, B.; IMRE, C.; KARPATI, E. Protein Patterns Larvicide Activity of Crystalline Inclusions of *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kumamotoensis*. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v. 18, n.7, p. 1945-1951.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970

LAMBERT, B.; HÖFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S.; SOETART, P.; PEFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.8, p. 2536-2542, 1992.

LECADET, M.M.; CHAUF AUX, 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, n.3, p. 840-849. 1991.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: ENWISTLE P.F.; CORY J.S.; BAILEY M.J.; HIGGS S. (eds.). ***Bacillus thuringiensis*, An Environmental biopesticide: Theory and Practice**. England: John Wiley & Sons Ltd., 1993, p. 37-69.

LOGUERCIO, L. L.; SANTOS, C. G.; BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 362-367, 2001.

MACEDO, L.L.P; SOUZA JUNIOR, J.A; COELHO, R.R; FONSECA, C.A.; FIRMINO, A.A.P; SILVA, M.C.M; FRAGOSO, R.R; ALBUQUERQUE, E.V.S; SILVA,M.S; ALMEIDA, J.E.; TERRA, W.R. GROSSI-DE-SÁ, M.F. Knocking down chitin synthase 2 by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. **Biotechnology Research and Innovation**. v. 1, n. 1, p. 72-86, 2017.

MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SILVA-WERNECK, J. O.; SONE, E. H.; WAGA, I.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton bollweevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 65-68, 2007

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; SOARES, M.S.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERÓN, M. BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. *PLoS One*, v. 10, n. 4, 2015

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; BERRY, C. (2007). Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, n.3, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R.G.; SILVA, S.F.; SILVA-WERNECK, J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 65p. (Documentos, 60).

MONNERAT, R.G.; DIAS, S.C.; OLIVEIRA NETO, O.B. de; NOBRE, S.D.; SILVA-WERNECK, J.O.; SÁ, M.F.G. de. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 46).

OLIVEIRA, E. C.; CARRARO, N. C. Análise do Comportamento e Participação do Agronegócio na Composição do Produto Interno Bruto (PIB) Brasileiro: Um Estudo da Série Temporal de 1996 a 2017. **Brazilian Journal of Development**. v. 5, n. 11, p. 24042-24064 nov. 2019

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n.9, p. 1727-1736, 2016.

OPPERT, B.; KRAMER, K.J.; BEEMAN, R.W.; JOHNSON, D.; MCGAUGHEY, W.H.; Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n. 38, p. 23473-23476, 1997.

PARAMASIVA, I.; SHARMA, H. C.; KRISHNAYYA, P. V. Antibiotics influence the toxicity of the delta endotoxins of *Bacillus thuringiensis* towards the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **BMC Microbiol.** v. 14, n.200, p. 2-11, 2014.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. DE S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16. 2004.

PRAÇA, L.; MARTINS, E.; BATISTA, A. C.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004

PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; RAMOS, F. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G. Caracterização entomopatogênica, bioquímica e molecular de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**. 2005, Salvador. Algodão: uma fibra natural: resumos. Salvador: ABAPA, 2005.

POLANCZYK, R.A.; ZANÚNCIO, J.C.; ALVES, S.B. Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. *Ciência Rural*, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2009.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**. v. 7, p.1-10, 2003.

POLANCZYK, R.A **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**, 2004. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2004.

PONTES, R. G. M. S. de; CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V.; LIMA, L. H. C. **Requisitos corporativos de qualidade para coleções de microrganismos da Embrapa**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 17 p. (Folhetos).

PRABHAKAR, A.; BISHOP, A. Invertebrate pathogenicity and toxin-producing potential of strains of *Bacillus thuringiensis* endemic to Antarctica. **Journal of invertebrate pathology**, v. 107, n. 2, p, 132-138, 2011.

ROBERTSON, J. R., H. K. PREISLER, AND R. M. RUSSELL. **Polo Plus. Probit and logit analysis user's guide**. LeOra Software, Petaluna, CA. 2002

ROSSO, M. L.; DELECLUSE, A. Distribution of the insertion elemento IS240 among *Bacillus thuringiensis* strains. **Current Microbiology**. v. 34, p. 384-352, 1997.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, .62, n.3, p.775-806, 1998.

SILVA-WERNECK, J.O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 5p. (Circular Técnica, 10).

SILVA, N. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae***. 2008, 40 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2004.

SHAO, Y.; CHEN, B.; SUN, C.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C.; BOLAND, W. Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. **Cell Chemical Biology**. v. 24, n. 1, p. 66-75, 2017.

SILVA-WERNECK, J.O.; NETO, J.R.M.V.A.; TOSTES, A.N.; FARIA, L.O.; DIAS, J.M.C.S.D. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.1, p.221-227, 2000.

SHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. da S. Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SILVA, S. F. da; DIAS, J. M. C. de S.; MONNERAT, R. G. **Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 4 p. (Comunicado Técnico, 70)

SUZUKY, M.T. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2006. 86f. Dissertação mestrado (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

POLANCZYK, R.A **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**, 2004. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2004.

TAYLOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A. M.; POLLOCK, T. J. Structural similarity between the lepidoptera and díptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelense*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 801-811, 1996

TRAVERS, R.S.; MARTIN, P. A.; W., REICHELDERFER, C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1263–1266, 1987

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors**. WHO Mimeograph Document 87.3, 41p., 1987.

YU, Z.; GONG, L.; LI, Q.; HUANG, G.; HE, L.; LI, P.; ZHENG, A. Diversity of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil and cloning of novel haplotypes of cry genes **Annals of Microbiology**. v. 65, n.4, p. 2179-2186, 2015

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* e *Lysinibacillus* COM ATIVIDADE DÍPTERO-ESPECÍFICA

RESUMO: Algumas espécies de culicídeos dos gêneros *Culex* e *Aedes* são consideradas importantes vetores de doenças humanas e, por isso, são alvo de programas de saúde pública que visam a diminuição da densidade populacional desses insetos e com isso, a transmissão das doenças. Este trabalho teve como objetivo selecionar estirpes dos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* pertencentes a Coleção de Bactérias de Invertebrados, buscando o reconhecimento de novas linhagens que possam ser usadas em formulações de bioinsetidas para controle dos vetores *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Das 125 amostras testadas, apenas a estirpe 2741 de Ls causou mortalidade de 100% para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Essa amostra foi caracterizada quanto a sua morfologia e seu perfil bioquímico e molecular. A CL_{50} obtida foi de 1,32 ng/mL, para *C. quinquefasciatus*. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a presença de cristais esféricos, característicos de *L. sphaericus*. O gel de proteínas (SDS-PAGE) apresentou perfil de 102, 58 e 38 KDa e produtos de PCR com tamanho esperado para a toxina binária BinA e BinB. A estirpe S2741 apresentou potencial bioinseticida para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*. *Aedes aegypti*. Controle biológico. Bactérias entomopatogênicas.

CHAPTER II: CHARACTERIZATION OF *Bacillus* and *Lysinibacillus* strains WITH DIPTER-SPECIFIC ACTIVITY

ABSTRACT: Some species of culicids of the genera *Culex* and *Aedes* are considered important vectors of public diseases and, therefore, are the target of health programs that aim to reduce the population density of these insects and, with that, the transmission of diseases. This study aimed to select strains of the *Bacillus* and *Lysinibacillus* genera belonging to the Invertebrate Bacteria Collection, aiming at the recognition of new strains that can be used in bioinserted formulations to control the vectors *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*. Of the 125 beads tested, only one strain of S2741 caused 100% mortality for *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* larvae. This sample was characterized in terms of its morphology and its biochemical and molecular profile. The LC₅₀ obtained was 1.32 ng / mL for *C. quinquefasciatus*. Scanning electron microscopy showed the presence of spherical crystals, characteristic of *L. sphaericus*. The protein gel (SDS-PAGE) showed a profile of 102, 58 and 38 KDa and PCR products with the expected size for the binary toxins BinA and BinB. A S2741 strain showed a potential bioinsecticide for *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*.

Key-words: *Culex quinquefasciatus*. *Aedes aegypti*. Biological control. Entomopathogenic bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por insetos ainda se constituem um sério problema de saúde pública. Entre os vetores mais importantes, destacam-se os mosquitos hematófagos que apresentam elevado potencial de transmissão de patógenos e disseminação de doenças. A família Culicidae (Diptera) abriga mais de 3.000 espécies de mosquitos, como *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Ambas as espécies são consideradas antropofílicas e endofílicas, e devido suas características biológicas, como ciclo de vida curto, elevada taxa reprodutiva e facilidade de adaptação ao ambiente, estão amplamente distribuídas pelo mundo, principalmente em regiões tropicais como o Brasil (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Culex quinquefasciatus é um dos principais vetores do filarídeo *Wuchereria bancrofti* (COBBOLD, 1877) causador da filariose linfática, que acomete milhões de pessoas em todo mundo. Além desta doença, também é responsável pela transmissão de outros vírus, como Vírus do Nilo Ocidental, da encefalite de St. Louis, Rocio, Oropoche, Mayaro e outros que já se encontram em circulação no Brasil (LIMA-CAMARA, 2016).

Aedes aegypti também é considerado importante vetor de múltiplos arbovírus, entre eles o vírus da Dengue, Chikungunya e Zika, que podem ser transmitidos simultaneamente para um mesmo indivíduo por um só mosquito e em um único episódio de alimentação (KOTSALIOZI et al., 2017; RÜCKERT et al., 2017). De acordo com o Ministério da Saúde (2020) a Dengue é reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, inclusive em território brasileiro, onde apenas para o primeiro trimestre de 2020, foram notificados mais de 390 mil casos prováveis no país, seguido de 11.453 casos prováveis para Chikungunya e 1.395 de Zika.

Para a maioria das doenças descritas anteriormente, ainda não ha vacinas disponíveis portanto, reduzir a população de vetores é uma das melhores alternativas para contenção dessas doenças. Para isso, algumas formas estão disponíveis, entre elas o controle mecânico através do uso de armadilhas e eliminação de criadouros, e também o uso de inseticidas químicos para controle de larvas e adultos (VERMELINGER; FERREIRA, 2013).

Historicamente, o controle químico tem sido amplamente utilizado, entretanto, em alguns casos, tem resultado na evolução da resistência para diversas espécies de

mosquitos em diferentes lugares no mundo (SANTOS; PAZ; LIMA, 2019; CHEDIK, et al., 2016; MOYES et al. 2017), fazendo com que os surtos populacionais sejam reemergentes todos os anos. Além deste inconveniente, o uso de inseticidas sintéticos também pode apresentar restrições devido à sua toxicidade para organismos não alvo e pelos riscos de contaminação ao homem e ao ambiente (CHAREONVIRIYAPHAP et al., 2013; HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Desta maneira, é imprescindível que outros métodos alternativos ao controle químico possam ser explorados a fim de integrarem os programas de manejo para controle de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Entre as opções disponíveis, alguns agentes microbianos de controle se destacam, como as bactérias entomopatogênicas *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), que apresenta elevada atividade inseticida contra larvas de *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* e também a bactéria *Lysinibacillus sphaericus* (Ls), que apresenta atividade larvicida para espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* e *Mansonia* (LACEY, 2007).

Além da atividade inseticida bem consolidada, ambos agentes de controle são altamente específicos para seus alvos e se mostram eficazes e seguros ao homem e ao ambiente, e são, inclusive, recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1985). Outras vantagens relacionadas a esses microrganismos é que apresentam facilidade para produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação (BRAVO et al., 2011; LACEY et al., 2015).

Diante do potencial destes microrganismos a realização de pesquisas, visando o isolamento e caracterização de cepas dos gêneros *Bacillus* ou *Lysinibacillus*, podem representar uma boa alternativa para programas de supressão de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Esses estudos poderiam desencadear a descoberta de diferentes combinações de novos genes com ação inseticida. E esta é considerada uma importante vantagem, pois, embora os gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* apresentem ampla variabilidade genética, atualmente, são encontrados no mercado, apenas produtos à base de *B. thuringiensis israelensis* (Bti), que tem como princípio ativo as toxinas formadoras de cristais Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, e CytAa (BERRY, et al., 2002), e produtos à base *L. sphaericus*, que apresenta como princípio ativo principal as toxinas binária BinA e BinB (SANTOS, 2017).

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade inseticida de novas estirpes de *Bacillus* spp. e *Lysinibacillus sphaericus*, pertencentes a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, enquanto agentes de controle biológico dos vetores *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por meio de bioensaios seletivos, a toxicidade cepas de *Bacillus* spp. e *Lysinibacillus sphaericus* para *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.
- Quantificar o potencial larvicida de estirpes de *Bacillus* spp e *Lysinibacillus sphaericus* ativos a *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* através de ensaios para estimar concentração letal média (CL50).
- Realizar a caracterização morfológica, molecular e bioquímica dos isolados que apresentarem atividade a *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA BIOENSAIOS SELETIVOS

As amostras utilizadas nos ensaios foram provenientes do material preservado em papel filtro e depositados na Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para preparo das amostras, uma tira de papel filtro impregnada com mistura esporo/cristal foi inoculada em Meio Embrapa Líquido e multiplicada em incubador rotativo sob agitação contínua de 200 rpm a 28 ± 2 °C por 72 horas até sua completa esporulação.

3.2. PROCEDÊNCIA DOS INSETOS

Os insetos utilizados em todos os ensaios foram provenientes da Plataforma de Criação de Plantas e Insetos (PCPI) da Embrapa Cenargen, criados em salas com condições controladas de temperatura ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa (70%) e fotoperíodo (14:10 claro:escuro).

Para manutenção de ambas as espécies, os ovos foram colocados em bandejas contendo água filtrada desclorificada, onde permaneceram até atingirem a fase de pupa, que eram coletadas e transferidas para gaiolas de contenção até virarem adultos. Na fase adulta, a alimentação foi a base de solução de mel a 10% e para as fêmeas, também foi oferecido sangue desfibrinado bovino. Semanalmente foi realizada a coleta dos ovos que eram acondicionados em bandejas contendo água para *C. quinquefasciatus* ou em papel filtro para *A. aegypti*, neste caso, quando necessário os papéis contendo ovos eram novamente depositados em bandejas com água para eclosão.

3.2. BIOENSAIOS SELETIVOS

Todos os bioensaios foram realizados com larvas de segundo ínstar de *A. aegypti* ou de *C. quinquefasciatus*, e consistiu em adicionar 1 mL da cultura bacteriana crescida por 72 horas em cada copo descartável contendo 100 mL de água filtrada desclorificada e 25 larvas.

Figura 01: Bioensaio seletivos para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Copos com água desclorificada contendo larvas de 2º instar *A. aegypti*.



Fonte: a autora

As estirpes foram testadas em duplicata e as avaliações foram realizadas após 24 horas, quando se tratava de estirpes de *Bacillus* spp. e com 48 horas para estirpes de *L. sphaericus*. Para os ensaios com Ls foi adicionada uma pitada de levedo de cerveja para garantir que a falta de alimento não estivesse relacionada a mortalidade das larvas. Durante a avaliação foi observada a motilidade larval, e os indivíduos não reativos, eram contabilizados como mortos. Como testemunha, foi feito

um controle sem adição da bactéria, e ao final de cada ensaio foi calculado a % de mortalidade, caso alguma estirpe apresentasse mortalidade maior que 90% eram selecionadas para compor os ensaios de dose e caracterização morfológica, molecular e bioquímica (MONNERAT et al., 2001; SILVA-WERNECK; MONNERAT, 2001).

3.4. ENSAIOS SELETIVOS COM DIFERENTES FRAÇÕES DO CALDO BACTERIANO E DIFERENTES TEMPOS DE CRESCIMENTO

Esses ensaios foram realizados apenas com as estirpes que provocaram mortalidade superior a 90% para *A. aegypti* ou *C. quinquefasciatus*, e seguiu o mesmo protocolo utilizado nos ensaios seletivos, diferindo apenas do material testado, que consistiu em quatro frações do caldo bacteriano crescido por 72h. A primeira porção era composta da mistura completa do esporo cristal obtida após o crescimento em meio líquido por 72h. Para obtenção das outras fases, 4 mL do cultivo esporulado foi centrifugado separadamente em microtubos de 2mL por 20 min a 12.000 rpm. Após centrifugação, 1mL do sobrenadante foi reservado e o outro 1mL foi filtrado em filtro milipore de 0.22 µm para garantir a ausência de qualquer material particulado (cristais, esporos ou restos de meio de cultura), o pelet contendo a mistura esporo/cristal obtido a partir do material centrifugado foi ressuspensão em 2 mL de água estéril. A microscopia óptica também foi realizada no material filtrado para certificar a ausência de qualquer material particulado nas amostras a serem testadas. Foram realizados ensaios seletivos com os cultivos bacterianos em diferentes tempos de crescimento, com 24h, 48h e 72h.

3.5. BIOENSAIOS DE CL₅₀

Os ensaios de dose foram realizados conforme metodologia descrita por Praça et al., (2013). Para tal, foram preparadas sete diluições seriadas a partir de amostras liofilizadas. Inicialmente foi preparada uma solução estoque "A" pesando-se 5mg do material liofilizado e adicionando 10 mL de água destilada estéril. A partir da solução "A" foi retirado 100 µL e adicionado 9,9 mL para solução "B" e a partir desta, a solução "C" adicionando 1000 µL a 9,0 mL de água (Tabela 01). As diluições foram obtidas a partir da solução "C" em função da potência da amostra.

Tabela 01. Soluções estoque utilizadas para preparo das diluições do bioensaio de CL₅₀ contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

SOLUÇÕES	
A	10mL H ₂ O + 5 mg bactéria
B	9,9 mL H ₂ O + 100 µL solução A
C	9,0 mL H ₂ O + 1000 µL solução B

Como se trata de novos isolados, primeiramente foram utilizadas as alíquotas estabelecidas para amostras de menor potência, ou seja, utilizando concentrações mais altas (Tabela 2).

Tabela 02. Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de CL₅₀ contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* para amostras de menor potência

Dose	Alíquota µL Solução C (0,005 mg/mL)	Concentração final (ng/mL)
1	5000	250
2	4000	200
3	2000	100
4	1000	50
5	800	40
6	400	20
7	200	10
8	100	5

No caso da impossibilidade do cálculo da CL₅₀ por alta mortalidade, foi preparado um novo bioensaio utilizando concentrações mais baixas, tomando como referência a Tabela 03. Foi considerado que amostras de maior potência são aquelas que se mostram tão eficientes, quanto à estirpe padrão para matar 50% da população tratada e o contrário para amostras de menor potência (PRAÇA et al., 2013).

Tabela 3. Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra *A. aegypti* C. *quinquefasciatus* para amostras de maior potência

Dose	Alíquota μL Solução C (0,005 mg/mL)	Concentração final (ng/mL)
1	200	10
2	160	8
3	120	6
4	80	4
5	40	2
6	20	1
7	10	0,5

Assim, a partir da solução **C**, foram feitas diluições seriadas decimais, adicionando as respectivas alíquotas (Tabela 02 ou Tabela 03) em copos de poliestireno contendo 100 mL de água filtrada desclorificada e 25 larvas de segundo instar de cada uma das espécies de mosquito testada.

Cada dose foi testada em triplicata com três réplicas biológicas em ensaios independentes. Para efeito de comparação foi utilizado um controle negativo sem adição de bactéria. As avaliações foram feitas conforme descrito nos bioensaios seletivos e os dados de mortalidade obtidos foram analisados mediante análise de Probits para determinação da CL_{50} (Robertson et al., 2002)

3.6. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

O conteúdo proteico foi determinado em gel de Poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE) com base no protocolo extração de proteínas descrito por Lecadet et al. (1991). As culturas bacterianas crescidas e com mais de 90% de esporulação foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm e os sobrenadantes descartados. Após centrifugação os sedimentos foram lavados com NaCl 5M e mais uma vez centrifugados por 15 minutos. Em seguida, os sedimentos foram lavados com uma solução de EDTA 100 mM e PMSF 1 mM e novamente centrifugados. Ao final, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em solução de inibidores. Para análise dos perfis proteicos a mistura espora/cristal foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e como referência foi adicionado marcador de proteína (marcador de massa molecular Rainbow da GE). A eletroforese foi realizada

em cuba vertical (Biorad), contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%) a voltagem constante de 120 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Ao final da corrida, o gel foi corado com solução corante de Comassie blue (40% metanol e 25% Comassie blue 250-R) por 12 horas e descorado com de solução descorante (40% de metanol, 10% ácido acético e 50% água destilada) até a visualização dos perfis proteicos das cepas.

3.7. ANÁLISE DA PRESENÇA DE GENES DE TOXINAS VIA PCR

A identificação dos possíveis genes codificadores das toxinas inseticidas foi realizada PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Inicialmente foi realizada a extração do DNA total com Kit específico para o aparelho Maxwell[®]. Cada estirpe foi semeada em placa de Petri, com meio Embrapa durante 16h em estufa (T= 28°±2°). Após esse período, uma porção do material crescido foi retirado com auxílio de alça descartável estéril e adicionado a um microtubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 200µL de água ultrapura Milli-Q[®]. Nessa mistura foi adicionado 1 µL de lisozima (25 mg/mL) e em seguida incubou-se em banho-maria por 2 horas a 37° C. Posteriormente, o volume total homogeneizado foi colocado no kit conforme o protocolo descrito pelos fabricantes. O kit é composto por cartuchos que contém os reagentes específicos para extração, solução eluente, cubeta para eluente, e macerador. No primeiro poço do cartucho foram adicionados 200 µl da amostra e na cubeta, 200 µL do eluente presente no kit. O cartucho foi inserido no equipamento que procedeu a extração automaticamente por aproximadamente 40 minutos. Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando o protocolo e o kit QuantiFluor[®] ONE dsDNA System desenvolvido para o equipamento Quantus[™] Fluorometer.

Após a extração de DNA foram montadas as reações de PCR, utilizando os iniciadores descritos para detecção dos genes presentes em *Lysinibacillus sphaericus* que codificam proteínas tóxicas, BinA, BinB e MTX (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; WIRTH et al., 2007; PALMA et al, 2014; LEKAKAM et al., 2015).

A análise foi feita em NESTED-PCR, que consiste em aperfeiçoamento da PCR convencional com intuito de melhorar a sensibilidade e a especificidade da técnica. Neste caso, foram utilizado dois conjuntos de iniciadores: o primeiro BSN1/BSN2 e BSN3/BSN4 e o segundo o conjunto BS1/BS2 e BS3/BS4. Para o preparo do primeiro mixer de reações foi utilizado 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 0,2µM

de cada iniciador (10 μ M), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 3mM de MgCl₂ e 1,0 μ l do DNA extraído, formando um volume final de 25 μ l por reação (OTSUKI et al., 1997; BRAVO et al., 1998; IBARRA et al., 2003). Para programação da máquina foi utilizado 30 segundos para desnaturação a 94°C, 55° C por 30 segundos para anelamento e 30 ciclos de 1 minuto a 72°C. A partir dos amplicons resultantes da primeira reação de PCR, foi montado uma nova reação contendo o segundo conjunto de iniciadores BS1/BS2 e BS3/BS4. Para a toxina Mtx, foi utilizado o conjunto de iniciadores 100.1/100.2 e foi feita apenas uma reação de PCR (OTSUKI et al., 1997).

Após as amplificações, uma alíquota de 15 μ l de cada mistura de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato (Tris-borato 45 mM, 1 mM EDTA (pH 8,0) a 90 V durante 90 minutos, corado com brometo de etídio e descorado em água destilada por 10 minutos. Em seguida, cada gel foi visualizado em fotodocumentador Gel Logic 212 PRO (Carestream).

Tabela 4. Sequência nucleotídica dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho esperado dos produtos das PCRs para cada um dos genes de interesse em dípteros das cepas de *L. sphaericus*

Iniciadores	Sequência 5'-3'	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicom (pb)
BSN1	CACGGAATGGTTATGGTT	55	1053
BSN2	AGGTGCATTAGGATACGA		
BSN3	GTACATTCGCGTTATGG	55	720
BSN4	GTATCATAGGTGAACC		
BS1	GTAGGGCGCTTGACAGTAGG	55	523
BS2	GGCCTATTTAGCCCCCTTG		
BS3	GGCATAATGGGTCCGT	55	478
BS4	GAGCGCGGACCACATGC		
100.1	CCAGGGGGAATTCGTC	55	700
100.2	GAGCTACTGTTCTCAC		

Ao final da reação, era esperado para os iniciadores BS1/BS2 a amplificação de um fragmento de 523 pb e para BSN1/BSN2 um fragmento de 1053 pb, ambos correspondentes para o gene da toxina de 51,4 kDa. Para os iniciadores BS3/BS4 e BSN3/BSN4 espera-se a amplificação de fragmentos com 478 pb e 720 pb respectivamente correspondendo a toxina de 41,9 kDa. Já o conjunto de iniciadores

100.1 / 100.2 amplifica um fragmento de 700 pb, correspondendo à toxina Mtx, de 100 kDa.

3.8. CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL POR MEV

As estirpes selecionadas foram visualizadas através de microscopia eletrônica de varredura, para confirmar a presença e o formato dos cristais proteicos. A análise foi realizada a partir de amostras liofilizadas, nos quais foram depositadas sobre suporte metálico tipo “stubs” previamente preparados com fita de carbono e posteriormente cobertos com ouro por 180 segundos utilizando-se metalizador Emitec Modelo K550 e observados em microscopio eletrônico de varredura modelo Zeiss DMS962.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram testadas 125 cepas bacterianas das quais 84 foram classificadas como *B. thuringiensis*, 26 como *L. sphaericus* e 15 como *Bacillus* sp (Tabela 5). Destas, apenas um isolado, a estirpe 2741 de Ls provocou mortalidade de 100% para *Aedes aegypti* e *C. quinquefasciatus*, representando menos de 1% do total analisado. Os dados obtidos neste estudo refletem a alta especificidade desses microrganismos as suas respectivas espécies alvo. Há poucos relatos de outras estirpes bacterianas com atividade mosquitocida além de *B. thuringiensis* var. *israelenses* (DIAS et al.,2002) e *L. sphaericus*, o que poderia explicar o baixo índice encontrado de estirpes ativas. Fato semelhante foi observado nos trabalhos de Praça e colaboradores (2004), estudando atividade de 300 isolados de Bt para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, detectaram apenas dois isolados com mortalidade significativa. Ootani et al. (2011) verificou entre 101 isolados de Bt testados para *A. aegypti*, e apenas um provocou mortalidade acima de 90%. Jung et al. (1998) avaliaram 352 isolados brasileiros e somente um causou mortalidade entre 70 e 80%, enquanto 149 mostraram resultados entre 0 e 10%, corroborando com os dados obtidos nesta pesquisa.

Tabela 5. % de mortalidade em bioensaios seletivos de estirpes de *Bacillus* spp. e *Lysinbacillus sphaericus* para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

% Mortalidade em bioensaios seletivos				% Mortalidade em bioensaios seletivos			
Estirpe	Spp.	A. <i>aegypti</i>	C. <i>quinquefasciatus</i>	Estirpe	Spp	A. <i>aegypti</i>	C. <i>quinquefasciatus</i>
S2645	<i>Bt</i>	0	2	S2678	<i>Bsp</i>	0	0
S2646	<i>Bt</i>	0	4	S2679	<i>Bt</i>	6	6
S2647	<i>Bt</i>	0	0	S2680	<i>Bt</i>	0	10
S2648	<i>Bt</i>	0	0	S2681	<i>Ls</i>	0	2
S2649	<i>Ls</i>	54	2	S2682	<i>Ls</i>	6	3
S2650	<i>Bt</i>	2	0	S2683	<i>Bsp</i>	22	4
S2651	<i>Bt</i>	0	2	S2684	<i>Bt</i>	0	20
S2652	<i>Bt</i>	2	0	S2685	<i>Ls</i>	0	0
S2653	<i>Ls</i>	0	2	S2686	<i>Bt</i>	10	3
S2654	<i>Ls</i>	4	0	S2687	<i>Bt</i>	0	0
S2655	<i>Ls</i>	0	4	S2688	<i>Bt</i>	4	4
S2656	<i>Bt</i>	0	0	S2689	<i>Bt</i>	2	0
S2657	<i>Bt</i>	0	2	S2690	<i>Bt</i>	0	0
S2658	<i>Bt</i>	0	2	S2691	<i>Bt</i>	12	2
S2659	<i>Bt</i>	0	4	S2692	<i>Ls</i>	36	6
S2660	<i>Bt</i>	0	0	S2693	<i>Bt</i>	8	0
S2661	<i>Bsp</i>	0	0	S2694	<i>Bt</i>	0	6
S2662	<i>Bt</i>	4	0	S2695	<i>Bt</i>	0	12
S2663	<i>Bsp</i>	52	0	S2696	<i>Bt</i>	8	0
S2664	<i>Bt</i>	0	0	S2697	<i>Bt</i>	2	0
S2665	<i>Bsp</i>	56	48	S2698	<i>Bt</i>	10	0
S2666	<i>Ls</i>	0	2	S2699	<i>Bt</i>	2	0
S2667	<i>Bt</i>	2	0	S2700	<i>Bt</i>	4	0
S2668	<i>Bt</i>	4	0	S2701	<i>Bsp</i>	0	0
S2669	<i>Bt</i>	0	0	S2702	<i>Bt</i>	0	0
S2670	<i>Bt</i>	0	8	S2703	<i>Ls</i>	0	0
S2671	<i>Bt</i>	0	0	S2704	<i>Bsp</i>	0	0
S2672	<i>Ls</i>	0	0	S2705	<i>Ls</i>	0	0
S2673	<i>Bt</i>	0	0	S2706	<i>Bt</i>	0	0
S2674	<i>Bt</i>	6	0	S2707	<i>Bt</i>	0	0
S2675	<i>Ls</i>	14	0	S2708	<i>Bt</i>	0	0
S2676	<i>Bt</i>	0	4	S2709	<i>Bt</i>	0	0
S2677	<i>Bt</i>	0	0	S2710	<i>Ls</i>	0	0

Continuação tabela 5...

% Mortalidade em bioensaios seletivos				% Mortalidade em bioensaios seletivos			
Estirpe	Spp	A. <i>aegypti</i>	C. <i>quinquefasciatus</i>	Estirpe	Spp	A. <i>aegypti</i>	C. <i>quinquefasciatus</i>
S2711	<i>Bt</i>	2	0	S2741	<i>Ls</i>	100	100
S2712	<i>Bt</i>	0	0	S2742	<i>Bt</i>	0	6
S2713	<i>Bt</i>	0	4	S2743	<i>Bt</i>	0	16
S2714	<i>Ls</i>	0	0	S2744	<i>Bt</i>	0	0
S2715	<i>Bt</i>	0	0	S2745	<i>Bt</i>	0	0
S2716	<i>Bsp</i>	0	0	S2746	<i>Ls</i>	0	0
S2717	<i>Bt</i>	0	0	S2747	<i>Bt</i>	0	22
S2718	<i>Bt</i>	0	0	S2753	<i>Bt</i>	0	2
S2719	<i>Bt</i>	0	0	S2754	<i>Bt</i>	2	6
S2720	<i>Bt</i>	0	0	S2755	<i>Bt</i>	0	0
S2721	<i>Bt</i>	0	0	S2756	<i>Bt</i>	2	0
S2722	<i>Bt</i>	0	0	S2757	<i>Bt</i>	0	0
S2723	<i>Bt</i>	2	12	S2758	<i>Bt</i>	0	0
S2724	<i>Bt</i>	0	0	S2759	<i>Bt</i>	0	0
S2725	<i>Bt</i>	0	0	S2760	<i>Bt</i>	0	2
S2726	<i>Bt</i>	0	0	S2761	<i>Bsp</i>	0	0
S2727	<i>Bt</i>	0	0	S2762	<i>Bsp</i>	0	2
S2728	<i>Bt</i>	2	0	S2763	<i>Ls</i>	0	0
S2729	<i>Ls</i>	0	0	S2764	<i>Ls</i>	0	0
S2730	<i>Bt</i>	0	0	S2765	<i>Ls</i>	0	0
S2731	<i>Bt</i>	0	0	S2766	<i>Bt</i>	0	8
S2732	<i>Ls</i>	0	0	S2767	<i>Bsp.</i>	2	2
S2733	<i>Bt</i>	0	0	S2768	<i>Bt</i>	0	0
S2734	<i>Ls</i>	0	0	S2769	<i>Bt</i>	0	0
S2735	<i>Bsp</i>	0	0	S2770	<i>Bt</i>	0	0
S2736	<i>Bt</i>	0	0	S2771	<i>Bsp.</i>	0	0
S2737	<i>Bsp</i>	0	0	S2772	<i>Ls</i>	16	0
S2738	<i>Bsp</i>	0	0	S2773	<i>Bsp.</i>	0	2
S2739	<i>Ls</i>	0	0	S2774	<i>Bt</i>	0	0
S2740	<i>Ls</i>	0	0				

Após os ensaios seletivos a estirpe 2741 foi selecionada para compor os bioensaios de CL₅₀ para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

Como se trata de novos isolados, inicialmente foram testadas as doses para estirpes de menor potência e com as doses estabelecidas, não foi possível estimar CL₅₀ para *A. aegypti*, pois não houve mortalidade significativa em nenhuma das concentrações testadas e obteve-se mortalidade de 6%. Também, não foi possível estimar a CL₅₀ para *C. quinquefasciatus*, devido as elevadas taxas de mortalidade, todos os indivíduos morreram mesmo na menor dose (Tabela 6). Em ambas as situações, por motivos diferentes, as exigências do teste de Probit, que requer índices de mortalidade entre 5-10% e 80-95% para determinação da curva de dose-resposta não foram atendidas (POLANCZYK, 2004).

Tabela 6. Mortalidade dos bioensaios de dose resposta da estirpe 2741 de *Lysinibacillus sphaericus* para *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* utilizando diluições para amostras de menor potencia

Concentração final (ng/mL)	Mortalidade (%) <i>Aedes aegypti</i>			Mortalidade (%) <i>C. quinquefasciatus</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
250	4	6	0	100	100	100
200	2	0	0	100	100	100
100	0	0	0	100	100	100
50	0	0	0	100	100	100
40	0	0	0	100	100	100
20	2	0	2	100	100	100
10	0	0	4	100	100	100
5	0	2	0	100	100	100

Diferentes estudos relatam uma menor sensibilidade de larvas de *A. aegypti* a *L. sphaericus*, no qual se estima que a concentração letal para essa espécie é cerca de 100-1000 superior que àquela para *Culex*, considerada uma espécie mais sensível (NIELSEN-LEROUX; CHALES, 1992). Algumas explicações para a refratariedade de *A. aegypti* e sensibilidade para *C. quinquefasciatus* a Ls, podem estar relacionadas a especificidade das interações entre proteínas Bin e os diferentes receptores presentes no epitélio intestinal das larvas de cada uma dessas espécies, sendo uma α -glicosidase, a *Culex quinquefasciatus* maltase (1Cqm1) para *C. quinquefasciatus*, e

α -glucosidases (Aam1) nas larvas de *A. aegypti*, que são ortólogas com a Cpm1, porém, não tem capacidade de interação com a toxina Bin (FERREIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2014).

Outro ponto a ser considerado, é que nos ensaios de dose foi utilizado apenas o material liofilizado, que tem a porção solúvel descartada durante o preparo, o que poderia ter influenciado no resultado obtido, se considerado que a porção solúvel também pudesse conter algum composto com atividade inseticida. Este fato fica ainda mais evidente com os resultados dos testes seletivos, utilizando diferentes frações do caldo bacteriano esporulado crescido por 72 h, no qual foi detectada alta mortalidade em todas as frações: caldo bacteriano completo (esporos, cristais e sobrenadante), pelet suspenso em água estéril, sobrenadante e sobrenadante filtrado (Tabela 7).

Tabela 7. Mortalidade (%) bioensaios seletivos da estirpe 2741 de *Lysinibacillus sphaericus* para *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* utilizando diferentes frações do caldo bacteriano (caldo bacteriano esporulado completo crescido por 72h, mistura esporo/cristal suspensos em água estéril, sobrenadante, sobrenadante filtrado e controle)

Amostra	Mortalidade (%) <i>Aedes aegypti</i>		Mortalidade (%) <i>C. quinquefasciatus</i>	
	R1	R2	R1	R2
Caldo bacteriano esporulado completo (72h)	96	100	100	100
Esporo/Cristal suspensos em água estéril	100	100	100	100
Sobrenadante	100	98	100	100
Sobrenadante filtrado	100	100	100	96
Controle	2	0	4	0

Os dados obtidos podem dar indícios que as causas para mortalidade provocada pela estirpe 2741 não se restringe apenas aos cristais proteicos, mas também a outros compostos que são secretados no meio, como as toxinas mosquitocida (Mtx) produzidas durante a fase de crescimento vegetativo. Acredita-se que cepas de Ls altamente tóxicas, contenham proteínas binárias (BinA/BinB) como fator principal, ou ainda toxinas binárias e Mtx simultaneamente, que inclusive, podem apresentar sinergismo entre si, chegando ser tóxica até mesmo para populações de *C. quinquefasciatus* resistentes as toxinas BinA/B (RUNGROD et al., 2009; WIRTH et al., 2007)

Resultados semelhantes foram encontrados nos bioensaios seletivos com as culturas bacterianas crescidas por 24 e 48h, no qual obteve 100% de mortalidade em

todos os tempos de crescimento, inclusive, com 24h quando há somente células vegetativas (Tabela 8).

Tabela 8. Mortalidade de bioensaios seletivos da estirpe 2741 de *Lysinibacillus sphaericus* para *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* utilizando amostra com diferentes tempos de crescimento (24, 48 e 72h).

Tempo (h)	Mortalidade (%) <i>Aedes aegypti</i>		Mortalidade (%) <i>C. quinquefasciatus</i>	
	R1	R2	R1	R2
24	100	100	100	100
48	100	100	100	100
72	100	100	100	100
Controle	0	2	0	0

A atividade de células vegetativas de *L. sphaericus* em larvas de *A. aegypti* também já foi avaliada por outros autores, no qual obtiveram mortalidade entre 90 a 100%, inclusive em uma população resistente ao inseticida temefós (ROJAS-PINZÓN; DUSSÁN, 2017). Além dos cristais proteicos e toxinas MTx, alguns trabalhos também destacam o papel das hemolisinas e quitinases na atividade inseticida de bactérias entomopatogênicas, como em algumas cepas de *L. sphaericus* (JURAT-FUENTES; JACKSON, 2012), sendo hemolisinas as enzimas que atuam diretamente na formação de poros e as quitinases que apresenta papel fundamental na hidrólise de estruturas quitinosas, podendo ambos os fatores ser determinantes para virulência dessa estirpe (FREDERIKSEN, 2012). Estudos mais detalhados devem ser realizados para melhor esclarecimento da contribuição dos componentes solúveis na mortalidade dessa cepa, inclusive extração de proteínas solúveis para realização de ensaios de dose.

A CL₅₀ para *C. quinquefasciatus* (Tabela 9) só foi possível estimar a dose a partir das diluições para amostras de maior potência (Tabela 5) ou seja, utilizando doses menos concentradas

Tabela 9. Concentração letal da estirpe 2741 de *Lysinibacillus sphaericus* em triplicatas para larvas de 2º instar de *Culex quinquefasciatus*

. Repetição	N	CL ₅₀ (ng/mL)	IC (95%)	GL	χ ²	Slope
1	525	1.404	1.211 - 1.616	7	10.38	4.162 ± 0.347
2	525	1.286	0.977 - 1.622	7	10.38	2.953 ± 0.222
3	525	1.268	0.918 - 1.657	7	12.65	2.696 ± 0.204

N, número total de insetos, intervalo de confiança; χ² qui-quadrado calculado

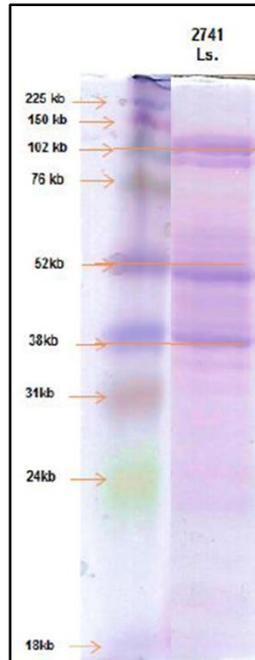
A CL_{50} da estirpe S2741 para *C. quinquefasciatus* foi em média 1,32 ng/mL ou 0,00132 mg/L com intervalo de confiança a 95% variando de 1,03-1,63 ng/mL. A concentração estimada se enquadra nas mesmas concentrações obtidas para as estirpes S1 2,90 ng/mL (1.01-3.18) e S260, 2,32 ng/mL (1,23-2,45), consideradas as estirpes de *L. sphaericus* com melhor desempenho contra *C. quinquefasciatus*. A estirpe 2741 apresentou uma CL_{50} inferior à da estirpe de referência Ls SPH88 que apresentou uma CL_{50} de 0,002 mg/L (0,002 - 0,004) para uma população de laboratório de *C. quinquefasciatus* (SANTOS, 2017).

Além de ser equivalente a outras estirpes de Ls de elevada potência, a CL_{50} para estirpe S2741 foi quatro vezes inferior a CL_{50} recomendada para o inseticida Temefós (0,006, mg/L) para uma população de campo de *C. quinquefasciatus* do município de Naviraí, MS, que apresentou indícios de resistência a esse organofosforado (SCUDELER, 2013). Neste caso, o uso de biolarvicidas a base de Ls, como a cepa 2741, poderia ser uma boa alternativa a no controle desse vetor, como também de outras populações de mosquito que vêm se tornando resistentes ao temefós e a outros inseticidas químicos em muitos lugares do Brasil e do mundo (ARAÚJO et al., 2015)

A produção de bioinseticidas também pode ser explorada em sua forma conjugada, ou seja, dois ingredientes ativos em uma única formulação, como o produto VectoMax® CG que apresenta cristais de *B. thuringiensis* e *L. sphaericus*. Esse tipo de exploração é considerado altamente vantajosa, pois aumenta o espectro de ação de um único produto, que poderá controlar diferentes espécies em um mesmo ambiente, influenciando diretamente nos custos operacionais (SANTOS, 2017). Além do mais, a combinação de diferentes mecanismos e ação também pode reduzir o potencial de seleção de indivíduos resistentes, devido à presença de toxinas com mecanismos de ação associados a diferentes receptores (SANTOS, 2017). Tal fato reflete a importância de realizar constantemente trabalhos de prospecção por novos ativos que possam ser explorados de forma individual ou conjuntamente, visando aumentar as opções de princípios ativos para controle desses e outros vetores de doenças.

Após os bioensaios deu-se prosseguimento as etapas de caracterização apenas para estirpe 2741. Na caracterização bioquímica, o isolado apresentou perfil composto por três proteínas principais com massa molecular de aproximadamente 38 e 52 kDa, e um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa (Figura 2).

Figura 2: Gel SDS-PAGE 10% da estirpe S2741, indicando a presença de proteínas de peso molecular de 102 kDa, 52 kDa e 41 kDa.



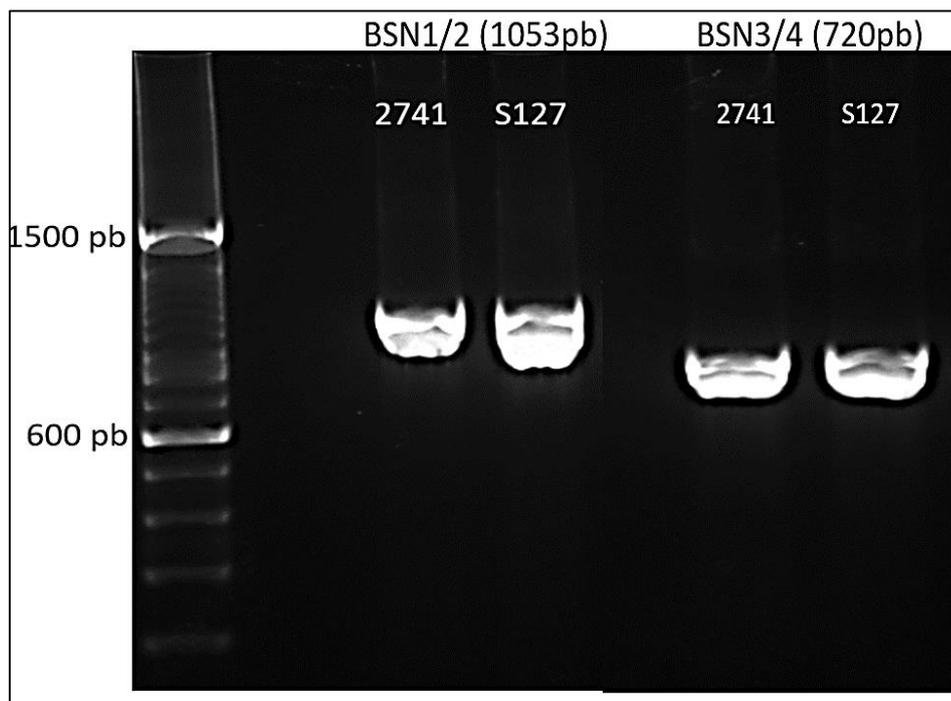
As bandas correspondentes ao perfil de 38 e 52 kDa podem estar relacionadas a toxina Binária BinA e BinB respectivamente, o que justificaria a alta letalidade dessa cepa para as espécies testadas nesse estudo. Entretanto, a estirpe 2741 também apresentou uma banda de 100 kDa. Há alguns relatos de outras estirpes de *L. sphaericus* expressando outro polipeptídeo proteico de ~100 kDa, como na cepa S1, tóxica a *C. quinquesfasciatus* (DUTRA, 2019). Em alguns casos, esse polipeptídeo de 100 kDa tem sido associado a toxina Mtx1, como demonstrado por Rashad e colaboradores (2012) a partir de proteínas extraídas de cultivos com 18h de crescimento. Vale destacar que a mesma banda não foi observada quando a extração foi feita com culturas de 120 horas, indicando que a proteína Mtx1, que foi produzida no início do crescimento, provavelmente tenha sido degradada no decorrer do processo. Este mesmo autor, também relata a presença de cepas de Ls com perfis variando entre 20 e 139 kDa em função do tempo de cultivo (RASHAD et al., 2012)

Além das proteínas Bin e Mtx, outros componentes podem estar associados a mortalidade de Ls, como as proteínas S-layer, produzidas tanto na fase vegetativa quanto na fase de esporulação (ALLIEVI et al, 2014; LOZANO; AYALA; DUSSAN, 2001). Trata-se de proteínas que também apresentam alto peso molecular (120 ~130 kDa) que estão envoltas aos esporos. Alguns autores sugerem que cepas mais tóxicas de Ls, produzem esporos contendo maiores quantidades das proteínas S-layer

(LOZANO; AYALA; DUSSAN, 2001), como também que essa porção proteica tem efeito sinérgico com o esporo (LOZANO; DUSSÁN, 2017).

Os perfis proteicos obtidos para as toxinas binárias (38 e 52 kDa) puderam ser confirmados pelos resultados da PCR, haja vista a amplificação dos iniciadores BSN1 e BSN2, confirmando a presença do gene responsável pela expressão dessa característica. Contudo, não foi possível a mesma associação entre o polipeptídeo de ~100 kDa e a proteína MTx, pois não houve amplificação para o conjunto de iniciadores 100.1/100.2, o que remete a necessidade de uma caracterização molecular mais ampla, como novos iniciadores para investigar a ação de outros genes que possam estar associados à atividade larvicida dessa estirpe.

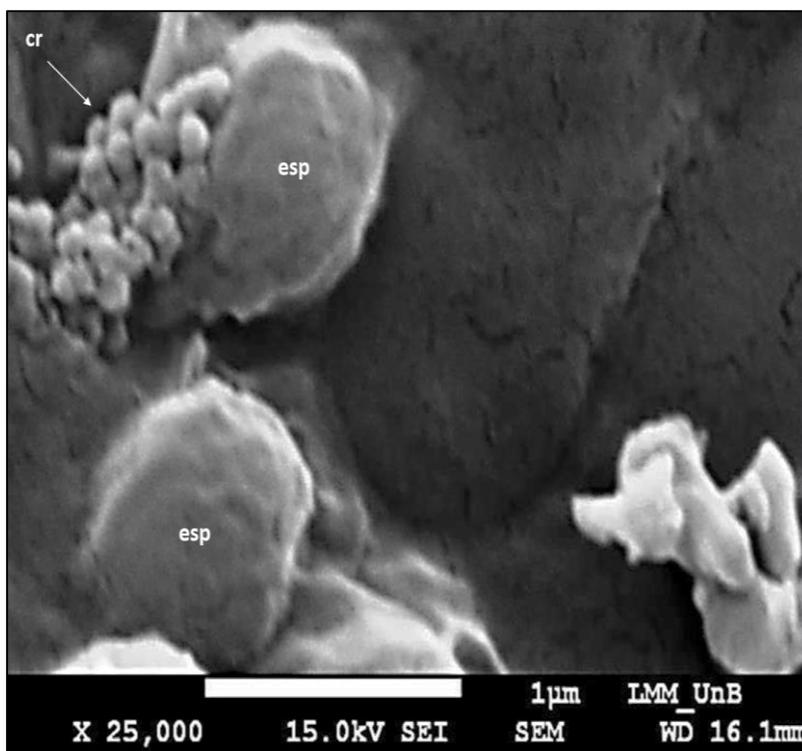
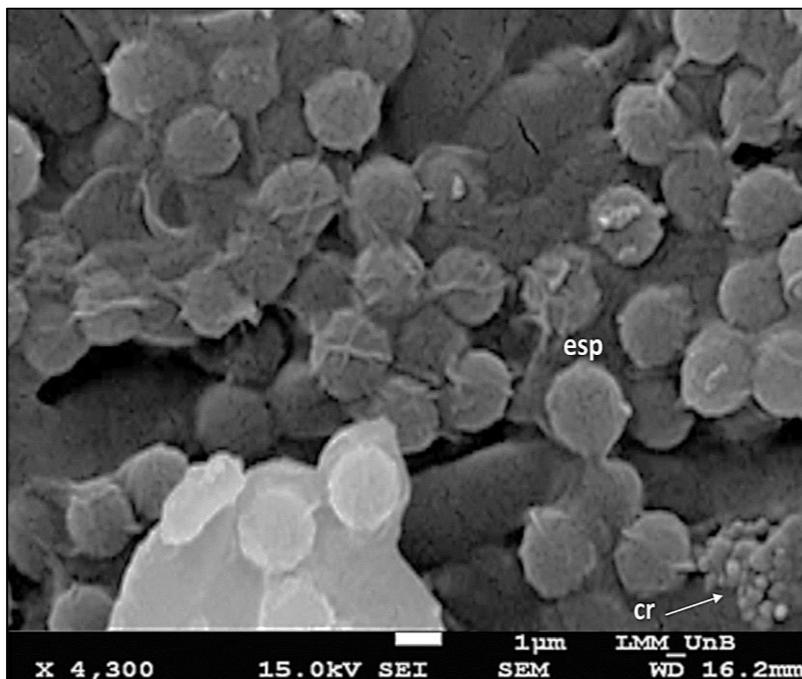
Figura 3. Gel de agarose 1,5% mostrando os amplicons resultantes da reação Nested PCR para as toxinas binárias (iniciadores BSN1/2 e BSN3/4) das cepas de *L. sphaericus* 2741 e 127 utilizada como controle positivo



Fonte: A autora

A análise ultra estrutural da mistura esporo cristal da estirpe 2741 evidenciou características clássicas de estirpes de *L. sphaericus*, como esporos esféricos e presença de cristais pequenos e redondos típicos (Figura 4)

Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporo-cristal da estirpe 2741 de *Lysinibacillus sphaericus*, mostrando esporos esféricos (esp) e cristais redondos (cr) pequenos típicos dessa espécie, sob aumento de 4.000X (A) e 25.000X (B)



Fonte: A autora

5. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou a identificação de uma cepa S2741 com atividade inseticida simultânea contra larvas de *A. aegypti* e principalmente para *C. quinquefasciatus*, com CL_{50} de 1,32 ng/mL semelhante a outras estirpes de elevada potência, apresentando fatores de virulência clássicos contra esses dípteros, como as toxinas BinA/B, mas também com indícios de que outros fatores além dos cristais proteicos possam estar associados. Esses dados se mostram promissores no que se refere ao desenvolvimento de um novo bioinseticida para supressão das populações de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, H.R.; CARVALHO, D.O.; IOSHINO, R.S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M.L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015.
- ALLIEVI, M.C.; PALOMINO, M.M; PRADO, M.; LANATI, L.; RUZAL, S.M.; SÁNCHEZ-RIVAS, C. Contribution of S-Layer proteins to the mosquitoicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. **Plos One**. v. 9, n.10, e111114. 2014.
- BRAVO, A. LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n.7, p. 423-431, 2011.
- BERRY, C.; O'NEIL. S.; BEM, D.E.; JONES, A.F.; MURPHY, L.; QUAIL, M.A.; HOLDEN, M.T.G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.10, p. 5082-5095, 2002.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n.4, p. 423-435, 2007.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.NUNEZ-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.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T.; BANGS, M.J.; SUWONKERD, W.; KONGMEE, M.; CORBEL, V.; NGOEN-KLAN, R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 280, p. 280-308, 2013.
- HEDIAK, M.; PIMENTA JR, F. G.; COELHO G. E. BRAGA, I.A.; LIMA, J. B. P.; CAVALCANTE, K. R.L.J.; DE SOUSA, L. C.; MELO-SANTOS, M. A. V.; MACORIS, M. L. DA G.; ARAÚJO, A. P.; AYRES, C. F.J. ANDRIGHETTI, M. T.M.; GOMEZ, R. G. A.; CAMPOS, K. B. GUEDES, R.N. C. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 311-321. 2016.
- CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1.ed., Editora Fiocruz, 215 p. Rio de Janeiro, 1998.
- DOS SANTOS, S. C.; PAZ, L. C. M.; LIMA, M. O. A. Prospecção Tecnológica sobre Métodos de Controle do Mosquito *Aedes aegypti*. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2019

DIAS, G. S. D.; SILVA, S. F. da.; MARTINS, E. S.; S, C. M. S.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; DIAS, J. M. C. de S. D.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 30), 2002.

DUTRA, T. T. B. **Prospecção de ativos biológicos com atividade larvicida para o controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.** 2019. 89f. Dissertação (Mestrado Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, 2019.

FONSECA-GONZÁLEZ, I.; QUIÑONES, M.L.; LENHART, A.; BROGDON, W.C. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. **Pest Management Science**, v. 6, p. 430–37. 2011

FREDERIKSEN, R.; PASPALIARI, D.K.; LARSEN, T.; STORGAARD, B.G.; LARSEN, M.H.; INGMER, H.; PALCI, M. M.; LEISNER, J. J. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. **Microbiology**, v. 159, p. 833-847, 2013.

FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 8, p. 604-610, 2010.

FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; NASCIMENTO, N. A.; COSTA, M.; REZENDE, A. M.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 50, p. 34-42, 2014.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000.

IBARRA, J.; RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.G.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.9, p. 5269-5274, 2003.

JUNG, Y. C.; KIM, S. U.; CÔTE, J. C.; LECADET, M. M.; CHUNG, Y. S.; BOK, S. H. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. Higo strain isolated from rice bran in Korea. **Journal of invertebrate pathology**, v. 71, n.1, p. 95-96, 1998.

KOTSAKIOZI, P.; GLORIA-SORIA, A.; CACCONE, A.; EVANS, B.; SCHAMA, R.; MARTINS, A.J.; POWELL, J.R. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.7, p.1-20, 2017.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LACEY, L.A. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Associatio, v. 23, n.2, p. 133-163, 2007.

LEKAKAM, H.; PROMDONKOV, B.; BOONSERM, P. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.132, p.125-131, 2015.

LIMA-CAMARA, T. N Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v.36, n. 50, p. 1-10, 2016.

LIMA, J.B.; DA-CUNHA, M.P.; SILVA, R.C.; GARLADO, A.K.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.; A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n.3, p. 329-333, 2003

LOZANO, L.C.; DUSSÁN, J. Synergistic activity between S-layer protein and spore-crystal preparations from *Lysinibacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* larvae. **Current Microbiology**, v. 74, p. 371-376, 2017.

LOZANO, L.; AYALA, J.; DUSSÁN, J. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 20, p. 37-41, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Coordenação Geral de Vigilância das Arboviroses** (Boletim Epidemiológico), v. 51, n. 12, p. 1-35, 2020.

MONNERAT, R.G.; SILVA, S.F.; SILVA-WERNECK, J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 65p. (Documentos, 60).

MOYES, C.L.; VONTAS, J.; MARTINS, A.J.; NG, L.C.; KOOU, S.Y.; DUSFOUR, I.; RAGHAVENDRA, K.; PINTO, J.; CORDEL, V.; DAVID, J.P.; WEETMAN, D. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n.7, p. 1-20. 2017.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.

OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; AZEVEDO, E. B.; GARCIA, B. O.; SANTOS, S. F.; AGUIAR, R. W. S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus, (Díptera: Culicidae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n.2: p. 37-43, 2011.

OTSUKI, K.; GUAYCURUS, T. V.; VICENTE, A. C. P. *Bacillus sphaericus* entomocidal potential determined by polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, n.1, p. 107-108, 1997.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

POLANCZYK, R.A **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**, 2004. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2004.

PRAÇA, L. B.; JUSTEN, F.; BURGAMN, A.; MONNERAT, R. G. **Comparação intralaboratorial de dois métodos para determinação de CL50 de *Bacillus thuringiensis* toxicas a larvas de *Aedes aegypti***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 14 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 305), 2013.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D.; GERHEIM, S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R. MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

RASHAD, F.; SALEH, W. D.; NASR, M.; FATHY, H. Identification of mosquito larvicidal bacterial strains isolated from north Sinai in Egypt. **AMB Express**. v. 2, n. 9, p. 2-9. 2012.

ROJAS-PINZÓN, P. A.; DUSSÁN, J. Efficacy of the vegetative cells of *Lysinibacillus sphaericus* for biological control of insecticide-resistant *Aedes aegypti*. **Parasit Vectors**, v.10, n. 231, p. 2-7, 2017.

RÜCKERT, C.; WEGER-LUCARELLI, J.; GARCIA-LUNA, S.M.; YOUNG, M.C.; BYAS, A.D.; MURRIETA, R.A.; FAUVER, J.R.; EBEL, G.D. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**. v.8, 9p., 2017.

RUNGROD, A.; TJAHAJA, N.; SOONSANGA, S.; AUDTHO-UTAMATHO, M.; PROMDONKOY, B. *Bacillus sphaericus* Mtx1 and Mtx2 toxins co-expressed in *Escherichia coli* are synergistic against *Aedes aegypti* larvae. **Biotechnology letters**, v. 31, n.4, p. 551-555, 2009.

SANTOS, E. M. de M. **Avaliação do impacto de um biolarvicida à base de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) para controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti***, 2017. 220f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 2017.

SILVA-WERNECK, J.O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 5p. (Circular Técnica, 10).

SCUDELER, C. G. da S. ***Culex quinquefasciatus* (Díptera: culicidae): avaliação da susceptibilidade aos inseticidas Temephos, Vectolex WG e Natular**, 2013, 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

WERMELINGER, E. D.; FERREIRA, A. P. Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 4, n. 3, p. 49-54, set. 2013. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232013000300007&lng=pt&nrm=iso>, acesso em 28 abr. 2020.

WIRTH, M.C.; YANG, Y.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A.; BERRY, C. Mtx toxins synergize *B. sphaericus* and Cry11A against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 19, p.6066–6071, 2007.

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.

CAPÍTULO III: MONTAGEM E ANÁLISE PARCIAL DO GENOMA DE ESTIRPES DE *Bacillus* sp. COM ATIVIDADE INSETICIDA A *Spodoptera frugiperda* E *Anthonomus grandis*

RESUMO: Diferentes espécies bacterianas como as dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e *Lysinibacillus* possuem múltiplos fatores de virulência com atividade inseticida e apresentam elevado potencial como agentes de controle biológico. Recentemente, foi observado que as estirpes de *Bacillus* sp. S2728 e S2744 da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa mostrou atividade inseticida para *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*, e também apresentou inclusões cristalinas, levando a crer que se tratavam de duas cepas de *B. thuringiensis* (Bt). Porém, a análise de genes clássicos para *Bt*, via reação em cadeia da polimerase (PCR), não geraram nenhuma amplificação, sugerindo que outros fatores poderiam estar associados a toxicidade dessas estirpes. O objetivo deste capítulo foi analisar a sequência genômica das estirpes 2728 e 2744 de *Bacillus* sp. ativas, visando identificar novos genes que pudessem estar associados as suas respectivas atividades inseticidas. O DNA total purificado foi sequenciado utilizando o sistema de sequenciamento Novaseq. As sequências de DNA das estirpes 2728 e 2744 foram comparadas com as sequências de diferentes espécies de *Bacillus* presentes em um banco de genomas previamente montadas. Os resultados permitiram concluir que as mesmas pertencem ao complexo do grupo *B. cereus lato sensu*, já que as análises *in silico* dos genes clássicos de *B. thuringiensis* e *B. cereus strictu sensu* não foram positivos. Por outro lado, a análise das sequências por BLASTn dos ORFs mostrou a presença de um gene responsável por codificar uma proteína do grupo de Proteínas Indutoras de Necrose e etileno (NEP Like Proteins - NLP). Embora existam poucos relatos sobre o efeito de proteínas do grupo NPLs para invertebrados, os complexos proteicos presentes nas estirpes 2728 e 2744 dão indícios da atividade dessas proteínas através de um mecanismo de ação totalmente novo, por meio do reconhecimento dos açúcares presentes na membrana intestinal do inseto.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus cereus lato sensu*. análise *in silico*. Nep-1. *Spodoptera frugiperda*. *Anthonomus grandis*.

CHAPTER III: ASSEMBLY AND PARTIAL ANALYSIS OF THE GENOME OF *Bacillus* sp. WITH INSECTICIDE ACTIVITY *Spodoptera frugiperda* E *Anthonomus grandis*

ABSTRACT: Different bacterial species such as the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* and *Lysinibacillus* have multiple virulence factors with insecticidal activity and, therefore, may have high potential as new biological control agents. Recently, strains of *Bacillus* sp. S2728 and S2744 of the Entomopathogenic Bacteria Collection Genetic Embrapa Resources and Biotechnology, showed insecticidal activity for *Spodoptera frugiperda* and *Anthonomus grandis*, and also presented crystalline inclusions, leading to the belief that there were two strains of *B. thuringiensis* (Bt). However, the analysis of classical genes for Bt, via polymerase chain reaction (PCR), did not generate any amplification, suggesting that other factors could be associated with the toxicity of these strains. The purpose of this chapter was to analyze the genomic sequence of strains 2728 and 2744 of *Bacillus* sp. active against *A. grandis* and *S. frugiperda*, aiming to identify new genes that could be associated with their respective insecticidal activities. The purified total DNA was sequenced using the Novaseq sequencing system, with the sequencing parameters 150 bp PE, ~ 2Gb / sample and the assembly of the reads using the Truseq DNA library 350 bp. The DNA sequences of strains 2728 and 2744 were compared with the sequences of different *Bacillus* species present in a genome bank previously assembled at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, however, the results obtained so far only allowed the conclusion that they belong to the complex of the *B. cereus lato sensu* group, since the *in silico* analyzes of the classic genes of *B. thuringiensis* and *B. cereus strictu sensu* were not positive. On the other hand, the BLASTn sequence analysis of the ORFs showed the presence of a gene responsible for encoding a protein in the group of Necrosis-Inducing Proteins and ethylene (NEP Like Proteins - NLP). Although there are few reports on the effect of proteins of the NPLs group for invertebrates, the protein complexes present in strains 2728 and 2744 give evidence of the activity of these proteins through a totally new mechanism of action, through the recognition of the sugars present in the intestinal membrane of the insect, mediated by the binding of hemolytic lectin or hemagglutinin.

KEYWORDS: *Bacillus cereus lato sensu*. *in silico* analysis. Nep-1. *Spodoptera frugiperda*. *Anthonomus grandis*.

1. INTRODUÇÃO

O grupo *Bacillus cereus* (Firmicutes: Bacillaceae), também chamado *B. cereus lato sensu* compreende um grupo ecologicamente diverso e com um número crescente de espécies. Algumas delas são consideradas de grande importância médica, como *Bacillus anthracis* (agente etiológico do antraz), *Bacillus cereus* stricto sensu (patógeno oportunista envolvido em doenças transmitidas por alimentos), e espécies de importância agrícola, como *B. thuringiensis*, um agente microbiano amplamente utilizado para controle de insetos pragas, cujo principal fator inseticida está relacionado a inclusões paraesporais compostas principalmente por proteínas do tipo Cry e Cyt (DUNLAP, 2019; SCHMIDT; SCOTT; DYER, 2011).

Além de *B. thuringiensis*, outras espécies bacterianas como *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus popilliae*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus laterosporus* e *L. sphaericus* podem apresentar atividade inseticida devido a existência de múltiplos fatores de virulência, como quitinases, metaloproteases e citolisinas, sendo considerado como novos agentes em potencial para uso no controle biológico (MONNERAT et al., 2020 ; CAI et al., 2007; NISHIWAKI et al, 2007; FEDHILA; NEL; LERECLUS, 2002)

Recentemente, foi observado que as estirpes de *Bacillus* sp. S2728 e S2744, da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, apresentaram atividade inseticida para o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* e o coleóptero *Anthonomus grandis*, duas das pragas mais prejudiciais as culturas do milho e algodão em território brasileiro. Ambos os materiais foram isolados a partir de amostras de solo de áreas de produção agrícola e foram caracterizados morfológicamente, bioquimicamente e molecularmente (capítulo II). Para essas duas estirpes, foram observadas inclusões cristalinas e perfil proteico com polipeptídios variando de 180 a 10 kDa e por isso foram previamente caracterizadas como duas estirpes de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Porém, a análise de genes clássicos para Bt (dados não mostrados) via reação em cadeia da polimerase (PCR) não apresentaram nenhuma amplificação, sugerindo que outros fatores poderiam estar associados a toxicidade dessas cepas.

Assim, o objetivo deste capítulo foi analisar a sequência genômica dessas duas cepas de *Bacillus* sp. ativas contra espécies de importância agrícola (*Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*) visando identificar potenciais genes inseticidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ISOLADOS BACTERIANOS

As estirpes de *Bacillus* sp., 2728 e 2744, pertencem a coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ambas foram isoladas a partir de amostras de solo de áreas de produção agrícola dos municípios de Turvelândia, GO (2728) (17°48'24.5"S 50°19'01.5"W) e São Desidério, BA (2744) (13°08'56"S/046°06'00.2"W) respectivamente

2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E DOS GENES DE TOXINAS PRESENTES NAS BACTÉRIAS

Para se determinar as espécies as quais as duas estirpes pertencem, e para a identificação dos genes de toxinas, os genomas completos foram sequenciados, seguindo os seguintes passos.

2.2.1. Extração do DNA

O DNA total de cada estirpe foi obtido a partir da cultura semeada por 16 horas em meio Embrapa sólido a 28 °C. Uma porção desse material foi retirado com auxílio de alça descartável estéril e adicionado a um microtubo de polipropileno de 1,5 ml contendo 200 µL de água ultrapura Milli-Q® e 2 µL de lisozima (25 mg/mL). A amostra foi bem homogeneizada e em seguida incubada em banho-maria por 2 horas a 37 °C. Decorrido esse período, a extração de DNA foi realizada utilizando o kit Wizard genomic DNA purification (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando-se o protocolo e o kit QuantiFluor® ONE dsDNA System desenvolvido para o equipamento Quantus™ Fluorometer e a avaliação da qualidade do DNA avaliada pela razão A_{260}/A_{280} por meio do espectrofotômetro Picodrop.

2.2.2. Sequenciamento do genoma

O DNA total purificado foi sequenciado pela Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) utilizando o sistema de sequenciamento Novaseq com os parâmetros de sequenciamento 150 bp PE, ~2Gb/sample e a montagem dos *reads* usando a biblioteca Truseq DNA library 350 bp.

2.2.3. Montagem de novo

A remoção dos *reads* de baixa qualidade, bases e adaptadores de sequenciamento foi feita com o programa fastq-mcf usando os seguintes parâmetros: Phred score 25, tamanho da janela $\frac{1}{4}$. O genoma foi montado com o SPAdes v3.10 no modo *careful*. Para verificar a qualidade da montagem, os *reads* foram mapeados de volta para *contigs* com o bowtie2, o arquivo de mapeamento foi processado com o samtools.

2.2.4. Anotação e análise de genoma

O genoma foi anotado com o RAST usando o esquema RASTtk. A análise funcional foi realizada usando as ferramentas incorporadas no portal do SEED. A previsão do CAZymes foi feita usando a meta dbCANservidor. A identidade média dos nucleotídeos foi calculada usando o script ani.rb (<https://github.com/Imrodriguezr/enveomics>) e probabilidade de ser uma nova espécie ou subespécie foi avaliada com o GGDC 2.1 (ZININA et al., 2019).

Para identificação das duas estirpes, foi feita a análise do genoma total, que foi comparado com um banco de genomas elaborado pelo Laboratório de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A identificação contou ainda com a análise da região 16S do DNA ribossomal. Foi realizado ainda um estudo de identidade através de BLAST para identificação dos genes de toxinas clássicas de *B. thuringiensis*, *cry*, *cyt*, *vip* e *sip*. Além desses genes, foram analisados os genes característicos de *B. cereus sensu stricto*: *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytdK*, *bceT* e *entFM* e do *cluster* gênico para a cereulide (*nrps*). Realizou-se também a busca por outras toxinas, tais como, proteínas do complexo de toxinas Tc e outras que podem ser encontradas em *Bacillus* como NLP (Nep-like proteins).

A identificação dos genes que codificam as proteínas Nep-1 nas estirpes 2728 e 2744 foi feita utilizando-se os algoritmos disponíveis no programa Geneious R10.1 (KEARSE et al., 2012). Em seguida, a determinação do *e-value*, cobertura, identidade e descrição da sequência de DNA e da proteína correspondente foi feito por BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A determinação da composição de nucleotídeos do gene e sequência proteica foi obtida pelos algoritmos disponíveis no *site Sequence Manipulation Suite* (<https://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>). Já a determinação da estrutura tridimensional da proteína foi feita pelo programa SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA PORÇÃO INTRACELULAR E SOLÚVEL

As estirpes também foram caracterizadas quanto ao perfil de proteínas.

2.3.1. Extração de proteínas

Para extração proteica da porção intracelular as amostras foram cultivadas em 40 mL meio Embrapa por 24 horas em incubador rotativo, a aproximadamente 27°C. Após esse período foi realizada a microscopia para averiguação da qualidade da amostra e verificar se a mesma não apresentava nenhum sinal de contaminação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi reservado para liofilização e o Pellet foi ressuspenso em 200 µl de solução de Tris-HCL 10 mM (pH 8,0), contendo 20% de sacarose e SDS 0,125%. Também foi adicionado 20 µl de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e amostrafoi acondicionado por 10 minutos no geloe centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 500 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂ 0,5 mM) e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada novamente por 5 minutos a 12000 rpm a 4 °C e o sobrenadante reservado para análise do perfil proteico.

Para extração da porção solúvel, cerca de 40 mL do sobrenadante obtido a partir da centrifugação do material crescido por 24 h foi filtrado em filtro 0,40 µm e reservado para ser liofilizado juntamente com o sobrenadante não filtrado. Após a

liofilização, o material foi ressuspensão na menor quantidade possível de água estéril (aproximadamente 500 µL) e armazenado em freezer até análise do perfil proteico.

2.3.2 Análise do perfil proteico (SDS-PAGE)

A análise das proteínas foi feita em gel de Poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE). Para isto, adicionou-se uma alíquota de 20 µL da solução tampão de proteína 5X (1,6 mL de SDS 10%, 0,4 mL 2-β-mercaptoetanol, 1 mL de 0,5 M Tris-HCl pH 6.8; 0,2 mL de azul de bromofenol 0,05%, 4 mL de água destilada; 0,8 mL de glicerol) a 20 µl de cada porção preparada (pellet, sobrenadante e sobrenadante filtrado), homogeneizou-se bem, e foi colocada sob aquecimento a 100 °C e 5 minutos. Decorrido esse tempo 20 µl de cada uma das amostras foi aplicada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%. Para efeito de comparação também foi utilizado 8 µl de marcador de proteína (TrueColor High Range Protein Marker Sinapse S260®). A eletroforese foi realizada em um aparelho de eletroforese vertical (Biorad), contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%) sob voltagem constante de 120 V por aproximadamente 2 horas.

Ao final da corrida, o gel foi transferido para um recipiente de acrílico onde foi incubado com solução de fixação (40% de metanol, 10% ácido acético e 50% água destilada) por 12h. Após esse período, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50% por 20 minutos sob agitação moderada, e depois da última lavagem, adicionou-se tiosulfato de sódio (20 mg para 100 ml de água destilada) por um minuto e lavou-se o gel com água destilada por mais 3 vezes por 20 segundos. Retirou-se água, e colocou-se a solução de nitrato de prata (200 mg AgNO₃ + 74 µl de formaldeído em 100 ml de água destilada) em quantidade suficiente para cobrir o gel, que ficou sob agitação de 20 minutos. Em seguida o gel foi lavado com água destilada três vezes por 20 segundos e depois, foi colocada a solução reveladora (6 g de Na₂CO₃ + 50 µl de formaldeído + 2 ml da solução de tiosulfato de sódio em 100 ml de água destilada). o gel agitado ficou sob agitação manual até começar a revelação das bandas. O processo de revelação foi interrompido pela lavagem do gel com solução de parada (45 ml de metanol + 10% 10 ml ácido acético em 45 ml de água destilada).

2.4 BIOENSAIOS DAS PROTEÍNAS DAS ESTIRPES COM *Spodoptera frugiperda*

Os bioensaios foram realizados com *Spodoptera frugiperda* conforme metodologia descrita nos ensaios seletivos (capítulo 2). Foram testados três extratos, o pellet (concentrado de esporos e cristais), sobrenadante e sobrenadante filtrado.

A extração da porção solúvel (sobrenadante e sobrenadante filtrado) foi realizada com intuito de verificar se haveria diferença ou não na mortalidade de cada uma dessas porções e a partir de então, ter algum indício se a atividade dessas estirpes estaria relacionada a porção não solúvel ou ao material concentrado no pellet, seja a porção intracelular ou as inclusões cristalinas visualizadas pela microscopia eletrônica, conforme observado no Capítulo 2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA total purificado da estirpe 2728 foi de 24 ng com a razão de pureza A_{260}/A_{280} igual a 1,7 e a estirpe 2744 foi de 31 ng com razão A_{260}/A_{280} igual a 1,8. Ambos os valores se enquadram nos valores médios obtidos para relação A_{260}/A_{280} de diferentes trabalhos de extração de DNA para espécies de *Bacillus*, refletindo em um material puro e adequado para as análises moleculares (MENDEZ-TRUJILLO et al., 2013; CHENG; JIANG, 2006).

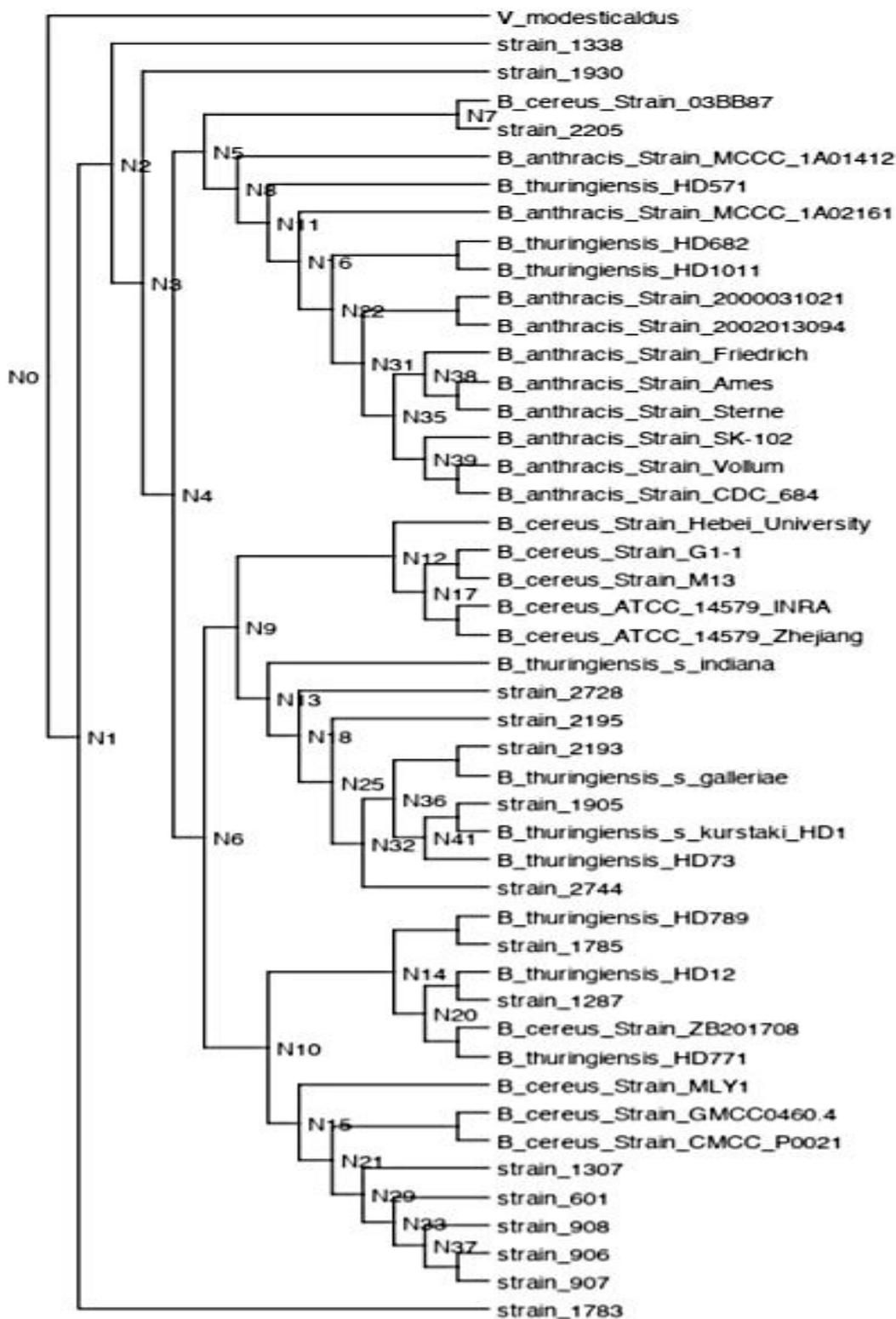
O número total de bases, *reads*, conteúdo de GC (%), Q20 (%) e Q30 (%) foram calculados para as duas amostras. Para a estirpe 2744, foram produzidas 19.387.976 *reads* e o total de bases lidas foi de 2,9 Gpb. O conteúdo de GC (%) foi 35,42% e Q30 foi de 91,37%. Já para a estirpe 2728 foram produzidas 20.386.726 *reads* e o total de bases lidas foi de 3,0 Gpb. O conteúdo de GC (%) foi 35,33% e Q30 foi de 91,10%.

A análise da estrutura genômica permitiu identificar apenas o DNA cromossômico e nenhum plasmídeo em ambas as estirpes. Pela predição de genes, foram identificados 5662 genes na estirpe 2728 e 5870 genes para a estirpe 2744.

As sequências de DNA das estirpes 2728 e 2744 foram comparadas com as sequências de diferentes espécies de *Bacillus* presentes em um banco de genomas previamente montado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A obtenção de um dendograma de similaridade demonstrou que as estirpes 2728 e 2744 foram alocadas em um grupo com características intermediárias entre *B. cereus strictu sensu* e *B. thuringiensis*, indicando que estas pertençam ao complexo do grupo *B.*

cereus lato sensu mas que ainda não é possível a identificação precisa da espécie (Figura 01).

Figura 1. Cladograma de similaridade de várias estirpes de *B. thuringiensis*, incluindo as estirpes 2728 e 2744 e outras espécies de *Bacillus*. A estirpe 2728 encontra-se no nodo N13 e a estirpe 2744 no nodo



N32.

Fonte: A autora

Também foi realizada a análise por BLAST da sequência 16S (Figura 2), o que também não resultou em identificação precisa da estirpe 2728 (Tabela 1).

Figura 2. Sequência de DNA correspondente a região 16S da estirpe 2728.

1	ATCAATTCTC	CATAGAAAGG	AGGTGATCCA	GCCGCACCTT	CCGATACGGC	TACCTTGTTA	CGACTTCACC	CCAATCATCT
81	GTCCACCTT	AGGCGGCTGG	CTCCAAAAG	GTTACCCAC	CGACTTCGGG	TGTTACAAAC	TCTCGTGGTG	TGACGGGCGG
161	TGTGTACAAG	GCCCGGAAC	GTATTCACCG	CGGCATGCTG	ATCCGCGATT	ACTAGCGATT	CCAGCTTCAT	GTAGGCGAGT
241	TGCAGCCTAC	AATCCGAAC	GAGAACGGTT	TTATGAGATT	AGCTCCACCT	CGCGGTCTTG	CAGCTCTTTG	TACCGTCCAT
321	TGTAGCACGT	GTGTAGCCCA	GGTCATAAGG	GGCATGATGA	TTTGACGTCA	TCCCCACCTT	CCTCCGGTTT	GTCACCGGCA
401	GTCACCTTAG	AGTGCCCAAC	TTAATGATGG	CAACTAAGAT	CAAGGGTTGC	GCTCGTTGCG	GGACTTAACC	CAACATCTCA
481	CGACACGAGC	TGACGACAAC	CATGCACCAC	CTGTCACTCT	GCTCCCGAAG	GAGAAGCCCT	ATCTCTAGGG	TTTTCAGAGG
561	ATGTCAAGAC	CTGGTAAGGT	TCTTCGCGTT	GCTTCGAATT	AAACCACATG	CTCCACCGCT	TGTGCGGGCC	CCCCTCAATT
641	CCTTGTAGTT	TCAGCCTTGC	GGCCGTACTC	CCCAGGCGGA	GTGCTTAATG	CGTTAACTTC	AGCACTAAAG	GCGGAAACC
721	CTCTAACACT	TAGCACTCAT	CGTTTACGGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	ATCCTGTTTG	CTCCCCACGC	TTTCGCGCCT
801	CAGTGTCACT	TACAGACCAG	AAAGTCGCCT	TCGCCACTGG	TGTTCTTCCA	TATCTCTACG	CATTTACCG	CTACACATGG
881	AATTCCACTT	TCCTCTTCTG	CACTCAAGTC	TCCCAGTTTC	CAATGACCCT	CCACGGTTGA	GCCGTGGGCT	TTCACATCAG
961	ACTTAAGAAA	CCACCTGCGC	GCGCTTTACG	CCCAATAATT	CCGATAACG	CTTGCCACCT	ACGTATTACC	GCGGCTGCTG
1041	GCACGTAGTT	AGCCGTGGCT	TTCTGGTTAG	GTACCGTCAA	GGTGCCAGCT	TATTCAACTA	GCACTTGTTT	TTCCCTAACA
1121	ACAGAGTTTT	ACGACCCGAA	AGCCTTCATC	ACTCACGCGG	CGTTGCTCCG	TCAGACTTTC	GTCCATTGCG	GAAGATTTCC
1201	TACTGCTGCC	TCCCGTAGGA	GTCTGGGCCG	TGTCTCAGTC	CCAGTGTGGC	CGATCACCCCT	CTCAGGTCGG	CTACGCATCG
1281	TTGCCTTGGT	GAGCCGTTAC	CTCACCAACT	AGCTAATGCG	ACGCGGGTCC	ATCCATAAGT	GACAGCCGAA	GCCGCCTTTC
1361	AATTTGGAAC	CATGCAGTTC	AAAATGTTAT	CCGGTATTAG	CCCCGGTTTC	CCGGAGTTAT	CCCAGTCTTA	TGGGCAGGTT
1441	ACCCACGTGT	TACTCACCCG	TCCGCCGCTA	ACTTCATAAG	AGCAAGCTCT	TAATCCATTC	GCTCGACTTG	CATGTATTAG
1521	GCACGCCGCC	AGCGTTCATC	CTGAGCCAGG	ATCAAACCTCT	CCAATAAAGT	TAGTTTGTCT	AGCATCTAAA	ATAAAAATTG
1601	ACGTTTCACG	TTGTTTGTTC	CGTT					

Fonte: A autora

Tabela 1. Resultado de BLAST obtido da sequência 16S da estirpe 2728.

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410 chromosome, complete genome	3000	41934	100%	0.0	100.00%	CP050183.1
<i>Bacillus wiedmannii</i> PL1 DNA, complete genome	3000	41884	100%	0.0	100.00%	AP022643.1
<i>Bacillus cereus</i> strain SGAir0260 chromosome	3000	35895	100%	0.0	100.00%	CP028009.1
<i>Bacillus</i> sp. A260 chromosome, complete genome	3000	41895	100%	0.0	100.00%	CP046398.1
<i>Bacillus albus</i> strain DLOU-Yingkou chromosome, complete genome	3000	41918	100%	0.0	100.00%	CP040344.1
<i>Bacillus bombysepticus</i> str. Wang, complete genome	3000	38973	100%	0.0	100.00%	CP007512.1
<i>Bacillus tropicus</i> strain AOA-CPS1 chromosome	2994	41801	100%	0.0	99.94%	CP049019.1
<i>Bacillus luti</i> strain FJ chromosome, complete genome	2994	41879	100%	0.0	99.94%	CP040336.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain FDAARGOS_695 chromosome	2988	32760	100%	0.0	99.88%	CP054816.1
<i>Bacillus paranthracis</i> strain MN1F chromosome, complete genome	2988	38718	100%	0.0	99.88%	CP048687.1
<i>Bacillus paranthracis</i> strain MN1F chromosome, complete genome	2988	38718	100%	0.0	99.88%	CP048687.1

⁽¹⁾Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos da sequência analisada, ⁽⁴⁾ cobertura da sequência, ⁽⁵⁾ expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto relacionado, ⁽⁷⁾ organismo que possui a sequência, com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade.

Observa-se que várias estirpes de *Bacillus* foram identificadas com *e-value* de 0,0, ou seja, as chances de obter uma sequência já descrita (no banco com o qual foi comparado) idêntica a sequência analisada é nula. A cobertura da sequência 16S da estirpe 2728 encontrou cobertura de 100% com outras sequências de *Bacillus* previamente depositadas no Genbank. As identidades variaram de 100% a 99,88% o

que não permite uma identificação precisa da espécie, podendo-se confirmar, apenas, o gênero *Bacillus*.

Partiu-se, então, para a análise do gene 16S da estirpe 2744, empregando-se o mesmo algoritmo de identificação e isolamento pelo programa Geneious. A partir desse procedimento identificou-se que a sequência de DNA completa corresponde a região 16S da estirpe 2744 (Figura 3).

Fonte: A autora

Figura 3. Sequência de DNA corresponde a região 16S da estirpe 2744.

```

1 ATCAATTCTC CATAGAAAGG AGGTGATCCA GCCGCACCTT CCGATACGGC TACCTTGTTA CGACTTCACC CCAATCATCT
81 GTCCACCTT AGGCGGCTGG CTCCAAAAG GTTACCCAC CGACTTCGGG TGTTACAAAC TCTCGTGGTG TGACGGGCGG
161 TGTGTACAAG GCCCGGAAC GTATTCACCG CGGCATGCTG ATCCGCGATT ACTAGCGATT CCAGCTTCAT GTAGGCGAGT
241 TGCAGCCTAC AATCCGAAC TGAACGGTT TTATGAGATT AGCTCCACCT CGCGGTCTTG CAGCTCTTTG TACCGTCCAT
321 TGTAGCACGT GTGTAGCCA GGTGATAAG GGCATGATGA TTTGACGTC TCCCCACCTT CCTCCGGTTT GTCACCGGCA
401 GTCACCTTAG AGTGCCCAAC TTAATGATGG CAACTAAGAT CAAGGGTTGC GCTCGTTGCG GGACTTAACC CAACATCTCA
481 CGACACGAGC TGACGACAAC CATGCACCAC CTGTCACTCT GCTCCGAAG GAGAAGCCCT ATCTCTAGGG TTTTCAGAGG
561 ATGTCAAGAC CTGGTAAGGT TCTTCGCGTT GCTTCGAATT AAACCACATG CTCCACCGCT TGTGCGGGCC CCCGTCAATT
641 CCTTTGAGTT TCAGCCTTGC GGCCGTACTC CCCAGGCGGA GTGCTTAATG CGTTAAC TTC GACTTAAAG GCGGAAACC
721 CTCTAACACT TAGCACTCAT CGTTTACGGC GTGGACTACC AGGGTATCTA ATCTGTTTG CTCCCCACGC TTTGCGCCT
801 CAGTGTCACT TACAGACCAG AAAGTCGCCT TCGCCACTGG TGTTCCTCCA TATCTCTACG CATTTACCG CTACACATGG
881 AATTCACCT TCCTCTTCTG CACTCAAGTC TCCAGTTTC CAATGACCCT CCACGGTTGA GCCGTGGGCT TTCACATCAG
961 ACTTAAGAAA CCACCTGCGC GCGCTTTACG CCCAATAATT CCGGATAACG CTTGCCACCT ACGTATTACC GCGGCTGCTG
1041 GCACGTAGTT AGCCGTGGCT TTCTGGTTAG GTACCGTCAA GGTGCCAGCT TATTCACCTA GCACTTGTTT TTCCCTAACA
1121 ACAGAGTTTT ACGACCCGAA AGCCTTCATC ACTCACGCGG CGTTGCTCCG TCAGACTTTC GTCCATTGCG GAAGATTCCC
1201 TACTGCTGCC TCCCGTAGGA GTCTGGGCCG TGTCTCAGTC CCAGTGTGGC CGATCACCTT CTCAGGTGCG CTACGCATCG
1281 TTGCCTTGGT GAGCCGTTAC CTCACCAACT AGCTAATGCG ACGCGGTCC ATCCATAAGT GACAGCCGAA GCCGCCTTTC
1361 AATTCGAAC CATGC

```

Fonte: A autora

Essa sequência então foi submetida a análise por BLAST para se identificar a espécie de *Bacillus* (Tabela 2). A análise por BLAST da sequência 16S gerou resultado semelhante ao da estirpe anterior de tal forma que também não foi possível realizar a identificação precisa da estirpe 2744 (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado de BLAST obtido da sequência 16S da estirpe 2728.

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410 chromosome, complete genome	2540	35563	100%	0.0	100.0%	CP050183.1
<i>Bacillus cereus</i> strain FDAARGOS_798 chromosome, complete genome	2540	35552	100%	0.0	100.0%	CP053954.1
<i>Bacillus</i> sp. RZ2MS9 chromosome, complete genome	2540	35530	100%	0.0	100.0%	CP049978.1
<i>Bacillus tropicus</i> strain AOA-CPS1 chromosome	2540	35491	100%	0.0	100.0%	CP049019.1
<i>Bacillus wiedmannii</i> PL1 DNA, complete genome	2540	35535	100%	0.0	100.0%	AP022643.1
<i>Bacillus toyonensis</i> strain BV-17 chromosome, complete genome	2540	35541	100%	0.0	100.0%	CP047044.1
<i>Bacillus albus</i> strain DLOU-Yingkou chromosome, complete genome	2540	35541	100%	0.0	100.0%	CP040344.1
<i>Bacillus luti</i> strain FJ chromosome, complete genome	2540	35547	100%	0.0	100.0%	CP040336.1
<i>Bacillus mobilis</i> strain ML-A2C4 chromosome, complete genome	2540	35487	100%	0.0	100.0%	CP031443.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. YBT-1520, complete genome	2540	32951	100%	0.0	100.0%	CP004858.1
<i>Bacillus bombysepticus</i> str. Wang, complete genome	2540	33023	100%	0.0	100.0%	CP007512.1

⁽¹⁾Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos sequência de analisada, ⁽⁴⁾ cobertura da sequência, ⁽⁵⁾ expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto relacionado, ⁽⁷⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade

Observa-se que várias estirpes de *Bacillus* foram identificadas com *e-value* de 0,0. A cobertura da sequência 16S da estirpe 2744 encontrou cobertura de 100% com outras sequências de *Bacillus* previamente depositadas no genbank. As identidades ficaram em 100% o que não permite uma identificação precisa da espécie, podendo-se confirmar, apenas, o gênero (*Bacillus*).

Partiu-se, então, para a tentativa de identificar *B. thuringiensis* ou *B. cereus* por meio da identificação de genes característicos dessas espécies. Os genes característicos de *B. cereus sensu stricto*: *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytdK*,

bceT e *entFM* e o *cluster* gênico para a cereulide (*nrps*) não foram detectados. Este pode ser considerado um fator positivo já que algumas cepas toxicogênicas de *B. cereus* podem ocasionalmente provocar doenças de origem alimentar, como êmese e diarreia o que poderia inviabilizar a utilização desses materiais como bioinsetidas (KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000; DIERICK et al., 2005).

A análise da presença dos genes das toxinas clássicas de *B. thuringiensis*, revelou a ausência dos genes *cry*, *cyt*, *vip* ou *sip*. Curiosamente, as imagens por microscopia eletrônica de varredura das duas estirpes evidenciaram a presença de cristais pequenos esféricos ou quase esféricos (Figura 05, capítulo I), e por isso era esperado que algum gene *cry* fosse encontrado. Contudo vale lembrar que *B. thuringiensis* não é o único microrganismo com habilidades de formação de cristais proteicos com atividade inseticida, havendo relatos para uma cepa cristalífera de *B. pumillus* ativa para mosca-da-fruta, *Ceratitis capitata* (MOLINA et al., 2010).

Por outro lado, a análise das sequências por BLASTn dos ORFs mostrou a presença de um gene responsável por codificar uma proteína na estirpe 2728, que apresentou 99,81% de identidade com uma toxina de uma cepa de *Bacillus thuringiensis* (WP_098562803.1) e também foi alinhada, com 95,15% de identidade com uma toxina de *Bacillus toyonensis* (WP_097980682.1), em ambos os casos as toxinas estão descritas como tóxicas a mosquitos (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação e identidade do GENE para estirpe 2728 por BLASTn no banco de dados de DNA (GenBank).

Description ⁽¹⁾	Query Cover ⁽²⁾	E-value ⁽³⁾	Identidade máxima obtida ⁽⁴⁾	Número de acesso para sequência alinhada ⁽⁵⁾
Mosquitocidal toxin protein (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	100%	0.0	99,81%	WP_098562803.1
Mosquitocidal toxin protein (<i>Bacillus toyonensis</i>)	100%	0.0	95,15%	WP_097980682.1

⁽¹⁾Sequência alinhada, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾ expect value, ⁽⁴⁾ Identidade máxima obtida, ⁽⁵⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade

Para estirpe 2744 a análise das sequências por BLASTn dos ORFs indicou a presença de um gene com 96,88% de identidade com dois genes plasmídias (pYC1)

da cepa YC-10 (CP011350.1) de *B. thuringiensis*, e também de um outro gene plasmidial da estirpe de *B. thuringiensis* ser. *kurstaki* strain HD 1 (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação e identidade do GENE para estirpe 2744 por BLASTn no banco de dados de DNA (GenBank).

Description ⁽¹⁾	Query Cover ⁽²⁾	E-value ⁽³⁾	Identidade máxima obtida ⁽⁴⁾	Número de acesso para sequência alinhada ⁽⁵⁾
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain YC-10 plasmid pYC1 (sequência completa)	100%	0.0	96.88%	CP011350.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed1, (sequência completa)	100%	0.0	96.88%	CP009998.1

⁽¹⁾Sequência alinhada, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾ expect value, ⁽⁴⁾ Identidade máxima obtida, ⁽⁵⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade

A partir da sequência de DNA dos genes selecionados para as duas estirpes, foi feito a predição da sequência de aminoácidos para uma proteína putativa. A sequência selecionada para 2728 apresentou identidade de 94% para uma proteína hipotética presente em diferentes espécies do grupo *Bacillus cereus* e identidade de 91,30% com uma proteína de *Bacillus cereus* tóxica a mosquito (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação e identidade da proteína por BLASTp no banco de dados de DNA por DNA para estirpe 2728.

Description ⁽¹⁾	Query Cover ⁽²⁾	E-value ⁽³⁾	Identidade máxima obtida ⁽⁴⁾	Número de acesso para sequência alinhada ⁽⁵⁾
MULTISPECIES: proteína hipotética (<i>Bacillus cereus</i> group)	100%	0.0	94.00%	WP_016090318.1
mosquitocidal toxin protein (<i>Bacillus cereus</i>)	100%	0.0	91.30%	WP_098208562.1

⁽¹⁾Sequência alinhada, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾ expect value, ⁽⁴⁾ Identidade máxima obtida, ⁽⁵⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade

Para estirpe 2744, a sequência de aminoácidos apresentou homologia de 99,81 e 95,15% com uma proteína de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus toyonensis* respectivamente com atividade tóxica a mosquito (Tabela 6).

Tabela 6. Identificação e identidade da proteína por BLASTp no banco de dados de DNA por DNA para estirpe 2744.

Description ⁽¹⁾	Query Cover ⁽²⁾	E-value ⁽³⁾	Identidade máxima obtida ⁽⁴⁾	Número de acesso para sequência alinhada ⁽⁵⁾
mosquitocidal toxin protein (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	100%	0.0	99.81%	WP_098562803.1
mosquitocidal toxin protein (<i>Bacillus toyonensis</i>)	100%	0.0	95,15%	WP_097980682.1

⁽¹⁾Sequência alinhada, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾expect value, ⁽⁴⁾Identidade máxima obtida, ⁽⁵⁾organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade

Além da sequência de aminoácidos, obteve-se também predição para os respectivos domínios e funções dessas proteínas. Em ambos os casos tratam-se de proteínas do tipo Nep1, do grupo de Proteínas Indutoras de Necrose e Etileno (NEP Like Proteins - NLP), que é compartilhada até mesmo entre organismos filogeneticamente distantes, como bactérias Gram-positivas (*B. thuringiensis*, *B. halodurans*, *Streptomyces coelicolor*) e Gram-negativas (*Erwinia* spp., *Vibrio pommerensis*) e organismos eucariotos como fungos (*Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *Moniliophthora perniciosa*) e oomicetos dos gêneros *Phytium* e *Phytophthora* (ZUH et al., 2015; GIJZEN; NURNBERGER, 2006; PEMBERTON; SALMOND, 2004).

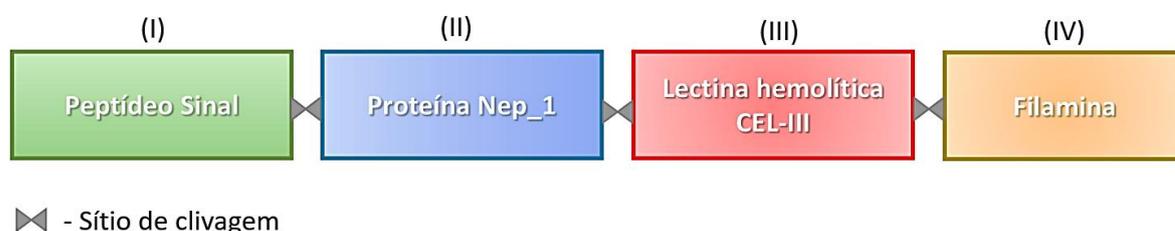
Embora as proteínas da família NLPs estejam associadas principalmente a necrose e produção de etileno em plantas dicotiledôneas (BAILEY et al., 1995; JENNINGS et al., 2001; FELLBRICH et al., 2002; KEATES et al., 2003; VERICA, et al., 2004), há relatos de proteínas desse grupo em microrganismos que não são fitopatogênicos, como *B. halodurans* e *B. thuringiensis* (ZUH et al., 2015), com indícios que o papel das NLPs não se restringe apenas a patogenicidade de plantas dicotiledôneas (ZAPAROLI, 2012). Zuh e colaboradores (2015), por exemplo, através da análise genômica comparativa entre duas linhagens patenteadas de *B. thuringiensis* (HD-1 e YBT-1520), observaram a presença dos genes *pft* e *nep1*,

sugerindo que os mesmos poderiam estar relacionados a elevada atividade inseticida dessas duas cepas.

Outro ponto a ser considerado, é que essas proteínas da família NLPs apresentam alto nível de conservação na sua sequência de genes, até mesmo se tratando de genomas de organismos distantes filogeneticamente, sugerindo que possa haver uma função comum para essas proteínas (ZAPAROLI, 2012). Alguns indícios dessa dupla atividade podem ser observados em uma proteína putativa de *B. thuringiensis* de dois domínios “Nel”, que apresenta um desses domínios semelhantes à Nep1 e um outro composto por um domínio de lectina tipo ricina B (RUAN et al, 2015). Nesta pesquisa, os autores destacaram a capacidade da proteína “Nel” em causar necrose nos tecidos foliares de *Arabidopsis thaliana*, como também, induzir a morte celular por necrose no nematóide *Caenorhabditis elegans*, sendo o intestino o seu principal alvo (RUAN et al, 2015).

A análise da sequência de aminoácidos obtida para a estirpe 2728, sugere que a proteína total tem massa molecular de 56,62 kDa, composta por um peptídeo sinal ligado a proteína Nep_1 que apresenta massa igual a 24,33 kDa, um domínio para lectina hemolítica Cel-III e um último domínio para filamina-B, todos interligados por sítios de clivagem para quimotripsina/tripsina (Figura 3).

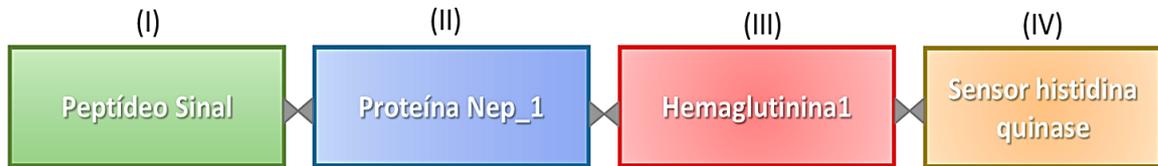
Figura 3. Esquema da estrutura provável do complexo proteico encontrado para Nep1 da estirpe S2728. A proteína total teria massa aproximada de 57 kDa, sendo composta por um peptídeo sinal na porção N-terminal (I) que está ligado a Nep_1 (24 kDa) (II) e esta, por sua vez, encontra-se aderida a um domínio para lectina hemolítica Cel-III (III) e, por último, a um domínio para filamina-B (IV).



Fonte: A autora

Para a estirpe 2744 também foi observada uma estrutura semelhante. Neste caso, a proteína total apresentou massa de 57,19 kDa, e é composta por um peptídeo sinal aderido a um sítio de clivagem para quimiotripsina/tripsina que faz a ligação com a porção da proteica da Nep_1 (24,79 kDa) e esta, por sua vez, se liga a um segundo sítio de clivagem para endopetidase/proteinase K que está ligada a uma porção de hemaglutinina1 e que se liga a um sensor histidina quinase RisS (Figura 2).

Figura 4: Esquema da estrutura provável do complexo proteico encontrado para Nep1 da estripe S2744. A proteína total teria massa molecular aproximada de 57 kDa, sendo composta por um peptídeo sinal na porção N-terminal (I) que está ligado a Nep_1 (24 kDa) (II) e esta, por sua vez, encontra-se aderida a um domínio hemaglutinina I (III) e por último a um domínio para um sensor de histidina quinase (IV).



✂ - Sítio de clivagem

Fonte: A autora

De modo geral o peptídeo sinal geralmente se encontra localizado nas extremidades N-terminal do complexo proteico, e sua presença é determinante para entrada e transporte intracelular, o que pode influenciar diretamente nas funções biológicas de uma proteína, já que se configura como fator determinante da sua localização (BLOBEL; DOBBERSTEIN, 1975).

Já as proteínas Nep1, seja de origem bacteriana, fúngica ou oomiceta atuam no processo de morte celular e contribuem para a infecção do hospedeiro por destruição da membrana plasmática e citólise (OTTMANN et al., 2009). Para invertebrados, a atividade da proteína Nel, que apresenta um domínio semelhante a Nep1, provocou alterações na morfologia intestinal do nematoide *C. elegans*, que incluíam a separação do intestino da parede do corpo e constrições ao longo de intestino (RUAN et al, 2015).

As lectinas assim como as hemaglutininas, são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas) e tem habilidade de induzir a aglutinação de células ao interagirem com glicoconjugados presentes em superfícies celulares, facilitando com isso a ligação/adesão de bactérias às respectivas células hospedeiras, o que é considerado um pré-requisito básico para a colonização e infecção bacteriana (PAIVA et al., 2010). Para as lectinas, em alguns casos, também já foi observada a atividade entomotóxica para coleópteros, dípteros, hemípteros e lepidópteros, e a ação ocorre devido à resistência dessas moléculas à degradação proteolítica no trato digestivo de insetos (PAIVA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). A lectina hemolítica CEL-III faz parte do

complexo de proteínas formadoras de poros (HATAKEYAMA et al., 1994; HATAKEYAMA et al., 1996), com uma proteína composta por dois domínios de reconhecimento de carboidratos (domínios 1 e 2) e um domínio C-terminal (domínio 3) que é responsável pela oligomerização nas membranas celulares alvo. Acredita-se que após a ligação às cadeias de carboidratos da superfície celular através dos domínios 1 e 2, o domínio 3 se associa para formar poros transmembranares, levando à lise ou morte celular (UNNO; GODA; HATAKEYAMA, 2014).

A filamina faz parte do grupo de proteínas de ligação às actinas podendo apresentar diferentes funções, como motilidade celular, adesão, sinalização de receptores, ativação do canal iônico da membrana e estabilização e tráfico de proteínas (FENG; WALSH, 2004; ZHANG; BREITWIESER, 2005; NAKAMURA; STOSSEL; HARTWIG, 2011).

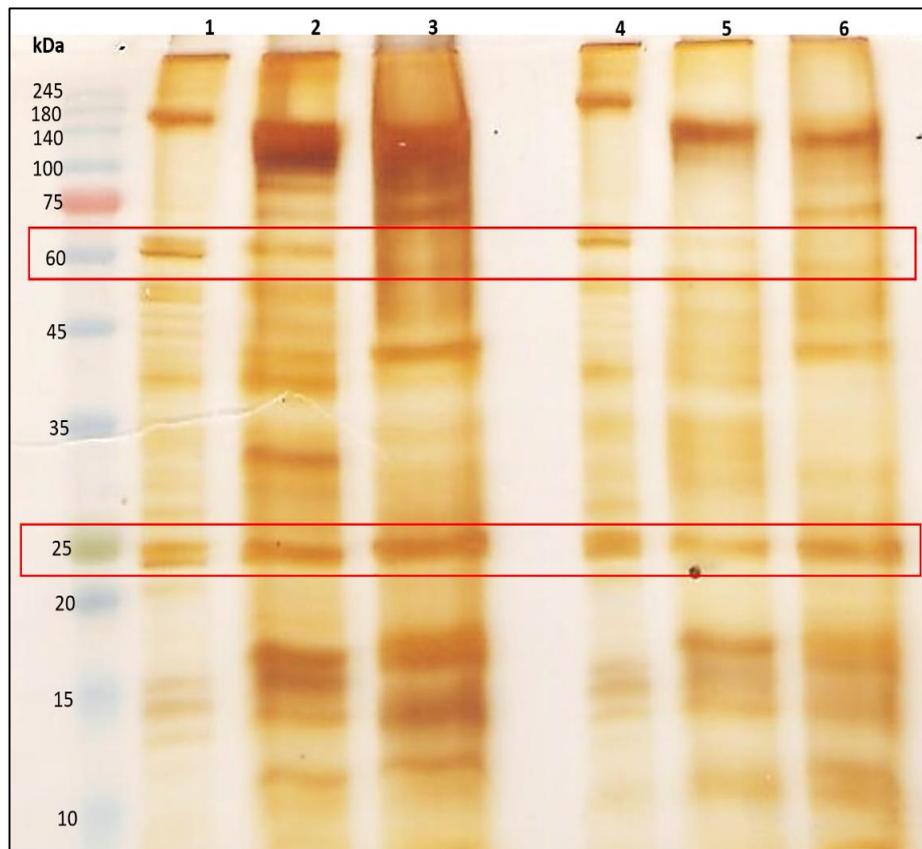
As proteínas censoras do tipo histidina-quinase, permitem que as bactérias “sintam” o ambiente em que se encontram, e adaptam seu comportamento em função deste, o que pode ser considerado particularmente relevante para interações patógeno-hospedeiro (GAO, STOCK 2009; ALM, HUANG, ARKIN 2006). Esse mecanismo pode ser observado em *Pseudomonas protegens*, uma rizobactéria que é benéfica para as plantas e, também, patogênica para insetos, com o sensor histidina cinase FitF considerado um regulador chave da produção de toxinas inseticidas dessa bactéria (KUPFERSCHMIED et al., 2014).

Embora ainda não seja possível afirmar que as proteínas Nep1 encontradas nos genomas estejam de fato envolvidas com a mortalidade causada pelas estirpes 2728 e 2744, as estruturas que compõe essas proteínas sugerem um possível novo mecanismo de ação através do reconhecimento dos açúcares presentes na membrana intestinal do inseto, haja vista que essa porção é composta por uma matriz peritrófica formada por quitina (polímero de N-acetilglicosamina e glicoproteínas) (TELLAM et al., 1999). Neste caso, poderia supor que o domínio lectina hemolítica ou a hemaglutinina, estariam envolvidas com a ligação as glicoproteínas ou glicolipídios do intestino do inseto, através do reconhecimento dos açúcares e a proteína Nep causaria a infecção do hospedeiro por destruição da membrana plasmática, como demonstrado por Ruan et al. (2015) para proteína Nel. Neste mesmo trabalho Ruan e colaboradores (2015) também sugerem que essa proteína com dupla atividade (vegetal e nematicida), poderia ser produto da transferência horizontal de genes, entre fitopatógenos e entomopatógenos, que mesmo sendo um mecanismo que ocorra em

baixa frequência, ainda assim é possível, principalmente se tratando de espécies que ocupem os mesmos nichos ecológicos como superfície da planta ou solo (RUAN et al., 2015).

A massa do complexo proteico, para as proteínas foram corroborados pelo gel SDS-PAGE (Figura 5), no qual é perceptível a formação de uma banda na altura de aproximadamente 60 kDa na porção correspondente ao pellet (porção intracelular) de ambas as estirpes, sendo que este mesmo fragmento vai perdendo a intensidade com o processamento da amostra (sobrenadante e filtrado), até tornar-se indetectável nas porções filtradas tanto para 2728 quanto para 2744 (poços 3 e 6), sugerindo que sejam fatores de natureza protéica e que são secretadas.

Figura 5: SDS-PAGE para 2728 pellet (1); 2728 sobrenadante (2); 2728 sobrenadante filtrado (3); 2744 pellet (4); 2744 sobrenadante (5) e 2744 sobrenadante filtrado (6). Marcador molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa) - Sinapse Inc.

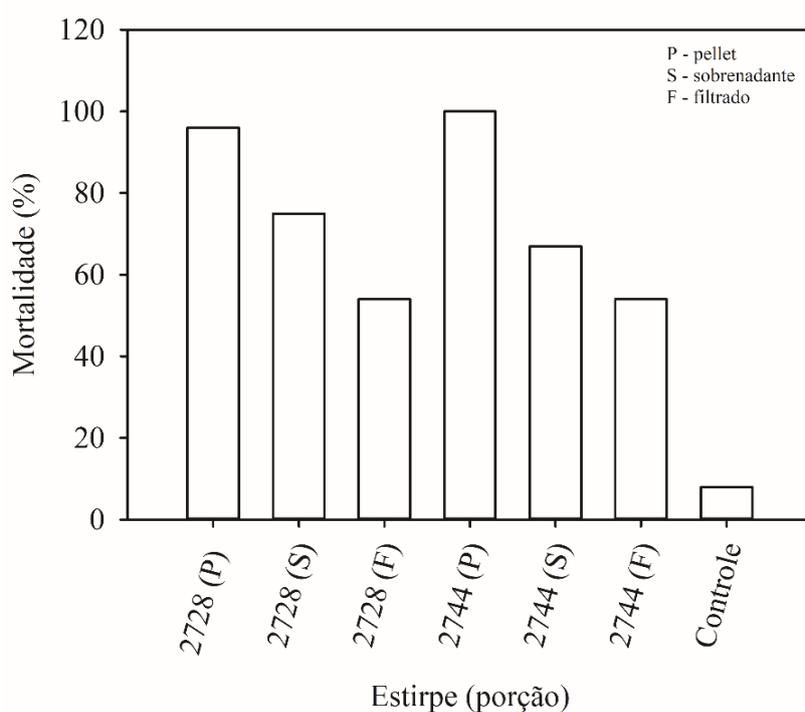


Fonte: A autora

A detecção na fração correspondente ao pellet sugere que a proteína é secretada no citoplasma e, posteriormente, é liberada no meio extracelular. Já o peptídeo de aproximadamente 25 kDa está presente em todas as porções analisadas, sugerindo que se trata de uma proteína solúvel e de baixa massa molecular e que não ficou retida nem mesmo no processo de filtragem. Contudo, em se tratando de uma proteína secretada, também haveria a possibilidade da mesma não estar presente na porção correspondente ao pellet, que tem a porção solúvel descartada durante o preparo. Fato que não ocorreu para as referidas amostras, considerando a banda de aproximadamente de 25 kDa. Nesse caso, poderia supor que essa proteína viesse mesmo a ser secretada, mas a sua liberação é lenta e, por isso, uma parte da mesma ainda poderia estar retida na porção intracelular no momento da extração, que ocorreu com 24 horas, antes da bactéria ter entrado na fase de esporulação.

Parte dessa suposição é corroborada através dos resultados dos bioensaios, onde observou-se um decréscimo na mortalidade das lagartas em função do processamento da amostra, obtendo as maiores proporções de mortalidade no pellet, seguido do sobrenadante e filtrado (Tabela 6).

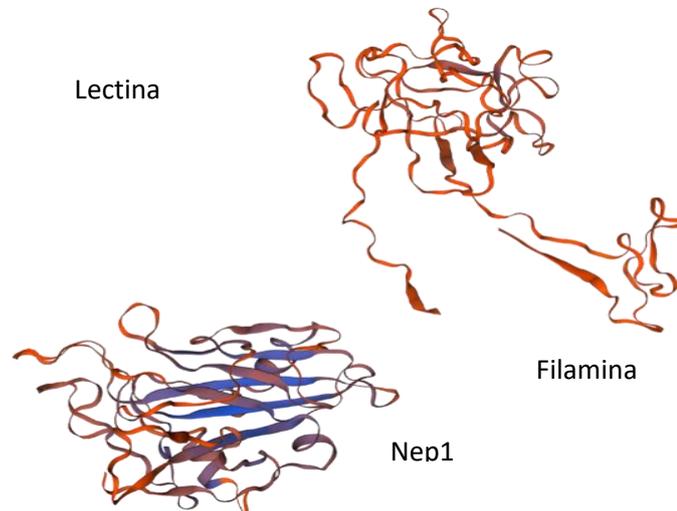
Figura 6. Percentagem de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* para as porções do pellet, sobrenadante e sobrenadante.



Fonte: A autora

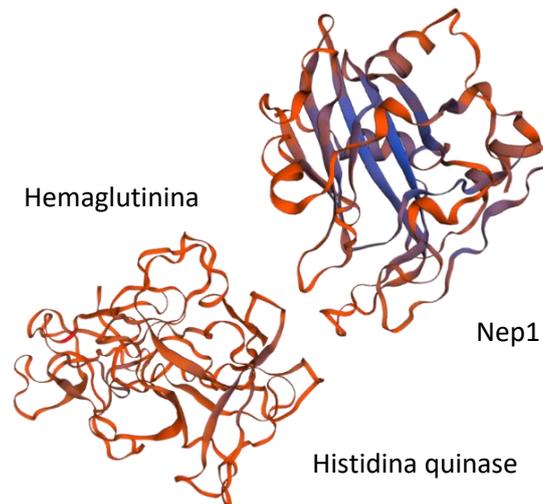
Utilizando a análise *in silico* foi possível determinar a estrutura molecular de complexo proteico, correspondente a proteína Nep-1 (Figura 7 e Figura 8).

Figura 7. Predição tridimensional da estrutura provável do complexo proteico encontrado para Nep1 da estirpe S2728.



Fonte: A autora

Figura 8. Predição tridimensional da estrutura provável do complexo proteico encontrado para Nep1 da estirpe S2744.



Fonte: A autora

Uma vez identificadas as proteínas e seus domínios estruturais, realizou-se a análise da identidade entre as duas sequências dos genes que codificam essas proteínas presentes nas estirpes 2728 e 2744. A identidade por BLASTn entre as sequências foi de 93,77% (Tabela 7).

Tabela 7. Análise por BLAST da identidade das sequências de DNA dos genes que formam o complexo Nep1 das estirpes 2728 e 2744.

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
None provided	2327	2327	100%	0.0	93.77%	Query_17963

⁽¹⁾Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos sequência de analisada, ⁽⁴⁾cobertura da sequência, ⁽⁵⁾expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto relacionado, ⁽⁷⁾organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade.

Realizou-se também, a análise da identidade por BLASTp das sequências de aminoácidos das proteínas encontradas nas duas estirpes. A identidade foi determinada em 88,01% (Tabela 8).

Tabela 8. Análise por BLAST da identidade das sequências de aminoácidos das proteínas que formam o complexo Nep1.

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
unnamed protein product	929	929	100%	0.0	88.01%	Query_45495

⁽¹⁾Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾pontuação do alinhamento, ⁽³⁾soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos sequência de analisada, ⁽⁴⁾cobertura da sequência, ⁽⁵⁾expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto relacionado, ⁽⁷⁾organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade.

Quando foi realizada a análise por BLASTp da sequência de aminoácidos da proteína Nep-1 encontrada nas estirpes 2728 e 2744, observou-se que a identidade entre elas foi de 88,13% (Tabela 9).

Tabela 9. Análise por BLAST e identidade das sequências de aminoácidos da proteína Nep1 nas estirpes 2728 e 2744

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
Unnamed protein product	404	404	100%	2,00E-150	88.13%	Query_31175

⁽¹⁾ Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾ pontuação do alinhamento, ⁽³⁾ soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos da sequência analisada, ⁽⁴⁾ cobertura da sequência, ⁽⁵⁾ expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto

relacionado, ⁽⁷⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Nep-1 nas estirpes 2728 e 2744 permitiu identificar posições na sequência das proteínas, nas quais foram encontradas diferenças nos aminoácidos (Tabela 10), e encontradas 25 mudanças ao todo (Figura 4).

Tabela 10. Análise por BLAST e identidade das sequências de aminoácidos da proteína Nep 1 descrita nas estirpes 2728 e 2744

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
404 bits(1039)	2,00E-150	Compositional matrix adjust.	193/219 (88%)	203/219 (92%)	0/219 (0%)

Figura 4. Alinhamento das sequências de aminoácidos para as estirpes 2744 e 2728. As diferenças entre as sequências estão destacadas em amarelo

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
404 bits(1039)	2e-150	Compositional matrix adjust.	193/219 (88%)	203/219 (92%)	0/219 (0%)
2728	YGDVIKALPQNASKIELDYAPVYDYDTDGCYATAAISPDGTTNPGLSLGGSP				60
2744	YGDVIKALPQNASKIELDYAPVYDYDTDGCYATAAISPDGTTNPGLSLGGSP				61
2728	RLENSNTYSRAKSNNGWTAIMYASYFEKDQSTSGPAAAGHRNDWEHTIVWA				120
2744	RLENSNTYSRAKSNNGWTAIMYASYFEKDQSTSGPAAAGHRNDWEHTIVWI				121
2728	YSAHGK WYTN SRSNVRFDGNHPKIVYHKD GAGTHAFRLANSNDEPPENYKHQWLHLPMVG				180
2744	YSAHGNWYTN PRSDVRFSGNHPKIVYHKDGLTHAFRLANSNDEPPENYKQWLQLPMVG				181
2728	WNGYPSSNIREKLMTTNFGDATLEIKDGRFEKALASAKP			219	
2744	WNGYPSHIREKLMTTDFGKATLEIKDKEFQEQALDSAKP			220	

Fonte: A autora

Também foi realizado o alinhamento por BLAST das sequências de aminoácidos das proteínas Hemolytic lectin CEL-III e Hemaglutinina I das estirpes 2728 e 2744, respectivamente. No qual foi observado uma identidade de 89,36% entre elas (Tabela 11).

Tabela 11. Análise por BLAST das sequências de aminoácidos das proteínas Hemolytic lectin CEL-III e hemaglutinina I das estirpes 2728

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
unnamed protein product	246	246	99%	1,00E-90	89.36%	Query_26365

⁽¹⁾ Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾ pontuação do alinhamento, ⁽³⁾ soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos da sequência analisada, ⁽⁴⁾ cobertura da sequência, ⁽⁵⁾ expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto relacionado, ⁽⁷⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Hemolytic lectin CEL-III na estirpe 2728 permitiu identificar posições na sequência das proteínas nas quais foram encontradas diferenças nos aminoácidos (Tabela 12). Foram encontradas 14 mudanças na sequência de aminoácidos entre as proteínas (Figura 5).

Tabela 12. Alinhamentos das duas proteínas e identificação dos aminoácidos diferentes.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
246 bits(629)	1,00E-90	Compositional matrix adjust.	126/141(89%)	134/141(95%)	0/141(0%)

Figura 5. Alinhamento das sequências de aminoácidos para proteínas Hemolytic lectin CEL-III nas estirpes 2728. As diferenças entre as sequências estão destacadas em amarelo

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
246 bits(629)	1e-90	Compositional matrix adjust.	126/141 (89%)	134/141 (95%)	0/141 (0%)
2728					60
2744					67
2728					120
2744					127
2728					141
/2744					148

Fonte: A autora

Quando foi realizada a análise por Blastp da sequência de aminoácidos da proteína Filamina-B encontrada na estirpe 2744, observou-se uma identidade de 87,04% com outras proteínas do banco de dados (Tabela 13).

Tabela 13. Análise por BLAST das sequências de aminoácidos das proteínas Filamina-B nas estirpes 2728 e 2744

Description ⁽¹⁾	Max Score ⁽²⁾	Total Score ⁽³⁾	Query Cover ⁽⁴⁾	E value ⁽⁵⁾	% ID ⁽⁶⁾	Accession ⁽⁷⁾
unnamed protein product	190	190	100%	1,00E-69	87.04%	Query_52125

⁽¹⁾ Description, refere-se ao produto que possui a sequência com a qual a sequência estudada apresentou maior similaridade. ⁽²⁾ pontuação do alinhamento, ⁽³⁾ soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos da sequência analisada, ⁽⁴⁾ cobertura da sequência, ⁽⁵⁾ expect value, ⁽⁶⁾ % ID (identidade), porcentagem de identidade entre as sequências das linhagens estudadas e o produto relacionado, ⁽⁷⁾ organismo que possui a sequência com a qual, a sequência estudada apresentou maior similaridade.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Filamina-B na estripe 2744 permitiu identificar posições na sequência das proteínas nas quais foram encontradas diferenças nos aminoácidos (Tabela 14). Foram encontradas 14 mudanças na sequência de aminoácidos entre as proteínas (Figura 6)

Tabela 14. Alinhamentos das duas proteínas e identificação dos aminoácidos diferentes. Os aminoácidos em negrito e destacados em amarelo correspondem às diferenças entre as proteínas das duas estirpes.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
190 bits(483)	1,00 E-69	Compositional matrix adjust.	94/108(87%)	99/108(91%)	0/108(0%)

Figura 6. Alinhamento das sequências de aminoácidos para proteína Filamina-B na estirpe 2744. As diferenças entre as sequências estão destacadas em amarelo

2728	G N L A R E V E S L Y K A Q P G Q S S R S S N F S L D N L A G T K V R V V L E G A G A T S L S F I A R D K S G T D	60
	G L REVESLYKAQPGQSSRSSNFSL++L AGTKVRVVLEGAGATSLSF I+RDKSG D	
2744	G T L T R E V E S L Y K A Q P G Q S S R S S N F S L E H L T A G T K V R V V L E G A G A T S L S F N I S R D K S G A D	61
2728	P V I W S N V R D G S I L T I P S G D D R K N L Y I A G P P S G Y T S N G T F K V K F Y A L P N	108
	IWS VRDGSIL IPSGD+RKNLYI+GPPSGYTSNGTFKVKFYALPN	
2744	S R I W S A V R D G S I L K I P S G D N R K N L Y I S G P P S G Y T S N G T F K V K F Y A L P N	109

Fonte: A autora

Os resultados obtidos pelas comparações através das sequências de genes e proteínas (Tabelas 8, 9, 10 11 e 12) e seus respectivos alinhamentos (Figuras 4, 5 e 6), deixam claro as diferenças existentes entre os complexos proteicos encontrados nas estirpes 2728 e 2744, mesmo que ambas tenham se enquadrado como

pertencentes ao grupo de proteínas Nep. Em estudos recentes, Seid, Van den Ackerveken (2019) demonstraram a ocorrência de pelo menos três tipos distintos de PNL: tipo I, tipo II (GIJZEN; NURNBERGER, 2006) e o tipo III descrito por Oome e Van den Ackerveken (2014) e essa diferenciação é realizada com base na ocorrência de resíduos conservados de cisteína, que são essenciais para a atividade da PNL (FELLBRICH et al., 2002).

Embora existam poucos relatos sobre a o efeito de proteínas do grupo NPLs para invertebrados, os complexos proteicos presentes em ambas as amostras, dão indícios da atividade dessas proteínas através de um mecanismo de ação novo, por meio do reconhecimento dos açúcares presentes na membrana intestinal do inseto, mediado pela ligação da lectina hemolítica ou a hemaglutinina. A confirmação ou não dessa hipótese, se dará por meio de testes mais aprofundados e será necessária a clonagem dos respectivos genes encontrados em cada uma das estirpes, bem como a expressão e purificação da proteína recombinante, para avaliar sua capacidade patogênica por meio de bioensaios feitos com dieta artificial suplementada com as proteínas puras. Caso a hipótese seja afirmativa, ou seja, de fato as proteínas Nep esteja envolvidas com a mortalidade dessas cepas, um novo leque de ferramentas para o controle de pragas se abrirá, através da exploração de uma nova proteína inseticida com um novo mecanismo de ação.

4. CONCLUSÕES

- 1- A análise das sequências não retornou a nenhum dos genes clássicos de *Bacillus thuringiensis* ou de *Bacillus cereus strictu sensu* não sendo possível até o momento, uma classificação exata das espécies em questão.
- 2- A análise das sequências permitiu a identificação de um gene responsável pela expressão de uma proteína formadora de poros que pode estar relacionada a toxicidade dessas cepas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, E.; HUANG, K.; ARKIN, A. The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. **PLoS Comput Biol.** v. 2, n. 11, e143, 2006.

BAILEY, B. A. Purification of a Protein from culture and filtrates of *Fusarium-Oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of erythroxyllum-coca. **Phytopathology.** v.85, n. 10, p. 1250-1255, 1995.

BLOBEL, G.; DOBBERSTEIN, B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. **Journal of Cellular Biology.** v. 67, n.3, p. 835-851, 1975.

CAI, Y.; YAN, J.; HU, X.; HAN, B.; YUAN, Z. Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by expression of chitinase gene chiAC in *Bacillus sphaericus*. **Appl Environ Microbiol.** v. 73, n.23, p. 7744-7746, 2007.

CHENG, H.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters.** v. 28, n. 55-59, 2006.

DIERICK, K.; VAN COILLIE, E.; SWIECICKA I.; MEYFROIDT, G.; DEVLIEGER, H.; MEULEMANS, A.; HOEDEMAEKERS, G.; FOURIE, L.; HEYNDRIX, M.; MAHILLON, J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. **Journal of clinical microbiology.** v. 43, n. 8, p.4277-4279. 2005.

DUNLAP, C. Phylogeny and Taxonomy of Agriculturally Important Bacillus Species. In: ISLAM, M.; RAHMAN, M.; PANDEY, P.; BOEHME, M.; HAESAERT, G. (eds) **Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol.** Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting. Springer, Cham. 2019.

EIDL, M. F.; VAN DEN ACKERVEKEN G. Activity and Phylogenetics of the Broadly Occurring Family of Microbial Nep1-Like Proteins, **Annual Review of Phytopathology,** v. 57, p. 367-386, 2019.

FEDHILA, S.; NEL, P.; LERECLUS, D. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. **Journal of Bacteriology.**v. 84, p. 3296- 3304. 2002.

FELLBRICH, G.; ROMANSKI, A.; VARET, A.; BLUME, B.; BRUNNER, F.; ENGELHARDT, S.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; KRZYMOWSKA, M.; NÜRNBERGER, T. NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. **Plant Journal.**v. 32, n.3, p. 375-390, 2002.

FELLBRICH G, ROMANSKI A, VARET A, BLUME B, BRUNNER F, ENGELHARDT, S.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; KRZYMOWSKA, M. NÜRNBERGER, T. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **Plant Journal.** v. 32, n. 3, p. 375-390. 2002.

FENG, Y.; WALSH, C.A. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. **Nature Cell Biology**. v. 6, n. 11, p. 1034-1038, 2004.

GAO, R.; STOCK, A.M. Biological insights from structures of two-component proteins. **Annual Review of Microbiology**. v. 63, n.1, p. 133-154, 2009.

GIJZEN, M.; NURNBERGER, T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. **Phytochemistry**. v. 67, n.16 p. 1800-1807. 2006.

HATAKEYAMA, T., KOHZAKI, H., NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Purification and characterization of four Ca²-dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. **Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 6, p. 209-214, 1994.

HATAKEYAMA, T., FURUKAWA, M., NAGATOMO, H., YAMASAKI, N.; MORI, T. Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands. **Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 16915-16920, 1996.

JENNINGS, J.C.; APEL-BIRKHOLO, P.C.; MOCK, N.M.; BAKER, C.J.; ANDERSON, J.D.; BAILEY, B.A. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. **Plant Science**. v. 161, n. 5, p. 891-899. 2001.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**. v. 28, 12, p. 1647-1649, 2012.

KEATES, S.E.; KOSTMAN, T.A.; ANDERSON, J.D.; BAILEY, B.A. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. **Plant Physiology**. 2003, 132, 1610-1622.

KOTIRANTA, A; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**. v. 2, n. 2, p. 189-198, 2000.

KUPFERSCHMIED, P.; PÉCHY-TARR, M; IMPERIALI, N.; MAURHOFER, M.; KEEL, C. Domain Shuffling in a Sensor Protein Contributed to the Evolution of Insect Pathogenicity in Plant-Beneficial *Pseudomonas protegens*. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 2, e1003964, 2014.

MENDEZ-TRUJILLO, V.; MORENO-RAMÍREZ, L.; CARRILLO-BELTRAN, M.; GONZÁLEZ-MENDOZA, D. Fast Protocol for DNA Isolation of DNA from Bacterial Isolated from a Hyper-Arid Environment. **Journal of Pure and Applied Microbiology**. 7. 2713-2716, 2013.

MOLINA, C. A.; CAÑA-ROCA, J. F.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. Selection of a *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) Larvae. **Applied and Environmental Microbiology**.v. 76, n. 5, p. 1320-1327, 2010.

MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P.; R. M.; MARTINS, É. S.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S. Controle biológico de pragas da agricultura. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed). **Controle de artrópodes-praga com bactérias entomopatogênicas** Brasília, Df. Embrapa, 2020. p. 167-200.

NAKAMURA, F.; STOSSEL, T.P.; HARTWIG, J.H. The filamins: organizers of cell structure and function. **Cell Adhesion and Migration**. v. 5, n. 2, p. 160-169, 2011.

NISHIWAKI, H.; NAKASHIMA, K.; ISHIDA, C.; KAWAMURA, T.; MATSUDA, K. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 73, v. 10, p.3404-3411, 2007.

OOME, S.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. Comparative and functional analysis of the widely occurring family of Nep1-like proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n.10, p.1081-1094, 2014.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARANGONI. S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of seed coagulant Moringa oleifera lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**. v. 46, n.2, p. 498-504, 2011.

OTTMANN, C.; LUBERACKI, B.; KÜFNER, I.; KOCH, W.; BRUNNER, F.; WEYAND, M.; MATTINEN, L.; PIRHONEN, M.; ANDERLUH, G.; SEITZ, H.; NÜRNBERGER, T.; OECKING, C. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.106, n. 25, p. 10359-10364, 2009.

PAIVA, P.M.G.; SANTANA, G.M.S.; SOUZA, I.F.A.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; AGRANETO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MéndezVilas A (Ed.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, p. 396-406, 2010.

PEMBERTON, C.; SALMOND, G. The Nep1-like Proteins - A growing family of microbial elicitors of plant necrosis. **Molecular plant pathology**. v. 5, n. 4, p.353-359, 2004.

SCHMIDT, T.R.; SCOTT, E.J.; DYER, D.W. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. **BMC Genomics**. v. 12, n. 430, 2011.

TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 29, n. 2, p. 87-101, 1999.

UNNO, H.; GODA, S.; HATAKEYAMA, T. Hemolytic Lectin CEL-III Heptamerizes via a Large Structural Transition from α -Helices to a β -Barrel during the Transmembrane Pore Formation Process **Journal of Biological Chemistry**. v. 289, n. 18, p.12805-12812, 2014.

VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S.N.; STREM, M.D.; CARLSON, J.E.; BAILEY, B.A.; GUILTINAN, M.J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Rep**. v. 23, n. 6, 404-413, 2004.

ZAPAROLI, G. H. A. **Caracterização dos mecanismos de ação de duas classes de proteínas indutoras de necrose (CPs e NLPs), presentes em fungos do gênero *Moniliophthora*, patogênicos do cacau**. 2012. 106 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/316800>>. Acesso em: 21 julho, 2020.

ZHANG, M.; BREITWIESER, G.E. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 280, n. 12, p.11140-11146, 2005.

ZININA, V.V.; KORZHENKOV, A.; TEPLYUK, A.; KANIKOVSKAJA, A.A.; PATRUSHEV, M.; KUBLANOV, I.V.; TOSHCHAKOV, S. Data on draft genome sequence of *Bacillus* sp. strain VKPM B-3276 isolated from *Culex pipens* larvae. **Journal Data in Brief**.v. 24, e-103757, 2019

ZUH, L.; PENG, D.; WANG, Y.; WEIXING, Y.; JINSHUI, Z.; CHANGMING, Z.; DONGMEI, H.; CE, G.; LIFANG, R.; JIN, H.; ZINIU, Y.; MING, S. Genomic and transcriptomic insights into the efficient entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. **Scientific Reports**. v. 5, n. 14129, 2015.

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

As bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* são dois dos microrganismos mais utilizados na produção de bioinseticidas para controle de insetos pragas. Embora existam muitas informações sobre utilização desse microrganismo, a prospecção de novas estirpes continua sendo fundamental, já que podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos ativos biotecnológicos úteis para diferentes finalidades, que vão desde controle de insetos a ação citotóxica contra células tumorais de câncer humano.

A conclusão deste trabalho, confirma a grande variabilidade existente entre as espécies isoladas, independentemente da região, área de produção ou substrato de isolamento, evidenciando a capacidade de adaptação e dispersão dessas bactérias. Toda essa variabilidade pode ser visualizada em cada uma das etapas de caracterização, principalmente nos resultados de bioensaios, no qual foi constatado a presença de estirpes com atividade simultânea para diferentes ordens, como em Lepidoptera e Coleoptera, ou mesmo atividade inseticida distinta para espécies de mesmo gênero, como os lepidópteros *S. frugiperda*, *H. armigera* e *A. gemmatilis*. Graças a essa variabilidade, foi possível selecionar, pelo menos para cada uma das espécies trabalhadas, uma estirpe com atividade inseticida, sugerindo o aproveitamento desses materiais como potenciais agentes de controle para insetos pragas de importância agrícola, e também, insetos pragas importantes para saúde pública.

Além de novos isolados bacterianos, os resultados obtidos demonstraram a presença de um novo gene capaz de expressar uma proteína formadora de poros (Nep-1), não conhecida com atividade no controle de insetos. Com a confirmação dessa hipótese, se abre um leque de novas ferramentas para o controle de pragas e como perspectivas futuras, sugere-se a:

1. Clonagem dos genes *nep* encontrados em cada uma das estirpes, para expressão e purificação da proteína recombinante.
2. Avaliação da capacidade patogênica das proteínas recombinantes por meio de bioensaios.
3. Avaliar o possível mecanismo de ação envolvido em cada uma das espécies pragas.