

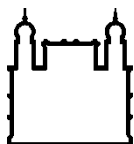
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biodiversidade e Saúde

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE
O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Musca domestica* (LINNAEUS,1758)
(DIPTERA: MUSCIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

VÍTOR DOS SANTOS BAÍA FERREIRA

Rio de Janeiro
Julho de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

VÍTOR DOS SANTOS BAÍA FERREIRA

Avaliação da bioatividade de bactérias entomopatogênicas sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Viviane Zahner

RIO DE JANEIRO

Julho de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F383 Ferreira, Vítor dos Santos Baía

Avaliação da bioatividade de bactérias entomopatogênicas sobre o desenvolvimento pós-embriônico de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório / Vítor dos Santos Baía Ferreira. – Rio de Janeiro, 2015.

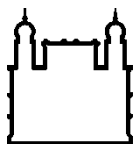
xiii, 49 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2015.

Bibliografia: f. 54-62

1. Controle microbiano. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. *Brevibacillus laterosporus*. 4. Mosca doméstica. 5. Microscopia de transmissão. I. Título.

CDD 579.362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Vítor dos Santos Baía Ferreira

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

Orientadora: Prof. Dra. Viviane Zahner

Aprovada em: 09/07/2015

EXAMINADORES:

Presidente Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. José Mario d'Almeida (UFF)

Prof. Dr. Valéria Magalhães Aguiar (Unirio)

Prof. Dr. Marina Vianna Braga (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Gisela Lara da Costa (IOC-Fiocruz)

Rio de Janeiro, 09 de Julho de 2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz pela oportunidade de desenvolver o trabalho no Laboratório de Entomologia Médica e Forense, e pelos cinco anos de convivência, onde tive uma quantidade imensa de aprendizado proporcionado, assim como pela amizade e carinho.

Gostaria de agradecer à Dra. Viviane Zahner pela orientação, pelas conversas no dia-a-dia, pelo conhecimento em uma nova área, pelas ótimas recomendações e pelos tantos e necessários puxões de orelha que me ajudaram tanto nessa jornada.

À Dra. Marina Vianna Braga por receber essa dissertação e oferecer suas valiosas correções de bom grado e vontade, mesmo num prazo tão curto.

À Dra. Jacenir dos Santos Mallet pela pronta assistência nos assuntos relacionados à microscopia eletrônica.

À plataforma de microscopia eletrônica Rudolf Barth – IOC/Fiocruz, por prover os excelentes serviços técnicos para a elaboração das micrografias de transmissão presentes nesse trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro, tão importante para o aluno de pós-graduação.

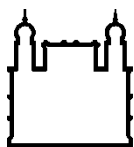
Agradeço ao curso de pós-graduação em Biodiversidade e Saúde pela oportunidade de realizar esse trabalho e pelo aprendizado proporcionado.

Agradeço imensamente aos colegas de laboratório, por providenciarem uma excelente convivência, coleguismo e amizade que serão apreciados por toda a vida.

Agradeço aos amigos que me acompanharam durante minha formação agora e em diante, pelos bons momentos, apreciada ajuda, companhia e a posição como válvula de descarga com as frustrações, decepções e vitórias que acompanharam o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecer à minha namorada Mayra Monteiro Nunes que, além de todas as atribuições descritas aos amigos e ser uma companheira sem igual, também foi um apoio inigualável quando tudo que eu queria era alguém pra me ouvir.

Por último agradeço imensamente à minha família, por tudo que me proveram até hoje, como incentivo, encorajamento, apoio financeiro e emocional e me dando acima de tudo equilíbrio social e mental, para que eu fosse a pessoa serena e amigável que acredito ser no ambiente de trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

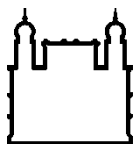
AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE), EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Vítor dos Santos Baía Ferreira

Musca domestica é um díptero que apresenta sérios riscos à saúde pública e ambiental. Essa espécie transmite diversos patógenos, é causadora de miíases em humanos e animais além de causar prejuízos econômicos. O uso de inseticidas químicos causa danos ambientais e possui eficácia questionável em *M. domestica*. Inseticidas biológicos de origem bacteriana apresentam uma boa alternativa aos inseticidas químicos em relação aos impactos ambientais, as espécies *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* demonstram ação inseticida em diversas ordens de insetos e podem apresentar atividade inseticida efetiva em *M. domestica*. Nove estirpes de bactérias foram testadas em *M. domestica* e destas três estirpes: BL102, BTI193A e BTK176 apresentaram valores de mortalidade maiores que 50% e por isso tiveram os efeitos subletais investigados. Em relação a massa das pupas, nenhuma das estirpes apresentou variação significativa na média da massa pupal, quando comparadas às médias dos controles puro e água. O período de desenvolvimento também não se diferenciou de forma estatisticamente relevante dos dois controles em nenhum tratamento. As três estirpes testadas apresentaram mortalidade estatisticamente superior às mortalidades dos dois controles com LC50 nas concentrações de 12.40×10^8 UFC/mL para BTI193, 4.76×10^8 UFC/mL para BTK176 e 4.16×10^8 UFC/mL para BL102. As micrografias de transmissão demonstraram que todas as estirpes apresentam o perfil de danos celulares já descritos para essas espécies de bactérias entomopatogênicas, como elevada vacuolização do citoplasma, além de desorganização das organelas celulares, porém somente as estirpes de *B. thuringiensis* apresentaram deformação e interrupção das microvilosidades e conteúdo citoplasmático extravasado para o lúmen intestinal. Os resultados obtidos com de *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* sugerem que essas estirpes são um agentes de controle biológico promissores para *M. domestica*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA BIOACTIVITY ON THE POST-EMBRIONARY DEVELOPMENT OF *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE), UNDER LABORATORY CONDITIONS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Vítor dos Santos Baía Ferreira

Musca domestica is a dipteran who presents a serious risk to public and environmental health. This species carries diseases, causes myiasis in humans and animals and may cause economic losses. The use of chemical insecticides, beyond causing environmental damage, have questionable efficacy in *M. domestica*. Biologic insecticides of bacterial origin presents a good choice over chemical insecticides regarding environmental impact. *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* species show insecticide action in several insect orders and may present insecticide effectiveness in *M. domestica*. Nine strains of bacteria were tested for mortality where three strains: BL102, BTI193 and BTK176 showed values above 50%. These strains were submitted to sub lethal effects experiments. In relation to pupal weight, none of the strains showed statistical variation when compared to pure and water controls. Development time was statistically undifferentiated from both controls in every treatment tested. All the tested strains showed statistically higher mortality when compared to both controls, showing LC50 concentrations of 12.40×10^8 CFU/mL for BTI193, 4.76×10^8 CFU/mL for BTK176 and 4.16×10^8 CFU/mL for BL102. Transmission micrographs showed that every strain presented cell damage profile established for these species of entomopathogenic bacteria, such as the high level of cytoplasm vacuolization and disorganization of cell organelles, however, only *B. thuringiensis* strains showed microvilli deformation and disruption and cytoplasmic content extruded into intestinal lumen. All these observations suggest that tested *B. laterosporus* and *B. thuringiensis* strains are promising agents to the biological control of *M. domestica*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos	22
3. METODOLOGIA	23
3.1. Estabelecimento e manutenção da colônia de <i>Musca domestica</i>	23
3.2. Manutenção das colônias bacterianas.....	24
3.2.1. Preparação das suspensões, diluições e contagem de UFC	24
3.3. Bioensaios	25
3.4. Preparo para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	27
3.4.1. Dissecção das larvas	27
3.4.2. Fixação	27
3.5. Análise dos dados.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Testes preliminares com estirpes entomopatogênicas.....	29
4.2. Massa pupal.....	31
4.3. Duração dos estágios de desenvolvimento	34
4.4. Mortalidade dos estágios de desenvolvimento e LC50	40
4.5. Análise das células epiteliais do trato digestório.....	48
5. CONCLUSÕES.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Gaiola com armação de madeira, revestida com tela de náilon e parte frontal com tecido de algodão em formato de manga de camisa para manutenção dos adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). 23
- Figura 2:** Dieta dos adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): água e sacarose, respectivamente. 24
- Figura 3:** (A) Recipiente com substrato de crescimento das larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). (B) Inserção em recipiente maior contendo vermiculita. 26
- Figura 4:** Estante ventilada utilizada no experimento com *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). 26
- Figura 5:** Comparação das massas das pupas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) em miligramas (mg), alimentadas com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 34
- Figura 6:** Comparação das durações do estágio larval de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 38
- Figura 7:** Comparação das durações do estágio pupal de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 39
- Figura 8:** Comparação das durações do período de neolarva a adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório 40
- Figura 9:** Comparação das mortalidades larvais de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) corrigidas pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 44
- Figura 10:** Comparação das mortalidades pupais da espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) corrigidas pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 45

Figura 11: Comparação das mortalidades de neolarva a adulto da espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) corrigidas pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 46

Figura 12: Célula epitelial do intestino médio do grupo controle com H₂O de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). A: Porção apical da célula epitelial, 48h após eclosão. x7800; B: Microvilosidades de células intestinais 48h após eclosão. x16000; C: Porção apical da célula epitelial, 72h após eclosão. x7800; D: Microvilosidades de células intestinais 72h após eclosão. x7800. L: Lúmen intestinal; M: Mitocôndria; mp: Matriz peritrófica; mv: Microvilosidades. .. 48

Figura 13: Célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com esporos de *Brevibacillus laterosporus* (BL102). A: Setas apontam aumento da formação de vesículas no citoplasma de células epiteliais, 48h após exposição. x7800; B: Setas apontam grande vacuolização, seguido de desorganização do citoplasma de células epiteliais 72h após exposição. x7800. L: Lúmen intestinal; mv: Microvilosidades..... 50

Figura 14: Célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193). A: Porção apical da célula epitelial mostra aumento elevado na vacuolização, 48h após exposição. x7800; B: Microvilosidades de células intestinais 48h após exposição. x7800; C: Porção apical da célula epitelial apresentando vacuolização e formação de corpos globulares densos, 72h após exposição. x7800; D: Microvilosidades com aspecto inchado e desorganizado 72h após exposição. x9600. cg: Corpo Globular L: Lúmen intestinal; mv: Microvilosidades; v: Vacúolos. 51

Figura 15: Célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK193). A: Porção apical da célula epitelial mostra aumento na vacuolização em célula menos afetada, 48h após exposição. x7800; B: Microvilosidades de células intestinais mais afetadas apresentam elevada deformidade, 48h após exposição. x5400; C: Porção apical da célula epitelial de larvas de *Musca domestica* apresentam elevada vacuolização e desorganização citoplasmática, 72h após exposição. x9600; D: Microvilosidades com aspecto inchado e desorganizado, 72h após exposição. x7800. cit: Fluido citoplasmático; L: Lúmen intestinal; mv: Microvilosidades; v: Vacúolos..... 52

Figura 16: Extrusão de conteúdo citoplasmático no lúmen intestinal de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). A: 48h após exposição a esporos de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Organelas e fluido citoplasmáticos presentes no lúmen; B: 48h após exposição a esporos de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*. Fluido citoplasmático presente no lúmen. L: Lúmen intestinal; M: Mitocôndria; ec: Extrusão citoplasmática 53

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela I:** Mortalidade do período de neolarva a adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) alimentada com dieta tratada com suspensão de diferentes estirpes bacterianas, em condições de laboratório. 29
- Tabela II:** Mortalidade de neolarva a adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) alimentada com dieta tratada com suspensão de diferentes estirpes bacterianas, que obtiveram mortalidade acima de 50%, em condições de laboratório. 31
- Tabela III:** Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 31
- Tabela IV:** Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 32
- Tabela V:** Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 33
- Tabela VI:** Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em média de dias, alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 35
- Tabela VII:** Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em média de dias, alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 36
- Tabela VIII:** Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em média de dias, alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 37
- Tabela IX:** Porcentagem de mortalidade dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório. 41

Tabela X: Porcentagem de mortalidade dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório..... 42

Tabela XI: Porcentagem de mortalidade dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico da espécie *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório..... 43

Tabela XII: Concentrações letais 50 (CL₅₀) de diferentes estirpes bacterianas em *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensões de *Bacillus thuringiensis* e *Brevibacillus laterosporus*, em condições de laboratório..... 47

1. INTRODUÇÃO

Musca domestica (Linnaeus, 1758) é um díptero pertencente à família Muscidae, que é caracterizada por ter de seis a sete milímetros de comprimento, tórax cinza-amarelado a cinza escuro com quatro listras escuras longitudinais estreitas no mesonoto e o abdome amarelado com uma listra mediana escura (Bennet, 2006). O sexo dos indivíduos pode ser determinado pela distância entre os olhos, que nas fêmeas são dicópteros (olhos separados) e nos machos, holópticos (olhos juntos).

Essa espécie representa uma das mais importantes pragas urbanas de interesse médico-veterinário, pois os adultos têm hábitos endófilos e depois de visitarem ambientes contaminados, como resíduos de produção humana ou animal, frequentam ou entram em contato com materiais de consumo, atuando como vetores mecânicos de diversos patógenos (Greenberg, 1971). Seu hábito alimentar envolve regurgitar sobre o alimento para poder sugá-lo pela probóscide, o que permite que os contaminantes presentes entrem em contato com seu aparelho digestor e partes corporais, carreando-os para outras fontes alimentares, os diversos microorganismos presentes (Malik et al. 2007).

Esses dípteros possuem ampla distribuição geográfica nas regiões de clima tropical e são quase sempre encontrados em grandes populações, pois seu desenvolvimento é favorecido em regiões de clima quente e pelo fato de suas formas jovens se desenvolverem em diversos tipos de matéria orgânica em decomposição (Marchiori et al. 2000).

A capacidade de vetoração de patógenos por *M. domestica* é bem ampla e envolvem fungos, protozoários, ovos e larvas de helmintos, vírus e bactérias, que podem ser encontradas tanto na superfície de seu corpo como no trato digestório (Greenberg, 1973). Fungos do gênero *Aspergillus* (Micheli, 1729), causadores da aspergilose como *Aspergillus flavus* (Link, 1809) já foram isolados em exemplares de *M. domestica* coletadas em lixões (Sales et al, 2002). Dos protozoários carreados, *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882), *Cryptosporidium* sp. (Tyzzer, 1910), *Blastocystis hominis*, (Brumpt 1912), *Cyclospora cayetanensis* (Ortega, et al. 1994) são exemplos que já foram identificados em *M. domestica* (Cárdenaz e Martínez, 2004), sendo *C. cayetanensis* um importante patógeno emergente causador de diarreia em humanos (Ortega e Sanchez, 2010). Ao pousar em fezes de animais contaminados, pode carrear

formas infectantes de helmintos (Sulaiman et al. 1988). *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758), *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876), *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) e *Toxocara canis* (Werner, 1782) são exemplos de parasitos intestinais de humanos, encontrados em *M. domestica*, sendo que *S. stercoralis*, *A. caninum* e *T. canis*, foram encontrados tanto ovos como parasitos em formas larvais (Umeche e Mandah, 1989). Os vírus carregados por *M. domestica* são patogênicos para animais de criação (Otake et al. 2004), animais selvagens (Barin et al. 2010) e humanos, incluindo estirpes altamente patogênicas de vírus da gripe aviária (H5N1) (Sawabe et al. 2006). A flora de bactérias de importância médica carregadas por esses dípteros também é abundante (Sukontason et al. 2000). Existem relatos da presença de diversos gêneros de bactérias patogênicas como *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Enterobacter* presentes em moscas coletadas em mercados e fazendas de criação pecuária (Bidawidi et al. 1971; Nazni et al. 2005).

Iwasa et al. (1999) isolaram a variação enterohemorrágica da espécie *Escherichia coli* (O157:H7) em uma fazenda de criação de gado no Japão. Em hospitais, Fotedar et al. (1992) isolou diversas espécies bacterianas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, provavelmente do contato direto do inseto com feridas de pacientes ou material hospitalar contaminado. Existe nesses ambientes a possibilidade de contato com bactérias patogênicas resistentes, como foi encontrado por Rahuma et al. (2005) que isolaram *Pseudomonas* spp. em moscas coletadas em hospitais, com resistência à diversos tipos de antibióticos.

Musca domestica não atua somente como carreadora de patógenos, mas também tem potencial de causar diretamente males à saúde humana e animal. Suas formas larvais podem se alimentar de carne em decomposição e por consequência, foram registradas causando miíases secundárias em animais selvagens (Dehghani et al. 2012), na pele e no intestino de humanos (Sehgal et al. 2002; Ucan et al. 2011) e em associação com outros dípteros muscoides (Ferraz et al. 2010), além de servirem como carreadores dos ovos de dípteros causadores de miíases primárias como *Dermatobia hominis* (Linnaeus, 1761) (Maia e Gomes, 1988).

Quando encontradas em alta densidade populacional, podem gerar danos econômicos para a produção pecuária. São frequentemente associadas a áreas de produção pecuária e avícola e a perturbação causada pelas moscas afeta a produção de ovos em granjas, como também perturba os funcionários (Miller et al. 1993). O mesmo

efeito também é observado em criações de gado para produção de leite (Malik et al. 2007).

A sua ampla distribuição geográfica, facilidade de adaptação a ambientes urbanizados, diversidade de hábitos alimentares, altos índices reprodutivos, capacidade vetorial, a possibilidade de causar miíases secundárias em humanos e animais, os problemas econômicos de seus efeitos em animais de criação e os incômodos causados conferem à espécie *M. domestica* uma posição importante nas preocupações com políticas de saúde pública (Polyakova, 1999). Embora a sanitização e a higiene local sejam fatores primordiais para a redução de seus indivíduos, *M. domestica* representa um alvo importante para programas de controle populacional, onde medidas de manejo e uso de inseticidas têm como objetivo reduzir os danos causados por essa espécie (Crespo et al. 1998).

O uso de inseticidas é uma das principais técnicas utilizadas no controle de pragas e vetores e seu uso foi o que permitiu avanços na agricultura e no controle de doenças como a malária, tifo e a febre amarela (van Emden e Peakall, 1996). Em meados da década de 1940, surgiram os inseticidas químicos produzidos por síntese: os organoclorados. Entre alguns exemplos, podem ser citados hexacloreto de benzeno, metoxiclor, toxafene, carbaril e o DDT (diclorodifeniltricloreto), que atuam no sistema nervoso dos insetos causando sua morte (Buss e Park-Brown, 2006). Esses inseticidas continham diversas propriedades que os tornavam próprios para o uso em grande escala como baixo custo de produção, a longa ação residual e a toxicidade para um amplo espectro de pragas e vetores (Sethajintanin e Anderson, 2006).

Os organoclorados foram utilizados indiscriminadamente por cerca de 30 anos por todo o mundo, até que a preocupação com a sua persistência no ambiente e sua toxicidade elevada causou a redução de seu uso e proibição do DDT na década de 70 (ATSDR, 2002). Esses inseticidas sintéticos contaminam a água, o solo e se impregnam na vegetação, são tóxicos a animais vertebrados e a insetos polinizadores (Aktar et al. 2009). O uso excessivo desses tipos de inseticidas também resultava em uma progressiva resistência das pragas a esses químicos, diminuindo sua efetividade e gerando consequências com potenciais negativos, como o aumento da frequência de uso, da dose e de misturas com compostos mais tóxicos (Hemingway e Ranson, 2000).

Pela importância médico-sanitária, *M. domestica* é uma espécie que teve a sua resistência a inseticidas como alvo de diversos estudos. Farnham (1973) estudou a

resistência de *M. domestica* a piretróides e Pimprikar e Georghiou (1979) descreveram os mecanismos que conferiam a essa espécie resistência ao diflubenzuron. Inseticidas que atuam diferentemente dos principais organoclorados também tinham sua eficácia reduzida, como observado por Bloomcamp et al. (1987), que constataram que a ciromazina, inseticida regulador do crescimento, não surtia efeito em populações de *M. domestica*. Há relatos inclusive de inseticidas de última geração ao qual indivíduos de *M. domestica* também apresentaram resistência, como a imidaclorapida (Wen e Scott, 1999), Spinosad (Shono e Scott, 2003) e Indoxacarb (Shono et al. 2004).

O desenvolvimento de resistência em várias espécies de pragas e vetores, baixa especificidade, aliado ao impacto ambiental, elevada toxicidade para vertebrados e o alto custo e eficiência questionável dos inseticidas sintéticos de última geração, demonstraram que o controle de vetores com o uso exclusivo desse tipo de inseticida não garantiria sua eficiência. Como resposta a esses fatores limitantes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado, nos últimos anos, a busca de novas estratégias de controle de insetos vetores de agentes etiológicos causadores de doenças humanas, dos animais domésticos e silvestres (Mörner et al. 2002).

Uma nova ferramenta eficaz na redução aos efeitos negativos dos pesticidas químicos e que garante sustentabilidade na prática do controle populacional de pragas e vetores tem sido o uso de inseticidas biológicos (Copping e Menn, 2000). Esses pesticidas apresentam características que do ponto de vista ecológico, apresentam vantagens na sua utilização no manejo de pragas, como baixa ação residual, alta volatilidade, baixa toxicidade para mamíferos, alta especificidade e elevada letalidade nos organismos alvo, além de representar risco mínimo ao aplicador (Cloyd, 2004).

Algumas bactérias, fungos e vírus possuem características entomopatogênicas, que podem apresentar opções viáveis para produção de bioinseticidas e sua utilização em programas de controle biológico. Para produção em massa e baixo custo, as bactérias se mostraram efetivas através dos primeiros inseticidas microbianos produzidos comercialmente nas décadas de 50 e 60 (Federici, 2005). A eficiência desses bioinseticidas foi demonstrada através da atuação direta sobre os insetos-praga das plantações, não afetavam os insetos polinizadores, podiam ser utilizados juntamente com outros inseticidas e técnicas de manejo ambiental visando controle biológico, sem apresentar risco ao homem (Copping e Menn, 2000).

Brevibacillus laterosporus é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, formadora de esporos, cuja principal característica é a formação de um corpo para-esporal em forma de canoa (Montaldi e Roth, 1990). Teve sua associação com insetos divulgada ao ser isolada como invasora secundária em abelhas da espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae), afetadas pela doença loque americana, causada pela ingestão de esporos da bactéria *Paenibacillus larvae* (White, 1906) por larvas dessa espécie (Forsgren, 2010). Sua atividade como entomopatógeno pode ser relacionada à ingestão ou contato com a bactéria em forma de esporo ou na fase vegetativa (Ruiu, 2013), causando lesões nas células epiteliais do aparelho gastrointestinal, caracterizado por dano nas microvilosidades, vacuolização do citoplasma e conseqüentemente, extrusão do conteúdo celular na luz do intestino (Ruiu et al. 2012).

A atividade inseticida de *B. laterosporus* foi observada por diversos autores em diferentes ordens de insetos. Oliveira et al. (2004) observaram a ação de diferentes estirpes de *B. laterosporus* e constataram atividade tóxica em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae), na lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e no besouro bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae). Atividade inseticida em outros insetos da ordem Coleoptera também foi descrita por Salama et al. (2004) em *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) e Echeverri-Molina e Santolamazza-Carbone (2010) (Coleoptera: Curculionidae) em *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal, 1883) (Coleoptera: Curculionidae). Vale acrescentar que estudos com os coleópteros dos gêneros *Diabrotica* spp., *Leptinotarsa* spp. e *Anthonomus* spp. mostraram toxicidade à toxinas presentes no sobrenadante do meio de cultura, chamadas de *insecticidal secretorial proteins* ou *ISP*. Estudos sobre a eficácia de estirpes de *B. laterosporus* em insetos da ordem Lepidoptera não mostraram atividade inseticida relevante para diversas espécies de importância econômica, como *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Trichoplusia ni* (Hubner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae), assim como não foi demonstrada atividade das toxinas *ISP*, em insetos dessa ordem (Ruiu, 2013).

A bioatividade de *B. laterosporus* em *M. domestica* foi primeiramente descrita por Ruiu et al. (2006), que demonstraram a elevada patogenicidade de diferentes concentrações que mataram 100% das larvas aplicadas. Zimmer et al. (2013) compararam a ação inseticida de diferentes espécies de bactérias entomopatogênicas e

observaram que a maior mortalidade foi causada pela estirpe de *B laterosporus*. Ruiu et al. (2007) utilizaram uma estirpe que não produzia cristais paraesporais e observaram ação inseticida sobre *M. domestica* e *A. aegypti*, apontando o corpo paraesporal como a principal localização das proteínas que causam o efeito tóxico observado nessas espécies.

De todas as bactérias com potencial inseticida, *Bacillus thuringiensis* seria a espécie mais notável (Federici, 2005). É uma bactéria Gram-positiva que produz uma inclusão proteica em forma de cristal, chamada de proteína Cry ou δ -endotoxina, que apresentam elevada toxicidade em diversas espécies de insetos com importância médica e econômica (Yul et al. 2007). A razão do sucesso de *B. thuringiensis* como bioinseticida pode ser devido à grande variedade de endotoxinas que produz, assim como o grande espectro de ação em insetos e especificidade do tipo de ação que cada variação da bactéria possui (Charles e Nielsen-LeRoux, 2000). Ao chegar ao intestino do inseto, essas proteínas são solubilizadas e convertidas pelas proteases do inseto. Essas toxinas, eventualmente se ligam a receptores específicos onde formam poros que aumentam a permeabilidade da célula, fazendo-a inchar e se romper (Copping e Menn, 2000).

Os grupos de insetos cuja atividade inseticida de *B. thuringiensis* já foi descrita são diversos e incluem diversas pragas e vetores com importância econômica e médico-sanitária, como coleópteros (Donovan et al. 1992), lepidópteros (Arvidson et al. 1989) que são pragas de plantações e insetos da ordem Diptera transmissores de doenças (Ben-Dov, 2014). Essa variedade fez com que diversos produtos baseados na bioatividade de *B. thuringiensis* fossem desenvolvidos para uso comercial em plantações e programas de saúde pública (Valicente et al. 2010)

Diversas estirpes já apresentaram alguma atividade em *M. domestica* (Johnson et al. 1997). Hodgman et al. (1993) descreveram uma estirpe portadora de genes para as toxinas CryIA(b), CryIB, CryIIA e CryIIB que matou 50% das larvas de *M. domestica* testadas na concentração de 10.2 $\mu\text{g/mL}$. O sorotipo H14 (*B.thuringiensis* var. *israelensis*) não provocou mortalidade em adultos de *M. domestica* (Wilton e Klowden, 1985), enquanto a variedade *kurstaki* já teve sua capacidade inseticida demonstrada em adultos e larvas (Indrasith, et al. 1992). Zimmer et al. (2013) testaram as variedades

israelensis e *kurstaki* em *M. domestica* tendo obtido mortalidade mais elevada com a variedade *kurstaki*.

Devido à ampla utilização de inseticidas com origem em toxinas geradas por *B. thuringiensis*, já existem relatos do aparecimento de resistência a essas substâncias (McGaughey e Beeman, 1988; Stone et al. 1989;), demonstrando que assim como no controle químico, seu uso deve ser planejado e deve ocorrer sinergismo com outras técnicas de controle populacional (Tabashnik, 1994).

Outra bactéria que também possui potencial atividade inseticida é *Lysinibacillus sphaericus*. Formalmente conhecida como *Bacillus sphaericus* por sua capacidade de formar um esporo terminal em formato esférico, foi redesignado para o gênero *Lysinibacillus* por produzir peptidoglicanos contendo ácido aspártico e lisina (Ahmed et al. 2007). Sua entomopatogenicidade está primariamente ligada a toxinas proteicas produzidas pela bactéria e com atividade inseticida em diferentes grupos de insetos. A toxina Sphaerolicosina mostrou atividade patogênica em *Blatella germanica* (Linnaeus, 1767) (Blatodea: Blatellidae) e *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) (Nishiwaki et al. 2007). As toxinas vegetativas de *B. sphaericus* possuem ação relatada em dípteros da família Culicidae e a toxina Mtx-1 mostrou toxicidade em células de larvas de *Ae. aegypti*, quando utilizados dois peptídeos de massas moleculares diferentes (Thanabalu et al. 1993). A toxina Mtx-2 possui variantes naturais que atuam mais especificamente em *Cu. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* (Chan et al. 1996). A toxina binária ou Bin é aquela que tem a ação bioquímica mais amplamente descrita em mosquitos, e é a principal toxina responsável pela atividade inseticida nesses insetos. É necessário que tanto a toxina BinA e a toxina BinB estejam presentes simultaneamente para que haja o efeito entomocida (Aly et al. 1989; Berry, 2012).

Sua atividade inseticida em *M. domestica* é brevemente descrita por Zimmer et al. (2013), entretanto os autores ao utilizarem a estirpe comercial 2362 sobre este alvo, não encontraram atividade inseticida elevada.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

-Avaliar a bioatividade de diferentes bactérias entomopatogênicas sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica*.

2.2. Específicos

-Distinguir as estirpes das espécies *B. laterosporus*, *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* que consigam causar mortalidade maior que 50% em testes preliminares com imaturos de *M. domestica*, alimentados com dieta contendo suspensões bacterianas e selecionar estas estirpes para os testes subsequentes.

-A partir dos testes preliminares, determinar os efeitos das aplicações das espécies *B. laterosporus*, *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* na massa das pupas, quanto ao tempo de duração e a mortalidade dos estágios larval, pupal e de neolarva a adulto, de *M. domestica*.

- Determinar a concentração letal 50% (CL50) de cada tratamento bacteriano.

-Avaliar as alterações causadas nas células epiteliais presentes no trato digestório, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3. METODOLOGIA

3.1. Estabelecimento e manutenção da colônia de *Musca domestica*

A criação dos dípteros muscoides foi estabelecida a partir de adultos coletados numa caçamba de lixo encontrada no Bairro do Amorim (Rio de Janeiro, RJ), próximo ao campus da Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ). O estabelecimento e manutenção das criações seguiram a metodologia preconizada por Queiroz e Milward-de-Azevedo (1991), que consiste na manutenção dos adultos em gaiolas de madeira de 30x30x30 cm (Figura 1) com alimentação à base de água provida em garrafas com um pavio feito de gaze e sacarose (Figura 2), oferecida na forma de açúcar refinado. Os dípteros utilizados foram provenientes de novas colônias, obtidas a partir da segunda geração em laboratório dos adultos coletados. Para substrato de postura, maturação das fêmeas e alimentação das larvas foi oferecida uma mistura de carne bovina moída putrefata e farelo de trigo (5g de carne/1g de farelo).



Figura 1: Gaiola com armação de madeira, revestida com tela de náilon e parte frontal com tecido de algodão em formato de manga de camisa para manutenção dos adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae).



Figura 2: Dieta dos adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): água, oferecida em garrafa plástica com pavio de gaze e sacarose, em formato de açúcar refinado, em recipiente plástico de 50mL respectivamente.

3.2. Manutenção das colônias bacterianas

O estoque das estirpes bacterianas foi mantido no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ/RJ), em temperatura ambiente em ágar-nutriente com óleo mineral.

3.2.1. Preparação das suspensões, diluições e contagem de UFC

As amostras do estoque de nove estirpes bacterianas: *B. thuringiensis* var. *israelensis*: BTI191, BTI193; *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*: BTK176; *B. thuringiensis* var. *yunnanensis*: BTY170; *B. laterosporus*: BL102, BL149, BL70 e BL112 e uma de *L. sphaericus*, que foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-nutriente para purificação e em sequência, foram feitos *slants* com o mesmo meio de cultura das colônias purificadas. Quarenta e cinco *slants* foram raspados em 15 mL de água destilada autoclavada para compor a suspensão mãe, quando nessas colônias, pelo menos, 95% das células estivessem no estágio de esporo livre, o que foi visualizado em microscópio óptico. Para as diluições, 7 mL da suspensão mãe homogeneizada em vórtice foram colocados em 7 mL de água destilada, reduzindo sua concentração pela metade, o que foi feito consecutivamente até a obtenção de quatro

diluições. A suspensão menos concentrada foi diluída até 10^{-5} , sendo feita termo resistência a 80°C na concentração de 10^{-2} . Da suspensão diluída a 10^{-5} foram feitas as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC).

3.3. Bioensaios

Para a preparação do substrato de crescimento das larvas, 1 mL de suspensão foi aplicado e misturado em 2,5g de dieta composta por farelo de trigo e carne bovina moída putrefata (5g de carne / 1g de farelo) para cada réplica do experimento. Esses recipientes com as misturas, foram colocados em recipientes maiores contendo vermiculita, que servia como substrato de pupação (Figura 3). Esse recipiente foi fechado com tecido de náilon para evitar a fuga das larvas. Para o controle puro, nada foi aplicado na dieta e no controle “água destilada”, foi aplicado 1 mL de água destilada autoclavada. Dez larvas recém eclodidas (L1) foram coletadas do substrato de postura utilizando-se um pincel e colocadas nos recipientes com substrato de crescimento, constituindo uma réplica. Cada grupo testado contou com 5 réplicas.

Os bioensaios foram realizados em duas etapas:

- Somente a suspensão mãe foi testada tendo somente a mortalidade de neolarva a adulto calculada.
- Somente as estirpes que obtiveram mortalidade maior que 50% na primeira etapa tiveram a segunda etapa realizada. A suspensão mãe e quatro diluições sucessivas foram testadas. Em todos os testes, as pupas foram coletadas, pesadas em balança de precisão e acondicionadas individualmente em tubos de ensaio para pupação, contendo até $\frac{1}{4}$ de seu volume preenchido com vermiculita e tampados com escaline, e nesse momento foi calculada a viabilidade larval. No momento da emergência dos adultos foi calculada a viabilidade pupal e, em conjunto, a viabilidade de neolarva a adulto. Os insetos foram observados quanto à viabilidade do desenvolvimento das fases de larva, pupa e neolarva a adulto e a duração de cada fase.

Todas as fases experimentais foram observadas e controladas diariamente até a emergência do adulto. Todos os experimentos foram realizados em condições de laboratório, em estante ventilada (Figura 4) regulada a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ URA e fotoperíodo de 12 horas.

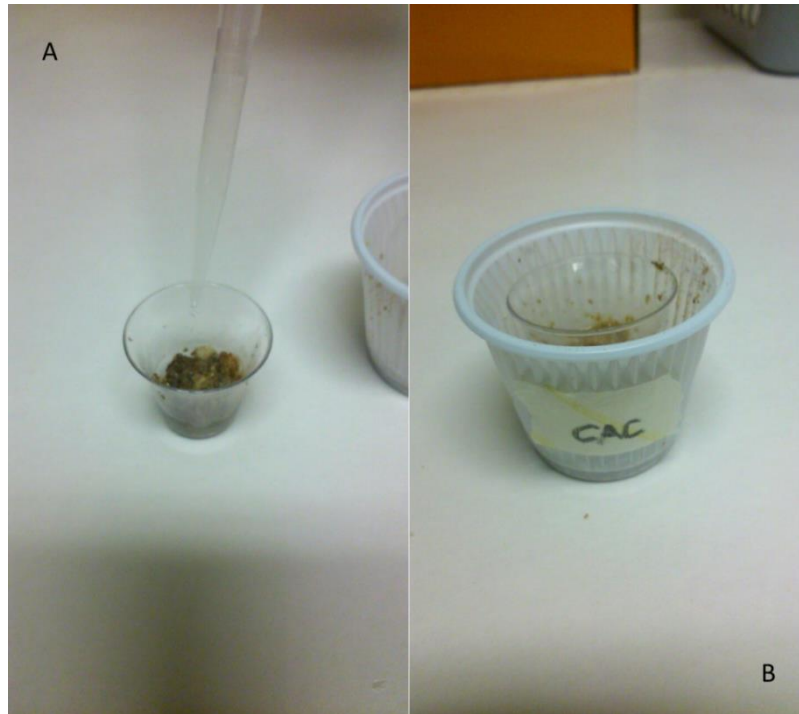


Figura 3: (A) Recipiente plástico de 10mL com substrato de crescimento das larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). (B) Inserção em recipiente maior de 50mL contendo vermiculita.



Figura 4: Estante ventilada utilizada no experimento com *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Foteperíodo de 12h, 25°C, 60% umidade relativa.

3.4. Preparo para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

3.4.1. Dissecção das larvas

As estirpes que foram testadas na segunda etapa tiveram duas repetições a mais, realizadas na suspensão mãe. Dessas repetições, foram extraídas larvas com 48 e 72h de alimentação na dieta, para dissecção do trato digestório. Essas larvas foram colocadas em suspensão salina, após passar 3 min no freezer a -4°C para anestesia. Em uma placa de Petri com o fundo preenchido por resina, as larvas foram presas com um alfinete entomológico (tamanho 1) fixado na parte do esqueleto céfalo-faríngeo e foi feito um corte transversal, utilizando-se de bisturi destacando totalmente o último segmento larval, contendo os espiráculos respiratórios, fazendo com que a porção final do trato digestório fosse expelida do corpo. A seção utilizada foi a porção posterior do intestino médio, como descrito por Ruiu et al. (2012), identificada pela proximidade dos túbulos de Malpighi.

3.4.2. Fixação

O material dissecado foi fixado com glutaraldeído (G.A.) a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio (G.A. 2,5%) e estocado em tubos Eppendorf® em refrigerador, por pelo menos, 72 horas. Após este período foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M por três vezes consecutivas, cada uma com duração de 10 min, pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% por uma hora no escuro, lavados por três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e desidratados em série etanólica a 30, 50, 70 e 90% e três etapas em etanol absoluto, cada etapa com duração de 10 minutos. Em seguida, foram infiltrados com uma mistura de etanol e resina Eponi (Epon) (proporção 1:1) *overnight* (aproximadamente 12h), Epon puro por 6 horas, incluídos em Epon e polimerizados em estufa por 48 horas a 60°C.

Esses blocos foram levados à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth (IOC/Fiocruz) para os cortes em ultra micrótomo Leica Ultracut S, contrastação com acetato de uranila a 5% em escuridão total e em seguida com citrato de chumbo a 2%. Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão marca JEOL JEM-1011.

3.5. Análise dos dados

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA: $P \leq 0,05$) e o teste de Tukey-Kramer foi utilizado para a análise da significância estatística e o desvio padrão foi calculado através da média dos experimentos. O pacote estatístico Graphpad® InStat foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos. A viabilidade do estágio larval foi contabilizada pelas larvas que se tornaram pupas, a viabilidade pupal foi contabilizada através das pupas que se tornaram adultos e a viabilidade de neolarva a adulto foi contabilizada pelas larvas que chegaram a adultos. A mortalidade foi calculada seguindo a fórmula ($\text{Mortalidade\%} = 100 - \text{Viabilidade\%}$) e corrigida através da fórmula de correção de Abbott (Abbott, 1925) ($\text{Mortalidade tratamento\%} - \text{Mortalidade controle\%}$). A concentração letal 50% (CL50) foi calculada através de regressão logarítmica LogProbit (Finney, 1962) e realizada no pacote estatístico POLO plus.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes preliminares com estirpes entomopatogênicas

Para a confecção dos testes preliminares, foram feitas suspensões de diferentes estirpes bacterianas, que estavam disponíveis no estoque do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (IOC/Fiocruz). Foram testadas nove estirpes bacterianas de diferentes espécies, sendo quatro da espécie *B. thuringiensis*, quatro de *B. laterosporus* e uma de *L. sphaericus* e avaliada a mortalidade do período de neolarva a adulto. As mortalidades observadas estão representadas na Tabela I.

Tabela I: Mortalidade do período de neolarva a adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) alimentada com dieta tratada com suspensão de diferentes estirpes bacterianas, em condições de laboratório.

Tratamento	UFC/mL	Mortalidade	Mortalidade
		Controle H ₂ O	Tratamento
		(%)	(%)
BTI191	3,11 x 10 ⁶	8,0	22,0
BTI193	1,76 x 10 ⁷	8,0	52,0
BTK176	4,63 x 10 ⁶	10,0	56,0
BTY170	1,16 x 10 ⁷	10,0	30,0
BL102	1,08 x 10 ⁷	6,0	62,0
BL149	1,11 x 10 ⁸	8,0	20,0
BL70	2,62 x 10 ⁷	8,0	12,0
BL112	3,40 x 10 ⁷	8,0	14,0
<i>L. sphaericus</i>	2,89 x 10 ⁷	10,0	20,0

. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Duas estirpes de *B. thuringiensis* e uma de *B. laterosporus* promoveram a mortalidade alvo acima de 50% enquanto a única estirpe testada de *L. sphaericus* não demonstrou atividade inseticida em *M. domestica* neste experimento. Zimmer et al. (2013) testaram diversas estirpes de bactérias entomopatogênicas em *M. domestica* e somente *B. laterosporus* e *B. thuringiensis israelensis* *B. thuringiensis kurstaki* provocaram alta mortalidade enquanto o produto comercial baseado na estirpe 2362 de *L. sphaericus* não provocou mortalidade elevada para essa espécie. A toxicidade de *B. thuringiensis* demonstrou que sua atividade inseticida está relacionada diretamente a estirpes produtoras de δ -endotoxinas (Sims, 1997), enquanto estirpes que produzem β -exotoxinas não possuem atividade inseticida relacionada à *M. domestica* (Levinson et al. 1990).

Devido à diversidade de endotoxinas produzidas pelas diferentes variedades de *B. thuringiensis* e como essas toxinas e as suas combinações apresentam toxicidade em diferentes espécies de insetos, é necessário que as espécies bacterianas testadas produzam a toxina correta que afete *M. domestica*. Geden (2012), concluiu que a toxina Cry1B produzida por *B. thuringiensis* é responsável pela toxicidade em *M. domestica* e associou a atividade inseticida superior nessa espécie de inseto a bactérias que produzam essa toxina, o que pode explicar a diferente resposta ao tratamento com as estirpes de *B. thuringiensis*.

O mesmo modelo de bioensaio foi repetido para confirmação dos resultados obtidos e as três estirpes, novamente, obtiveram a mortalidade alvo acima de 50%, como mostra a **Tabela II**. Após a confirmação da meta pré-estabelecida de mortalidade, novas suspensões foram feitas para a realização de bioensaios em diferentes concentrações e avaliação de características não letais.

Tabela II: Mortalidade de neolarva a adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) alimentada com dieta tratada com suspensão de diferentes estirpes bacterianas, que obtiveram mortalidade acima de 50%, em condições de laboratório.

Tratamento	UFC/mL	Mortalidade	Mortalidade
		Controle H ₂ O	Tratamento
		(%)	(%)
BTI193	1,76 x 10 ⁷	8,0	54,0
BTK176	7,96 x 10 ⁶	10,0	52,0
BL102	8,84 x 10 ⁶	6,0	58,0

. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

4.2. Massa pupal

Nenhuma concentração testada da estirpe de *B. laterosporus* (BL102) alterou de forma significativa a massa das pupas, quando comparadas aos dois controles, como pode ser observado na Tabela III: Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tabela III: Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Massa			
Tratamento	Pupal	Mínimo	Máximo
Média ± DP			
controle puro	20,51 ± 1,73b	17mg	- 23,5mg
controle H₂O	21,81 ± 2,08ab	17mg	- 25mg
1,21x10⁸ UFC/mL	21,92 ± 2,13a	16mg	- 26mg

2,42x10⁸ UFC/mL	21,06 ± 1,63ab	19mg	-	25mg
4,84x10⁸ UFC/mL	22,30 ± 2,47a	15mg	-	25mg
9,68x10⁸ UFC/mL	21,43 ± 2,14ab	16mg	-	24mg
19,30x10⁸ UFC/mL	22,54 ± 1,35a	21mg	-	25mg

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. . UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Nos bioensaios realizados com as estirpes de *B. thuringiensis*, nenhuma concentração testada de *B. thuringiensis* (BTI193) (Tabela IV) e de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) (

Tabela V) afetaram de forma significativa a massa das pupas em relação aos dois controles.

Nenhum tratamento demonstrou grandes variações na massa das pupas, como mostra a Figura 5. Ruiu et al. (2006) observaram que larvas de *M. domestica* tratadas com uma estirpe de *B. laterosporus* apresentaram massa reduzido com o tratamento, demonstrando alguma atividade inibidora de alimentação, o que não foi visualizado neste experimento com *B. laterosporus*. As estirpes de *B. thuringiensis* BTI193 e BTK176 também não apresentaram diferenciação na massa dos imaturos. Resultado semelhante foi observado por Erb et al. (2001) na avaliação feita na mariposa *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) tratada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, onde não houve restrição alimentar nem geração de pupas menores.

Tabela IV: Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Massa			
Tratamento	Pupal	Mínimo	Máximo
	Média ± DP		

controle puro	20,51 ± 1,73b	17mg	-	23,5mg
controle H₂O	21,81 ± 2,08a	17mg	-	25mg
1,58x10⁸ UFC/mL	20,60 ± 2,03b	16mg	-	23,5mg
3,16x10⁸ UFC/mL	20,59 ± 1,27ab	17mg	-	23mg
6,32x10⁸ UFC/mL	19,44 ± 1,76b	15mg	-	23mg
12,60x10⁸ UFC/mL	20,30 ± 1,42b	18mg	-	22mg
25,20x10⁸ UFC/mL	20,37 ± 2,01ab	15mg	-	22mg

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Tabela V: Massa das pupas em miligramas (mg) de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Massa			
Tratamento	Pupal	Mínimo	Máximo
Média ± DP			
controle puro	19,96 ± 2,63ab	11mg	- 23,5mg
controle H₂O	17,48 ± 3,77c	13mg	- 24mg
1,17x10⁸ UFC/mL	18,14 ± 2,92bc	14mg	- 24mg
2,34x10⁸ UFC/mL	20,08 ± 3,28ab	14mg	- 27mg
4,68x10⁸ UFC/mL	18,52 ± 3,44b	14mg	- 24mg
9,36x10⁸ UFC/mL	20,98 ± 2,89a	17mg	- 25mg

18,70x10⁸ UFC/mL 22,03 ± 3,57a 15mg - 25mg

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Talvez uma redução na capacidade alimentar não seja interessante para o tipo de ação que determina a atividade patogênica dessas estirpes bacterianas, pois como relatado por Tharwat et al. (1995), Ruiu et al. (2006; 2007), Zimmer et al. (2013), e no presente estudo, a mortalidade em *M. domestica* é dose-dependente e se eleva nas maiores concentrações e possivelmente em maiores quantidades de esporos ingeridos.

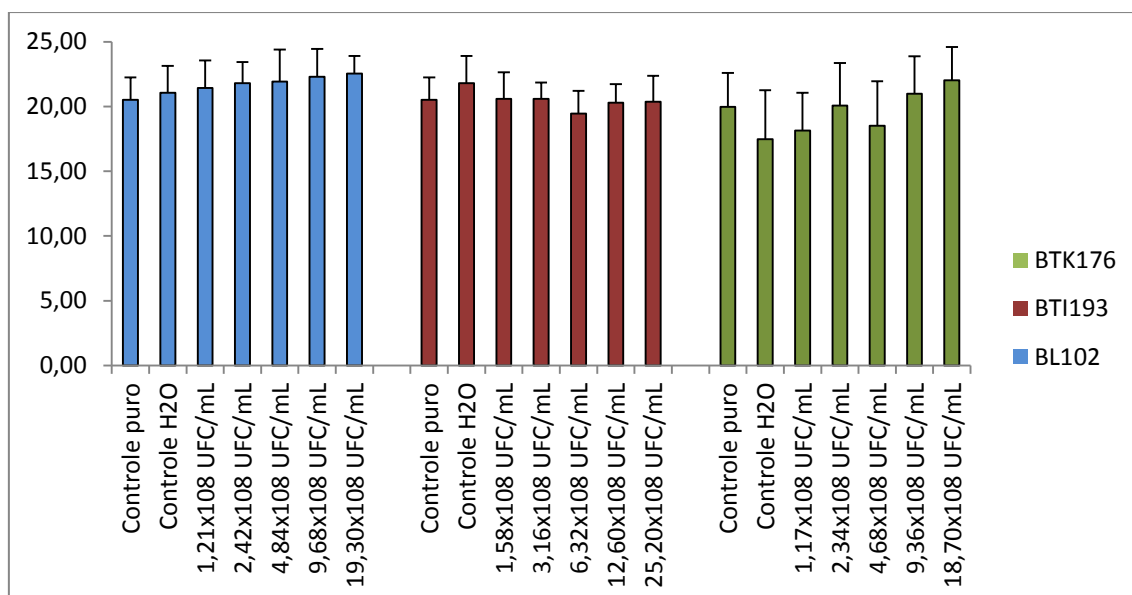


Figura 5: Comparação das massas das pupas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) em miligramas (mg), alimentadas com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

4.3. Duração dos estágios de desenvolvimento

O tratamento com *B. laterosporus* (BL102) não alterou o tempo de desenvolvimento das larvas de forma estatisticamente significativa quando comparado ao controle H₂O (Tabela VI). O desenvolvimento pupal não diferenciou estatisticamente em nenhum dos grupos testados. O período de neolarva a adulto seguiu a proporção do

período larval e nenhuma concentração testada diferenciou-se estatisticamente do controle H₂O.

Tabela VI: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em média de dias, alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tratamento	Estágio	Estágio	Estágio Neolarva a
	Larval	Pupal	Adulto
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
controle puro	5,13 ± 0,62b	6,29 ± 0,45a	11,42 ± 0,81b
controle H₂O	6,52 ± 0,69a	6,02 ± 0,52a	12,48 ± 0,50 ^a
1,21x10⁸ UFC/mL	6,69 ± 0,66a	6,09 ± 0,45a	12,73 ± 0,51 ^a
2,42x10⁸ UFC/mL	6,52 ± 0,51a	6,04 ± 0,48a	12,50 ± 0,67 ^a
4,84x10⁸ UFC/mL	6,52 ± 0,51a	6,25 ± 0,77a	12,75 ± 0,72 ^a
9,68x10⁸ UFC/mL	6,63 ± 0,50a	6,00 ± 0,50a	12,59 ± 0,62 ^a
19,30x10⁸ UFC/mL	6,52 ± 0,69a	6,50 ± 0,54a	12,67 ± 0,51 ^a

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Os tratamentos com *B. thuringiensis* (estirpe BTI193), assim como *B. laterosporus*, também não apresentaram diferença estatística em comparação ao controle H₂O. O controle puro apresentou diferença significativa em relação a todos os outros grupos. O estágio pupal teve a duração reduzida estatisticamente em relação ao controle puro em quase todas as concentrações testadas e nenhuma concentração testada diferenciou estatisticamente do controle H₂O. No estágio de neolarva a adulto, novamente, nenhum grupo tratado se diferenciou estatisticamente dos dois controles.

Tabela VII: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em média de dias, alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tratamento	Estágio	Estágio	Estágio Neolarva a
	Larval	Pupal	Adulto
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
controle puro	5,13 ± 0,62c	6,29 ± 0,45a	11,42 ± 0,81c
controle H ₂ O	6,52 ± 0,69ab	6,02 ± 0,52ab	12,48 ± 0,50a
1,58x10 ⁸ UFC/mL	6,34 ± 0,70ab	6,09 ± 0,59ab	12,34 ± 0,74ab
3,16x10 ⁸ UFC/mL	6,21 ± 0,82ab	5,93 ± 0,38b	12,11 ± 0,83ab
6,32x10 ⁸ UFC/mL	5,95 ± 0,78b	5,83 ± 0,39b	11,96 ± 0,82abc
12,60x10 ⁸ UFC/mL	5,96 ± 0,70b	5,90 ± 0,30b	11,81 ± 0,75bc
25,20x10 ⁸ UFC/mL	6,25 ± 0,45ab	5,93 ± 0,47b	12,14 ± 0,66ab

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

O desenvolvimento larval das moscas tratadas com *B. thuringiensis* var *kyushuensis* (BTK176) também não foi alterado de forma a diferenciar estatisticamente dos dois controles, como mostra a Tabela VIII. O estágio pupal, assim como no tratamento com as outras estirpes, não diferenciou estatisticamente dos controles em nenhuma concentração testada.

Os tratamentos tiveram pouca variação no tempo de desenvolvimento larval quando comparados aos controles, como mostra a Figura 6. Ruiu et al. (2006) notou aumento na duração do instar larval em *M. domestica* tratada com suspensão de *B.*

laterosporus, porém não diferenciando estatisticamente do controle, como pôde ser visualizado no presente estudo. Esses resultados diferem do obtido por Zimmer et al. (2013) utilizando *B. laterosporus*, onde na maior concentração testada foi encontrado um período mais longo em relação ao controle e às outras concentrações, porém não foi observada alteração na duração do estágio larval nos testes realizados com *B. thuringiensis* var *israelensis*.

Tabela VIII: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em média de dias, alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tratamento	Estágio	Estágio	Estágio Neolarva a
	Larval	Pupal	Adulto
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
controle puro	4,93 ± 0,49c	6,22 ± 0,52a	11,15 ± 0,64bc
controle H ₂ O	5,62 ± 0,72a	6,15 ± 0,53a	11,72 ± 0,82ac
1,17x10 ⁸ UFC/mL	5,65 ± 0,69a	6,23 ± 0,43a	11,85 ± 0,54 ^a
2,34x10 ⁸ UFC/mL	5,33 ± 0,76abc	6,19 ± 0,40a	11,54 ± 0,86abc
4,68x10 ⁸ UFC/mL	5,44 ± 0,92abc	6,09 ± 0,30a	11,38 ± 0,92abc
9,36x10 ⁸ UFC/mL	5,05 ± 0,86bc	6,22 ± 0,43a	11,21 ± 0,96c
18,70x10 ⁸ UFC/mL	5,56 ± 0,51ab	6,36 ± 0,50a	11,92 ± 0,61 ^a

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

A duração do desenvolvimento pupal, assim como o larval, também não foi alterada significativamente, como mostram as Figura 7 e 7. O mesmo foi observado por Ruiu et al. (2006) com suspensão de *B. laterosporus* que também não apresentou

nenhum tratamento que tenha alterado a duração desse período de desenvolvimento. Em 2013, Zimmer et al. avaliaram a bioatividade de *B. thuringiensis* em *M. domestica* e encontraram alteração somente na menor concentração testada. A utilização de uma estirpe de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* na mariposa *L. dispar*, também não resultou em alteração da duração do instar pupal para essa espécie em condições de laboratório.

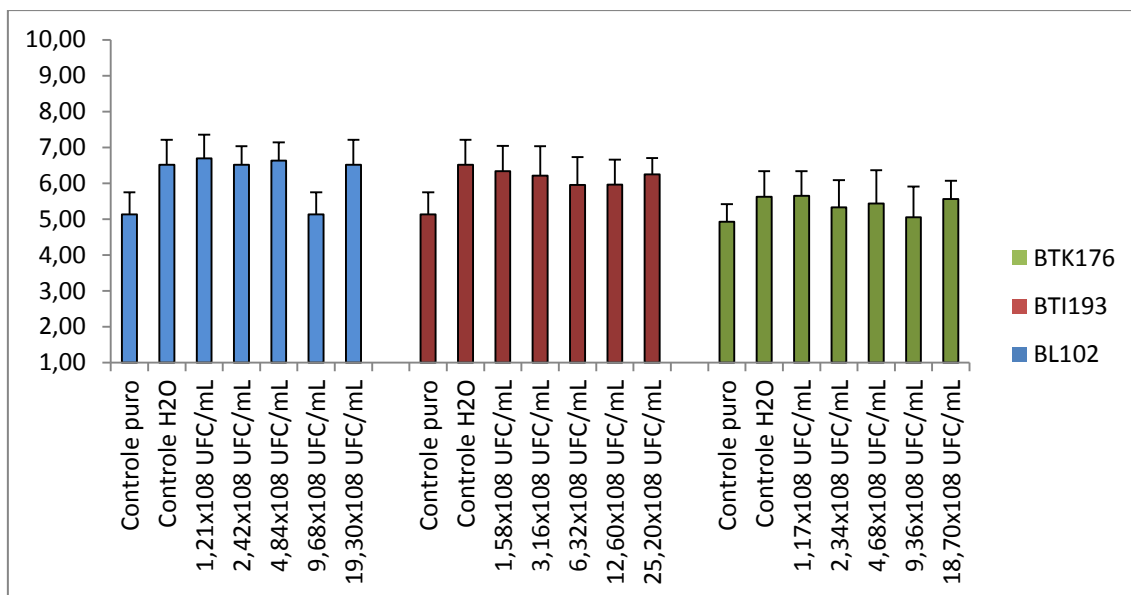


Figura 6: Comparação das durações do estágio larval de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes controles (puro e H2O), em condições de laboratório.

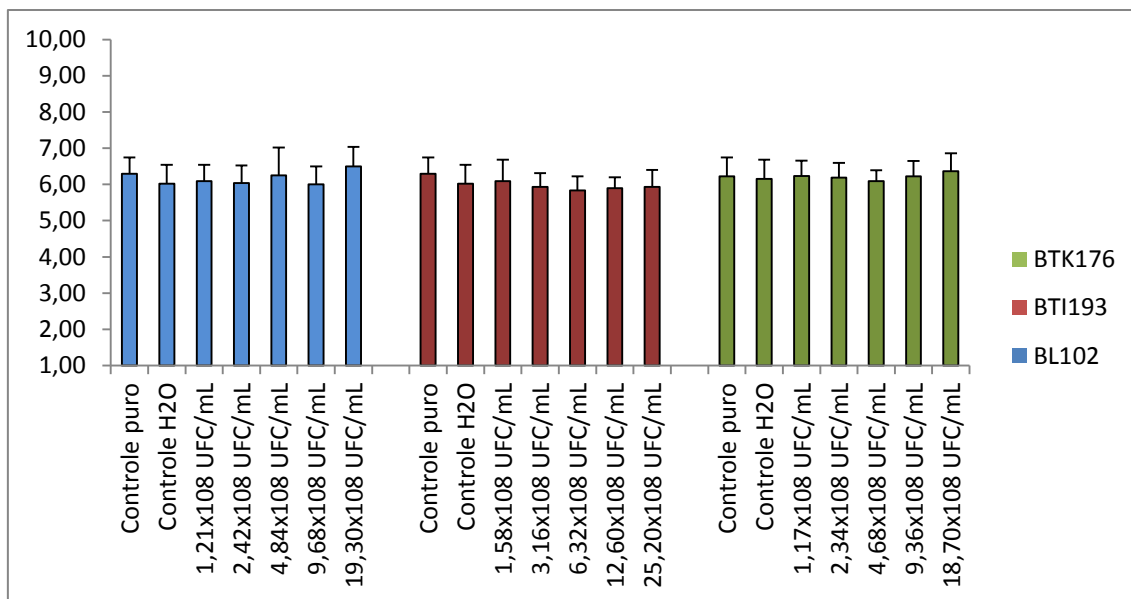


Figura 7: Comparação das durações do estágio pupal de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Em relação ao período de neolarva a adulto, como reflexo dos dados dos períodos anteriores, não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa em nenhuma suspensão, em nenhuma concentração testada, como mostra a Figura 8.

A ação de bactérias entomopatogênicas, no caso de *B. thuringiensis*, é caracterizada por proteínas cristalogênicas que causam lise no endotélio do intestino do inseto (Schnepf et al. 1998), enquanto *B. laterosporus*, provoca lesões e vesículas na parte apical das células endoteliais intestinais (Ruii et al. 2012). Esse modo de ação não aparenta interferir no crescimento e na mudança de estágios de desenvolvimento do inseto, que é mediado pelos hormônios juvenil, ecdisona, regulador de crescimento e de eclosão (Riddiford e Truman, 1978).

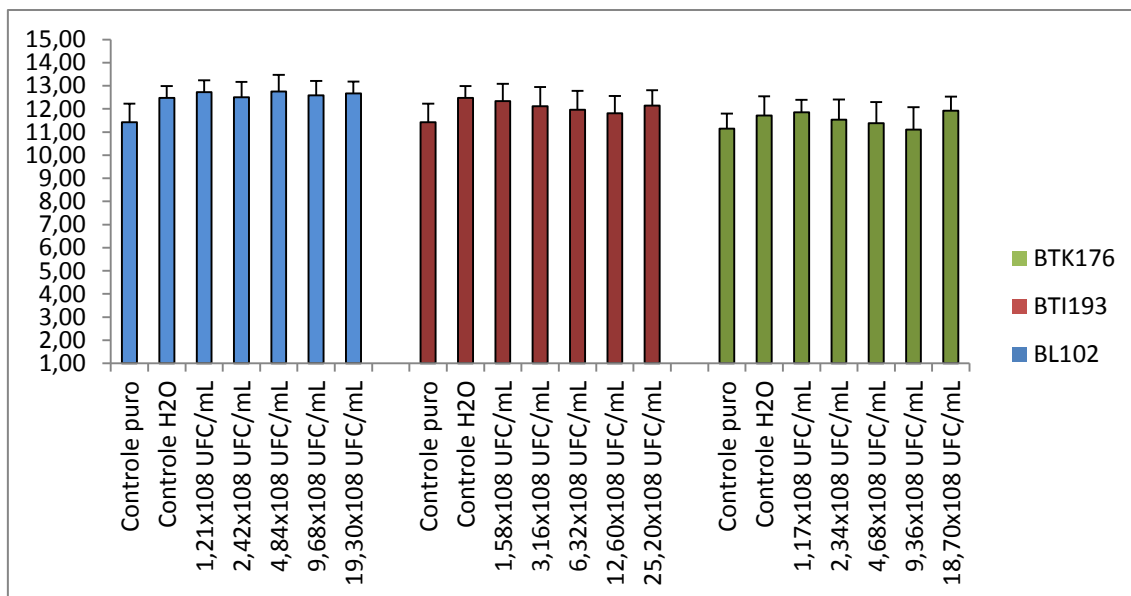


Figura 8: Comparação das durações do período de neolarva a adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório

4.4. Mortalidade dos estágios de desenvolvimento e LC50

Todas as larvas tratadas com suspensão de *B. laterosporus* (BL102) diferenciaram estatisticamente dos dois controles e ao contrário dos efeitos subletais, demonstraram grande atividade biológica. Todas as concentrações apresentaram mortalidade elevada em relação aos controles e a mortalidade larval foi dose-dependente, de acordo com a Tabela IX. Não houve diferenciação na mortalidade pupal e ela não apresentou relação com a concentração, se mostrando aleatória. A mortalidade de neolarva a adulto acompanha a tendência da mortalidade larval com todas as concentrações diferenciou-se estatisticamente do controle e com a mortalidade se mostrou dose-dependente, como mostra a Tabela IX.

Tabela IX: Porcentagem de mortalidade dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tratamento	Mortalidade	Mortalidade	Mortalidade
	Larval	Pupal	Neolarva a Adulto
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
controle puro	6,0 ± 5,47d	4,22 ± 5,79a	10,0 ± 7,07d
controle H ₂ O	8,0 ± 8,37d	8,50 ± 8,59a	16,0 ± 8,94d
1,21x10 ⁸ UFC/mL	26,0 ± 5,47c	8,22 ± 7,54a	32,0 ± 8,37c
2,42x10 ⁸ UFC/mL	50,0 ± 7,07b	11,34 ± 10,44a	56,0 ± 5,48b
4,84x10 ⁸ UFC/mL	54,0 ± 5,48b	14,00 ± 21,91a	60,0 ± 12,25b
9,68x10 ⁸ UFC/mL	58,0 ± 8,37b	18,00 ± 10,37a	66,0 ± 5,48b
19,30x10 ⁸ UFC/mL	78,0 ± 4,47a	43,34 ± 43,47a	88,0 ± 8,37a

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Assim como no tratamento com *B. laterosporus*, *B. thuringiensis* (BTI193) também teve a mortalidade larval dos grupos tratados estatisticamente diferente dos grupos controle e apresentou mortalidade dose-dependente. A mortalidade pupal não diferenciou estatisticamente dos controles nem entre si. A mortalidade de neolarva a adulto, assim como a mortalidade larval, foi dose dependente e diferenciou estatisticamente dos dois controles em todos os tratamentos, com a mortalidade mais elevada em 72%, como mostra a Tabela X.

Tabela X: Porcentagem de mortalidade dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tratamento	Mortalidade	Mortalidade	Mortalidade
	Larval	Pupal	Neolarva a Adulto
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
controle puro	6,0 ± 5,48e	4,22 ± 5,79a	10,0 ± 7,07d
controle H ₂ O	8,0 ± 8,37e	8,50 ± 8,59a	16,0 ± 8,94d
1,58x10 ⁸ UFC/mL	24,0 ± 5,47d	15,36 ± 10,38a	36,0 ± 5,47c
3,16x10 ⁸ UFC/mL	34,0 ± 11,40cd	15,20 ± 9,40a	44,0 ± 11,40bc
6,32x10 ⁸ UFC/mL	46,0 ± 8,94bc	13,32 ± 18,24a	54,0 ± 8,94b
12,60x10 ⁸ UFC/mL	54,0 ± 5,47ab	9,00 ± 12,45a	58,0 ± 8,37ab
25,20x10 ⁸ UFC/mL	68,0 ± 8,36a	10,00 ± 13,69a	72,0 ± 4,47a

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

A mortalidade larval de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*, demonstra o mesmo padrão das outras suspensões testadas, mais uma vez com mortalidade dose-dependente e suspensões que diferenciam significativamente dos dois controles em todas as concentrações. Novamente, a mortalidade pupal não diferenciou significativamente de nenhum grupo tratado. A mortalidade neolarva a adulto repete o padrão da mortalidade larval mais uma vez, com seu valor mais elevado em 72% (Tabela XI).

Tabela XI: Porcentagem de mortalidade dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico da espécie *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), alimentada em dieta tratada com suspensão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Tratamento	Mortalidade	Mortalidade	Mortalidade
	Larval	Pupal	Neolarva a Adulto
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
controle puro	8,0 ± 8,37d	2,00 ± 4,47a	10,0 ± 7,07c
controle H ₂ O	10,0 ± 10,00d	5,00 ± 6,85a	14,0 ± 15,16c
1,17x10 ⁸ UFC/mL	26,0 ± 8,94cd	22,38 ± 15,69a	38,0 ± 16,43b
2,34x10 ⁸ UFC/mL	40,0 ± 12,25bc	11,44 ± 15,66a	48,0 ± 8,37b
4,68x10 ⁸ UFC/mL	50,0 ± 10,00ab	16,34 ± 17,09a	58,0 ± 13,04ab
9,36x10 ⁸ UFC/mL	58,0 ± 8,37ab	15,66 ± 15,06a	64,0 ± 11,40ab
18,70x10 ⁸ UFC/mL	68,0 ± 8,37a	10,00 ± 13,69a	72,0 ± 4,47a

Letras diferentes representam médias diferentes entre si. DP = Desvio padrão. UFC – Unidades Formadoras de Colônia

A mortalidade larval representa os valores mais elevados de mortalidade relativa, talvez por ser o estágio de aplicação das suspensões e a principal fase de alimentação das larvas. Através dos resultados apresentados na Figura 9, observa-se que a maior mortalidade larval corrigida alcançada foi aquela da estirpe de *B laterosporus* (BL102) com 78%. Ruiu et al. (2007) observaram mortalidade de 100% ao utilizarem a mesma espécie bacteriana em *M. domestica*. Zimmer et al. (2013) também encontraram mortalidade elevada (± 55%) na concentração testada mais elevada com *B. laterosporus* em *M. domestica*.

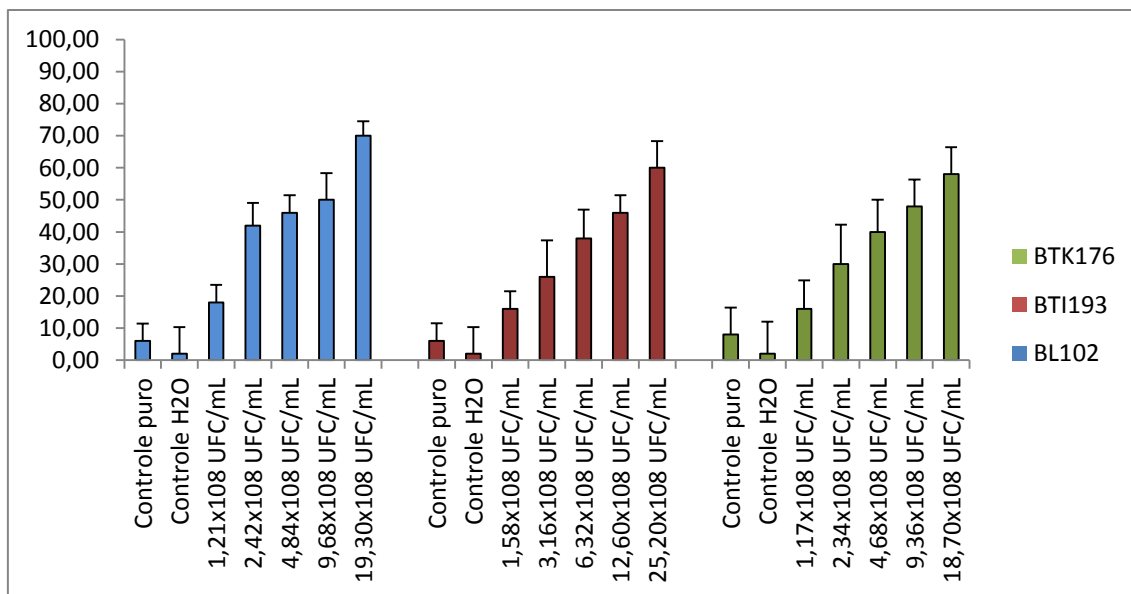


Figura 9: Comparação das mortalidades larvais de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) corrigidas pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

A mortalidade larval de *B. thuringiensis* (BTI193), foi idêntica em valor absoluto ao de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) no presente trabalho, com 68%, consideravelmente mais elevada do que os valores encontrados por Zimmer et al. (2013) que foram de aproximadamente 20% para *B. thuringiensis* var. *israelensis* e 17,5% para *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em *M. domestica*.

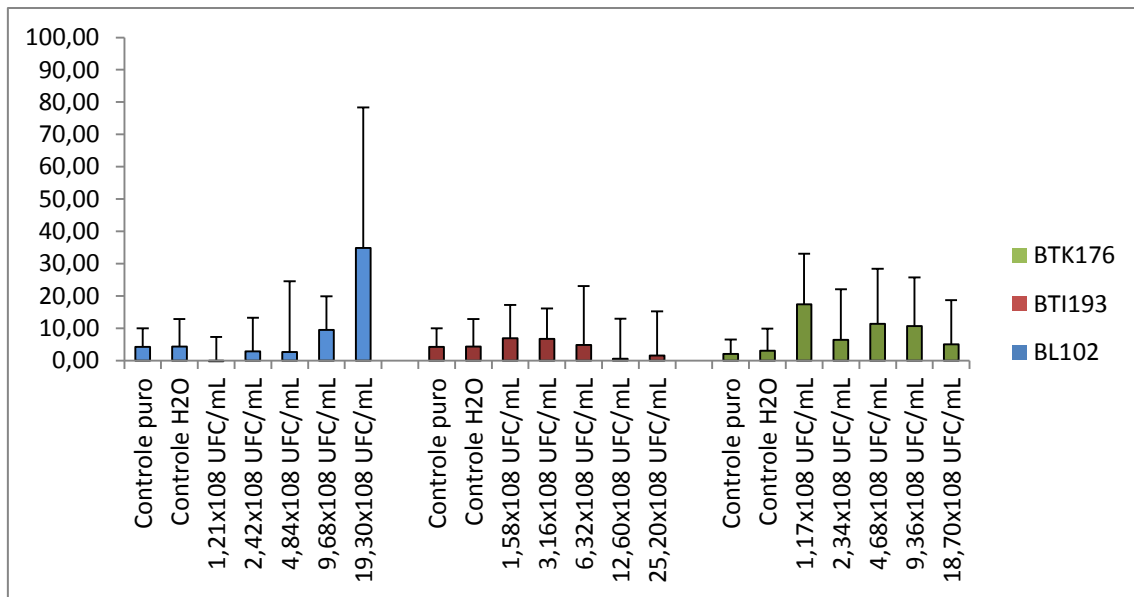


Figura 10: Comparação das mortalidades pupais da espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) corrigidas pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

A mortalidade pupal dos tratamentos, representada na Figura 10, não teve alteração estatisticamente relevante em nenhum grupo tratado, apresentando mortalidades variadas, geralmente reduzidas, em todos os tratamentos, o que diverge do encontrado por Zimmer et al. (2013) para *B. laterosporus*, que apresentaram elevadas mortalidades pupais na menor concentração testada.

A mortalidade de neolarva a adulto contabiliza o total de larvas que não se tornaram adultos e representa a mortalidade total da fase de imaturo. Na Figura 11, pode ser observado um padrão parecido com o demonstrado na mortalidade larval, com mortalidades dose-dependentes.

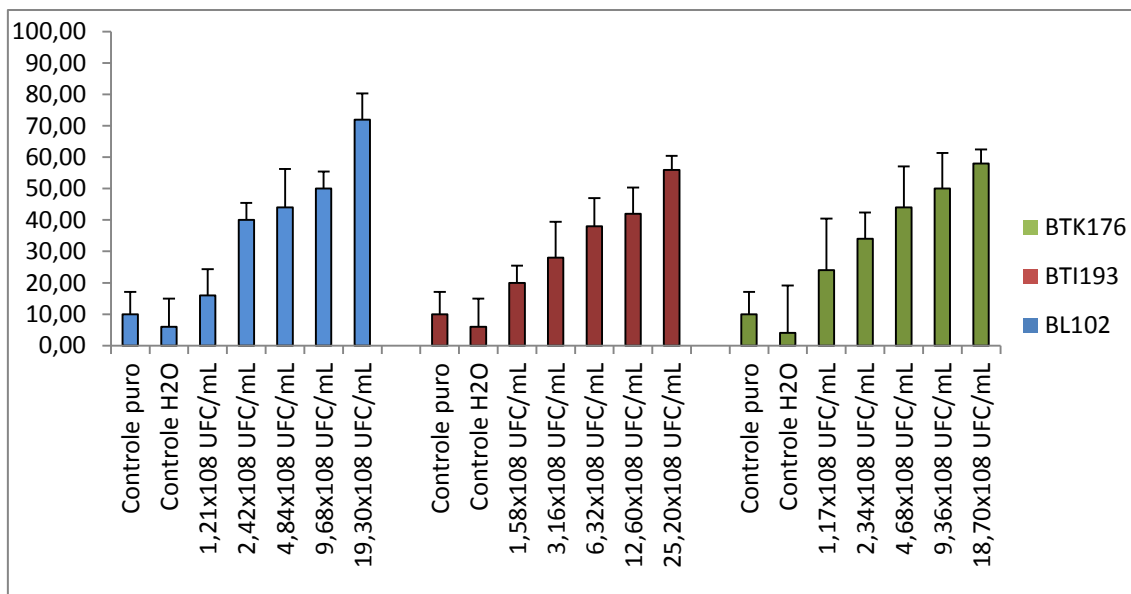


Figura 11: Comparação das mortalidades de neolarva a adulto da espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) corrigidas pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925), alimentada com dieta tratada com suspensão de *Brevibacillus laterosporus* (BL102), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193), *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) em diferentes concentrações e controles (puro e H₂O), em condições de laboratório.

Para comparar as diferentes estirpes bacterianas e determinar qual seria a mais viável na utilização como inseticida, foi calculada a concentração letal 50 (LC₅₀) desse período de desenvolvimento, como mostra a Tabela XII. A estirpe de *B. laterosporus* (BL102) foi a que apresentou melhor viabilidade para uso como inseticida com LC₅₀ no valor de $4,16 \times 10^8$ UFC/mL. Ruiu et al. (2006) encontraram valores de LC₅₀ para larvas de primeiro instar de $0,72 \times 10^8$, que é consideravelmente menor do que os valores encontrados no presente estudo e aqueles encontrados por Ruiu et al. (2007) para uma estirpe de *B. laterosporus* não produtora de corpo para-esporeal não foram comparados pois foram calculados baseados em massa seca e não em UFC. As estirpes de *B. thuringiensis* testadas no presente estudo causaram mortalidade significativamente maior do que as encontradas por Tharwhat et al. (1995) para os inseticidas comerciais Bactimos e Vectobac (38 – 53% e 55 - 71%, respectivamente). Zimmer et al. (2013) testaram as variedades *israelensis* e *kurstaki* de *B. thuringiensis* e constataram que as duas estirpes causaram alta mortalidade para *M. domestica*.

O aumento da variedade de bioagentes que possam ser utilizados em programas de controle de pragas e vetores é uma das fundamentais linhas de pesquisa no que se diz

respeito ao controle biológico (Bell, 1990). A variação da bioatividade apresentada por agentes biológicos representam uma das principais vantagens no uso desses agentes como bioinseticidas e em conjunto com o refinamento do entendimento sobre essa atividade, ocorre o aumento do arsenal de inseticidas sustentáveis a serem usados no manejo e controle de populações.

Tabela XII: Concentrações letais 50 (CL₅₀) de diferentes estirpes bacterianas em *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), alimentada com dieta tratada com suspensões de *Bacillus thuringiensis* e *Brevibacillus laterosporus*, em condições de laboratório.

Tratamento	Teste de normalidade (P>0,05)	CL₅₀ em UFC/mL	Limites (,95) X 10⁸	
BTI193	NÃO	12,40 x 10 ⁸	Inferior	4,94
			Superior	52,53
BTK176	SIM	4,76 x 10 ⁸	Inferior	1,75
			Superior	10,49
BL102	NÃO	4,16 x 10 ⁸	Inferior	1,67
			Superior	7,44

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Com a variedade de toxinas e modos de ação apresentados por bactérias entomopatogênicas, é muito interessante que se descubram novas estirpes com atividade inseticida para o uso em programas de controle biológico. Devido à aquisição de resistência aos inseticidas, inclusive aos baseados em formulações de *B. thuringiensis* e até que se tenha total entendimento sobre os mecanismos de resistência desses insetos se torna importante a descoberta de estirpes bacterianas que apresentem bons resultados no controle de pragas e vetores (Tabashnik, 1994).

4.5. Análise das células epiteliais do trato digestório

As bactérias entomopatogênicas testadas nesse experimento causam atividade tóxica primariamente causando lesões no tecido epitelial do intestino do inseto-alvo (Copping e Menn, 2000; Ruiu et al. 2006). No intuito de esclarecer a atividade dessas bactérias em ao nível celular, foram feitas microscopias das porções apicais das células epiteliais da porção posterior do intestino médio de *M. domestica* após a ingestão da dieta tratada com os três tipos bacterianos testados anteriormente e comparadas com micrografias do grupo controle H₂O, 48 e 72 horas após a eclosão.

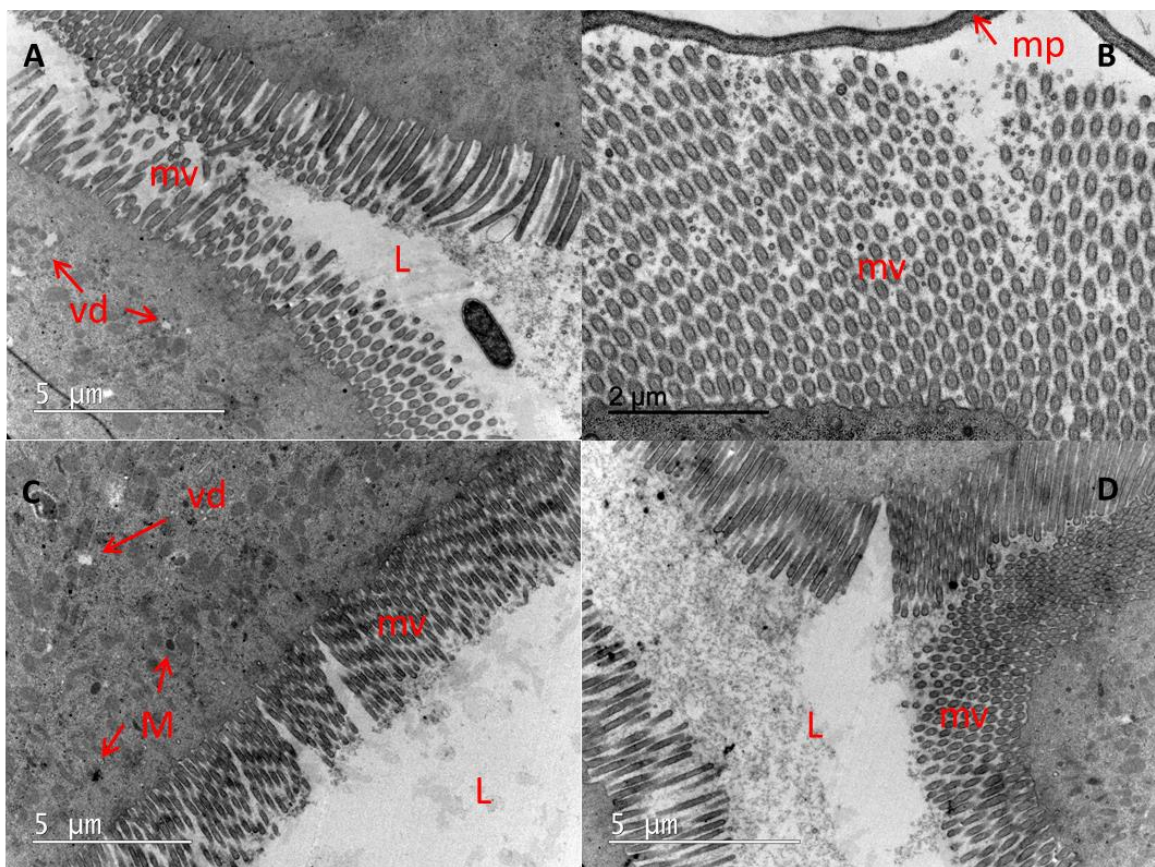


Figura 12: Célula epitelial do intestino médio do grupo controle com H₂O de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). A: Porção apical da célula epitelial, 48h após eclosão. x7800; B: Microvilosidades de células intestinais 48h após eclosão. x16000; C: Porção apical da célula epitelial, 72h após eclosão. x7800; D: Microvilosidades de células intestinais 72h após eclosão. x7800. L: Lúmen intestinal; M: Mitocôndria; mp: Matriz peritrófica; mv: Microvilosidades. vd: Vacúolos digestivos.

A porção apical das células epiteliais do grupo controle H₂O, 48h após a eclosão, apresenta citoplasma íntegro, com poucos e pequenos vacúolos digestivos como mostra a Figura 12: A. As microvilosidades são digitiformes, com estrutura alongada e presença

contínua ao bordo da célula (Figura 12B). Setenta e duas horas após a eclosão a integridade do citoplasma se mantém, assim como a presença de poucos vacúolos e organelas dispostas de forma organizada (Figura 12C), assim como as microvilosidades mantêm-se digitiformes e alongadas e acompanham integralmente o bordo da célula (Figura 12D).

No tratamento com *B. laterosporus* o aumento da produção de vacúolos já é evidente, em conjunto com desarranjo do citoplasma, 48h após a exposição aos esporos, porém, não é observada alteração no aspecto e na disposição das microvilosidades (Figura 13A). Setenta e duas horas após a exposição aos esporos, a vacuolização excessiva é evidente, causando grande desorganização no citoplasma e das organelas celulares (Figura 13B), concedendo um aspecto esponjiforme. As microvilosidades, no entanto, mantêm o aspecto normal presente no controle H₂O, mantendo o aspecto alongado e a distribuição uniforme (Figura 13B). Ruiu et al. (2006) observaram vacuolização citoplasmática parecida em *M. domestica* tratada com *B. laterosporus*, 12h após a exposição aos esporos. Nesse caso, a vacuolização também gerou desorganização estrutural do citoplasma, além de ter danificado cristas mitocondriais dessas células. Ruiu et al. (2006) também observaram lesão na membrana celular acompanhada de extrusão do conteúdo citoplasmático e danos estruturais às microvilosidades, o que não foi observado no presente estudo. Os danos celulares observados condizem com a descrição dos danos celulares causados pelas proteínas de *B. thuringiensis* por diversos autores em diferentes ordens de insetos-praga (Silva et al. 2008; Abdelkefi-Mesrati et al. 2011; Song et al. 2012).

O tratamento com a estirpe de *B. thuringiensis* var. *israelensis* demonstra aumento na vacuolização e desorganização citoplasmática semelhante ao encontrado no tratamento com a estirpe de *B. laterosporus*, após 48h de contato. (Figura 14A). As microvilosidades não apresentaram modificação estrutural, mas apresentaram interrupção da continuidade da distribuição na membrana celular (Figura 14B). Com 72h de exposição, pode ser observada a presença de corpos globulares no citoplasma, ocupando grande espaço no fluido citoplasmático e possivelmente, causando aumento volumétrico da célula epitelial, em conjunto com os vacúolos (Figura 14C).

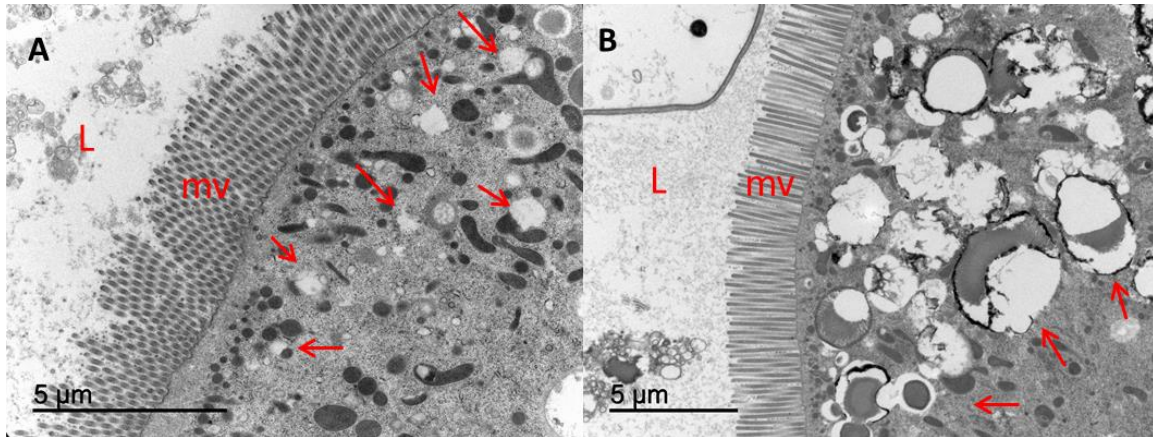


Figura 13: Célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com esporos de *Brevibacillus laterosporus* (BL102). A: Setas apontam aumento da formação de vesículas no citoplasma de células epiteliais, 48h após exposição. x7800; B: Setas apontam grande vacuolização, seguido de desorganização do citoplasma de células epiteliais 72h após exposição. x7800. L: Lúmen intestinal; mv: Microvilosidades.

As microvilosidades também são afetadas após 72h de exposição, apresentando aspecto inchado e disforme, formas clavadas e distribuição irregular na membrana da célula epitelial, além de vacuolização próxima à extremidade da célula (Figura 14D).

O tratamento com a estirpe de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK176) apresentou diferença nos efeitos entre as células, tendo variações entre o aumento da vacuolização e deformação das microvilosidades. No citoplasma das células expostas à 48h, algumas células apresentaram pouca vacuolização e pouca ou nenhuma alteração nas microvilosidades (Figura 15A). Outras células apresentaram aumento considerável na vacuolização, desestruturação do citoplasma e microvilosidades inchadas e disformes, com aspecto globuloso e clavado (Figura 15B). Após 72h de exposição a vacuolização do citoplasma é intensa e o fluido citoplasmático se torna menos denso, além de desorganização das organelas (Figura 15C). As microvilosidades mantêm as deformações e formas inchadas acrescentando a descontinuidade do seu aparecimento ao longo da membrana celular.

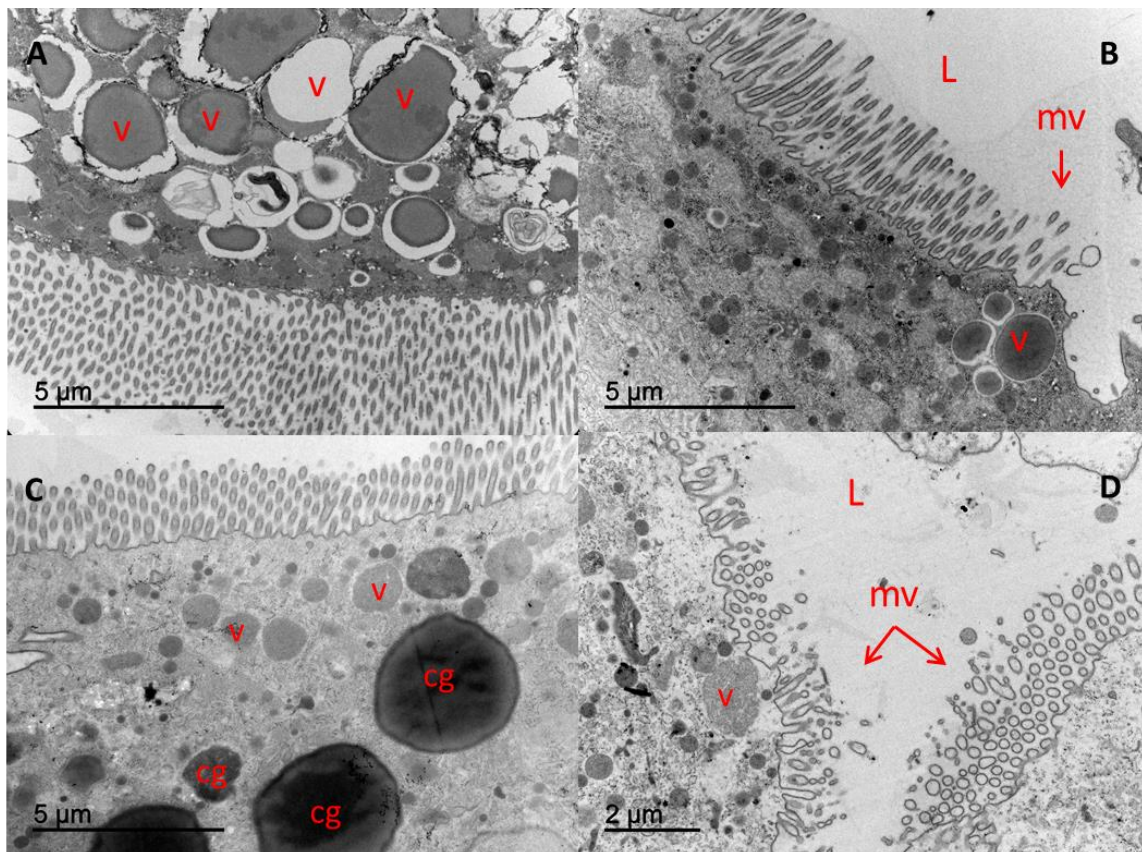


Figura 14: Célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI193). A: Porção apical da célula epitelial mostra aumento elevado na vacuolização, 48h após exposição. x7800; B: Microvilosidades de células intestinais 48h após exposição. x7800; C: Porção apical da célula epitelial apresentando vacuolização e formação de corpos globulares densos, 72h após exposição. x7800; D: Microvilosidades com aspecto inchado e desorganizado 72h após exposição. x9600. cg: Corpo Globular L: Lúmen intestinal; mv: Microvilosidades; v: Vacúolos.

As lesões apresentadas pela exposição a diferentes estirpes de *B. thuringiensis* em *M. domestica* no presente estudo corroboram aquelas relatadas por diversos autores em diferentes ordens de insetos. A formação de vacúolos no citoplasma e desorganização das organelas é descrita por Percy e Fast (1982), Singh et al. (1985), Yu et al. (1996) e Cavados et al. (2004) como sintoma comum à infecção por *B. thuringiensis*. O aparecimento de tais lesões é descrito como ocorrendo até 15 minutos após a exposição e se agravam com o passar do tempo, diferenciando conforme a toxicidade das estirpes (Singh et al. 1985).

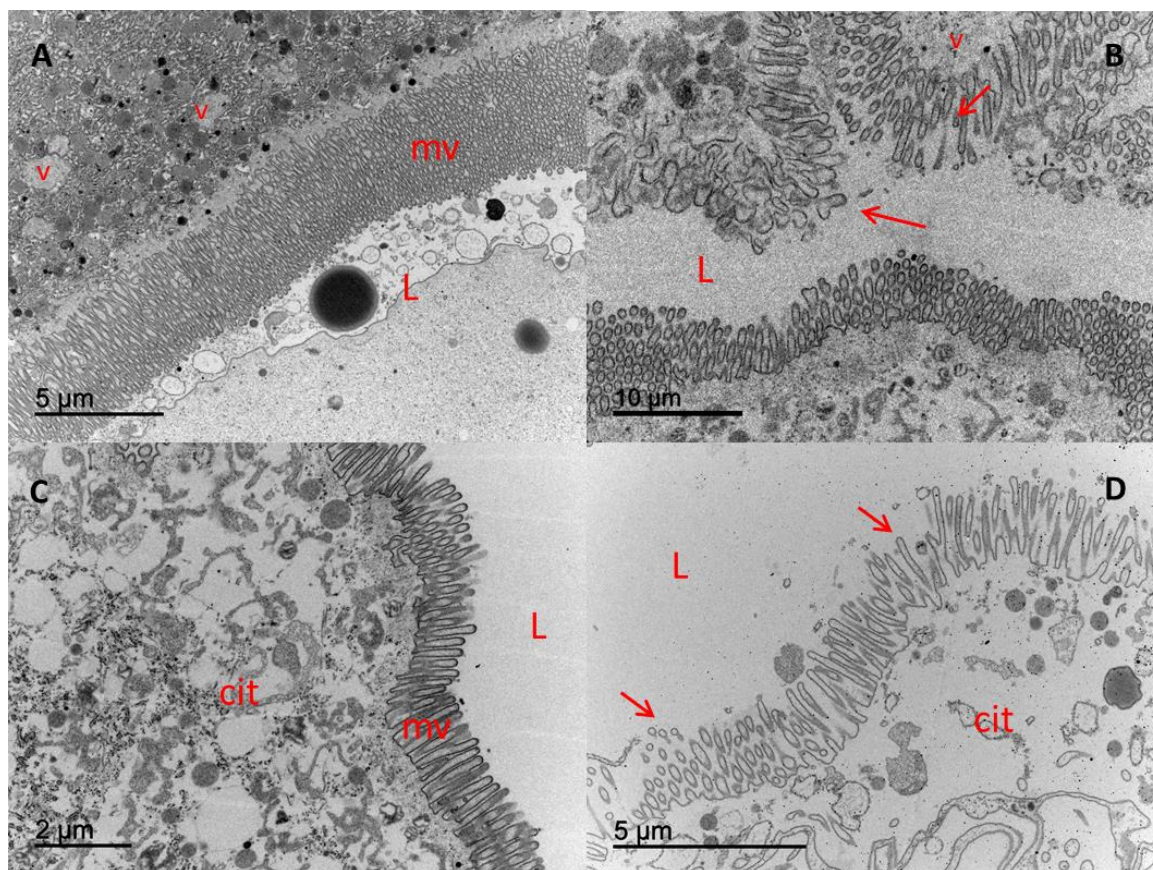


Figura 15: Célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* (BTK193). A: Porção apical da célula epitelial mostra aumento na vacuolização em célula menos afetada, 48h após exposição. x7800; B: Microvilosidades de células intestinais mais afetadas apresentam elevada deformidade, 48h após exposição. x5400; C: Porção apical da célula epitelial de larvas de *Musca domestica* apresentam elevada vacuolização e desorganização citoplasmática, 72h após exposição. x9600; D: Microvilosidades com aspecto inchado e desorganizado, 72h após exposição. x7800. cit: Fluido citoplasmático; L: Lúmen intestinal; mv: Microvilosidades; v: Vacúolos.

Diversos autores também identificam a interrupção das vilosidades ao longo da membrana como efeito conhecido da infecção por *B. thuringiensis* (Percy e Fast 1982; Lahkim-Tsoror et al. 1983; Singh et al. 1985; Yu et al. 1996; Cavados et al. 2004). Tal atividade deve ocorrer pois as toxinas produzidas por *B. thuringiensis* se acoplam a receptores presentes na membrana celular das microvilosidades, afetando os canais de permeabilidade nessas regiões (Copping e Menn, 2000), podendo causar aumento volumétrico, as interrupções e as deformidades visualizadas nessas estruturas e posteriormente no resto da célula.

Esse aumento de volume excessivo e enfraquecimento da membrana celular devido à vacuolização próxima e interrupção na continuidade das microvilosidades,

pode estar conectado diretamente ao extravasamento de conteúdo citoplasmático observado na Figura 16. Esse tipo de dano causado às células epiteliais também foi observado por Percy e Fast (1982) e pode ser o principal responsável pelas disfunções fisiológicas causadas por esse entomopatógeno. A presença de células mais ou menos afetadas nos mesmos grupos tratados, parece corroborar a afirmativa de que a ação das proteínas tóxicas ocorre somente em células sensibilizadas (Endo e Nishiitsutsuji-Uwo, 1982). Esses resultados demonstram que as estirpes utilizadas de *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* nesse experimento apresentam as mesmas características de ação de outras estirpes bacterianas que apresentam atividade bioinseticida efetiva

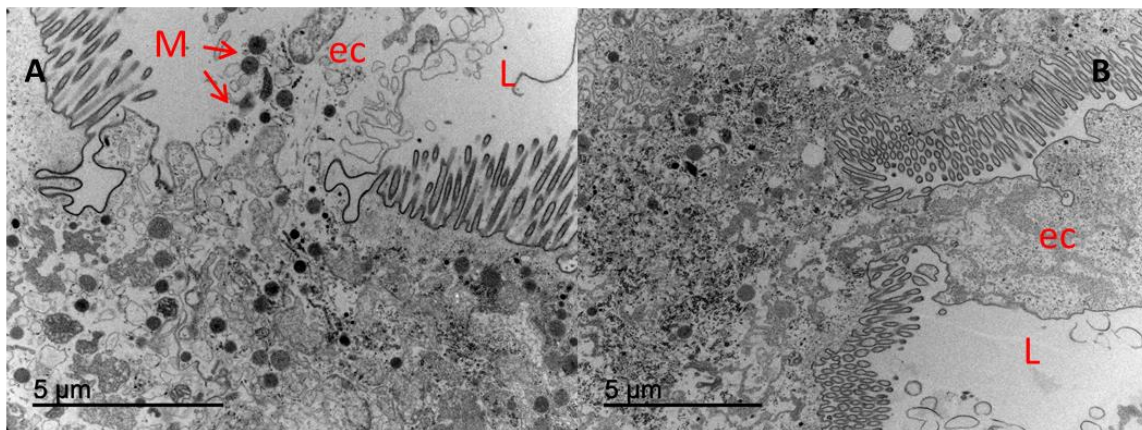


Figura 16: Extrusão de conteúdo citoplasmático no lúmen intestinal de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). A: 48h após exposição a esporos de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Organelas e fluido citoplasmáticos presentes no lúmen; B: 48h após exposição a esporos de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*. Fluido citoplasmático presente no lúmen. L: Lúmen intestinal; M: Mitocôndria; ec: Extrusão citoplasmática

5. CONCLUSÕES

- Das nove estirpes bacterianas testadas, *B. thuringiensis* e *B. laterosporus* apresentaram a mortalidade considerada aceitável para que fosse feita uma avaliação posterior mais completa.
- Das três estirpes testadas (BL102, BTI193 e BTK176) nenhuma apresentou variação significativa na massa das larvas quando comparadas aos dois controles (puro e H₂O), demonstrando que não houve atividade inibidora de alimentação, o que pode ser apropriado, devido à mortalidade ser compatível com a concentração testada e conseqüentemente, com a quantidade de esporos ingeridos.
- Não houve variação na duração dos períodos de desenvolvimento, o que indica que a ingestão e contato com essas estirpes não devem interferir com o mecanismo hormonal que regula as funções de crescimento.
- Todas as estirpes demonstraram mortalidade elevada e dose-dependente em *M. domestica*, o que pode apontar que sejam organismos viáveis para a utilização em programas de controle biológico.
- As estirpes testadas de *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* possuem atividade histopatológica condizente com o que é apresentado na literatura, tanto na ação sobre o citoplasma como na interrupção na distribuição uniforme das microvilosidades.
- As três estirpes testadas mostraram potencial elevado para que, com o aprofundamento do conhecimento sobre sua ação e sobre a resposta ao tratamento demonstrada por *M. domestica*, possam ser produzidos bioinseticidas comerciais a partir destas bactérias.
- A descrição das toxinas produzidas pelas estirpes de *B. thuringiensis* se faz importante para um melhor entendimento dos seus mecanismos de ação e especificidade.

BIBLIOGRAFIA

Abbott WS. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 1925. 18: 265-266.

Abdelkefi-Mesrati L, Boukedi H, Dammak-Karray M, Sellami-Boudawara T, Jaoua S, Tounsi S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 2011. 106:250–254.

Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. 57: 1117–1125

Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc Toxicol.* 2009. Vol. 2(1): 1–12.

Aly C, Mulla MS, Federici BA. Ingestion, dissolution, and proteolysis of the *Bacillus sphaericus* toxin by mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 1989. 53: 12–20.

Arvidson H, Dunn PE, Strnad S, Aronson AI. Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved in vivo and in the structure of a purified protoxin. *Mol Microbiol.* 1989. 3:1533-1543.

ATSDR. Toxicological Profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2002.

Barin A, Arabkhazaeli F, Rahbari S, Madanis A. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field. *Med and Vet Entomol.* 2010. 24, 88–90

Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins.* 2014 6: 1222–1243.

Bennet SM. The house fly (*Musca domestica*). 2006. Disponível em: <http://www.thepiedpiper.co.uk/th6a.htm>

- Berry C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. J of Invertebr Pathol. 2012. 109: 1–10
- Bidawid SP, Edeson JFB, Ibrahim J, Matossian RM. The role of non-biting flies in the transmission of enteric pathogens (*Salmonella* spp. and *Shigella* spp.) in Beirut. Lebanon. Ann Trop Med Parasitol. 1978; 72: 117-121.
- Bloomcamp CL, Patterson RS. Koehler PG. Cyromazine resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol. 1987. 80: 352:357.
- Buss EA, Park-Brown SG. Natural products for insect pest management. IFAS Extension, University of Florida. 2006. ENY-350; 6 p
- Cárdenas M, Martínez R. Parasite protozoa of importance in public health picked up by *Musca domestica* Linnaeus in Lima, Peru. Rev. Peru. biol. 2004. v.11 n.2.
- Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo-Coutinho CJPC, Rabinovitch L. Histopathological and ultrastructural effects of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). Mem do Inst Oswaldo Cruz. 2004. 99:493-8.
- Chan SW, Thanabalu T, Wee BY, Porter AG. Unusual amino acid determinants of host range in the Mtx2 family of mosquitocidal toxins. J. Biol. Chem. 1996. 271, 14183–14187.
- Charles JF, Nielsen-LeRoux C. Mosquitocidal Bacterial Toxins: Diversity, Mode of Action and Resistance Phenomena. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000. 95: 201-206.
- Cloyd R. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better than conventional insecticide? Illinois Pesticide Review. 2004. 17: 1-3.
- Copping LG, Menn JJ. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Management Science. 2000. 56, 8-651–676
- Crespo DC, Lecuona RE, Hogsette JA. Biological Control: An Important Component in Integrated Management of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Caged-Layer Poultry Houses in Buenos Aires, Argentina. Bio Control. 1998. 13, 16–24

Dehghani R, Sedaghat MM, Sabahi-Bidgoli M. Wound Myiasis due to *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Persian Horned Viper, *Pseudocerastes persicus* (Squamata: Viperidae). J Arthropod-Borne Dis, 2012, 6(1): 86–89

Donovan WP, Rupar MJ, Slaney AC, et al. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. Appl Environ Microbiol. 1992. 3921-3927

Endo Y, Nishiitsutsuji-Uwo J. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol. 1980. 36:90–103.

Erb SL, Bouchier RS, van Frankenhuyzen K, Smith SM. Sublethal Effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the Tachinid Parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). Environ Entomol, 2001. 30: 1174-1181.

Farnham AW. Genetics of resistance of pyrethroid-selected houseflies, *Musca domestica* L. Pesticide Science. 1973 V. 4, I. 4, 513–520.

Federici BA. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. J of Invertebr Pathol. 2005. 89 30–38.

Ferraz ACP, Proença B, Gadelha BQ, Faria LM, Barbalho MGM, Aguiar-Coelho VM, Lessa CSS. First record of human myiasis caused by association of the species *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae), and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). J of Med Entomol. 2010. 47(3):487-490

Finney DJ. Probit Analysis. University Press, Cambridge. 1962. 50-80.

Forsgren E. European foulbrood in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 2010. 103:S5–S9.

Fotedar R, Banerjee U, Shrinivas SS, Verma AK. The housefly (*Musca domestica*) as a carrier of pathogenic microorganisms in a hospital environment. J of Hosp Infect. 1992. 20, 209–215.

Geden CJ. Status of biopesticides for control of house flies. JBiopest. 2012. 5: 1-11

Greenberg B. Flies and disease. Vol I Ecology, classification and biotic association. Princeton. Princeton Univ. Press, 1971. 856p.

Greenberg B. Flies and Disease. Vol II: Biology and disease transmission. Princeton. Princeton Univ. Press. 1973. 447p.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu. Rev. Entomol. 2000. 45:371–391

Hodgman TC, Ziniu Y, Ming S, Sawyer T , Nicholls CM , Ellar DJ. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. FEMS Microbiol Lett. 1993. 114: 17-22

Indrasith LS, Suzuki N, Ogiwara K, Asano S, Hori H. Activated insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovars killed adult houseflies. Lett. Appl. Microbiol., 1992. 14: 174 – 177.

Iwasa M, Makino SI, Asakura H, Kobori H, Morimoto Y. Detection of Escherichia coli O157:H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a Cattle Farm in Japan. J of Med Entomol. 1999. 108-112

Johnson C, Bishop AH, Turner CL. Isolation and Activity of Strains of *Bacillus thuringiensis* Toxic to Larvae of the Housefly (Diptera: Muscidae) and Tropical Blowflies (Diptera: Calliphoridae). J. Invertebr Pathol. 1997. 71: 138–144

Lahkin-Tsoror C, Pascar-Gluzman Z, Margalit J, Barak Z. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Serovar H14 in *Aedes aegyptic* Histopathological Studies, J. Invertebr. Pathol. 1983. 41:104

Levinson BL, Kasyan KJ, Chiu SS, Currier TC, Gonzalez JM. Identification of b-exotoxin production, plasmids encoding b-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. J. Bacteriol. 1990. 172: 3172–3179.

Maia AAM, Gomes AG. Vetores de *Dermatobia hominis* , (Linnaeus, 1781) (Diptera: Cuterebridae) na região de Uberaba, Minas Gerais. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 1988. [S.l.], v. 25, n. 1, p. 47-51.

- Malik A, Singh N, Satya S. House fly (*Musca domestica*): A review of control strategies for a challenging pest. J of Environ Sci and Health. 2007. Part B. 42, 453–469
- Marchiori CH, Castro MEV, Paiva TCG, Teixeira FF, Silva CG. Dípteros muscoides de importância médica e veterinária e seus parasitóides em Goiás. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 52, n. 4, 2000. p. 215-220
- McGaughey WH, Beeman RW. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 1988. 8: 28-33
- Miller RW, Pickens LG, Potts WE. Comparison of traps and an integrated program to manage house flies and stable flies on dairy farms. J. Agric. Entomol. 1993. 10, 189–196.
- Montaldi FA, Roth JL. Parasporal bodies of *Bacillus laterosporus* sporangia. J Bacteriol. 1990. 172: 2168-2171.
- Mörner J, Bos R, Fredrix M. Reducing and eliminating the use of persistent organic pesticides. Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management. 2002. 91p. Disponível em: <http://www.who.int/heli/risks/vectors/vectordirectory/en/index.html> Acessado em: Novembro/2014
- Nazni WA, Seleena B, Lee HL, Jeffery J, Rogayah TAR, Sofian MA. Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica*. Trop Biomed. 2005. 22(2): 225–231
- Nishiwaki H, Nakashima K, Ishida C, Kawamura T, Matsuda K. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal poreforming toxin, Sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol. 2007. 73, 3404–3411.
- Oliveira EJ, Rabinovitch L, Monnerat RG, Passos LKJ, Zahner V. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. Appl. Environ. Microbiol. 2004. 70(11):6657
- Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. Clin. Microbiol. Rev. 23(1):218. 2010.

Otake S, Dee Sa, Moon RD, Rossow KD, Trincado C, Pijoan C. Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). Veterinary Record. 2004. 154, 80-85

Percy J, Fast PG. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J Invertebr Pathol. 1983.41: 86-98.

Pimprikar GD, Georghiou GP. Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house fly, *Musca domestica* (L.). Pesticide Biochemistry and Physiology. 1979 V. 12, I. 1, 10–22.

Polyakova YB. Response reactions of urban populations of house flies against anthropogenic influence. Proceedings of the 3rd International Conference Of Urban Pests. Robinson WH, Rettich F, Rambo GW (editores). 1999

Queiroz MMC, Milward-de-Azevedo EMV. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (wiedemann) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE), em condições de laboratório. Rev. Bras. Zool. 1991. 8:75-84.

Rahuma N, Ghenghesh KS, Ben-Aissa R, Elamaari A. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. Ann of Trop Med & Parasitol. 2005. Vol. 99, No. 8, 795–802

Riddiford LM, Truman JW. Biochemistry of Insect Hormones and Insect Growth Regulators. Academic Press. 1978, 307p.

Ruiu L. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. Insects 2013. 4: 476-492

Ruiu L, Delrio G, Ellar DJ, et al. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). Entomol Exp et Appl. 2006. 118: 137–144

Ruiu L, Floris I, Satta A, Ellar DJ. Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti*. Bio Control. 2007. 43: 136–143

- Ruiu L, Satta A, Floris I. Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after *Brevibacillus laterosporus* ingestion. *J of Invertebr Pathol.* 2012. 211–216
- Salama, HS, Foda MS, El-Bendary MA, Abdel-Razek A. Infection of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, by spore-forming bacilli indigenous to its natural habitat in Egypt. *J. Pest Sci.* 2004. 77: 27-32.
- Sales MSN, Costa GL, Bittencourt VREP. Isolation of Fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) Captured at Two Natural Breeding Grounds in the Municipality of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(8).* 2002. 1107-1110
- Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, et al. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(2), 2006, pp. 327–332.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Micro And Mol Biol Rev.* 1998. 775–806
- Sehgal R, Bhatti HPS, Bhasin DK, Sood AK, Nada R, Malla N, Singh K. Intestinal myiasis due to *Musca domestica*: A report of two cases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2002. 55, 191-193
- Sethajintanin D, Anderson KA. Temporal bioavailability of organochlorine pesticides and PCBs. *Environ Sci Technol.*, 15; 40(12): 3689-95. 2006.
- Shono T, Scott JG. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pest Biochem and Physiol.* 2003. V. 75, I. 1–2, p.1–7
- Shono T, Zhang L, Scott JG. Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pest Biochem and Physiol.* 2004. 80:106–112
- Silva VC, Pinheiro NL, Scherer PO, Falcão SS, Ribeiro VR, et al. Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Microsc. Res. Technol.* 2008. 71:663–668.

- Sims SR. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein. Effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. *Southwestern Entomologist*. 1997. 22: 395-404
- Singh GJP, Schouest Jr. LP, Gill SS. The Toxic Action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Aedes aegypti* *in vivo* I. The Relevance of Midgut Lesions to Its Poisoning Syndrome. *Pest Biochem and Physiol*. 1985. 26:36-46
- Song, P, Wang QY, Nangong ZY, Su J, Ge D. Identification of *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) midgut putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry7Ab3 toxin. *J. Invertebr. Pathol*. 2012; 109: 318–322
- Stone TB, Sims SR, Marrone PG. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the 8-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol*. 1989. 53:228--34
- Sukontason K, Bunchoo M, Khantawa B, Sukontason K, Piangjai S, Choochote W. *Musca domestica* as a Mechanical Carrier of Bacteria in Chiang Mai, North Thailand. *J. Vect. Ecol*. 2000. 25, 114–117.
- Sulaiman S, Sohadi AR, Yunus H, Ibrahim, R. The role of some cyclorrhaphan flies as carriers of human helminths in Malaysia. *Med Veterinary Entomol* 1988; 2: 1-6.
- Tabashnik BE. Evolution of resistance To *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol*. 1994. 39:47-79
- Thanabalu T, Berry C, Hindley J. Cytotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitoicidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1: possible roles of the 27- and 70-kilodalton peptides. *J. Bacteriol*. 1993. 175, 2314–2320.
- Tharwat ME, Hassan AN, Moustafa AA, Mahran AH. Effects of industrial formulations of *Bacillus thuringiensis* on the biology of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *The J of the Egyptian Pub Health Assoc*. 1995. 70: 151-163.
- Ucan CM, Erol B, Balacan F, Atilgan S, Yaman F, Arslanoglu Z, et al. Myiasis caused by *Musca domestica* larvae in child: a case study. *J of Animal and Vet Adv*. 2011. 10(16): 2149-2152.

Umeche N, Mandah LE. *Musca domestica* as a carrier of intestinal helminths in Calabar, Nigeria. East Afr Med J. 1989. 66(5):349-52.

Valicente FH, Tuelher ES, Leite MIS, Freire FL, Vieira CM. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. Rev Bras de Milho e Sorgo 2010, 9: 1-11.

van Emden HF, Peakall DB. Beyond Silent Spring: Integrated pest management and chemical safety. Springer. 1996. 320p.

Wen Z, Scott JG. Cross-Resistance to Imidacloprid in Strains of German Cockroach (*Blattella germanica*) and House Fly (*Musca domestica*). Pesticide Science. 1999. V. 49, I. 4, p. 367–371.

Wilton BE, Klowden MJ. Solubilized crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis: effect on adult house flies, stable flies (Diptera: Muscidae), and green lacewings (Neuroptera: Chrysomelidae). J. Am. Mosq. Contr. Assoc. 1985. 1: 97-98.

Yu C-G, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG, Estruch JJ. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl and Environ Microbiol. 1996. 532–536

Yul RJ, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. J. Microbiol. Biotechnol. 2007, 17: 547–559
Bacillus thuringiensis as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control

Zimmer CR, de Castro LLD, Pires SM, et al. Efficacy of entomopathogenic bacteria for control of *Musca domestica*. J of Invertebr Pathol. 2013. 114: 241–244