



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

***BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya megacephala*
(FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO***

Isabel Nogueira Carramaschi

Rio de Janeiro

Junho de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde

Orientador: Prof. Dra. Viviane Zahner

RIO DE JANEIRO

Junho de 2015

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

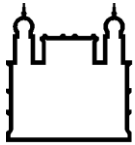
C312 Carramaschi, Isabel Nogueira

Bioprospecção de bactérias entomopatogênicas sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório / Isabel Nogueira Carramaschi. – Rio de Janeiro, 2015.
xi, 86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2015.
Bibliografia: f. 77-86

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. Controle biológico. 3. Moscas sinantrópicas. I. Título.

CDD 579.3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

AUTOR: ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya megacephala*
(FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO**

ORIENTADOR: Prof. Dra. Viviane Zahner

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra Gisela Lara da Costa – Fiocruz/RJ - Presidente

Prof. Dr. José Mario D'almeida – Universidade Federal Fluminense/RJ

Prof. Dra. Vania Rita Elias Pinheiro Bittencourt – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/RJ

Prof. Dra Margareth Maria de Carvalho Queiroz – Fiocruz/RJ

Prof. Dra. Marina Viana Braga – Fiocruz/ RJ

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me encorajou nesta caminhada e me permitiu chegar aonde cheguei.

Agradeço aos meus pais Therezinha Barros Nogueira e Victor Luiz Neves Carramaschi pelo amor, carinho, apoio, conselhos, ajuda e atenção. Agradeço ao meu irmão Victor Carramaschi, pelos momentos de preocupação de irmão mais velho. Agradeço ao meu namorado Pedro Henrique Lannes pelo companheirismo. Sem o apoio e ajuda deles não teria realizado este trabalho.

Agradeço à minha orientadora, professora e amiga Dra. Viviane Zahner pela orientação, paciência ao longo destes anos, além do incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Agradeço por todos seus ensinamentos e conselhos.

À professora e chefe do Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Dra. Margareth Queiroz pela orientação, conselhos, paciência e ajuda na elaboração deste trabalho. Agradeço à Marina Braga, pesquisadora do laboratório, por ter me ajudado em vários momentos.

Agradeço aos meus amigos de laboratório que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, Jéssica, Lorrane, Jonathan, Isadora, Vitor, Thiany, Lucas, Eliane, Raquel, Alexandre, Paloma, Rodrigo, Luiz, Carlos, e Karyne por todos os momentos e conversas compartilhadas no laboratório.

Agradeço ao Otávio Padula, pelo livre acesso ao laboratório de Bioprodutos em Farmanguinhos e por ter possibilitado o uso de diversos equipamentos. À Dra. Jacenir Mallet pela ajuda na preparação das amostras e ajuda no microscópio eletrônico de transmissão do IOC.

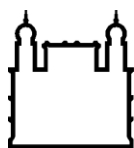
Agradeço ao professor Celso Barbosa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela ajuda nos testes estatísticos utilizados.

Agradeço às plataformas tecnológicas de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth e a Plataforma de Sequenciamento de DNA.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Saúde, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa e ao Instituto Oswaldo Cruz.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

(Albert Einstein)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

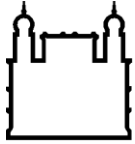
BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

Chrysomya megacephala, conhecida como mosca-varejeira, tem importância para a saúde pública devido ao fato de os adultos serem potenciais vetores de patógenos entéricos, e causadores de miíase, tanto em humanos quanto em animais. Além disso, trata-se de uma espécie exótica invasora. Os poucos estudos que abordam o controle de *C. megacephala* empregam os inseticidas químicos, como os piretroides e os organofosfatos e o uso de parasitoides e metabólitos secundários de plantas. Bactérias entomopatogênicas são uma alternativa inteligente para a redução do uso de agroquímicos, pois possuem maior eficácia, menor custo e benefícios ambientais, como segurança para os humanos e outros organismos não alvo. Nesse sentido, este trabalho avaliou a bioatividade de *Brevibacillus laterosporus* e *Bacillus thuringiensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala*. Foram testadas (bioensaios preliminares) 15 cepas da espécie *Brevibacillus laterosporus* e 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de primeiro instar de *C. megacephala*. Análises estatísticas indicaram maior atividade larvicida das cepas Bon 707, IGM 16-92 e Shi 3 de *B. laterosporus*, causando mortalidade significativa e superior a 50%. Foram realizados bioensaios completos analisando os efeitos letais (mortalidade larval, pupal e total) e subletais (período de desenvolvimento pós-embrionário em dias e média de peso das larvas), das cepas Bon 707, Shi 3 e IGM 16-92. Suspensões de esporos das cepas Shi 3 e Bon 707 apresentaram taxas de mortalidade superiores. A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou alterações intestinais decorrentes da ingestão pelas larvas de esporos das cepas Bon 707 e IGM 16-92.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

BIOPROSPECTING ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA ON THE POST-EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) IN LABORATORY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI

Chrysomya megacephala, known as a blowfly species, is important for public health due to the fact that adults are potential vectors of enteric pathogens, and cause myiasis, both in humans and in animals. Furthermore, it is an exotic invasive species. The few studies that address the control of *C. megacephala* employ chemical insecticides, such as pyrethroids and organophosphates, the use of parasitoids and secondary plant metabolites. Entomopathogenic bacteria are a smart alternative for reducing the use of pesticides because they have greater efficiency, lower cost and environmental benefits such as safety for humans and other non-target organisms. Therefore, this study evaluated the bioactivity of *Brevibacillus laterosporus* and *Bacillus thuringiensis* strains on the post-embryonic development *Chrysomya megacephala*. Fifteen strains of *Brevibacillus laterosporus* species and 3 strains of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* were tested (preliminary bioassays) against first instar larvae of *C. megacephala*. Statistical analysis indicated higher larvicidal activity of the strains Bon 707, IGM 16-92 and Shi 3 of *B. laterosporus*, causing significant mortality, higher than 50%. Complete bioassays analyzing the lethal effects (larval, pupal and total mortality) and sublethal effects (period in days of post-embryonic development and mean weight of larvae) were performed with strains Bon 707, Shi 3 and IGM 16-92. Spore suspensions of strains Bon 707 and Shi 3 presented higher mortality rates. Analysis by transmission electron microscopy revealed intestinal alterations resulting from the intake of spores of Bon 707 and IGM 16-92 strains by the larvae.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dípteros Muscoides e sua importância na saúde pública	1
1.1.1 Miíases	3
1.2 A família Calliphoridae	7
1.2.1 O gênero <i>Chrysomya</i>	7
1.2.2 A espécie <i>Chrysomya megacephala</i>	9
1.3 Controle de Insetos Vetores e Pragas	14
1.4 Uso de bactérias em programas de controle de vetores	17
1.4.1 Modo de ação de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
1.4.2 Outras bactérias com potencial ação inseticida.....	21
1.4.3 O gênero <i>Brevibacillus</i>	22
1.4.3.1 A ESPÉCIE <i>Brevibacillus laterosporus</i>	24
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Método de Coleta de Dípteros	30
4.2 Manutenção das colônias de <i>Chrysomya megacephala</i> em laboratório	30
4.3 Manutenção das cepas bacterianas	32
4.4 Identificação de estirpes com atividade tóxica contra larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> (testes preliminares)	34
4.5 Preparo de suspensão bacteriana (biomassa) por meio de crescimento em meio líquido NYSM	35
4.6 Bioensaios realizados a partir do crescimento em meio líquido – Bioensaios completos	36
4.7 Bioensaio com adultos de <i>Chrysomya megacephala</i>	37
4.8 Identificação das bactérias cultiváveis presentes na dieta larval através de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	38

4.9	Dissecção dos insetos e análise ultraestrutural através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	40
4.9.1	Análises Estatísticas.....	42
5	RESULTADOS	44
5.1	Bioensaio com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> IGM 16-92.....	45
5.2	Bioensaio com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707.....	48
5.3	Bioensaio com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Shi 3.....	55
5.4	Cortes ultrafinos do intestino médio posterior de larvas de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> analisados através de microscopia eletrônica de transmissão	59
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Caçamba de lixo da Comunidade do Amorim, próxima a uma das entradas da Fiocruz, local onde foi realizada a coleta de indivíduos adultos de <i>Chrysomya megacephala</i> . Fonte: Acervo Pessoal.....	30
Figura 2: Placa de Petri contendo substrato para maturação e obtenção de postura de fêmeas adultas de <i>Chrysomya megacephala</i> (esquerda). Gaiola de criação e manutenção da colônia de <i>Chrysomya megacephala</i> sob condições de laboratório (direita).....	31
Figura 3: Larva de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> posicionada ventralmente na placa de Petri para dissecação do intestino médio posterior.....	40
Figura 4: Intestino médio exposto de <i>Chrysomya megacephala</i>	41
Figura 5: Representação das porções do trato digestivo de dípteros ciclorrafos e a região de interesse para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: Ruiu et al., (2012). Journal of Invertebrate Pathology (2012) 211–216.	41
Figura 6: Microscópio de transmissão Jeol Jem-1011, pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.....	42
Figura 7: Período de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto (em dias) de <i>Chrysomya megacephala</i> após bioensaio com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> IGM 16-92. Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas. Valores de significância são representados como *P<0,05 (t-test).	47
Figura 8: Período de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto (em dias) de <i>Chrysomya megacephala</i> após bioensaio com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707 (crescimento em meio líquido NYSM). Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas. Valores de significância são representados como *P<0,05 (t-test).....	53
Figura 9: Mortalidade (%) de adultos de <i>Chrysomya megacephala</i> recém-emergidos por dias de tratamento com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707 (crescimento em meio líquido NYSM).	54
Figura 10: Período de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto (em dias) de <i>Chrysomya megacephala</i> após bioensaio com a cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Shi 3 (crescimento em meio líquido NYSM). Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas. Valores de significância são representados como *P<0,05 (t-test).....	56
Figura 11: Cortes ultrafinos da porção posterior do intestino médio de larvas de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> do grupo controle. a Intestino médio	

posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Aumento de 5.000 vezes. b Extremidade da vilosidade do intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Aumento de 8.000 vezes. c Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Aumento de 8.000 vezes. d Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Camada de tecido epitelial abaixo das vilosidades. Aumento de 8.000 vezes. e Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Microvilosidades íntegras. Aumento de 15.000 vezes. f Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Borda do epitélio intestinal e vilosidades. Aumento de 25.000 vezes. * Lúmen Intestinal. V vacúolos digestivos.60

Figura 12: Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com suspensão de esporos da cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707. a Rompimento das vilosidades intestinais, vacuolização e deformidades do tecido epitelial. Aumento de 8.000 vezes. b Esporos da cepa Bon 707 em camada de tecido epitelial de *C. megacephala*. Aumento de 8.000 vezes. c Perfis de membrana liberados para o meio extracelular. Aumento de 8.000 vezes. d Região de descontinuidade de borda. Aumento de 8.000 vezes. e Intestino médio posterior de larva de *C. megacephala* após bioensaio com suspensão de esporos da cepa Bon 707. Região de descontinuidade de borda. Aumento de 25.000 vezes. f Esporos da cepa Bon 707 no epitélio intestinal de larvas de terceiro instar de *C. megacephala*. Aumento de 25.000 vezes. L lúmen intestinal, V vacúolos, Es esporos, Pm perfis de membrana e Mv microvilosidades.61

Figura 13: Cortes do intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com suspensão de esporos da cepa IGM *Brevibacillus laterosporus* 16-92. a Base do epitélio intestinal, Tr traqueia, Tm tecido muscular e Mb membrana basal sem modificações. b Vacuolização da camada de tecido epitelial abaixo das microvilosidades, V vacúolos. c Presença de esporos (Es) da cepa IGM 16-92 no lúmen (L) intestinal entre uma célula com a microvilosidade intacta e outra destruída. d Presença de esporos (Es) da cepa IGM 16-92 no lúmen (L) intestinal entre uma célula com a microvilosidade intacta e outra danificada. e Presença de esporos (Es) da cepa IGM 16-92 no lúmen (L) intestinal entre uma célula com a microvilosidade intacta e outra destruída. f Esporos da cepa Bon IGM 16-92 no lúmen intestinal de larvas de terceiro instar de *C. megacephala*.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas bacterianas de <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Brevibacillus laterosporus</i> utilizadas nos bioensaios.....	33
Tabela 2: Iniciadores específicos para amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizados nas reações de PCR.	39
Tabela 3: Efeito tóxico de cepas de <i>Brevibacillus laterosporus</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas de primeiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae) sob condições de laboratório.....	44
Tabela 4: Mortalidade (%) larval, pupal, total e peso médio (mg) de larvas de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> , após bioensaio com diferentes concentrações de esporo da cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> IGM 16-92, a partir de crescimento em meio NYSM líquido.....	46
Tabela 5: Mortalidade (%) larval, pupal e total de <i>Chrysomya megacephala</i> após bioensaio com diferentes concentrações da cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707, a partir de crescimento em meio líquido NYSM.	49
Tabela 6: Mortalidade (%) larval, pupal, total e peso médio (mg) de larvas de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> após bioensaio com diferentes concentrações de esporo da cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707, a partir de crescimento em meio NYSM líquido e sólido (Ágar Nutriente).....	51
Tabela 7: Mortalidade (%) larval, pupal, total e peso médio (mg) de larvas de terceiro instar de <i>Chrysomya megacephala</i> tratada com diferentes concentrações de esporo da cepa <i>Brevibacillus laterosporus</i> Shi 3, a partir de crescimento em meio NYSM líquido.....	55
Tabela 8: Identificação das cepas bacterianas cultiváveis isoladas da dieta larval utilizada nos bioensaios com as diferentes cepas de <i>Brevibacillus laterosporus</i>	58

1 Introdução

1.1 Dípteros Muscoides e sua importância na saúde pública

Diversas espécies de moscas parasitam humanos e animais de criação causando irritação e levando a perdas na produção do gado; são ainda capazes de gerar doenças em ambos. As moscas sugadoras de sangue (tabanídeos e moscas do estábulo) são frequentemente encontradas em locais de criação de animais e causam picadas dolorosas, que podem resultar em significativa perda de sangue pelo animal. Além disso, podem ser vetores mecânicos de agentes patogênicos do gado, como *Anaplasma marginale* e *Trypanosoma vivax* (Peter et al. 2005).

Adultos de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (“Horn flies”) também constituem um grande problema, pois permanecem no gado, atrapalhando sua alimentação e descanso, além de causarem picadas dolorosas. A espécie *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (“Stable fly”) também causa os mesmos problemas no gado, além de transmitir mecanicamente algumas doenças. Moscas tsé-tsé, pertencentes ao grupo *Glossina* spp., também são sugadoras de sangue e transmitem o agente etiológico da doença do sono, tanto em humanos quanto em animais. Essas moscas ocorrem em uma grande região da África Subsaariana e prejudicam o desenvolvimento de certas atividades econômicas, como agricultura e pecuária (Peter et al. 2005).

Moscas sinantrópicas, do tipo não picadoras (Famílias Sarcophagidae, Muscidae e Calliphoridae) vivem em associação ao homem e são capazes de se reproduzir em lixões e em matéria orgânica em decomposição (Greenberg, 1973). Devido aos seus hábitos, essas moscas podem veicular diversos micro-organismos patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários (Greenberg, 1973), fato que ressalta a importância do seu controle para a saúde pública. Sabe-se que a veiculação destes patógenos ocorre por meio da região externa de seu corpo (patas, asas e tórax), por regurgitação de seu alimento sobre superfícies e também por meio de suas fezes contaminadas (Greenberg, 1973).

No Paquistão, o controle de populações de moscas com aplicações de inseticidas em “spray”, como deltametrina, levou a uma redução significativa de diarreia infantil, durante os períodos de alta densidade de moscas (Chavassee et al. 1999). Poucos estudos haviam demonstrado o impacto positivo de medidas de controle de moscas na incidência de diarreia em países em desenvolvimento. No Japão, foi sugerida a transmissão mecânica por moscas do vírus H5N1 (subtipo do vírus influenza A), causador da gripe aviária em aves e humanos, contribuindo para disseminação do surto (Sawabe et al. 2011).

A revisão de Graczyk et al. (2001) mostra a importância das moscas não picadoras pertencentes ao gênero *Musca* sp. na transmissão de doenças infecciosas humanas, como *Chlamydia trachomatis*, bactéria causadora do tracoma, uma doença infecciosa que causa inflamação da conjuntiva, podendo levar à cegueira, principalmente em crianças na África Subsaariana. Além disso, os autores também relacionam as moscas à transmissão de infecções nosocomiais e também de enteropatógenos (Graczyk et al. 2001). No Brasil existem focos localizados da doença, principalmente na região nordeste (WHO 1997)

Estudo realizado na Nigéria sugeriu o envolvimento de moscas sinantrópicas na epidemiologia de helmintoses intestinais humanas. As espécies de dípteros foram expostas a fezes humanas contaminadas e foi feita análise posterior da sua superfície corporal e conteúdo intestinal, revelando a presença de ovos viáveis de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Taenia* sp. (Adenusi e Adewoga, 2013).

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas clinicamente importantes, presentes em bactérias capazes de hidrolisar e inativar antibióticos beta-lactâmicos, reduzindo as opções terapêuticas dos pacientes em ambientes hospitalares (Nóbrega e Brocchi, 2014). Cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs já foram detectadas em moscas domésticas e varejeiras coletadas em aviários, demonstrando constituir potencial via de disseminação de genes de resistência adquiridos nestes locais de criação de animais, carreando-os para a comunidade (Blaak et al. 2014).

De acordo com Zurek e Ghosh (2014), diversos estudos apontam a relação entre cepas resistentes em alimentos de origem animal e sua veiculação por moscas. Além disso, pode ocorrer a multiplicação de bactérias, bem como a

transferência horizontal de genes de resistência aos antibióticos no trato digestório desses insetos. Os autores ressaltam a possibilidade de transmissão de bactérias multirresistentes dos locais de criação de animais para a população humana. A adoção de programas de manejo integrado de pestes nestes locais, visando à diminuição da disseminação desses genes carregados pelas moscas, deve ser levada em consideração.

Na literatura científica, percebe-se que vem crescendo o número de estudos que evidenciam a relação entre espécies de moscas sinantrópicas, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Chrysomya* sp., e problemas de saúde pública, principalmente em populações mais pobres e com condições sanitárias deficientes. Dentre estes problemas, podemos destacar a transmissão mecânica desempenhada por estes insetos de diversos patógenos, como bactérias, vírus, fungos, protozoários e ovos de helmintos. Tal fato resalta a importância dos estudos desses dípteros e a necessidade de conhecer melhor suas características, para que possam ser tomadas medidas alternativas e eficientes visando ao seu controle.

1.1.1 Miíases

O termo miíase (*myia*, em grego: mosca) foi proposto por Hope, em 1840, para diferenciar a doença causada por larvas de mosca das doenças ocasionadas por larvas de Lepidoptera e Coleoptera. De acordo com Zumpt (1965), miíase pode ser definida como infestação de animais vertebrados e de humanos vivos por larvas de dípteros, que se alimentam durante um período de tempo do tecido do hospedeiro, vivo ou morto, de substâncias líquidas corporais ou da comida ingerida pelo hospedeiro. Miíases causam um impacto econômico muito maior em animais de criação do que em humanos e não existe espécie que só parasite humanos, mas algumas espécies são restritas a alguns animais hospedeiros.

A classificação das miíases pode ser feita de duas formas, uma sob a perspectiva anatômica, baseada na parte do corpo infestada pelas larvas de moscas, e outra baseada em conceitos parasitológicos, de acordo com o tipo de relação entre o parasita e o hospedeiro (Patton, 1922). De acordo com Zumpt

(1965), a classificação da miíase baseada na anatomia pode ser dividida em cinco grupos: sanguinívora, dermal e subdermal, nasofaríngeal, intestinal e urogenital.

A classificação mais utilizada de miíase é baseada em conceitos da parasitologia, de acordo com o tipo de relação entre o parasita e o hospedeiro, o que auxilia no entendimento sobre a biologia da mosca. De acordo com esse conceito, existem três grupos de espécies causadoras de miíase: a parasita obrigatória ou primária, que se desenvolve em hospedeiros vivos, a parasita facultativa ou secundária, que pode se desenvolver em matéria orgânica viva ou morta. As espécies primárias conseguem iniciar a miíase e as secundárias só ocorrem após as obrigatórias ou primárias já terem iniciado a infestação. Por fim, o último grupo é denominado miíase acidental ou pseudomiíase que ocorre quando ovos ou larvas de mosca são acidentalmente ingeridos pelo hospedeiro (Zumpt, 1965).

As três maiores famílias de moscas produtoras de miíase são Oestridae, com as subfamílias Oestrinae, Gasterophilinae, Hypodermatinae e Cuterebrinae, família Calliphoridae (blowflies) e família Sarcophagidae (fleshflies); todas pertencem à superfamília Oestroidae (Calyptrate) (Zumpt, 1965; Hall & Wall 1995). As famílias Calliphoridae e Sarcophagidae incluem espécies parasitas facultativas e obrigatórias, e todos os seus indivíduos se alimentam nas fases larval e adulta. Os membros da família Oestridae são todos parasitas obrigatórios e suas necessidades nutricionais são adquiridas exclusivamente na fase de larva, uma vez que os adultos possuem aparelho bucal atrofiado e não se alimentam (Zumpt, 1965; Hall & Wall 1995).

Os membros pertencentes à família Calliphoridae causadores de miíase podem ser divididos em três grupos funcionais baseados nos hábitos alimentares de suas larvas: saprófagos, que se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição e em carcaças de animais, não sendo capazes de iniciar uma miíase (espécie facultativa secundária); ectoparasitas facultativos, capazes de iniciar miíase, mas ocasionalmente agindo como saprófago facultativo (espécie facultativa primária); ou espécies primárias, parasitas obrigatórios, que se alimentam apenas em tecidos de vertebrados vivos, como mamíferos ou pássaros (Hall & Wall, 1995).

Em relação à maioria dos gêneros que causam miíases, os ovos ou larvas de primeiro instar são depositados no hospedeiro e, enquanto as larvas se alimentam,

ocorre o desenvolvimento até o terceiro instar. Após esse período de constante alimentação no hospedeiro, a larva abandona o substrato de criação e torna-se pupa, antes da emergência do adulto. Em infestações causadas por *Chrysomya bezziana* Villeneuve, 1914 e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), pertencentes à família Calliphoridae, as larvas penetram no tecido do hospedeiro e o segmento posterior e os espiráculos da larva ficam expostos. O tecido apresenta, então, liquefação progressiva, necrose e hemorragia, antes de as larvas abandonarem a ferida (Hall & Wall, 1995). A digestão do tecido ocorre extraoralmente, através da ação da amilase na saliva e enzimas proteolíticas presentes nos excretas larvais (Hall & Wall, 1995).

Em estudo epidemiológico realizado em quatro municípios do estado do Rio de Janeiro, foi analisada a ocorrência de miíases humanas em unidades públicas de atendimento. Foi demonstrado que a maior prevalência dessa infestação ocorre em adultos e idosos acima de 51 anos e em crianças com menos de 10 anos de idade. Além disso, ela está associada a pessoas de baixo nível social e econômico, debilitados, alcoolizados, com higiene pessoal reduzida, desabrigados e desnutridos. Segundo os autores, os profissionais de saúde dão pouca importância a esse problema, e a falta de programas de saúde pública faz com que sua ocorrência e real dimensão sejam ocultadas (Marquez et al. 2007).

Em outro estudo epidemiológico conduzido no Hospital do Andaraí, também foi observado que crianças (0 a 12 anos) e idosos (acima de 65 anos) são os mais acometidos por essas infestações. Isto ocorre devido à falta de cuidados básicos por parte dos pais e pelo fato de a debilidade em idosos facilitar a deposição de ovos pelas moscas na pele ou em feridas. Outros fatores, como o baixo nível sócioeconômico e educacional dos pacientes, também estão relacionados à maior incidência de miíases. Além disso, foi observado que larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) foram o agente causador da doença em um dos casos, o que é raro, por se tratar de um agente etiológico exótico no Brasil (Ferraz et al. 2011).

Na literatura científica, existem diversos relatos de miíases ocasionadas por larvas de *Chrysomya megacephala*. (Fabricius, 1794), Dois casos de miíase cutânea causados por esta espécie foram relatados no Sri Lanka pela primeira vez em 2000. O fator de predisposição principal foi dermatite infecciosa, mas outros, como

diabetes mellitus, doença psiquiátrica e hanseníase também foram observados (Kumarasinghe et al. 2000). Miíase neonatal umbilical por *C. megacephala* associada à sepse foi descrita na Índia em 2012. Foram retiradas mais de 100 larvas do cordão umbilical do neonato e isso constituiu a porta de entrada para a infecção por *Staphylococcus aureus* (Patra et al. 2012). Outro relato na Índia também descreveu miíase umbilical associada à sepse por *S. aureus* causada por *C. megacephala* em um neonato (Mondal et al. 2014). A continuidade de casos semelhantes de miíase evidencia, desse modo, como a alta densidade populacional dessas moscas pode fornecer riscos à saúde pública em uma determinada localidade, principalmente aos mais vulneráveis.

De acordo com Fernandes et al. (2009), *C. megacephala* está entre as mais importantes espécies causadoras de miíase em humanos no estado de Goiás, Brasil. Apesar de o estudo ter sido conduzido em um grande hospital público do estado, é provável que o mesmo não reflita a real prevalência de casos de miíase humana. Assim, os autores discordam da visão presente na literatura científica de que esta doença em humanos seja rara (Fernandes et al. 2009). Sua sub-reportagem ocorre em função de a mesma não ser uma doença de notificação obrigatória. Assim, a falta de cuidado, de atenção e a repulsa dos profissionais de saúde, os quais descartam as larvas sem maior investigação e, ainda, as tentativas de tratamento doméstico por familiares dos pacientes acometidos, fazem com que esses casos não cheguem aos hospitais e postos públicos (Fernandes et al. 2009).

Ferraz et al. (2010) relataram um raro caso de miíase com pediculose causada simultaneamente por larvas de *C. megacephala*, *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* e *Musca domestica* Linnaeus em um paciente de 54 anos de idade no Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro. O paciente possuía higiene precária e as feridas causadas pelas larvas eram grandes (11cm de diâmetro, com exposição do crânio parietal), profundas, com odor putrefato e áreas necrosadas. Aproximadamente 75% das larvas retiradas da ferida desse paciente eram da espécie *C. megacephala*. Ainda não havia relato sobre miíase em humanos causadas por essa espécie no Brasil (Ferraz et al. 2010).

1.2 A família Calliphoridae

A família Calliphoridae inclui um grande número de espécies de cor azul, verde ou cobre metálico de tamanho médio. Nos adultos, a arista é plumosa e os pelos geralmente são compridos até o ápice. O mesonoto pode apresentar ou não faixas pretas longitudinais; nervura M_{1+2} apresenta curva acentuada, estreitando a célula apical (James, 1947). Os Calliphoridae diferenciam-se dos Muscidae pela presença de uma fila de cerdas merais. Em relação aos Sarcophagidae, diferenciam-se pela coloração metálica e pela presença de duas cerdas notopleurais, raramente três (Oliveira-Costa et al. 2007).

As larvas geralmente são do tipo necrófaga, alimentando-se em matéria orgânica em decomposição, sendo algumas delas parasitas acidentais, facultativas ou obrigatórias de vertebrados e de alguns invertebrados. Apresentam, em sua maioria, extremidade posterior truncada, geralmente com três pares de tubérculos acima e três abaixo. As fendas espiraculares são alongadas, finas e subparalelas (James, 1947).

Os califorídeos de ocorrência na região neotropical pertencem a quatro subfamílias: Mesembrebrinellinae, Chrysomyinae, Calliphorinae e Toxitarinae com aproximadamente 27 gêneros e 125 espécies, sendo conhecidas como “moscas varejeiras” (James, 1970).

1.2.1 O gênero *Chrysomya*

As espécies pertencentes ao gênero *Chrysomya* são moscas de tamanho médio (5,0-12,0mm), da tribo Chrysomyini; possuem coloração verde escura, azul metálica, cobre ou roxa. O tórax não apresenta faixas longitudinais no mesonoto. A caliptra inferior é coberta por curtos pelos e há a presença de faixas escuras nos tergitos abdominais (Oliveira-Costa et al. 2007). O gênero contém cerca de 12 espécies originárias das regiões tropical e subtropical do velho mundo. Os adultos são considerados sinantrópicos; são ágeis e atraídos por matéria orgânica em decomposição. As larvas são saprófagas, desenvolvem-se em detritos orgânicos, tais como: fezes, carcaças de animais e também em tecido animal vivo, como parasita facultativo ou obrigatório (Oliveira-Costa et al. 2007).

A introdução de espécies do gênero *Chrysomya* no Brasil foi primeiramente relatada em 1978, mas a coleta das amostras já havia sido realizada em 1976, por um estudante da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba. Os espécimes foram confirmados como pertencentes à subfamília Chrysomyinae e a um gênero que não havia ainda sido relatado no Novo Mundo. Posteriormente, a identificação em nível de espécie confirmou ser *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann), mosca comum na parte sul da África (Guimarães et al. 1978).

Os mesmos autores também relataram a presença de moscas sinantrópicas, como *C. chloropyga*, *C. albiceps* e *C. megacephala*, nas cidades de Campinas e Santos, no Estado de São Paulo. *C. megacephala* foi encontrada em grande quantidade visitando carnes e peixes em mercados ao ar livre. De acordo com os autores, a introdução destas três espécies ocorreu possivelmente após 1974, via regiões sul e sudeste, provavelmente pelos portos, transportadas por navios trazendo escravos e que continham lixo. A presença dessas moscas no Novo Mundo foi relatada como uma séria ameaça em relação à disseminação de patógenos fecais, vírus, helmintos parasitas e protozoários (Guimarães et al. 1978).

Sabe-se que as relações de comércio entre os países asiáticos e o Brasil aumentaram, assim como o número de viagens internacionais de avião, fatores que podem explicar a introdução acidental de *C. megacephala* na América (Guimarães et al. 1979). Entre os anos de 1975 e 1976, vários navios com refugiados portugueses de Angola chegaram à costa Brasileira. Animais domésticos foram trazidos nos navios, como cabras, cachorros e galinhas, e tal ocorrência pode ajudar a explicar a introdução de *C. chloropyga* e *C. albiceps*, espécies que já se encontravam amplamente distribuídas no continente africano.

De acordo com Guimarães et al. (1979), as três espécies de *Chrysomya* introduzidas se dispersaram por todo o Brasil. Os autores, na época, ressaltaram a necessidade de medidas de controle dessas moscas, devido a sua rápida expansão e à vulnerabilidade das comunidades. Dentre as pestes exóticas na América do Sul, as originárias da Etiópia e da região Oriental possuem importância particular, especialmente em função das similaridades climáticas.

A presença de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) foi observada, entre 1978 e 1979, em diferentes estados de todas as regiões brasileiras, enquanto *C.*

megacephala e *C. albiceps* apresentavam uma distribuição mais restrita à costa leste do Brasil (Guimarães et al. 1979). Posteriormente, outros estudos, no período de 1977 a 1983, relataram a presença das mesmas espécies em países como Peru, Colômbia, Argentina, Paraguai e Bolívia (Mariluis, 1981). O primeiro relato de coleta de espécimes de *C. megacephala* no Novo Mundo, fora da América Latina, ocorreu em 1988, no México e nos Estados Unidos (Greenberg, 1988). De acordo com este autor, *C. putoria* e *C. megacephala* podem ser consideradas espécies transmissoras de patógenos tão importantes quanto *M. domestica*, em locais com condições sanitárias precárias.

Espécies do gênero *Chrysomya* são consideradas moscas com alta capacidade autônoma de dispersão, facilitada pelos seus hábitos sinantrópicos. Uma vez que o movimento de dispersão das moscas pode ser aliado à mobilidade e à movimentação do ser humano, sua propagação e conquista de novos ambientes são potencializadas (Baumgartner & Greenberg, 1984).

A introdução das três espécies causou o declínio acentuado de populações de moscas nativas, como a espécie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), devido à similaridade de nichos e à intensa competição por recursos, principalmente durante a fase larval (Guimarães et al. 1979). A diferença de 1 a 2 dias no tempo total de desenvolvimento conferiu vantagens adaptativas às espécies do gênero *Chrysomya* em relação às espécies nativas do gênero *Cochliomyia*, já que as espécies exóticas emergiam antes e logo alcançavam o substrato de criação (Baumgartner & Greenberg, 1984).

De acordo com Baumgartner & Greenberg (1984), a maneira como essas espécies afetariam as espécies de moscas nativas era uma questão ecológica intrigante com importantes implicações médico–veterinárias. Além disso, os autores ressaltaram que a sinantropia e a endofilia dessas moscas acrescentam outro problema, o impacto na saúde das pessoas nos países em desenvolvimento.

1.2.2 A espécie *Chrysomya megacephala*

Adultos de *C. megacephala* possuem coloração verde, azul ou roxa e o espiráculo protorácico é escuro. As antenas e genas são amareladas (Oliveira-Costa

et al. 2007); possuem um comprimento médio de 8,9 a 10 mm e são provenientes das regiões Oriental, Australiana e Paleártica (Prins, 1982).

Os ovos de *C. megacephala* medem aproximadamente 1,38 x 0,33 mm, são brilhantes e de curto período de incubação, cerca de 14h a 26°C (Prins, 1982). Em testes realizados em laboratório, a duração do primeiro instar larval foi de 23 horas, alcançando um tamanho de 3-4 mm. As larvas de segundo instar perduraram por mais 21 horas, aumentando cerca de 6 mm de comprimento. Quarenta e quatro horas após a eclosão, as larvas alcançaram o terceiro estágio de desenvolvimento, e assim permaneceram se alimentando por 60-72 horas, até que abandonaram o substrato e caíram no solo para pupação (Prins, 1982).

As larvas não possuem tubérculos e possuem o esclerito oral pigmentado (Oliveira-Costa et al. 2007). Por microscopia óptica, observa-se que as larvas de primeiro instar são semelhantes às de terceiro instar, exceto pelo tamanho e formato dos espiráculos posteriores, que apresentam duas fendas alongadas que se encostam ventralmente. As larvas de segundo instar apresentam espiráculos anteriores com 8 a 9 ramificações e o espiráculo posterior apresenta fendas ovais e alongadas. Já nas larvas de terceiro instar estão presentes espiráculos anteriores com 8 a 10 ramificações curtas e espiráculo posterior de cor castanha (Prins, 1982).

De acordo com Barros-Cordeiro e Pujol-Luz (2010), as larvas de primeiro instar possuem o corpo formado por 12 segmentos divididos por fileiras de micro-espinhos que variam em formato, tamanho e posição em volta de cada segmento. Possuem um par de antenas, um par de palpos, crista oral na cavidade pré-oral, dentes suprabucais e esqueleto cefalofaringeano pouco pigmentado e esclerotizado. O último segmento abdominal apresenta um par de espiráculos com apenas uma abertura espiracular, peritrema incompleto e a duração do instar de 16 horas. Na transição do primeiro para o segundo instar, a larva aumenta de tamanho e há a formação do espiráculo anterior, próximo ao final do segundo segmento torácico.

Nas larvas de segundo instar, a maxila é fortemente esclerotizada, pigmentada e curva, com ápice pontiagudo. A região posterior do último segmento abdominal possui um par de espiráculos com duas aberturas cada, com peritrema incompleto e pigmentado. As larvas de terceiro instar possuem o esqueleto cefalofaringeano formado, mandíbula presa à maxila, o espiráculo anterior encontra-

se completo e pigmentado e os espiráculos posteriores presentes no último segmento abdominal, cada um com três aberturas espiraculares e peritrema incompleto (Barros-Cordeiro e Pujol-Luz, 2010).

Em relação ao tempo de desenvolvimento pós-embriônico total em laboratório (tempo de neolarva a adulto, em dias), já foram relatadas variações entre diferentes estudos, como por exemplo, 10,8 dias sob temperatura de 24°C, 7,92 dias sob temperatura de 30°C (Milward-de-Azevedo et al. 1996), 11,7 dias sob temperatura de 26°C e 8,08 dias sob temperatura de 26°C (Barros-Cordeiro e Pujol-Luz, 2010). De acordo com Barros-Cordeiro e Pujol-Luz (2010), as diferenças entre os resultados obtidos devem-se, possivelmente, aos diferentes métodos de criação desses dípteros em laboratório e às condições não controladas durante os experimentos.

De acordo com Linhares e Avancini (1989), fêmeas adultas de *C. megacephala*, sob condições de laboratório, apresentam ovogênese completa entre 10 a 13 dias após sua emergência, quando alimentadas com fígado cru. Outras dietas também podem proporcionar vitelogênese completa nesta espécie, como fezes de galinha e fezes humanas, porém este período torna-se mais longo, 48 e 36 dias, respectivamente. De acordo com Pires et al. (2009), fêmeas férteis, alimentadas com peixe *in natura* na fase larval apresentam peso médio de 65,185mg e número médio de ovos de 220,722. Quanto menor o peso das fêmeas, maior a porcentagem de infertilidade, mostrando que o peso das fêmeas influencia a fecundidade de *C. megacephala*, produzindo um efeito em sua dinâmica populacional (Pires et al. 2009).

Em sua região de origem, *C. megacephala* tem como hábito se alimentar preferencialmente de peixe “in natura”. No entanto, sua alta plasticidade fenotípica e hábitos generalistas proporcionaram sua grande dispersão e criação em outros tipos de dieta em ambientes exóticos (Pires et al. 2009). A disponibilidade dessas dietas naturais no ambiente facilitou sua rápida dispersão pela região neotropical (Linhares e Avancini, 1989). Tal fato ressalta sua importância para a saúde pública, pois esta espécie consegue se multiplicar em locais com lixões a céu aberto com fezes humanas e de animais sem tratamento adequado de resíduos e, assim, torna-se um importante vetor mecânico de diversos patógenos (Linhares e Avancini, 1989).

Em estudo realizado em bancas de pescado em feiras de São Paulo, foram obtidas amostras de *C. megacephala* positivas para poliovírus tipo III (Furlanetto et al, 1984). Oliveira et al. (2006) coletaram espécimes de *C. megacephala* no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro e confirmaram a presença de bactérias como *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Morganella* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp e *Salmonella* Agona, tanto na superfície do corpo quanto no conteúdo intestinal das moscas.

No nordeste da Tailândia, o número de espécimes de *C. megacephala* coletados em mercados de alimentos frescos, pilhas de lixo, restaurantes, cantinas escolares e campos de arroz, foi significativamente superior ao de *M. domestica* (Chaiwong et al. 2014). Além de ser a mais abundante, esta espécie carrega de 11 a 12 vezes mais bactérias do que *M. domestica*, incluindo espécies de enterobactérias, *Bacillus* sp. e *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica (Chaiwong et al. 2014).

C. megacephala foi a espécie de mosca mais abundante coletada em estudo conduzido no aeroporto internacional de Chengdu, na China. Além disso, foram isoladas bactérias dos insetos, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. hydrophila*, que apresentaram resistência a uma gama de 8 a 16 antibióticos comumente utilizados, como a amoxicilina, gentamicina e ciprofloxacina (Liu et al. 2013). Tal estudo ressaltou a importância de medidas efetivas de controle para esses dípteros nesses ambientes.

Na literatura científica, há diversos artigos que descrevem estratégias de controle de moscas. No entanto, a maioria aborda as medidas utilizadas para as espécies que causam algum tipo de prejuízo econômico, como *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) e *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), conhecidas como pragas de ovelhas, que causam grande dano à produção de lã na Austrália (Tellam e Bowles, 1997; Sandeman et al. 2014). *M. domestica* também é alvo de pesquisas, por ser uma das principais pragas domésticas, médicas e veterinárias, causando irritação e contaminação alimentar (Malik et al. 2007). Tabanídeos, moscas-do-estábulo (*S. calcitrans*) e mosca-dos-chifres (*H. irritans*) são insetos hematófagos que picam o gado e causam grandes problemas ao seu desenvolvimento e diversos prejuízos (Foil e Hogsette, 1994).

Os esforços relacionados ao controle desses dípteros incluem medidas tradicionais, como o uso de inseticidas químicos, biopesticidas no controle biológico, com vírus, fungos, bactérias, parasitoides e extratos botânicos e o desenvolvimento de vacinas e tecnologias genéticas, visando à seleção de gado menos suscetível às infestações. Em relação às pragas de animais de criação, são descritos o uso de armadilhas, repelentes e o manejo do habitat das larvas, como vegetação em decomposição, estrume e restos de alimentos. Além disso, algumas pesquisas tentam analisar importantes genes alvo para suprimir, ou até erradicar, futuramente, populações desses insetos (Foil e Hogsette, 1994; Tellam e Bowles, 1997; Malik et al. 2007; Sandeman et al. 2014).

No entanto, a literatura científica ainda é escassa em relação ao controle de *C. megacephala* e não existem trabalhos científicos de revisão que discutam todas as medidas de controle utilizadas. Dentre esses poucos estudos, podemos destacar aqueles relacionados ao uso de inseticidas químicos, como os piretroides (deltametrina e permetrina) e os organofosfatos, que mostraram ter maior efeito inseticida em populações adultas de *C. megacephala* mantidas em laboratório, quando comparadas às populações coletadas em campo, consideradas sinantrópicas (Mihara e Kurahashi, 1991; Sukontason et al. 2005).

Outras metodologias de controle incluem o uso de metabólitos secundários de plantas, como o óleo de eucalipto, que causa alterações ultraestruturais superficiais no tegumento larval (Sukontason et al. 2004), o uso de lignanas, como o yangambin, extraído das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) que causam inibição do desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* (Cabral et al. 2007), o uso de latex da planta *Parahancornia amapa* (Apocynaceae), que causa o mesmo tipo de efeito no desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* (Mendonça et al. 2011), e, ainda, a utilização de extrato de neem contendo Azadiractina A, que causa diminuição na emergência dos adultos e redução da fecundidade na geração seguinte de moscas (Siriwattananurungsee et al. 2008).

Por fim, outras metodologias incluem o uso de micro-himenópteros parasitoides (Carvalho et al. 2004), reguladores de crescimento de insetos, como o precoceno, que altera o crescimento e a metamorfose de *C. megacephala* (Singh e Kumar, 2011), o uso de radiações por micro-ondas, que afetam as moléculas de

água presentes no corpo da larva, causando fricção e rompimento dos tecidos (Sripakdee et al. 2005), e cepas de *Bacillus thuringiensis* (Cavados et al. 1998).

Devido aos problemas de saúde pública gerados por *C. megacephala*, torna-se evidente que métodos complementares de controle, para utilização em ambientes urbanos, devem ser pesquisados e desenvolvidos. Em vista disso, o presente estudo avaliou a atividade tóxica de diferentes cepas de *Brevibacillus laterosporus* e *Bacillus thuringiensis*, como estratégia alternativa no controle biológico dessa espécie.

1.3 Controle de Insetos Vetores e Pragas

Os defensivos químicos chegaram aos campos de produção agrícola no fim da Segunda Grande Guerra Mundial. Eles revolucionaram a metodologia de controle de mosquitos vetores de doenças. Inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides têm sido empregados em várias regiões do mundo para o controle de mosquitos. O DDT (Dicloro-difenil-tri-cloro-etano) é um produto barato, com elevado poder residual, tóxico e de baixa absorção cutânea; por outro lado, não é biodegradável, sendo acumulativo nas gorduras de animais de sangue quente. Pode interferir no metabolismo do sódio e do potássio e mostrou-se carcinogênico em camundongos (Aldridge, 1979; Mariconi, 1980).

De acordo com Berg (2009), o DDT ainda é produzido em países como China, Coreia do Norte e notadamente na Índia, para fins de controle de insetos vetores de doenças. De maneira geral, a maior quantidade de DDT produzida nestes países é utilizada na agricultura, apesar de não ser aceita pela Convenção de Estocolmo. Os malefícios causados à saúde, devido à exposição a esses inseticidas, incluem interrupção de gravidez, perda de fertilidade, leucemia, câncer no pâncreas, diabetes e câncer de mama (Beard 2006, Ribas-Fito et al. 2006). Os efeitos ambientais do DDT estão relacionados à persistência de suas moléculas e ao seu baixo metabolismo. Além disso, sua concentração no ambiente aumenta de acordo com o aumento do nível trófico na cadeia alimentar (Berg, 2009).

Os compostos organoclorados, utilizados no controle de doenças como malária e leishmaniose visceral, foram abolidos pelos países desenvolvidos em 1960. No entanto, logo depois ocorreu a introdução de novos inseticidas, como os organofosfatos, carbamatos, piretroides, herbicidas e fungicidas (Aktar et al. 2009). Estes compostos são considerados de solução rápida, fácil e de baixo custo para controlar insetos praga e vetores em paisagens urbanas. No entanto, os resíduos desses inseticidas são encontrados no solo, no ar, e em águas superficiais e subterrâneas, causando problemas aos organismos não-alvo, como micro-organismos benéficos do solo, insetos, plantas, peixes e aves (Aktar et al. 2009).

A partir da conscientização sobre os riscos dos pesticidas químicos e da necessidade de reduzir seu uso, tem-se procurado obter produtos eficientes no controle de pragas, principalmente por meio de micro-organismos (Vilas-Boas et al. 1992). O controle biológico é um fenômeno natural, baseado na regulação do número de plantas e animais por meio de inimigos naturais. Todas as espécies de plantas e animais possuem inimigos naturais e deles sofrem ataques em seus variados estágios de vida. Dentre esses inimigos, existe uma grande diversidade de grupos biológicos, como: insetos, vírus, fungos, bactérias, nematoides, protozoários, rickettsias, micoplasmas, ácaros, aranhas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Parra et al. 2002).

Sabe-se que os biopesticidas têm um papel importante na proteção das culturas, embora sejam mais utilizados em combinação com outras estratégias, incluindo pesticidas químicos como parte do Manejo Integrado de pragas (Usta, 2013). O controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para a redução do uso de agroquímicos no controle de pragas e vetores. A comparação entre entomopatógenos e pesticidas químicos convencionais geralmente é feita sob a perspectiva da maior eficácia e do menor custo. No entanto, as vantagens dos primeiros são numerosas quando levamos em consideração os benefícios ambientais, como segurança para os humanos e outros organismos não alvo, redução dos resíduos de pesticidas nos alimentos e aumento da atividade de outros inimigos naturais (Usta, 2013).

Os biopesticidas são substâncias que ocorrem naturalmente e que controlam pestes, ou pragas, de maneira não tóxica, podendo ser organismos vivos, ou algum

produto proveniente do seu metabolismo, como fitoquímicos ou produtos microbianos (Usta, 2013). Os inseticidas biológicos à base de microrganismos incluem vírus, bactérias, fungos e protozoários (Usta, 2013). A utilização de biopesticidas microbiológicos apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso de inseticidas químicos, como o benefício ecológico, pelo fato de não ser nocivo ao meio ambiente e não tóxico para humanos. Além disso, apresentam especificidade ao organismo alvo, não afetando outros organismos benéficos, como predadores naturais, parasitas, parasitoides e polinizadores (Usta, 2013; Ruiu, 2013).

Os biopesticidas microbianos geralmente são efetivos em pequenas quantidades e são decompostos rapidamente no meio ambiente, minimizando problemas como a contaminação ambiental, da água, dos alimentos e a seleção de populações resistentes (Usta, 2013; Ruiu, 2013). Geralmente, podem ser utilizados em associação a outros inseticidas sintéticos, pois, na maioria dos casos, o produto microbiano não é inativado por resíduos gerados pelos inseticidas convencionais. Os biopesticidas microbianos, portanto, consistem em uma estratégia sustentável quando utilizados como componente em programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Usta, 2013).

Entretanto, existem algumas limitações inerentes ao uso de inseticidas biológicos microbianos, mas que não devem ser julgadas como entraves a sua utilização, mas sim como precauções no momento da escolha do melhor bioinseticida a ser empregado. A alta especificidade dos biopesticidas a um organismo alvo não permite o controle de outros tipos de pragas em determinada área afetada, ocasionando seu aumento. O calor, o dessecamento e a exposição à radiação ultravioleta reduzem a efetividade dos inseticidas biológicos à base de microrganismos, exigindo maior cuidado na utilização e aplicação do produto (Usta, 2013).

Além disso, a formulação dos produtos deve ser adequada e seus procedimentos de estocagem devem ser respeitados pelos usuários. Por fim, cabe lembrar que os custos de produção, registro e utilização dos pesticidas microbianos ainda são elevados quando comparados aos custos dos inseticidas químicos (Usta, 2013). Os inseticidas microbianos formulados a partir de bactérias são os mais comuns e mais baratos dentre os biopesticidas, sendo em sua maioria constituídos

por bactérias esporulantes, em forma de bastonete e pertencentes ao gênero *Bacillus* (Usta, 2013).

1.4 Uso de bactérias em programas de controle de vetores

A primeira descoberta de bactéria com potencial inseticida, posteriormente conhecida como *Bacillus thuringiensis*, é de autoria de Ishiwata e ocorreu em 1901, no Japão, enquanto estudava doença bacteriana no bicho da seda. Tempos depois, o pesquisador Berliner (1915) encontrou na região de Thuringia na Alemanha, um bacilo semelhante que causara a morte de larvas de mariposa e nomeou-o de *B. thuringiensis*. Apenas em 1930, na França, começou o interesse de se estudar *B. thuringiensis*, para utilização no controle biológico de larvas da ordem Lepidoptera, de importância na agricultura e, então, foi desenvolvido um produto denominado “Sporeine” (Federici, 2005).

Após a Segunda Guerra Mundial, os estudos sobre *B. thuringiensis* ganharam força em vários países e houve uma grande busca por novos isolados com maior efetividade. Dois estudos importantes foram publicados posteriormente, demonstrando os corpos cristalinos que acompanhavam os esporos e relacionando-os à morte de lagartas (Federici, 2005).

Em 1960, com o avanço das pesquisas sobre potencial inseticida de *B. thuringiensis*, as primeiras formulações à base desta bactéria começaram a ser comercializadas. As empresas Abbott Laboratories, com seu produto Dipel, e Sandoz Corporation, com seu produto Thuricide, dominaram o mercado mundial, sendo ambos formulados a partir do isolado HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Tais produtos foram utilizados no campo e em florestas, contra pragas da Ordem Lepidoptera. O sucesso do seu uso levou ao desenvolvimento de outros produtos e também à descoberta de novas subespécies como *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (H 14), com atividade inseticida contra larvas de mosquitos e simúlídeos, além de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, com atividade contra larvas e adultos de algumas espécies de coleópteros (Federici, 2005).

Alguns produtos baseados em formulações de *B. thuringiensis israelensis*, como Teknar e VectoBac, foram muito utilizados no mundo todo em programas de controle de vetores, como o Programa de Controle de Oncocercose (OCP) no oeste da África, entre 1980 e 1990. Diferentes produtos à base de *B. thuringiensis israelensis* associados a inseticidas químicos foram utilizados no controle da larva *Simulium damnosum*, espécie vetora do nematódeo causador da filariose (Federici, 2005). De acordo com Regis e colaboradores (2000), o sucesso do uso de *B. thuringiensis israelensis* em grandes programas deve-se à alta eficácia contra o inseto alvo, causando morte rápida, seletividade e capacidade de produção em larga escala por fermentação.

No Brasil, dois grandes programas de controle de simúlideos foram feitos utilizando-se produtos à base de *B. thuringiensis israelensis* (Regis et al. 2000). O Programa de Controle de Simúlideo no Rio Grande do Sul em 1983 combateu populações de *Simulium pertinax* Kollar, 1832 e um programa semelhante foi desenvolvido pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo em quatro municípios, onde o turismo é uma das principais atividades econômicas da região. Tais programas foram motivados pelo surgimento de populações de simúlideo resistentes ao inseticida químico Temephos, mas nenhuma resistência ao *B. thuringiensis israelensis* foi notificada na época (Regis et al. 2000).

Regis et al. (2000) afirmam que o maior programa de controle de mosquitos implementado no Brasil, o Programa para Erradicação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em 1997, foi realizado inicialmente apenas com o uso do larvicida e adulticida Temephos, e que a utilização de agentes biológicos no controle de mosquitos estava restrita a pesquisas experimentais e operacionais. No entanto, as autoridades de saúde responsáveis pelo programa decidiram substituir o Temephos pelo *B. thuringiensis israelensis*, em função do surgimento de mosquitos resistentes ao inseticida no Rio de Janeiro (Regis et al. 2000).

1.4.1 Modo de ação de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis, bactéria em forma de bastonete, esporulante e que produz inclusões cristalinas durante a esporulação, destaca-se como patógeno de insetos

(Glare & O' Callaghan, 2000). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) produz inclusões cristalinas compostas por pró-toxinas proteicas (δ -endotoxinas), que são utilizadas como biopesticida comercial contra larvas da subordem Nematocera. Tal atividade larvicida ocorre em função de quatro principais pró-toxinas cristais, codificadas pelos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* e *cyt1Aa* (Ben-Dov, 2014).

De acordo com Ramírez-Lepe e Ramírez-Suero (2012), existe um modelo assumido para a ação das toxinas Cry em larvas de dípteros. Segundo esses autores, após a ingestão das toxinas pelas larvas, ocorre a solubilização dos cristais no meio alcalino seguido de ativação proteolítica. As toxinas ativadas, ligam-se a receptores específicos presentes nas células epiteliais intestinais, o que resulta em mudança na conformação das toxinas, permitindo sua inserção na membrana. Há evidências que sugerem que as toxinas geram poros nas membranas das células, distúrbios no equilíbrio osmótico, paralisia e, por fim, morte da larva (Ramírez-Lepe e Ramírez-Suero, 2012).

Broderick et al. (2006) apresentaram três evidências indicadoras de que as bactérias residentes no intestino da larva de mariposa cigana contribuem para a mortalidade causada por *B. thuringiensis*. A atividade inseticida de *B. thuringiensis* foi abolida com a eliminação da comunidade bacteriana intestinal dessas larvas e foi restaurada após o restabelecimento de *Enterobacter sp.*, espécie presente na comunidade bacteriana normal do intestino. Além disso, uma cepa de *Escherichia coli* que produz a toxina de *B. thuringiensis* foi capaz de matar a larva contendo ou não outras bactérias no intestino.

Entretanto, quando a cepa de *E.coli* foi morta por aquecimento antes de ser oferecida à lagarta, esta foi capaz de causar mortalidade apenas nas larvas que continham a comunidade bacteriana intestinal normal. Esses resultados, associados às observações de que *Enterobacter sp.* e *E.coli* crescem rapidamente na hemolinfa da larva, o que não ocorre com *B. thuringiensis*, indicam que bactérias entéricas associadas à toxicidade de *B. thuringiensis* são responsáveis por causar septicemia (Broderick et al. 2006).

Por outro lado, em trabalho posterior, Raymond et al. (2009) questionaram os resultados obtidos e a metodologia empregada por Broderick et al. (2006). Os primeiros autores sugeriram que a criação da lagarta *Plutella xylostella* (Linnaeus,

1758) de forma asséptica, com o uso de altas quantidades de antibióticos, provavelmente também interferiu na ação de *B. thuringiensis* sobre o inseto alvo. Foi mostrado que o uso de toxinas Bt purificadas e a mistura de esporos com toxinas foram tóxicas às larvas assépticas (sem uso de antibiótico na dieta). Além disso, a inoculação das larvas com uma cepa de *Enterobacter* sp. reduziu sua mortalidade. De acordo com Raymond et al. (2009), a presença da microbiota intestinal é capaz de reduzir o efeito letal de *B. thuringiensis*, e isso não depende de outras cepas presentes na microbiota do inseto.

As toxinas que compõem o cristal de *B. thuringiensis* (δ -endotoxinas) são inclusões cristalinas formadas durante a fase estacionária do crescimento bacteriano e incluem as toxinas Cry e Cyt. As toxinas Cry não formam uma família única e homóloga de proteínas, mas um grupo de linhagens não relacionadas, sendo a proteína Cry, de três domínios a mais conhecida (Cry1 a Cry73). Estas, apresentam atividade inseticida contra nematódeos e contra as ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hemiptera (Palma et al. 2014).

As toxinas Cyt são codificadas por genes *cyt* e formam outra família de proteínas inseticidas em *B. thuringiensis*. Tais proteínas possuem atividade citolítica geral (hemolítica) *in vitro* e grande especificidade contra dípteros *in vivo*. A Comissão de Nomenclatura de toxina Bt classificou as proteínas Cyt em três famílias diferentes (Cyt1, Cyt2 e Cyt3) com toxicidade principalmente contra alguns mosquitos e borrachudos. As toxinas Cyt são capazes de agir sinergicamente com outras toxinas Cry e diminuir os níveis de resistência a estas toxinas em algumas espécies; por exemplo, Cyt1Aa pode reprimir a resistência à Cry4 e Cry11Aa em larvas de *Culex quinquefasciatus* Say (1823), em laboratório (Palma et al. 2014).

Durante a fase de crescimento vegetativo de *B. thuringiensis*, são produzidos outros tipos de toxinas. Entre elas, podemos destacar as proteínas inseticidas vegetativas (Vips) e as proteínas inseticidas secretadas (Sip). As proteínas Vip1 e Vip2 formam uma toxina binária com ação inseticida contra algumas larvas de Coleoptera. Vip3 possui atividade inseticida contra Lepidoptera, mas seu mecanismo de ação, assim como o mecanismo de ação de Vip4, ainda não são totalmente conhecidos (Palma et al. 2014).

A toxina Sip1 parece ser formadora de poro com atividade tóxica contra algumas espécies de Coleoptera (Palma et al. 2014). *B. thuringiensis* é uma espécie de bactéria que produz uma vasta variedade de proteínas com diversos modos de ação, diferentes organismos alvo e grande potencial biotecnológico.

1.4.2 Outras bactérias com potencial ação inseticida

Outras espécies de *Bacillus* possuem potencial para o controle de insetos praga e de vetores de doença. *Lysinibacillus sphaericus* é utilizado no controle de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles* desde 1980 (Poopathi e Abidha, 2010). As cepas com alto poder inseticida produzem cristais proteicos durante a esporulação, que contêm dois grandes polipeptídios, denominados Bin A e Bin B. Os dois componentes agem sinergicamente e se ligam a receptores intestinais do inseto alvo (Poopathi e Abidha, 2010). Os genes que codificam estas toxinas estão localizados nos cromossomos das cepas mais letais.

Além das toxinas cristais (Bin A e Bin B), algumas cepas de *L. sphaericus* produzem toxinas Mtx, expressas durante a fase vegetativa, e seus genes estão localizados em cromossomos. As formulações utilizadas à base de *L. sphaericus* incluem pó molhável, concentrado dispersível em água, concentrado emulsificado, grânulos e pó. Esses produtos são utilizados e comercializados nos EUA, França, Brasil, Zaire, Índia e Bangladesh (Poopathi e Abidha, 2010).

Entretanto, novas espécies de bactérias, além daquelas do gênero *Bacillus*, vêm sendo cada vez mais estudadas e formuladas em novos produtos inseticidas. Entre elas, a espécie *Clostridium bifementans* serovar *malaysia* possui atividade inseticida conhecida contra mosquitos e borrachudos e produz uma toxina com homologia às δ -endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis* (Ruiu et al. 2013).

Bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são Gram-negativas, endossimbiontes de nematódeos inseticidas e despertam grande interesse em sua utilização. As primeiras encontram-se associadas ao gênero *Steinernema*, enquanto as segundas colonizam o intestino de espécies do gênero *Heterorhabditis* (Ruiu et al. 2013). O nematódeo, em seu estado juvenil, utiliza aberturas naturais como boca e ânus de larvas de insetos alvo como porta de entrada, e alcança o trato digestivo

da larva antes de penetrar na hemocele, onde liberam as bactérias. Estas produzem toxinas inseticidas orais (toxinas Tc “*toxin complexes*” e Pir- “*Photorhabdus insect-related toxins*”), causando danos ao epitélio intestinal dos insetos. No cadáver do inseto ocorre a multiplicação bacteriana e a reprodução dos nematódeos, completando seu ciclo de vida (Nielsen-LeRoux et al. 2012).

A espécie *Chromobacterium subtsugae* é uma bactéria produtora de colônias com coloração violeta devido à produção de violaceína. Sua ação inseticida ocorre via ingestão por espécies alvo de diferentes ordens, como Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera (Ruiu et al. 2013). Seu mecanismo de ação é considerado complexo, através da produção de toxinas termoestáveis e da produção de diversos metabólitos (Ruiu et al. 2013). Recentemente, uma patente que descreve métodos de obtenção de extratos contendo diferentes metabólitos desta bactéria com ação pesticida foi depositada (Asolkar et al. 2012). Já existe disponível no mercado um produto à base desta bactéria (Grandevo, Marrone Bio Innovations Inc.).

Pseudomonas entomophila está presente no solo e seu mecanismo de ação é através da ingestão pelo inseto alvo. Seu genoma contém diversos genes que codificam toxinas inseticidas putativas, proteases, hemolisinas, *clusters* de genes de biossíntese para produção de cianeto de hidrogênio e *clusters* de genes para produção de metabólitos secundários (Vodovar et al. 2006).

Outra opção de entomopatógeno é a espécie *Brevibacillus laterosporus* (Laubach 1916), bactéria aeróbica e formadora de esporo. Essa espécie foi primeiramente isolada de água (Laubach, 1916), mas também foi encontrada em solo (Oliveira et al. 2004). Seu espectro de ação já foi relatado contra diferentes Ordens, como Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, moluscos e nematoides (Oliveira et al. 2004; Huang et al. 2005; Tian et al. 2007; Ruiu, 2013).

1.4.3 O gênero *Brevibacillus*

O gênero *Brevibacillus* foi criado após estudo em que foram analisadas sequências do gene 16S rRNA de cepas de 11 espécies pertencentes aos grupos *Bacillus brevis* e *Bacillus aneurinolyticus*. Os resultados revelaram a presença de dois clusters filogeneticamente diferentes, o que baseou a proposta de

reclassificação do cluster de *B. brevis* no gênero *Brevibacillus* (Shida et al. 1996). O novo gênero possui como características células com formato de bastonete, Gram positivas ou Gram variáveis, móveis por meio de flagelos peritríquios e esporos elipsoides formados em esporângios. A maioria das espécies é estritamente aeróbica, sendo *B. laterosporus* anaeróbio facultativo (Shida et al. 1996). De acordo com Panda et al. (2014), algumas cepas de *B. laterosporus* crescem anaerobicamente através de denitrificação parcial ou completa do nitrato.

Atualmente, o gênero *Brevibacillus* inclui 20 espécies (<http://www.bacterio.cict.fr/b/Brevibacillus.html>) e seu habitat se sobrepõe ao de *Bacillus*, sendo encontrados em locais como pedras, poeira, ambientes aquáticos e trato digestivo de vários insetos e animais (Panda et al. 2014). As espécies que formam o gênero possuem, em sua maioria, genes envolvidos em resposta a “stress” ambiental, como fatores sigma e receptores quimiotáticos, sugerindo capacidade de adaptação a ambientes diversos. Além disso, sob condições adversas, *Brevibacillus* induz sua esporulação e se protege de choque osmótico (Panda et al. 2014).

O gênero *Brevibacillus* possui inúmeras aplicações biotecnológicas. Dentre estas, a produção de proteína recombinante se deve à excelente capacidade de algumas espécies de expressar proteínas heterólogas e produzir proteínas intracelulares na forma solúvel no citoplasma, sem a formação de corpos de inclusão. Já existem diversas patentes abordando essa capacidade de *Brevibacillus* (Panda et al. 2014). Em algumas espécies, como em *Brevibacillus parabrevis*, já foi demonstrada a capacidade de utilizar derivados de petróleo como substrato de crescimento e fonte de carbono, produzindo dióxido de carbono. Essa propriedade tem potencial para ser utilizada na biodegradação de polímeros gerando menos resíduos tóxicos (Panda et al. 2014).

Enzimas e proteínas com interesse biotecnológico, como dipeptidases, amidases, gelatinases e hidrolases também já foram isoladas e descritas para este gênero. Por fim, *Brevibacillus* spp. é um potencial agente de biocontrole e essa área de pesquisa vem despertando muito interesse (Panda et al. 2014). *Brevibacillus laterosporus* possui ação inseticida demonstrada contra diversas Ordens e produz

uma ampla gama de enzimas e proteínas, que contribuem para a sua ação tóxica (Panda et al. 2014; Ruiu, 2013).

1.4.3.1 A espécie *Brevibacillus laterosporus*

Brevibacillus laterosporus, anteriormente classificado como *Bacillus laterosporus*, foi inserido no cluster de *Bacillus brevis* após análises de sequências do gene 16S rRNA (Shida et al. 1996). *B. laterosporus* caracteriza-se pela produção de um típico corpo para-esporal lamelar aderido a um dos lados do esporo e pode estar presente em diferentes formas e tamanhos (Smirnova et al. 1996).

O genoma de *B. laterosporus* ainda é pouco caracterizado. Zahner et al. (1999) utilizaram três técnicas moleculares para análise do polimorfismo entre cepas e buscaram um marcador molecular associado à patogenicidade. Os resultados indicaram relação de clonalidade entre as cepas e as técnicas RAPD e PFGE mostraram-se mais eficientes na detecção de polimorfismos. No entanto, nenhum marcador molecular foi encontrado. O genoma da cepa LMG 15441 revelou a presença de um cromossomo e dois plasmídeos circulares, além de genes cromossomais codificadores de poliquetídeos, peptídeos não ribossomais e genes putativos para toxinas, com similaridade à toxina de *Lysinibacillus sphaericus* e a antígenos de *Bacillus anthracis* (Djukic, 2011).

Propriedades inseticidas de *B. laterosporus* foram demonstradas contra larvas de mosquitos das espécies *C. quinquefasciatus*, *Culex pipens* Linnaeus, *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* Liston (Favret & Yousten, 1985; Rivers et al. 1991; Orlova et al. 1998; Oliveira et al. 2004). O corpo paraesporal de *B. laterosporus* não era considerado responsável por qualquer atividade inseticida (Favret & Yousten, 1985) até que Orlova et al. (1988) demonstraram que alguns cristais produzidos durante a esporulação são altamente tóxicos para larvas de *A. aegypti* e *A. stephensi*. Zubasheva et al. (2010) analisaram as condições ótimas de crescimento de quatro cepas de *B. laterosporus* produtoras de cristais altamente tóxicos contra larvas de *A. stephensi* e *A. aegypti*.

Ruiu et al. (2006) isolaram uma cepa de *B. laterosporus* na Itália que mostrou-se altamente tóxica contra larvas e adultos de *M. domestica*, produzindo também

efeitos subletais, como aumento do período larval e redução no peso pupal (Ruiu et al. 2006). Tal cepa tornou-se tóxica após alcançar a fase estacionária de crescimento da cultura bacteriana e foi mantida após a esporulação. O mesmo estudo sugeriu que as toxinas devem localizar-se nos esporos e no corpo paraesporal (Ruiu et al. 2007a). Além disso, a mesma cepa não mostrou atividade tóxica contra organismos benéficos, como *Muscidifurax raptor* Girault & Sanders, 1910, um parasitoide natural de *M. domestica* (Ruiu et al. 2007b), indicando ser uma boa estratégia no manejo integrado.

Larvas de *M. domestica*, após ingestão de dieta misturada com esporos de *B. laterosporus*, sofreram efeitos histopatológicos como deterioração progressiva do epitélio intestinal, alterações de microvilosidades, vacuolização do citoplasma e deformação do retículo endoplasmático. Essas alterações foram similares àquelas descritas para *B. thuringiensis*, o que suporta uma hipótese baseada na interação de toxinas com receptores de membrana (Ruiu et al. 2012). A formulação de esporos da mesma cepa, quando aplicada em alta concentração, causou redução da emergência de adultos de *M. domestica*, tanto no laboratório quanto em experimentos com gaiolas no campo e em uma fazenda de gado de corte. Esses resultados mostram *B. laterosporus* como excelente alternativa no controle desta praga (Ruiu et al. 2008).

O isolado G4 de *B. laterosporus*, que não é produtor de cristal, apresentou alta atividade inseticida contra os nematódeos *Panagrellus redivius* e *Bursaphelenchus xylophilus*. Tal atividade foi atribuída a proteases extracelulares secretadas no sobrenadante da cultura, que causaram a destruição da cutícula dos nematódeos (Huang et al. 2005; Tian et al. 2007). Outra cepa de *B. laterosporus*, isolada em amostra de solo na Índia, mostrou-se produtora de quitinases extracelulares com atividade contra o fungo fitopatogênico *Fusarium equiseti* e também contra a lagarta *Plutella xylostella* (Prasanna et al. 2013).

A cepa denominada ZQ2, altamente estável, apresentou forte atividade contra fungos patogênicos de maçãs. Peptídeos catiônicos acumulam-se na membrana celular das hifas do fungo, causando danos nos domínios de membrana ricos em esteróis, afinamento das hifas e a não germinação dos esporos (Song et al. 2011). Outro isolado, denominado BM3, proveniente de amostras de águas quentes da

Índia, também causou a inibição do crescimento de fungos patogênicos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Magnaporthe* e *Rhizoctonia* (Saikia et al. 2011).

O amplo potencial biotecnológico de *B. laterosporus* é facilmente compreendido devido às patentes depositadas e publicadas nos últimos anos. Delrio et al. (2011) descreveram a metodologia de controle de larvas e adultos de *M. domestica* a partir de formulações do isolado italiano. Posteriormente, novas toxinas inseticidas (ISP1A e ISP2A) sinérgicas, e suas sequências de DNA, foram descritas para o controle de espécies de coleópteros do gênero *Diabrotica*, praga na produção de milho nos EUA (Arnaut et al. 2011). Outra patente relata cepa de *B. laterosporus* produtora de toxinas inseticidas e enzimas quitinolíticas com potencial para o manejo de pestes na agricultura, nas florestas, no programa de controle de vetores e controle de doenças de plantas (Gangavaramu, 2013).

Além do seu potencial entomopatogênico e nematocida, *B. laterosporus* desperta interesse devido a sua ampla produção de moléculas e enzimas (Ruii, 2013). Um novo peptídeo antimicrobiano, ativo contra patógenos de plantas, foi descrito em cepa de *B. laterosporus* isolada do solo (Zhao et al. 2012), além de cepas produtoras de substâncias proteicas com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (Hassi et al. 2012). Outra cepa isolada do canal auditivo de um animal selvagem mostrou-se produtora de três compostos bioativos que inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (Theodore et al. 2014). Filtrados de diferentes concentrações de outro isolado demonstraram ação algicida contra *Oscilalatoria*, alga encontrada em tanques de camarão na China, causando destruição de sua membrana e do seu mecanismo de fotossíntese (Jia et al. 2014).

Embora exista grande interesse no uso de inseticidas baseados em diferentes estirpes de *B. laterosporus*, ainda faltam estudos direcionados para a elucidação do modo de ação dessa bactéria (Ruii et al. 2012). Apesar de haver alta homologia entre as cepas, diferenças em seus perfis fenotípicos foram detectadas, o que resulta na variada produção de moléculas com mecanismos de ação tão distintos nesta bactéria. Semelhante ao que ocorreu com *B. thuringiensis*, novas cepas de *B. laterosporus* são isoladas e estudadas no mundo todo, a fim de que sejam

compreendidos seus diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, explorado seu amplo potencial biotecnológico (Ruiu, 2013).

2 Justificativa

C. megacephala é um importante alvo de controle biológico, em virtude de ser altamente sinantrópica e potencial vetora de patógenos entéricos, tanto para os homens quanto para os animais. Além disso, pode causar miíase em humanos e animais. *C. megacephala* é uma espécie exótica invasora que, através de sua introdução, conseguiu se estabelecer e reduzir indivíduos da espécie *C. macellaria*, nativa das Américas. O aprimoramento do controle biológico torna-se importante nos dias atuais, devido à resistência dos insetos, pragas e vetores aos inseticidas químicos e, fundamentalmente, devido aos danos causados ao meio ambiente decorrentes do seu uso em larga escala. Muitos estudos já demonstraram a capacidade entomocida das bactérias *B. laterosporus* e *B. thuringiensis*. No entanto, não há estudos sobre o potencial inseticida de *B. laterosporus* sobre *C. megacephala* como espécie alvo. Além disso, o mecanismo de ação desta bactéria ainda não está bem estabelecido.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a bioatividade de diferentes cepas de *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* sobre *C. megacephala*.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a atividade de estirpes de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis*, quanto à mortalidade dos indivíduos tratados;
- Verificar a atividade das estirpes testadas sobre o desenvolvimento de *C. megacephala* (períodos larval, pupal e de neolarva a adulto);
- Investigar as alterações relacionadas à ultraestrutura intestinal das larvas tratadas e alterações morfológicas dos adultos por microscopia eletrônica de transmissão;
- Prospectar a microbiota cultivável presente na dieta larval e sua possível capacidade de interferir na ação inseticida das diferentes estirpes testadas.

4 Material e Métodos

4.1 Método de Coleta de Dípteros

Indivíduos adultos de *C. megacephala* foram coletados com rede entomológica (puçá) e com auxílio de isca (carne bovina moída putrefata) para atração dos mesmos. O local de coleta foi a caçamba de lixo da comunidade do Amorim (latitude: - 22.875707, longitude: - 43.250606) (Figura 1), próxima a uma das entradas do campus da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos, Rio de Janeiro. Os espécimes coletados foram acondicionados em tubos de ensaio de vidro (17x160mm), cobertos com algodão hidrofóbico e levados ao laboratório para posterior identificação e criação. As coletas foram feitas preferencialmente de manhã e em dias com altas temperaturas.



Figura 1: Caçamba de lixo da Comunidade do Amorim, próxima a uma das entradas da Fiocruz, local onde foi realizada a coleta de indivíduos adultos de *Chrysomya megacephala*. Fonte: Acervo Pessoal.

4.2 Manutenção das colônias de *Chrysomya megacephala* em laboratório

Os indivíduos adultos coletados foram levados ao Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF), Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/ FIOCRUZ, e identificados

de acordo com a chave dicotômica para a família Calliphoridae, elaborada por Mello (2003). As colônias foram colocadas em gaiolas de madeira (30cm x 30cm x 30cm), revestidas por tela de náilon nas laterais com uma abertura frontal para o manuseio e foram denominadas “geração selvagem de moscas”.

As gaiolas foram mantidas em câmara climatizada regulada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar $70\pm 10\%$ e com fotofase de 12 horas. Para alimentação dos adultos, foram oferecidas soluções de água e açúcar a 30% em bebedouros com gaze, *ad libitum*. As soluções foram substituídas uma vez por semana. Foi oferecida carne bovina moída putrefata em placas de Petri (aproximadamente 10 gramas), para obtenção de posturas referentes à primeira geração de moscas criadas em laboratório (Figura 2).

A primeira geração (ou geração F1) foi criada também em substrato de carne até que as larvas de terceiro instar abandonassem a dieta; então, foram coletadas e colocadas em potes com vermiculita para posterior pupação. Após emergência dos adultos, foi feita a criação em gaiolas de madeira como descrito acima, com aproximadamente 10 a 15 casais, respeitando-se a proporção de 1:1, entre machos e fêmeas. Foi oferecida carne bovina moída putrefata durante os primeiros sete dias após a emergência dos adultos, com o objetivo de auxiliar a maturação dos folículos ovarianos das fêmeas. Após esse período, o mesmo substrato foi usado para estimular a oviposição das fêmeas. A partir da geração F1, as posturas obtidas das gerações seguintes foram utilizadas nos experimentos com larvas de primeiro instar e também utilizadas para a manutenção da colônia.



Figura 2: Placa de Petri contendo substrato para maturação e obtenção de postura de fêmeas adultas de *Chrysomya megacephala* (esquerda). Gaiola de criação e manutenção da colônia de *Chrysomya megacephala* sob condições de laboratório (direita).

4.3 Manutenção das cepas bacterianas

As cepas encontram-se em estoque no LEMEF/IOC/FIOCRUZ. Os estoques estão mantidos a 4°C em ágar-nutriente e em BHI glicerol (20%) a 20°C. Estas cepas estão depositadas na Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB) do IOC, FIOCRUZ. A Tabela 1 relaciona todas as cepas usadas no estudo.

Tabela 1: Cepas bacterianas de *Bacillus thuringiensis* e *Brevibacillus laterosporus* utilizadas nos bioensaios.

Cepa	Origem
Bon 707	Institute of Higiene, University of Aarhus, Aarhus C, Denmark.
IGM 16-92	Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow
Shi 3	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
NRS 1648	American Type Culture Collection
Shi 2	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
Shi 5	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
NRS 1642	American Type Culture Collection
NRS 661	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
NRS 590	American Type Culture Collection
NRS 856	Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos - CCGB
NRS 342	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
ATCC 6457	American Type Culture Collection
Bon 712	Institute of Higiene, University of Aarhus, Aarhus C, Denmark.
NRS 1247	Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos - CCGB
<i>L. sphaericus</i>	Universidade Federal de Pelotas*
LFB 913	Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos - CCGB
LFB 868	Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos - CCGB
LFB 857	Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos - CCGB

Todas as cepas estão depositadas na Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos - CCGB. * Cepa cedida por Fábio P. Leivas Leite da Universidade Federal de Pelotas, CDTec, Biotecnologia, Brazil.

4.4 Identificação de estirpes com atividade tóxica contra larvas de *Chrysomya megacephala* (testes preliminares)

As estirpes mantidas em estoque no laboratório foram plaqueadas em meio Ágar nutriente para verificação de pureza. Após isso, colônias isoladas foram selecionadas e estriadas em aproximadamente 12 tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado (Ágar nutriente em *slant*) e colocadas em estufa bacteriológica a 33°C, para crescimento. Após 72 horas, foi feita a confirmação da fase bacteriana de esporo livre através de microscopia óptica.

Após a confirmação, foram feitos raspados das cepas, que foram transferidas para um tubo de ensaio com tampa de rosca que continha 9 ml de água destilada autoclavada, formando a suspensão bacteriana concentrada. A partir dessa suspensão, 1mL foi retirado e transferido para outro tubo contendo 9mL de água. A partir daí, foram feitas diluições seriadas, até 10^{-6} . Para quantificação de esporos, as suspensões foram submetidas a termo-resistência a 80°C durante 15 minutos. Para contagem das unidades formadoras de colônias, foram retirados 100µL das duas últimas diluições, que foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar nutriente, em triplicata, e colocadas em estufa a 33 °C. Após 24 horas, as colônias foram contadas e calculada a UFC/mL.

Os bioensaios iniciais foram feitos de acordo com protocolo estabelecido por Ruiu et al (2006). Foram utilizadas dez larvas de primeiro instar (L1) em 2,5g de dieta previamente preparada, que consistiu em carne bovina moída putrefata misturada a 1mL de suspensão bacteriana; foram usadas no mínimo 3 réplicas para cada teste. A dieta larval misturada a 1mL de água destilada autoclavada foi usada como controle negativo. De modo geral, a proporção entre quantidade de carne e número de larvas utilizadas em experimentos com larvas do gênero *Chrysomya* é de 1:1 (Mendonça et al., 2011). No entanto, neste trabalho foi utilizada uma quantidade menor de dieta, com o objetivo de possibilitar maior ingestão de esporos bacterianos pelas larvas durante sua alimentação.

A dieta com as larvas foi colocada em potes plásticos de 50mL dentro de potes maiores de 250mL contendo vermiculita para abandono das larvas maduras e posterior pupação, cobertos com tecido tipo organza. A partir do terceiro dia de experimento, tempo aproximado de duração dos três estágios larvais de *C. megacephala*, as larvas que não abandonaram a dieta e aquelas que não se tornaram pupas foram consideradas mortas.

As larvas que conseguiram abandonar o substrato foram transferidas para tubos contendo vermiculita cobertos com algodão hidrofóbico e registradas como vivas. A mortalidade larval foi observada diariamente até o fim do experimento, que ocorreria aproximadamente após o sétimo dia de abandono do substrato. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

Os testes preliminares foram feitos com o objetivo de eleger as cepas com maior potencial inseticida contra neolarvas de *C. megacephala*. Dessa forma, tais cepas foram submetidas ao crescimento em meio líquido em caldo NYSM e foram realizados novos testes, analisando-se o desenvolvimento pós-embrionário das moscas. Estes bioensaios foram denominados bioensaios completos.

4.5 Preparo de suspensão bacteriana (biomassa) por meio de crescimento em meio líquido NYSM

O preparo do Caldo NYSM (Favret & Yousten, 1985) foi realizado da seguinte forma: Caldo Nutriente (Merck) 8g/l; Extrato de lêvedo (Difco) 0,50g/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,20g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Baker Analyzed) 0,01g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,10g/l e água destilada até completar o volume desejado. Os reagentes do meio de cultura foram dissolvidos em 80% do volume total de água; após isso, o pH foi ajustado a 7,2 – 7,4 com NaOH 1N. O volume final de água foi ajustado e o meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Quando necessário, o meio Caldo-NYSM foi usado na forma sólida; nesse caso, foram adicionados 15g/l de ágar-ágar (NYSM-ágar).

Após verificação de pureza das estirpes em placas de Petri, o processo fermentativo teve início com a transferência do induto bacteriano através de uma alça bacteriológica para tubos de ensaio de vidro contendo 5 mL do meio NYSM (Favret e Yousten et al. 1985); esta etapa denomina-se pré-inóculo. O pré-inóculo tem como objetivo adaptar as células bacterianas às condições do ambiente e diminuir a duração da fase *lag* do crescimento bacteriano (Cavados et al. 1998).

O pré-inóculo foi realizado durante 6 horas, a 120 rpm em *shaker* orbital e a 31°C. Após isso, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 1000mL contendo 225 mL do mesmo meio de cultura. As cepas foram mantidas em *shaker* orbital a 200 rpm e 31°C até 72 horas ou até a obtenção da esporulação completa. Em paralelo, foi feito um controle negativo nas mesmas condições de crescimento, porém sem inóculo bacteriano.

O cultivo foi centrifugado a 11.000 rpm em centrífuga refrigerada (Thermo Scientific Sorvall RC 6+), a 4°C, durante 1 hora. O *pellet* foi ressuspenso em água destilada autoclavada em frasco âmbar e o pH da biomassa foi ajustado para 5,0 com ácido propiônico 0,7%. (Oliveira et al. 2004). O número de esporos foi calculado através de diluição seriada em salina autoclavada e a contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro foi feita em placas de NYSM – Ágar (UFC/mL). Por fim, a biomassa foi diluída em água destilada estéril para obtenção de suspensões com diferentes concentrações utilizadas nos bioensaios.

4.6 Bioensaios realizados a partir do crescimento em meio líquido – Bioensaios completos

Os experimentos com as cepas selecionadas foram realizados utilizando-se as cepas que apresentaram as maiores taxas de mortalidade larval nos primeiros bioensaios (Tabela 3). As cepas Bon 707, IGM 16-92 e Shi 3 foram cultivadas em meio NYSM líquido com o objetivo de se obter, através de centrifugação refrigerada, biomassa concentrada de esporos. A biomassa foi diluída em água destilada autoclavada até se obter suspensões com diferentes concentrações de esporos de

cada cepa. As suspensões foram submetidas a termo- resistência e foi calculada a concentração de esporos em cada suspensão.

As suspensões de cada cepa, em diferentes concentrações de esporos, foram misturadas na dieta à base de carne bovina moída putrefata em copos plásticos com neolarvas de *C. megacephala*. Para cada teste, foram utilizadas três a cinco concentrações de esporos diferentes, um grupo controle com apenas a dieta larval e um grupo controle com água destilada autoclavada misturada à dieta. Foram feitas 5 repetições diferentes para cada concentração teste, contendo dez neolarvas adicionadas em 5 gramas de dieta e misturadas em 4 ml de suspensão bacteriana.

Os copos foram colocados em recipientes maiores com vermiculita, para obtenção de larvas maduras sobreviventes, diariamente observadas, contadas e alocadas em tubos de ensaio para pupação e emergência dos adultos. Os experimentos foram conduzidos em câmara climatizada (B.O.D.), regulada à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e 12 horas de fotofase.

Neste experimento, o desenvolvimento pós-embrionário das moscas foi acompanhado até a emergência dos adultos. Os parâmetros biológicos analisados foram: mortalidade larval, mortalidade pupal, mortalidade total (neolarva a adulto), peso (mg) de larvas de terceiro instar, período em dias do desenvolvimento larval, pupal e total.

4.7 Bioensaio com adultos de *Chrysomya megacephala*

Indivíduos recém-emergidos foram retirados das gaiolas de criação e foram montadas gaiolas para realização dos experimentos. Em cada gaiola foram colocados dez indivíduos aleatórios, independente do sexo. Para a gaiola do grupo controle foi oferecida diariamente uma placa de Petri contendo gaze autoclavada embebida de solução de açúcar a 30% e para a gaiola do grupo teste foi oferecida também diariamente uma placa de Petri com gaze autoclavada embebida em uma mistura (1:1) de solução de açúcar a 60% com o mesmo volume de suspensão de esporos. A placa de Petri, a gaze e as soluções foram substituídas diariamente, para evitar a proliferação de fungos e outras bactérias. O experimento foi repetido três

vezes, nas mesmas condições. A mortalidade dos adultos foi analisada diariamente até dez dias após o início do experimento.

4.8 Identificação das bactérias cultiváveis presentes na dieta larval através de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para identificação das espécies bacterianas cultiváveis presentes na dieta larval (carne bovina moída putrefata), 1 grama da mesma carne que foi oferecida às larvas nos bioensaios foi pesado e colocado em 9 ml de salina (NaCl 0,85%) autoclavada, misturado com auxílio de agitador vórtex e feita a diluição seriada até 10^{-5} . A última diluição foi plaqueada em triplicata em meio Agar nutriente e as placas foram deixadas em estufa bacteriológica a 33°C por 24 horas. Diferentes colônias foram selecionadas, isoladas e purificadas.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras isoladas a partir da dieta larval foi extraído pelo método de fervura. Cada amostra foi crescida em placas de Agar nutriente em estufa bacteriológica *overnight*. Uma alça do crescimento bacteriano foi colocada em tubos do tipo *Eppendorf* contendo 1 mL de água destilada autoclavada e misturada com auxílio de agitador vórtex. Após isso, as amostras foram colocadas no *freezer* por 20 minutos e, em seguida, por 10 minutos em água a 94°C. Após fervura, o DNA foi centrifugado durante 1 minuto a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo do tipo *Eppendorf* limpo e guardado no *freezer*.

A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores específicos para amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Sequência do iniciador (5'→3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
16S rDNA	515-F: GCCAGCAGCCGCGGTAA 806-R: GGACTACCAGGGTATCTAAT	240	Zahner et al. (2006)

A reação foi realizada no volume final de 25 µl, contendo 5 ng de DNA, 12,4 µl de água Milli-Q, 2,5 µl de tampão PCR 10X, 0,5 µl (1pmol/ µl) de cada *primer*, 2,5 µl (2mM) de deoxinucleotídeos, 5 µl (20mM) de MgCl₂ e 0,1 µl de Taq DNA polymerase (1,25U) (GoTaq FlexiPromega).

As condições de amplificação consistiram de um ciclo inicial por 12 minutos a 95 °C, 30 ciclos com desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento de 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por minuto. Por fim, uma extensão final de 72 °C por 1 minuto.

A amplificação do DNA foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (Ultra-pure Invitrogen) a 0,8% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X, sob uma corrente de 90 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (5mg/ml) e observado no transiluminador Kasvi.

Os amplicons gerados foram purificados através do kit “GFX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare) e sequenciados no 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), na Plataforma de Sequenciamento DNA – PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática, IOC, Fiocruz. A análise das sequências de DNA geradas foram feitas com o *software* Bioedit.

4.9 Dissecção dos insetos e análise ultraestrutural através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As alterações em nível ultraestrutural ocorridas no intestino médio da larva devido à ingestão da bactéria foram observadas através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia óptica (MO). Para realização dos experimentos de dissecção, larvas de *C. megacephala* de primeiro instar foram previamente submetidas a bioensaios onde foi utilizada suspensão de esporos.

As dissecções foram feitas de acordo com Boonsriwong et al (2011), sendo utilizadas dez larvas de terceiro instar por grupo estudado, com três a quatro dias de idade. As larvas foram coletadas e lavadas várias vezes com solução salina para remoção de resíduos da dieta aderidos ao tegumento. Após isso, foram transferidas para placas de Petri e anestesiadas em freezer a 0°C durante 5 minutos. Cada larva foi transferida individualmente para uma placa de parafina e preparada para a dissecção. Todas as larvas foram dissecadas individualmente e imersas em solução salina, sob lupa Zeiss.

Após posicionamento na placa de parafina com auxílio de alfinetes inseridos através do tegumento, a larva foi ventralmente dissecada com auxílio de finas pinças e o trato digestivo foi exposto. Após remoção do tegumento, o trato digestório foi transferido para outra placa de Petri para dissecção das divisões do intestino médio.



Figura 3: Larva de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* posicionada ventralmente na placa de Petri para dissecção do intestino médio posterior.



Figura 4: Intestino médio exposto de *Chrysomya megacephala*.

A seleção da região do intestino médio para análise ultraestrutural foi realizada de acordo com Ruiu et al. (2012), em que porções do intestino médio posterior de cada larva foram seccionadas e fixadas. O intestino médio posterior foi cortado, com a ajuda de estiletos entomológicos, separado da seção média (ou porção mediana do intestino médio) da seção posterior, no nível da inserção dos túbulos de Malpighi (Figura 5)

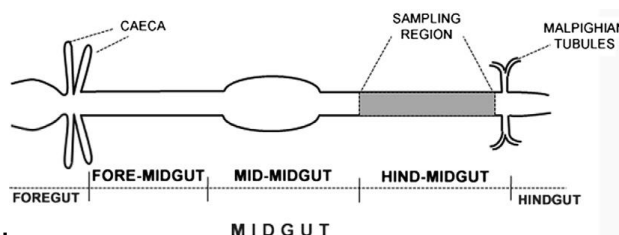


Figura 5: Representação das porções do trato digestivo de dípteros ciclorrafos e a região de interesse para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: Ruiu et al., (2012). Journal of Invertebrate Pathology (2012) 211–216.

Após dissecção da região de interesse, o intestino médio posterior de cada larva foi colocado em tubos do tipo *Eppendorf* contendo solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M), submetido a três lavagens seguidas no mesmo tampão por dez minutos cada. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, durante uma hora no escuro. Prosseguiu-se a três lavagens consecutivas no mesmo tampão por dez minutos cada. Após as lavagens, as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de concentração de

etanol (50%, 70%, 90%) por dez minutos cada e, por fim, em três séries de desidratação em etanol 100%, dez minutos cada. As amostras foram deixadas em solução de etanol (100%) e Epon (1:1) por no mínimo 12 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao Epon puro por seis horas e depois procedeu-se à inclusão em Epon.

Cortes semi-finos (1 μ) foram obtidos, corados com solução de azul de toluidina e observados em microscópio Zeiss Axioplan. Seções ultrafinas (50 a 80 nm de espessura) foram recolhidas em grades de cobre revestidas de colódio e contrastadas em acetato de uranila a 5% em escuridão total durante 20 a 30 minutos e em citrato de chumbo 2% durante cinco minutos. Os cortes foram observados em um microscópio de transmissão Jeol Jem-1011, pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, IOC, Fiocruz (Figura 6).

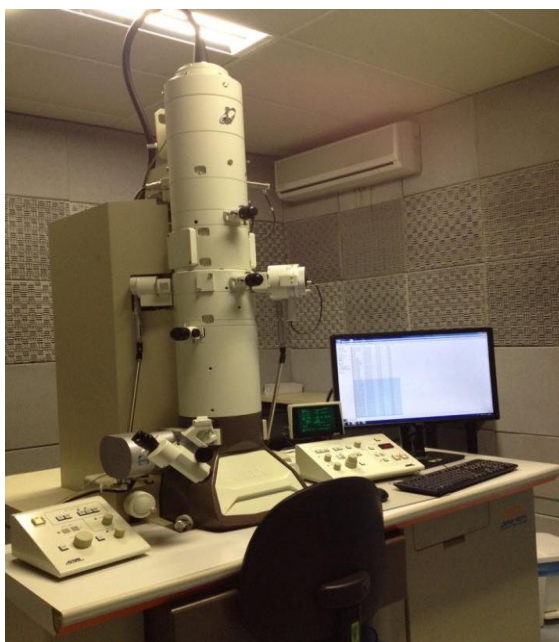


Figura 6: Microscópio de transmissão Jeol Jem-1011, pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

4.9.1 Análises Estatísticas

Nos testes preliminares, os valores de mortalidade no grupo tratado foram corrigidos utilizando-se a fórmula de Abbott (1925), da seguinte forma: $M_c (\%) = (\%M_t - \%M_{co}) / (100 - \%M_{co}) \times 100$, onde M_c é a mortalidade corrigida, M_t é a mortalidade do grupo tratado e M_{co} é a mortalidade no grupo controle. O número

corrigido de larvas mortas foi submetido ao teste binomial de duas amostras independentes, sendo utilizado o programa Bioestat 5.0. O nível de significância foi definido quando $P < 0,05$. Quando o valor da mortalidade corrigida foi inferior ao valor do grupo controle, não foram utilizados testes estatísticos.

Os resultados dos bioensaios completos foram submetidos à análise de variância (ANOVA 1; $P \leq 0,05$). O teste de Tukey foi utilizado na análise do desenvolvimento pós-embrionário. A significância estatística foi determinada pelos testes do qui-quadrado (χ^2) e Student's T test, sendo considerado significativo P menor ou igual a 0,05 e o erro padrão foi calculado através da média dos experimentos.

5 Resultados

O presente estudo avaliou a suscetibilidade de larvas de primeiro instar de *C. megacephala* a 15 cepas de *B. laterosporus* e a três cepas de *B. thuringiensis*, sob condições de laboratório. Nos testes preliminares, foi utilizada a maior concentração de esporos obtida do crescimento de cada cepa, sem diluição. Apesar de o método de crescimento bacteriano ter sido padronizado, o número de esporos por grama de dieta variou de 10^6 a 10^8 (Tabela 3). A Tabela 3 mostra os resultados dos bioensaios preliminares em ordem decrescente de mortalidade.

Tabela 3: Efeito tóxico de cepas de *Brevibacillus laterosporus* e *Bacillus thuringiensis* contra larvas de primeiro instar de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) sob condições de laboratório.

Cepa*	Esporos/grama de dieta	Mortalidade Corrigida ¹	Mortalidade no grupo controle	P valor ²
<i>Brevibacillus laterosporus</i>				
Bon 707	$1,46 \times 10^7$	70,5%	15,0%	< 0,0001
IGM 16-92	$3,44 \times 10^8$	64,5%	22,5%	< 0,0001
Shi 3	$1,36 \times 10^8$	51,6%	22,5%	0,0028
NRS 1648	$6,4 \times 10^7$	43,24%	26,00%	0,0296
Shi 2	$2,00 \times 10^7$	30,1%	17,0%	0,0481
Shi 5	$2,49 \times 10^7$	18,0%	16,7%	0,4051
NRS 1642	$1,16 \times 10^7$	13,8%	27,5%	-
NRS 661	$1,88 \times 10^8$	12,0%	16,7%	-
NRS 590	$7,4 \times 10^7$	10,8%	26%	-
NRS 856	$9,2 \times 10^7$	8,6%	22,2%	-
NRS 342	$4,8 \times 10^6$	2,8%	22,2%	-
ATCC 6457	$1,08 \times 10^7$	0	26,0%	-
Bon 712	$2,72 \times 10^8$	0	15%	-
NRS 1247	$4,4 \times 10^7$	0	8%	-
<i>L. sphaericus</i>	$7,44 \times 10^7$	0	26%	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>				
LFB 913	$8,88 \times 10^7$	38,55%	17%	0,0066
LFB 868	$4,00 \times 10^7$	0	22,5%	-
LFB 857	$1,08 \times 10^8$	0	30%	-

*Todas as cepas estão depositadas na CCGBC.

¹A mortalidade foi corrigida utilizando a fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

² O valor de P foi obtido utilizando teste binomial de duas amostras independentes no programa Bioestat 5.0. ND – Não Determinado.

Em relação à espécie *B. laterosporus*, as cepas Bon 707, IGM 16-92 e Shi 3 apresentaram os maiores níveis de atividade tóxica contra larvas, produzindo 70,5%, 64,5% e 51,6% de mortalidade corrigida, respectivamente, com diferenças significativas em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Curiosamente, o isolado Bon 707 exibiu a maior toxicidade, apesar de ter sido utilizado a uma concentração relativamente baixa de esporos por grama de dieta. As estirpes Shi2 e NRS 1648 também causaram mortalidade significativa de larvas quando comparadas ao grupo controle; no entanto, abaixo de 50%. Já as estirpes NRS 1642, NRS 661, NRS 590 BL 856, NRS 342, ATCC 6457, Bon 712, NRS 1247 e *B. laterosporus* mostraram pouca ou nenhuma atividade inseticida contra as larvas destes dípteros (Tabela 3).

Três cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foram utilizadas nos testes preliminares (LFB 913, LFB 868 e LFB 857). Entre elas, as cepas LFB 868 e LFB 857 não exibiram efeito tóxico sobre larvas de *C. megacephala*, enquanto a cepa LFB 913 causou mortalidade larval corrigida significativa de 38,55%. Por fim, as cepas Bon 707, IGM 16-92 e Shi 3, de *B. laterosporus*, foram selecionadas para realização dos bioensaios, analisando-se o desenvolvimento pós-embrionário completo de *C. megacephala* sob diferentes concentrações de esporos, e não apenas a mortalidade larval. A estratégia empregada neste “screening” inicial foi a utilização do maior número possível de esporos em cada suspensão, para reduzir a possibilidade de não detecção de atividade larvicida das mesmas.

5.1 Bioensaio com a cepa *Brevibacillus laterosporus* IGM 16-92

No teste realizado com a cepa IGM 16-92 foram utilizadas cinco concentrações diferentes de suspensão de esporos: 1×10^9 ufc/ml (concentração 1), 5×10^8 ufc/ml (concentração 2), 1×10^8 ufc/ml (concentração 3), 5×10^7 ufc/ml (concentração 4) e 1×10^7 ufc/ml (concentração 5). Tais concentrações foram preparadas a partir da biomassa de esporos após crescimento em meio líquido NYSM. Algumas condições do experimento foram modificadas em relação aos testes

preliminares, como, por exemplo, a utilização de cinco repetições contendo 5 g de dieta e dez larvas recém-eclodidas (primeiro instar), cada. Além disso, foram utilizados 4 ml de suspensão bacteriana e 4 ml de água no grupo controle, ao invés de 1 ml como nos testes preliminares (Tabela 3).

A cepa IGM 16-92 apresentou alta produção de esporos durante seu crescimento em meio líquido NYSM; assim, foi possível utilizar suspensões com altas concentrações de esporos no bioensaio. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para mortalidade larval, pupal e total (efeitos letais) causados pela cepa IGM 16-92 e o peso médio das larvas (em miligramas) de terceiro instar sobreviventes (efeito subletal).

Tabela 4: Mortalidade (%) larval, pupal, total e peso médio (mg) de larvas de terceiro instar de *Chrysomya megacephala*, após bioensaio com diferentes concentrações de esporo da cepa *Brevibacillus laterosporus* IGM 16-92, a partir de crescimento em meio NYSM líquido.

Tratamento	Mortalidade larval (%)	Mortalidade Pupal (%)	Mortalidade Total (%)	Peso(mg)/Média±DP
Controle	14 ^{ab}	14 ^{ab}	26 ^a	67,35 ± 9,34 ^{a***}
Cont. água	8 ^{ab}	2,2 ^b	10 ^a	57,60 ± 7,88 ^b
1x10 ⁹ ufc/ml	28 ^{a*}	0 ^{ab}	28 ^a	55,84 ± 10,91 ^b
5x10 ⁸ ufc/ml	22 ^{ab}	2,6 ^{ab}	24 ^a	59,10 ± 5,53 ^b
1x10 ⁸ ufc/ml	6 ^b	2,1 ^{ab}	8 ^a	54,00 ± 11,97 ^b
5x10 ⁷ ufc/ml	14 ^{ab}	4,6 ^{ab}	18 ^a	57,17 ± 9,96 ^b
1x10 ⁷ ufc/ml	10 ^{ab}	8,8 ^a	18 ^a	57,15 ± 10,9 ^b

Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas de *C. megacephala*. Valores de significância são representados como * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$ em relação ao controle (t-test). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram significativamente entre si e médias seguidas por letras diferentes foram significativas pelo teste de Tukey.

De acordo com a Tabela 4, a maior concentração de esporos utilizada (1x10⁹ufc/ml) gerou mortalidade larval superior (28%) aos dois grupos controle (14% no controle puro e 8% no controle com água) e às outras concentrações de esporos utilizadas. No entanto, tal mortalidade só diferiu estatisticamente da terceira maior concentração de esporos (1x10⁸ ufc/ml), que apresentou a menor taxa de mortalidade larval (6%). Em relação à mortalidade pupal e total, não houve diferença estatisticamente significativa.

A média de peso das larvas de terceiro instar do grupo controle puro (em mg) foi superior à média alcançada pelas larvas do grupo controle com água e à média alcançada em todos os grupos teste (Tabela 4).

Outros parâmetros subletais como tempo de desenvolvimento (em dias) dos períodos larval, pupal e total (neolarva a adulto) também foram analisados. A Figura 7 mostra o período de desenvolvimento pós – embrionário, em dias, das moscas alimentadas com dieta misturada à suspensão de esporos da cepa IGM 16-92. Em relação ao período larval, as larvas do grupo controle puro se diferenciaram estatisticamente dos demais grupos, apresentando média em dias de desenvolvimento inferior, de 3,44 dias. A presença de água na dieta larval, tanto nos grupos teste quanto no grupo controle com água, pareceu prolongar o período de permanência da larva na dieta, em relação ao controle puro. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao desenvolvimento pupal entre os diferentes grupos.

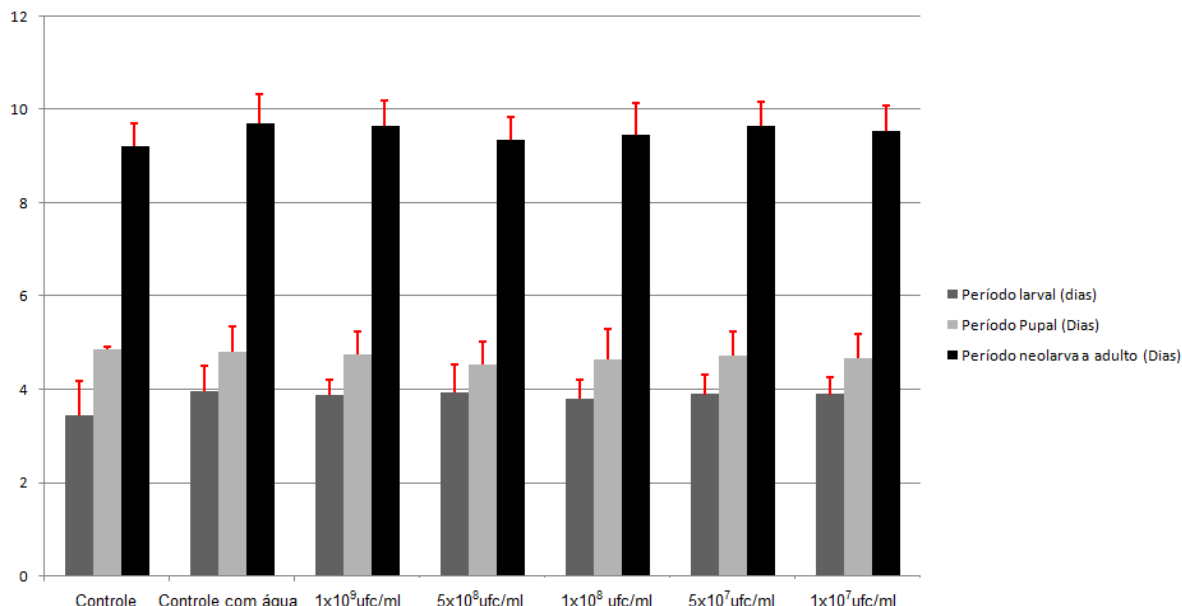


Figura 7: Período de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto (em dias) de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com a cepa *Brevibacillus laterosporus* IGM 16-92. Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas. Valores de significância são representados como *P<0,05 (t-test).

No grupo controle puro, o período de desenvolvimento total da mosca (neolarva a adulto) foi mais curto (9,22 dias) quando comparado ao grupo controle com água e aos demais grupos teste. Mais uma vez, há o indicativo de que a presença da água na dieta interfere na alimentação e no desenvolvimento das larvas. No entanto, o controle puro se diferenciou estatisticamente em relação ao grupo controle com água e às concentrações de 1×10^9 ufc/ml e 5×10^7 ufc/ml. Os períodos de desenvolvimento total do grupo controle com água e dos grupos teste não se diferenciaram entre si.

Por fim, foram observados sete adultos que apresentaram alterações morfológicas, provavelmente decorrentes da ingestão da dieta larval misturada aos esporos da cepa IGM 16-92. Já no grupo controle foi observado apenas um adulto, que apresentou alteração morfológica branda. As alterações morfológicas severas consistiram em corpo mal desenvolvido e atrofiado dos insetos adultos e coloração escura dos mesmos. Além disso, alguns adultos apresentaram tórax pouco desenvolvido, pernas mais curtas e asas reduzidas e enrugadas.

5.2 Bioensaio com a cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707

Primeiramente, foi realizado o bioensaio com a cepa Bon 707, baseado na metodologia proposta por Ruiu et al. (2006), segundo a qual 1 ml de suspensão bacteriana em diferentes concentrações foi adicionado a 2,5g de dieta e oferecido a dez larvas recém-eclodidas. O experimento foi feito com dez repetições para cada grupo e o resultado representa a média entre eles.

A partir da biomassa de esporos, obtida após crescimento em meio líquido NYSM, foram feitas diluições em água e obtidas três diferentes concentrações para o bioensaio: 1×10^8 ufc/ml (concentração 1), 5×10^7 ufc/ml (concentração 2) e 1×10^7 ufc/ml (concentração 3). Em paralelo, foi feito um controle puro composto apenas de dieta e um controle com água no mesmo volume utilizado com a suspensão (1 ml). Os parâmetros avaliados foram mortalidade larval, mortalidade pupal, mortalidade total (neolarva a adulto) e peso larval. A Tabela 5 demonstra os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 5: Mortalidade (%) larval, pupal e total de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com diferentes concentrações da cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707, a partir de crescimento em meio líquido NYSM.

Tratamento	Mortalidade larval (%)	Mortalidade Pupal (%)	Mortalidade Total (%)	Peso larval (mg) ± DP
Controle puro	75	7	92***	46,40 ± 10,29 ^a
Controle com água	50	16	64	39,51 ± 14,36 ^a
1x10 ⁸ ufc/ml	87***	3	90***	18,91 ± 11,72 ^a
5x10 ⁷ ufc/ml	89***	4	95***	24,24 ± 16,84 ^a
1x10 ⁷ ufc/ml	66	8	63	31,40 ± 14,47 ^a

Dados obtidos a partir de experimentos com dez repetições com grupos de dez larvas de *C. megacephala* cada. Valores de significância são representados como ***P<0,001 em relação ao controle (t-test). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram significativamente entre si e médias seguidas por letras diferentes foram significativas pelo teste de Tukey.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 5, é possível perceber que as taxas de mortalidade larval causada pelas concentrações de esporos 1x10⁸ufc/ml e 5x10⁷ufc/ml (concentrações 1 e 2, respectivamente) diferenciaram-se com alta significância estatística (p<0,001), em relação ao grupo controle com água. No entanto, mesmo não apresentando diferença estatística significativa entre eles, os dois grupos controle utilizados neste experimento (puro e com água) apresentaram uma mortalidade larval alta, principalmente o controle puro. Em relação à mortalidade pupal, não houve diferença significativa. O controle puro, a concentração 1 e concentração 2 apresentaram mortalidade total de 92%, 90% e 95%, respectivamente, resultados estatisticamente significativos em relação ao controle com água.

A média de peso larval não variou estatisticamente entre os grupos tratados (Tabela 5). Porém, podemos observar médias de peso (em mg) mais baixas nas larvas sobreviventes após o bioensaio com as concentrações 1x10⁸ufc/ml, 5x10⁷ufc/ml e 1x10⁷ufc/ml. Nestes casos, parece que a presença da suspensão de esporos na dieta prejudicou a alimentação das larvas, fazendo com que as larvas sobreviventes alcançassem média de peso inferior à média alcançada pelas larvas dos dois grupos controle.

A alta mortalidade encontrada nos grupos controle pode ser decorrente de diferenças entre as larvas utilizadas no experimento. As larvas são selecionadas ao acaso em placas de Petri, que contêm a postura das colônias de diferentes gaiolas

presentes no laboratório, porém todas da mesma geração. Além disso, o grupo controle puro contém apenas a dieta larval, sem adição de água, e em função disso apresenta tendência a ressecamento, o que pode ter contribuído para a alta mortalidade larval.

Em função da alta mortalidade observada nos dois grupos controle (puro e com água), o experimento com a cepa Bon 707 foi repetido e modificado. A modificação consistiu na utilização de 5 g de carne bovina moída putrefata por repetição, ao invés de 2,5 g conforme utilizada no experimento anterior, mantendo-se dez larvas de primeiro instar por repetição.

Outra modificação foi a utilização de 4 ml de suspensão bacteriana misturada à dieta larval, por repetição, e 4 ml de água misturada à dieta do grupo controle com água. Além disso, foi feito experimento com cinco concentrações diferentes de suspensão de esporos, obtidas por crescimento em meio líquido NYSM, $4,45 \times 10^8$ ufc/ml, $2,26 \times 10^8$ ufc/ml, $4,4 \times 10^7$ ufc/ml, $2,24 \times 10^7$ ufc/ml e $4,5 \times 10^6$ ufc/ml, e outro experimento com apenas uma concentração de suspensão de esporos, obtida por crescimento em meio sólido Agar Nutriente ($1,6 \times 10^7$ ufc/ml). Os resultados destes bioensaios estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Mortalidade (%) larval, pupal, total e peso médio (mg) de larvas de terceiro ínstar de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com diferentes concentrações de esporo da cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707, a partir de crescimento em meio NYSM líquido e sólido (Ágar Nutriente).

Tratamento	Mortalidade larval (%)	Mortalidade Pupal (%)	Mortalidade Total (%)	Peso(mg)/Média±DP
Crescimento em meio líquido				
Controle	16 ^b	16,6 ^a	30 ^a	64,30 ^{a,b} ±5,98
Controle água	18 ^b	17 ^a	32 ^a	63,12 ^{a,b} ±11,96
4.45x10 ⁸ ufc/ml	32 ^{ab}	8,8 ^a	38 ^a	55,46 ^{c***} ±8,72
2.26x10 ⁸ ufc/ml	36 ^{ab}	3,1 ^a	38 ^a	61,0 ^{a,b,c} ±7,67
4.4x10 ⁷ ufc/ml	46 ^{a**}	3,7 ^a	48 ^a	66,17 ^{a,b} ±5,78
2.24x10 ⁷ ufc/ml	32 ^{ab}	8,8 ^a	38 ^a	61,67 ^{a,b,c} ±11,77
4.5x10 ⁶ ufc/ml	30 ^{ab}	11,4 ^a	38 ^a	59,45 ^{a,b,c} ±6,31
Crescimento em meio sólido				
Controle	10,8a	14a	32b	51,16b ± 1,40
1.6x10 ⁷ ufc/ml	56b ^{***}	10a	66a ^{***}	34,24a±1,60 ^{***}

Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas de *C. megacephala* cada. Valores de significância são representados como $***P < 0,001$ em relação ao controle (t-test). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram significativamente entre si e médias seguidas por letras diferentes foram significativas pelo teste de Tukey.

A Tabela 6 evidencia o resultado dos dois bioensaios com a cepa Bon 707. No experimento realizado com as suspensões de esporos obtidas por crescimento em meio líquido, observa-se maior mortalidade larval com a concentração de 4,4x10⁷ ufc/ml, com diferença estatística significativa em relação aos dois grupos controle. Esta concentração intermediária de esporos causou 46% de mortalidade, índice maior que o das mortalidades causadas pelas duas suspensões de maior concentração de esporos (Tabela 6). Todas as concentrações de esporos utilizadas resultaram em mortalidade larval superior à dos dois grupos controle.

No mesmo bioensaio, não houve mortalidade pupal significativa entre os grupos testados. A mortalidade total causada por todas as suspensões de esporos (38% e 48%) foi superior àquelas causadas pelos grupos controle (30% e 32%), porém essas não se diferenciaram estatisticamente (Tabela 6). Em relação ao peso médio das larvas de terceiro instar, a suspensão de maior concentração de esporos (4,45x10⁸ufc/ml) gerou larvas com o menor peso (55,46 mg), com diferença

estatisticamente significativa em relação às outras concentrações testadas e aos grupos controle (Tabela 6).

A utilização de suspensão de esporos, obtida a partir de crescimento em meio sólido Agar Nutriente, gerou mortalidades altas. Neste bioensaio, foi utilizada apenas uma concentração de esporos ($1,6 \times 10^7$ ufc/ml), que causou 56% de mortalidade larval, 66% de mortalidade total e redução no peso médio das larvas de terceiro instar (34,24 mg), apresentando todos esses resultados diferença estatística extremamente significativa em comparação ao grupo controle ($***P < 0,001$). Em nenhum dos três experimentos com a cepa Bon 707 ocorreu mortalidade pupal significativa.

A Figura 8 mostra os períodos de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto das larvas sobreviventes do bioensaio com a cepa Bon 707, após crescimento em meio líquido NYSM. O período de desenvolvimento larval foi mais curto para as larvas do grupo controle puro, de 3,97 dias, enquanto no grupo controle com água e nas diferentes concentrações de esporos utilizadas os períodos foram superiores a quatro dias. No entanto, o desenvolvimento larval não variou estatisticamente entre os tratamentos.

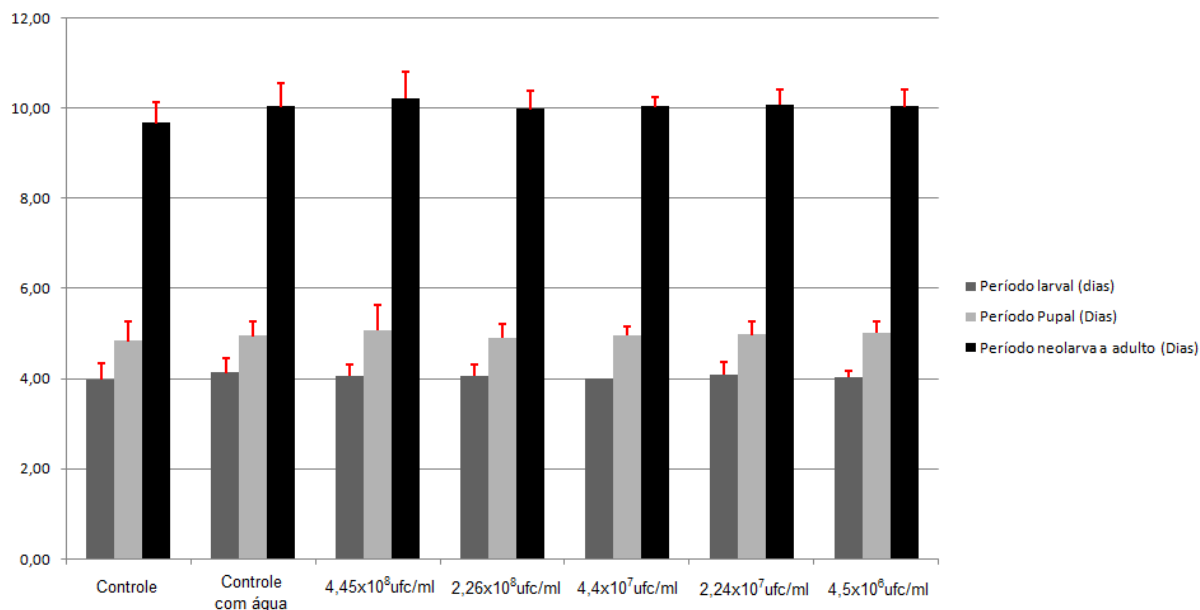


Figura 8: Período de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto (em dias) de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com a cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707 (crescimento em meio líquido NYSM). Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas. Valores de significância são representados como *P<0,05 (t-test).

Em relação ao desenvolvimento de pupa a adulto, as moscas alimentadas com a dieta misturada à maior concentração de esporos ($4,45 \times 10^8$ ufc/ml) tiveram período superior aos outros grupos, de 5,06 dias. O menor período de desenvolvimento pupal pode ser observado nas moscas do grupo controle puro, de 4,82 dias. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados.

O desenvolvimento total dos indivíduos (neolarva a adulto) foi maior para as moscas sobreviventes após ingestão da dieta misturada com a maior concentração de esporos ($4,45 \times 10^8$ ufc/ml), alcançando 10,19 dias. As larvas do grupo controle puro alcançaram desenvolvimento total mais curto, de 9,65 dias. O período de desenvolvimento total das moscas do grupo controle puro se diferenciou estatisticamente do desenvolvimento total das moscas do grupo controle com água e dos grupos das concentrações $4,45 \times 10^8$ ufc/ml, $4,4 \times 10^7$ ufc/ml, $2,24 \times 10^7$ ufc/ml e $4,5 \times 10^6$ ufc/ml.

A Figura 9 relaciona a mortalidade dos adultos recém-emergidos de *C. megacephala*, alimentados com uma mistura de solução de açúcar com suspensão

de esporos da cepa Bon 707 (grupo teste), em comparação ao grupo controle por dia de observação do experimento. Foram feitas três réplicas do experimento, cada uma contendo um grupo controle de dez indivíduos adultos e um grupo teste também com dez indivíduos.

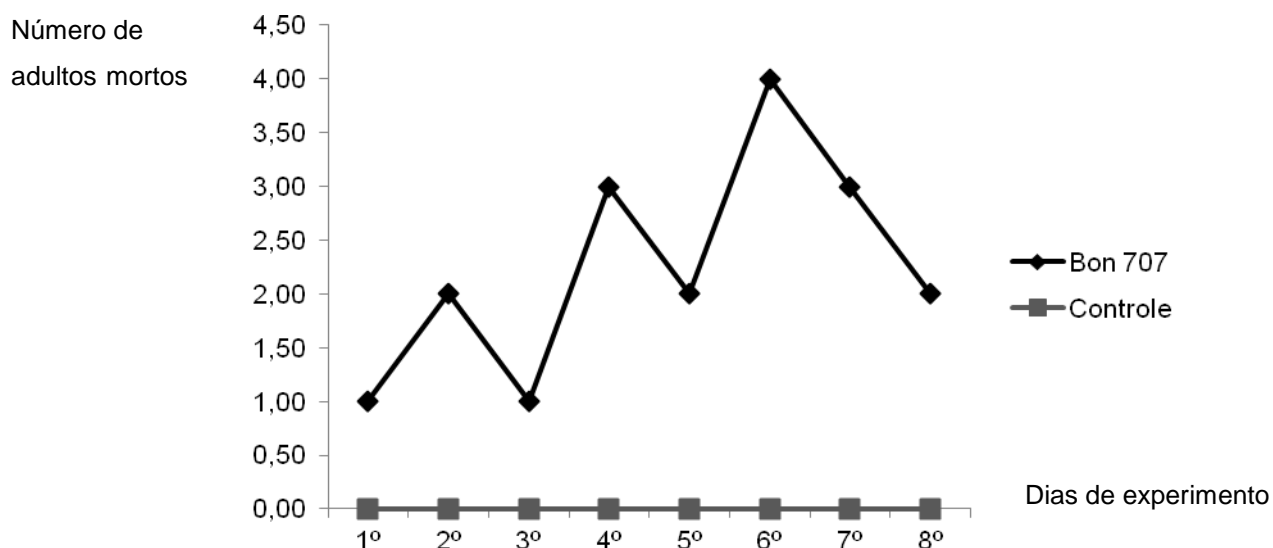


Figura 9: Mortalidade (%) de adultos de *Chrysomya megacephala* recém-emergidos por dias de tratamento com a cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707 (crescimento em meio líquido NYSM).

É possível observar a mortalidade temporal de adultos de *C. megacephala* alimentados com uma mistura de solução de açúcar (4 ml, 60% açúcar) com uma suspensão de esporos da cepa Bon 707 (4 ml, 2×10^7 ufc/ml), substituídos diariamente até o 5º dia de experimento. No grupo controle foi oferecida a mesma solução de açúcar, misturada com 4 ml de água destilada estéril. Não ocorreu mortalidade no grupo controle, enquanto no grupo teste houve mortalidade em todos os dias do experimento, totalizando 60% de mortalidade de adultos.

5.3 Bioensaio com a cepa *Brevibacillus laterosporus* Shi 3

A cepa de *B. laterosporus* Shi 3 apresentou efeito tóxico (mortalidade de 51,6%), sobre larvas de *C. megacephala*, quando testada na concentração de $1,36 \times 10^8$ esporos por grama de dieta, e após crescimento em meio sólido (Ágar nutriente).

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da mortalidade larval, pupal e total de moscas, após a ingestão de dieta larval contendo suspensão de esporos com concentrações diferentes da cepa Shi 3. Foram utilizadas 4 concentrações ($6,62 \times 10^8$ ufc/ml, $3,31 \times 10^8$ ufc/ml, $5,3 \times 10^7$ ufc/ml e $1,06 \times 10^7$ ufc/ml). Para este bioensaio, foram utilizadas cinco repetições para cada grupo, um grupo controle com água e cada um contendo 5 gramas de dieta larval misturada a 4 ml de suspensão de esporos e adicionadas dez larvas de primeiro ínstar.

Tabela 7: Mortalidade (%) larval, pupal, total e peso médio (mg) de larvas de terceiro ínstar de *Chrysomya megacephala* tratada com diferentes concentrações de esporo da cepa *Brevibacillus laterosporus* Shi 3, a partir de crescimento em meio NYSM líquido.

Tratamento	Mortalidade larval (%)	Mortalidade Pupal (%)	Mortalidade Total (%)	Peso(mg) Média±DP
Controle água	18 ^b	43 ^a	52 ^a	45,87 ± 3,47 ^b
$6,625 \times 10^8$ ufc/ml	66 ^a **	38 ^a	78 ^a	44,56 ± 5,24 ^b
$3,313 \times 10^8$ ufc/ml	40 ^{a,b}	34 ^a	62 ^a	46,42 ± 5,62 ^b
$5,3 \times 10^7$ ufc/ml	38 ^{a,b}	47 ^a	66 ^a	47,82 ± 3,57 ^{a,b}
$1,06 \times 10^7$ ufc/ml	32 ^{a,b}	31 ^a	50 ^a	49,80 ± 2,22 ^a

Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas de *C. megacephala* cada. Valores de significância são representados como *** $P < 0,001$ em relação ao controle (t-test). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram significativamente entre si e médias seguidas por letras diferentes foram significativas pelo teste de Tukey.

A maior concentração de esporos ($6,625 \times 10^8$ ufc/ml) utilizada neste bioensaio resultou em mortalidade larval de 66%, apresentando diferença estatística significativa em relação aos outros grupos teste, e em relação ao grupo controle. Todas as demais concentrações de esporos utilizadas causaram mortalidade larval superior à do grupo controle, no entanto, estas não se diferenciaram estatisticamente. A mortalidade pupal não se diferenciou entre os grupos teste e o grupo controle.

As três maiores concentrações de esporos testadas geraram mortalidade superior à mortalidade do grupo controle, com os índices 78%, 62% e 66%, comparada a 52% de mortalidade total no grupo controle, no entanto, estas não se diferenciaram estatisticamente. Entretanto, é possível perceber que a presença da cepa Shi 3 na dieta larval não interferiu na alimentação das larvas sobreviventes. De acordo com a Tabela 7, as larvas de terceiro instar do grupo controle com água alcançaram peso médio de 45,87 mg, enquanto as larvas sobreviventes da dieta contendo a maior concentração de esporos alcançaram peso médio de 44,56 mg. A Figura 10 apresenta os períodos de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto em dias (efeitos subletais) de *C. megacephala* após bioensaio com a cepa Shi 3. O desenvolvimento larval das moscas do grupo controle foi mais curto (3,76 dias) quando comparado ao período de desenvolvimento dos demais tratamentos. A suspensão contendo a segunda maior concentração de esporos ($3,313 \times 10^8$ ufc/ml) resultou no maior período de desenvolvimento larval, de 4,269 dias. As suspensões com as concentrações de esporos $6,62 \times 10^8$ ufc/ml, $5,30 \times 10^7$ ufc/ml e $1,06 \times 10^7$ ufc/ml resultaram em período larval de 4,17; 3,93 e 4,13 dias, respectivamente. No entanto, não houve diferença estatística significativa em relação ao desenvolvimento larval entre os grupos teste e o grupo controle.

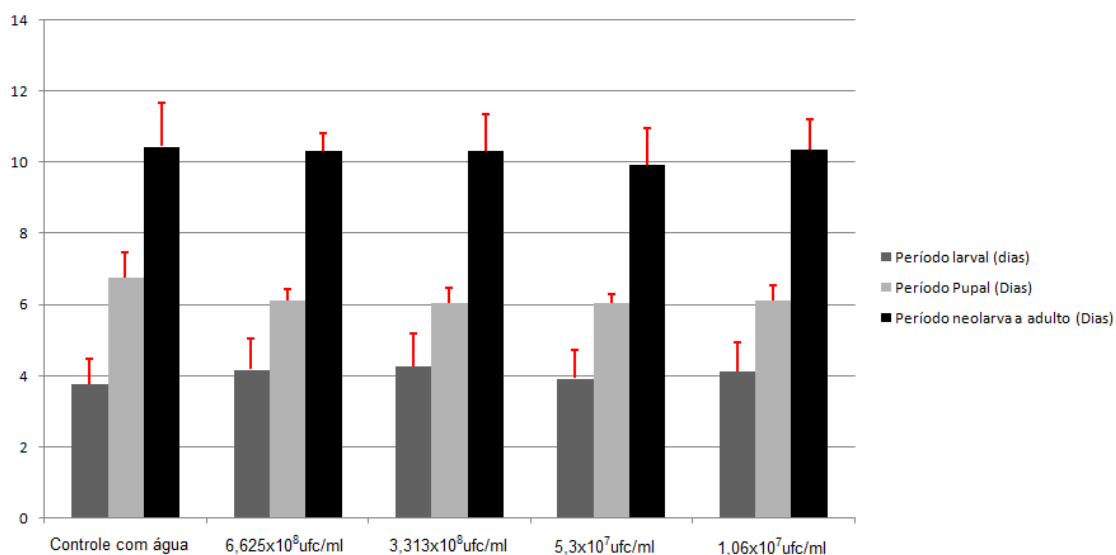


Figura 10: Período de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto (em dias) de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com a cepa *Brevibacillus laterosporus* Shi 3 (crescimento em meio líquido NYSM). Dados obtidos a partir de experimentos com cinco repetições com grupos de dez larvas. Valores de significância são representados como * $P < 0,05$ (t-test).

A figura 10 apresenta os períodos de desenvolvimento larval, pupal e neolarva a adulto em dias (efeitos subletais) de *C. megacephala* após bioensaio com a cepa Shi 3. O desenvolvimento larval das moscas do grupo controle foi mais curto (3.76 dias) quando comparado ao período de desenvolvimento dos demais tratamentos. A suspensão contendo a segunda maior concentração de esporos (3.313×10^8 ufc/ml) resultou no maior período de desenvolvimento larval, de 4,269 dias. As suspensões com as concentrações de esporos 6.62×10^8 ufc/ml, 5.30×10^7 ufc/ml e 1.06×10^7 ufc/ml resultaram em período larval de 4.17; 3.93 e 4.13 dias, respectivamente. No entanto, não houve diferença estatística significativa em relação ao desenvolvimento larval entre os grupos teste e o grupo controle.

O desenvolvimento pupal (período em dias de pupa até a emergência do adulto) das moscas sobreviventes após o bioensaio foi mais longo nas moscas do grupo controle, de 6,77 dias em média. Todas as suspensões de esporos da cepa Shi 3 resultaram em desenvolvimento larval mais longo quando comparados ao grupo controle. As suspensões, em ordem decrescente de concentração de esporos, originaram período pupal de 6,11, 6,05, 6,06 e 6,12 dias, respectivamente. As quatro concentrações de esporos analisadas resultaram em período de desenvolvimento pupal estatisticamente diferente em relação ao grupo controle. No entanto, as quatro concentrações de esporos não se diferenciaram entre si.

Novamente, as moscas do grupo controle tiveram tempo de desenvolvimento total (neolarva a adulto) mais longo quando comparadas às moscas dos demais grupos teste (submetidas a suspensões diferentes de esporos da cepa Shi 3). O tempo total de desenvolvimento das moscas do grupo controle foi de 10,45 dias, enquanto o tempo de desenvolvimento das moscas submetidas à ingestão de esporos, em ordem decrescente de concentração, foi de 10,33, 10,31, 9,94 e 10,36 dias, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

A fim de se compreender uma possível interferência da microbiota cultivável presente na carne que era oferecida aos insetos, foram feitos isolamentos de cepas e identificação bacteriana, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Identificação das cepas bacterianas cultiváveis isoladas da dieta larval utilizada nos bioensaios com as diferentes cepas de *Brevibacillus laterosporus*.

Bioensaios	Identificação das cepas isoladas da dieta larval
Bioensaio com a cepa IGM 16-92	<i>Myroides</i> sp <i>Lysinibacillus</i> sp <i>Serratia</i> sp <i>Citrobacter</i> sp
Bioensaio com a cepa Bon 707	<i>Buttiauxella</i> sp <i>Klebsiella</i> sp <i>Enterobacter hormaechei</i>

A Tabela 8 evidencia os resultados referentes à identificação das cepas bacterianas cultiváveis, isoladas a partir da dieta larval composta de carne bovina moída putrefata. Em paralelo à realização dos bioensaios com as cepas de *B. laterosporus* IGM 16-92 e Bon 707, 1 mg da mesma carne utilizada no experimento foi adicionada em salina e misturada com auxílio de agitador vórtex.

A partir da dieta larval utilizada para bioensaio com a cepa IGM 16-92, foram isoladas colônias, posteriormente identificadas como pertencentes aos gêneros bacterianos *Myroides* sp, *Lysinibacillus* sp, *Serratia* sp e *Citrobacter* sp. No experimento com a cepa Bon 707, foram isoladas e identificadas cepas pertencentes aos gêneros *Buttiauxella* sp, *Klebsiella* sp e a espécie *Enterobacter hormaechei* (Tabela 8).

5.4 Cortes ultrafinos do intestino médio posterior de larvas de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* analisados através de microscopia eletrônica de transmissão

As Figuras 11, 12 e 13 mostram cortes ultrafinos da porção posterior do intestino médio de larvas de *C. megacephala* analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Na Figura 11 é possível observar a estrutura intestinal das larvas do grupo controle, enquanto que nas Figuras 12 e 13 estão representados cortes do intestino médio posterior de larvas após bioensaio com as cepas Bon 707 e IGM 16-92, respectivamente.

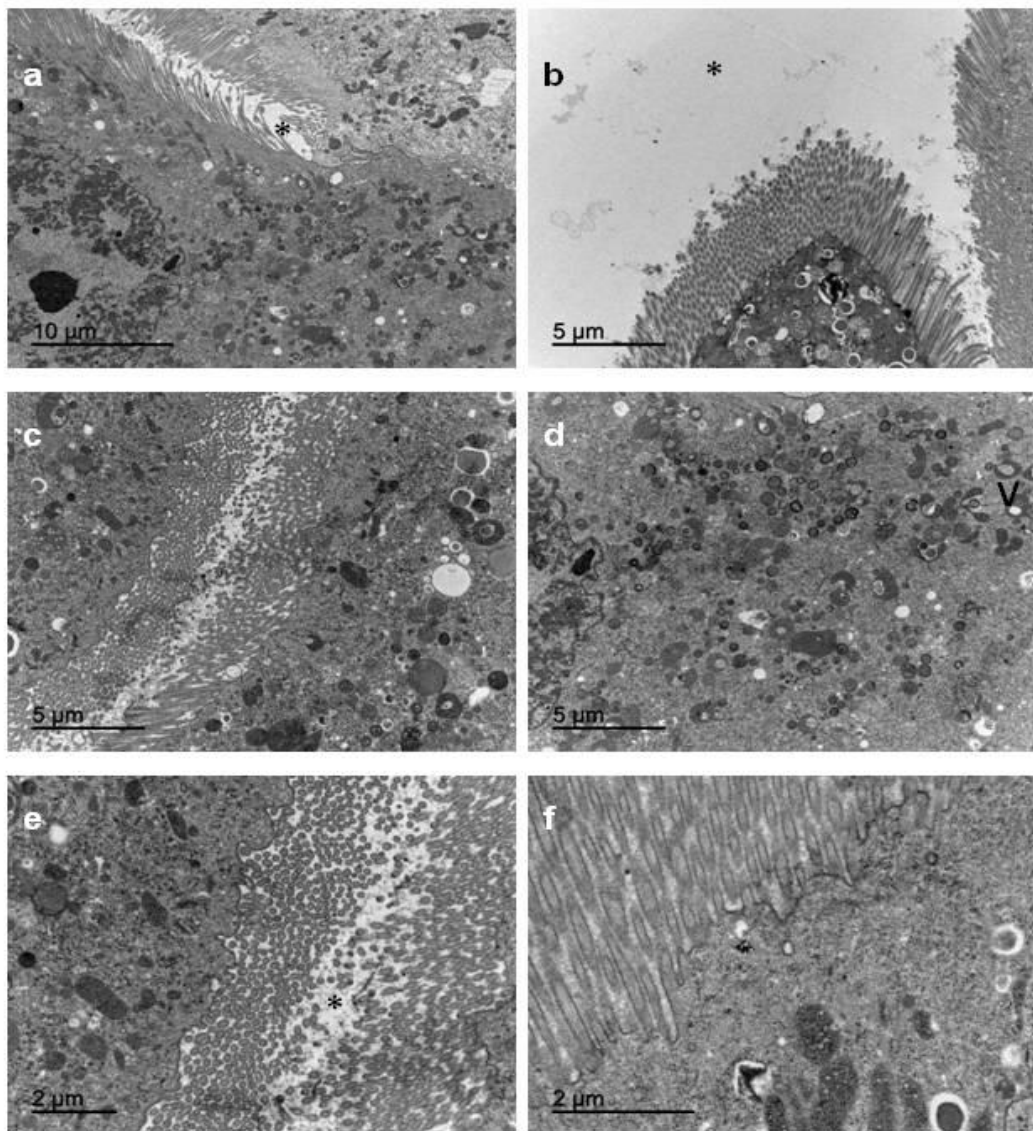


Figura 11: Cortes ultrafinos da porção posterior do intestino médio de larvas de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* do grupo controle. **a** Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Aumento de 5.000 vezes. **b** Extremidade da vilosidade do intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Aumento de 8.000 vezes. **c** Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Aumento de 8.000 vezes. **d** Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Camada de tecido epitelial abaixo das vilosidades. Aumento de 8.000 vezes. **e** Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Microvilosidades íntegras. Aumento de 15.000 vezes. **f** Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *C. megacephala* do grupo controle. Borda do epitélio intestinal e vilosidades. Aumento de 25.000 vezes. * Lúmen Intestinal. V vacúolos digestivos.

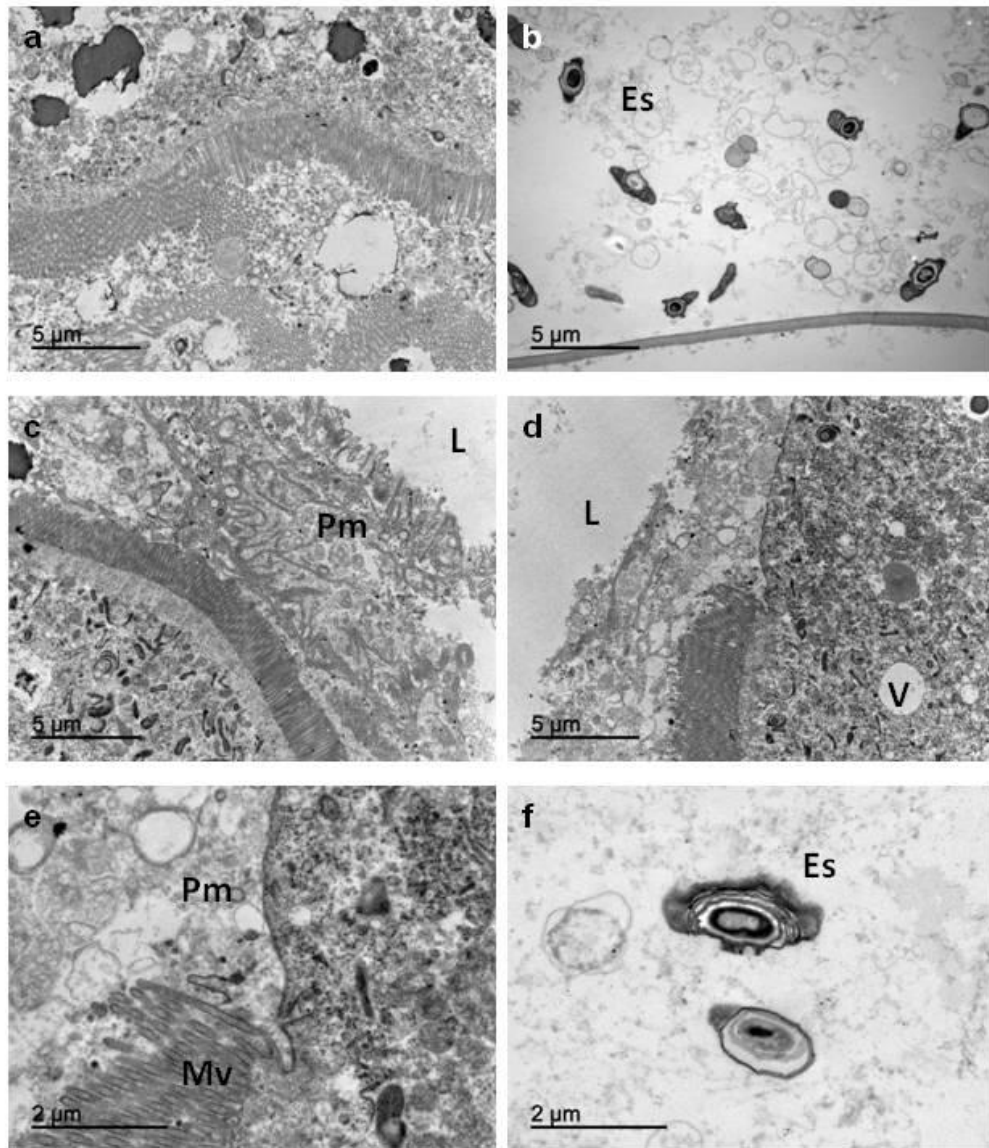


Figura 12: Intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com suspensão de esporos da cepa *Brevibacillus laterosporus* Bon 707. **a** Rompimento das vilosidades intestinais, vacuolização e deformidades do tecido epitelial. Aumento de 8.000 vezes. **b** Esporos da cepa Bon 707 em camada de tecido epitelial de *C. megacephala*. Aumento de 8.000 vezes. **c** Perfis de membrana liberados para o meio extracelular. Aumento de 8.000 vezes. **d** Região de descontinuidade de borda. Aumento de 8.000 vezes. **e** Intestino médio posterior de larva de *C. megacephala* após bioensaio com suspensão de esporos da cepa Bon 707. Região de descontinuidade de borda. Aumento de 25.000 vezes. **f** Esporos da cepa Bon 707 no epitélio intestinal de larvas de terceiro instar de *C. megacephala*. Aumento de 25.000 vezes. **L** lúmen intestinal, **V** vacúolos, **Es** esporos, **Pm** perfis de membrana e **Mv** microvilosidades.

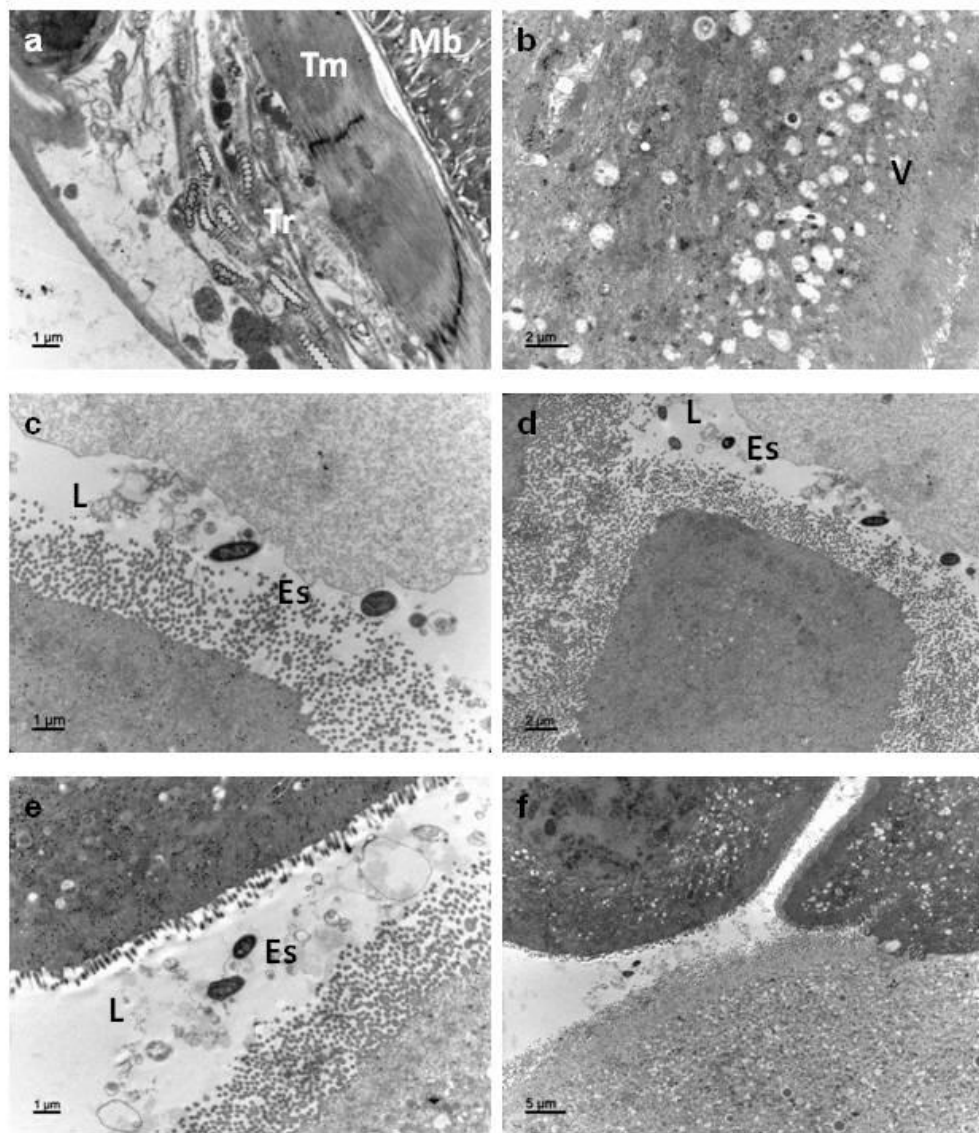


Figura 13: Cortes do intestino médio posterior de larva de terceiro instar de *Chrysomya megacephala* após bioensaio com suspensão de esporos da cepa IGM *Brevibacillus laterosporus* 16-92. **a** Base do epitélio intestinal, **Tr** traqueia, **Tm** tecido muscular e **Mb** membrana basal sem modificações. **b** Vacuolização da camada de tecido epitelial abaixo das microvilosidades, **V** vacúolos. **c** Presença de esporos (**Es**) da cepa IGM 16-92 no lúmen (**L**) intestinal entre uma célula com a microvilosidade intacta e outra destruída. **d** Presença de esporos (**Es**) da cepa IGM 16-92 no lúmen (**L**) intestinal entre uma célula com a microvilosidade intacta e outra danificada. **e** Presença de esporos (**Es**) da cepa IGM 16-92 no lúmen (**L**) intestinal entre uma célula com a microvilosidade intacta e outra destruída. **f** Esporos da cepa Bon IGM 16-92 no lúmen intestinal de larvas de terceiro instar de *C. megacephala*.

6 Discussão

Chrysomya megacephala alcança altas densidades populacionais em centros urbanos e é uma espécie fortemente atraída por lixões a céu aberto e locais com carnes e peixes expostos que servem como criadouros, causando seu aumento populacional (Guimarães et al. 1978; Braack 1991; Dias et al. 2009). Este cenário é particularmente preocupante no Brasil, pois as condições sanitárias são escassas em algumas localidades, inclusive em grandes cidades. De acordo com Ferreira e Lacerda (1993), *C. megacephala* é frequentemente encontrada em aterros sanitários, feiras-livres, mercados e caçambas coletoras de lixo em Goiânia.

C. megacephala foi a espécie mais coletada nas regiões urbana e rural do município de Vassouras no Rio de Janeiro, apresentando grande capacidade de dispersão e adaptação nos dois ambientes estudados (Macedo et al. 2011). Estes dados confirmam que se trata de um inseto sinantrópico e de ampla distribuição. Além disso, *C. megacephala* pode ser considerada uma espécie r-estrategista, de hábito alimentar generalista, podendo se adaptar em variados ambientes, desde fragmentos de mata até ambientes modificados pelo homem (Prado e Guimarães 1982; Dias et al. 2009, Macedo et al. 2011).

As medidas drásticas utilizadas para erradicação da espécie causadora de miíase *C. hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), na América do Norte, através da liberação de machos estéreis, foram extremamente caras e possivelmente causaram impactos ecológicos negativos (Moya-Borja 2003). Dessa forma, a implementação de tais medidas não seria considerada viável ou prática no Brasil. De maneira alternativa, estudos com foco no manejo integrado de pragas devem ser incentivados, incluindo novos métodos de controle biológico.

A importância do presente estudo consistiu em avaliar o efeito de diferentes cepas de *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* contra larvas de *C. megacephala*, pré-requisito necessário para demonstrar o potencial uso dessas bactérias como possíveis agentes de controle biológico. Inicialmente, foram feitos testes preliminares, utilizando apenas suspensões com uma concentração de esporos de cada cepa, para avaliação do possível efeito tóxico de cada uma destas (Tabela 3).

O painel de cepas utilizadas neste trabalho exibiu níveis de toxicidade altamente variáveis (Tabela 3), demonstrando possíveis e diferentes mecanismos patogênicos de ação contra a mesma espécie alvo. Verificou-se que apenas cinco cepas de *B. laterosporus* e uma cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Carramaschi et al. *in press*). Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Oliveira et al. (2004).

Todos os bioensaios preliminares foram realizados com larvas de primeiro instar, uma vez que já foi relatado que nesta fase de desenvolvimento a suscetibilidade a agentes bacterianos de controle biológico é superior, à medida que ocorre maior ingestão de alimento misturado ao entomopatógeno e por um período maior de tempo (Ruiu 2013).

As três cepas de *B. laterosporus* que exibiram maior efeito inseticida no presente estudo (IGM 16-92, Bon 707 e Shi 3) exibiram toxicidade baixa ou nula contra larvas de *A. aegypti*, *C. quiquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae), *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) (Oliveira et al. 2004). Fato semelhante foi relatado por Ruiu et al. (2007b) em que uma cepa de *B. laterosporus* com elevado efeito inseticida não exibiu o mesmo efeito contra a espécie *M. raptor* Girault & Sanders (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoide natural de *M. domestica*.

De acordo com a perspectiva do controle biológico de insetos vetores, a especificidade ao inseto alvo e o estreito espectro de ação de cepas larvicidas, identificadas no presente estudo, são extremamente importantes. De acordo com Brodeur (2012), a especificidade no controle biológico é importante para não afetar as espécies não alvo.

Não há relatos na literatura científica sobre o uso de cepas de *B. laterosporus* como agente de controle biológico de *Chrysomya* spp. No entanto, a atividade entomopatogênica de *B. thuringiensis* contra larvas de moscas deste gênero já foi previamente relatada (Cavados et al. 1998; Oliveira et al. 2006). De acordo com estes autores, os elevados níveis de mortalidade ocasionados pela cepa LFB-FIOCRUZ 907 ocorreram em função da germinação dos esporos na hemolinfa das larvas de *C. megacephala* e *C. putoria*.

Johnson et al. (1998) relataram a susceptibilidade de três espécies de moscas, *M. domestica*, *C. albiceps* e *L. cuprina*, a diferentes cepas de *B. thuringiensis* produtoras de toxinas Cry IB. Os autores concluíram que a toxicidade de δ -endotoxinas aumentou após a adição de esporos e este efeito foi mais evidente em larvas de *C. albiceps*. Além disso, a toxicidade foi mais elevada após a ativação proteolítica de toxinas com tripsina. No presente estudo, três cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foram utilizadas, no entanto, apenas uma delas (LFB 913) causou mortalidade larval significativa (38,55%) na concentração de $8,88 \times 10^7$ UFC/g de dieta, mas tal mortalidade foi inferior a 50%.

Nesse contexto, as cepas IGM 16-92 e Shi 3 são produtoras de cristal, mas a presença deste não deve ser analisada como único fator responsável pela toxicidade. Outras cepas não cristalogênicas, como Bon 707, NRS 1648 e Shi 2 também foram efetivas contra larvas de *C. megacephala* (Tabela 3). Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para elucidar a(s) causa(s) da mortalidade ocasionada por *B. laterosporus* em moscas varejeiras.

Nos bioensaios preliminares, foi oferecida às larvas suspensão inicial de esporos. No entanto, não foram realizados experimentos complementares para avaliar se os esporos germinaram na dieta larval, produzindo células vegetativas, o que poderia contribuir para a ação inseticida. Similarmente, não foi analisado se os esporos germinaram na hemolinfa ou no trato digestivo das larvas. Conforme já discutido, os mecanismos tóxicos de ação de *B. laterosporus* são complexos e multifatoriais. Os estudos de todas as variáveis mencionadas e sua influência na toxicidade de cada cepa seriam laboriosos e altamente custosos.

Nesse sentido, de acordo com a Tabela 3, foi possível selecionar três cepas de *B. laterosporus* para dar continuidade aos bioensaios. As cepas Bon 707, IGM 16-92 e Shi3 foram selecionadas, pois causaram taxas de mortalidade significativas em larvas de *C. megacephala*, em comparação ao grupo controle, e superiores a 50%.

No presente estudo, todas as cepas utilizadas nos testes preliminares cresceram em meio de cultura sólido (Ágar Nutriente). Dessa forma, as suspensões de esporos provavelmente continham todas as proteínas ou outras moléculas secretadas pela bactéria durante as primeiras 72 horas de crescimento, até a

esporulação. De acordo com a Tabela 3, a cepa IGM 16-92 causou 64,5% de mortalidade corrigida em larvas de *C. megacephala*, resultado significativo. No entanto, a análise do efeito tóxico da mesma cepa após crescimento em meio líquido NYSM resultou em baixa mortalidade larval (Tabela 4).

A diferença de mortalidade larval ocorrida nos dois bioensaios com a cepa IGM 16-92 pode ser compreendida em função do método de crescimento utilizado. O crescimento bacteriano em meio sólido é inteiramente retirado com auxílio de alça bacteriológica descartável e transferido para tubo de ensaio com água destilada. Já o crescimento em meio líquido foi centrifugado a 11.000 rpm e, possivelmente, moléculas de baixo peso molecular secretadas pela cepa IGM 16-92 durante seu crescimento, e importantes para sua ação patogênica, tenham sido descartadas juntamente com o sobrenadante. De acordo com Zubasheva et al. (2010), a cepa IGM 16-92 forma cristais pequenos, medindo 0,4x 0,3 µm e a análise do conteúdo proteico de cristais purificados revelou a presença de um peptídeo maior, com peso molecular de 68 kDa.

As suspensões de esporos da cepa IGM 16-92 não se diferenciaram estatisticamente em relação aos parâmetros subletais avaliados, como média de peso das larvas sobreviventes de terceiro instar e os períodos de desenvolvimento pós-embrionário (Tabela 4 e Figura 7). No entanto, os testes estatísticos diferenciaram apenas os resultados do grupo controle puro em comparação aos grupos controle com água e aos grupos teste.

Zubasheva et al. (2010) estudaram as características de quatro cepas produtoras de cristais de *B. laterosporus*, como: morfologia, influência dos fatores de cultivo no crescimento, formação de esporos, cristais e toxicidade contra mosquitos. A cepa LAT 006, após crescimento em meio de cultura menos rico, demonstrou menor produção de esporos e cristais, porém resultou no mesmo nível de toxicidade contra *A. stephensi*. Este resultado sugere que outros fatores podem estar envolvidos na toxicidade, tais como toxinas solúveis, bacteriocinas e proteases. Após centrifugação, a patogenicidade permaneceu associada à cultura líquida e ao precipitado, e não ao sobrenadante (Zubasheva et al. 2010).

É interessante perceber que apenas as larvas do grupo controle puro (dieta à base de carne bovina pura, sem adição do diluente) alcançaram peso superior aos

outros grupos. As larvas deste grupo apresentaram peso médio superior e significativo em relação às larvas do grupo controle com água e em relação às larvas tratadas com as concentrações de esporos (Tabela 4). Neste caso, parece que a presença da água na dieta dificulta a alimentação larval, em função da mudança da consistência da carne, gerando larvas com peso menor. Mesmo assim, as repetições com concentrações de esporos de 1×10^9 ufc/ml e 1×10^8 ufc/ml da cepa IGM 16-92 originaram as larvas com menor peso médio (Tabela 4).

Deve-se ressaltar que, as neolarvas utilizadas neste experimento foram obtidas de posturas retiradas de gaiolas contendo moscas criadas em laboratório (terceira geração) misturadas com moscas selvagens (primeira geração) coletadas no lixo. A mistura de moscas adultas selvagens à colônia de criação é importante, para aumentar a variabilidade genética dos adultos presentes na gaiola; no entanto, tal prática pode ter influenciado o resultado do experimento, uma vez que podem ter sido introduzidas moscas mais resistentes à colônia.

Os resultados indicam que a presença de água na dieta larval (4 ml diluídos em 5 g de carne) altera a consistência da mesma, podendo influenciar no período de desenvolvimento pós-embriônico das larvas, tornando-o mais longo. Além disso, as larvas do grupo controle puro alcançaram peso médio superior em relação aos demais grupos, corroborando a ideia de que a consistência da dieta influencia na quantidade de alimento ingerido pelas larvas (Figura 7).

O bioensaio com a cepa Bon 707, a partir de crescimento em meio líquido, foi inicialmente realizado de acordo com a metodologia de Ruiu et al. (2006) como citado anteriormente. De acordo com a Tabela 5, a suspensão contendo 1×10^8 ufc/ml gerou 87% de mortalidade larval e 90% de mortalidade total, enquanto a suspensão de 5×10^7 ufc/ml gerou 89% e 95% de mortalidade larval e total, respectivamente. Apesar de os resultados terem sido significativos em relação ao grupo controle com água, o grupo controle puro também apresentou mortalidades extremamente altas, invalidando o experimento (Tabela 5).

A alta mortalidade encontrada nos grupos controle (Tabela 5) pode ser decorrente de diferenças entre as larvas utilizadas no experimento, já que as mesmas são selecionadas ao acaso em placas de Petri contendo a ovipostura das colônias de laboratório e podem ter sido provenientes de diferentes gaiolas

presentes no laboratório. Além disso, a dieta contendo apenas carne pura tem tendência a rressacar, o que pode causar mortalidade de larvas.

A média de peso larval não variou estatisticamente entre os grupos teste (Tabela 5). Entretanto, podemos observar uma média de peso (em mg) mais baixa nas larvas sobreviventes após bioensaio com as três concentrações, em relação aos controles. De acordo com Von Zuben (1998), as larvas de terceiro ínstar de *C. megacephala* necessitam alcançar um peso mínimo de 30,5 mg, no caso de machos, e de 32 mg, no caso de fêmeas, em condições experimentais de laboratório, para se tornarem adultos viáveis. As suspensões da cepa Bon 707 geraram uma média de peso inferior a esses valores, mostrando que a presença da bactéria na dieta prejudica a alimentação das larvas.

De acordo com a Tabela 6, no segundo bioensaio com a cepa Bon 707, curiosamente, a maior mortalidade larval ocorreu com a suspensão de terceira maior concentração de esporos ($4,4 \times 10^7$ ufc/ml). A suspensão mais concentrada de esporos ($4,45 \times 10^8$ ufc/ml) influenciou no peso das larvas sobreviventes de terceiro ínstar, pois gerou média de peso inferior ao grupo controle e com diferença estatisticamente significativa.

Esses resultados são referentes ao bioensaio utilizando biomassa de esporos obtida a partir de crescimento em meio líquido NYSM. O bioensaio com suspensão de esporos da mesma cepa, obtida, porém, a partir de crescimento em meio sólido, gerou elevada mortalidade larval, total e grande redução no peso médio das larvas sobreviventes de terceiro ínstar. Além disso, a suspensão utilizada continha menor concentração de esporos (Tabela 6).

As moscas utilizadas nos dois bioensaios mostrados na Tabela 6 foram provenientes da quinta geração de moscas (Geração F5) da criação do laboratório. Estas moscas correspondiam a uma geração “mais velha” do que aquelas utilizadas no experimento com a cepa IGM 16-92 e, provavelmente, eram mais bem adaptadas às condições de laboratório.

De forma semelhante aos resultados da cepa IGM 16-92, a cepa Bon 707 apresentou maior taxa de mortalidade quando utilizada após crescimento em meio sólido (Ágar Nutriente), do que após crescimento em meio líquido NYSM. De acordo

com Orlova et al. (1998), a análise por microscopia óptica e eletrônica revelou que a cepa *B. laterosporus* 615 produz mais inclusões cristalinas quando semeada em Agar Nickerson do que quando inoculada em caldo Nickerson. No entanto, apenas a cepa IGM 16-92 produz inclusões cristalinas, enquanto a cepa Bon 707 não.

Em relação ao desenvolvimento pós-embriônico de *C. megacephala*, não houve efeito significativo causado pela ingestão da bactéria (Figura 4). Apenas as larvas do grupo controle puro e do grupo teste de concentração $2,26 \times 10^8$ ufc/ml apresentaram desenvolvimento total (neolarva a adulto) mais curto, quando comparadas aos demais grupos.

A cepa Shi 3, após crescimento em meio líquido NYSM, causou mortalidade larval significativa em comparação ao grupo controle com água (Tabela 7). Todas as demais suspensões de esporos causaram taxas de mortalidade larval superiores ao grupo controle com água. Neste bioensaio, foi possível observar relação proporcional entre aumento da concentração de esporos de *B. laterosporus* e aumento das taxas de mortalidade, conforme já relatado por Zimmer et al. (2013), utilizando outra cepa de *B. laterosporus* no controle de *M. domestica*.

Em relação aos efeitos subletais da cepa Shi 3 (Figura 10), apenas o período pupal (período de pupa a adulto) sofreu alteração em função da ingestão da dieta misturada aos esporos. Todas as concentrações de esporos da cepa Shi 3 causaram redução do período pupal em relação ao grupo controle com água (Figura 10). No entanto, o período de desenvolvimento total (neolarva a adulto) não sofreu influência da ação da bactéria.

Ruiu et al. (2006) determinaram o valor de CL_{50} de $0,72 \times 10^8$ esporos por grama de dieta em larvas de primeiro instar de *M. domestica* e concluíram que larvas mais jovens são mais suscetíveis às suspensões de esporos de *B. laterosporus*. Zimmer et al. (2013) demonstraram que a mortalidade das larvas causada por outra cepa de *B. laterosporus* foi proporcional ao aumento da concentração de esporos bacterianos, atingindo 53% de mortalidade larval com suspensão de 1×10^9 UFC/mL. No presente estudo, pode ser observado que não ocorreu essa proporcionalidade em todos os bioensaios realizados.

Os mesmos autores enfatizaram que as cepas testadas causaram efeitos subletais aos insetos, resultando em tempo de desenvolvimento larval mais longo, redução no peso final dos adultos (Zimmer et al. 2013), redução no peso de pupas, diminuição da taxa de emergência dos adultos, redução da longevidade e da fecundidade (Ruiu et al. 2006). É importante destacar que ambos os estudos foram realizados com diferentes cepas e diferentes espécies-alvo de moscas. Além disso, nesses estudos foi oferecido meio artificial às larvas para realização dos experimentos, enquanto nosso estudo foi conduzido com dieta natural, que consistiu em carne bovina moída putrefata.

Em geral, cepas patogênicas de *B. lateroporus* possuem distintos mecanismos de ação contra o inseto-alvo, como contato tópico ou por meio de ingestão. Além disso, a toxicidade pode ser devido a proteínas ou inclusões produzidas e secretadas pelas cepas em diferentes fases de crescimento das bactérias, desde a célula vegetativa até os esporos, mas muito ainda permanece desconhecido (Ruiu 2013). Mais estudos são importantes para se entender a relação dos organismos-alvo com os mecanismos patogênicos envolvidos. Vários fatores podem ter influenciado este estudo, tais como os microrganismos presentes na dieta larval e as diferenças genéticas entre as cepas utilizadas.

A dieta utilizada para manutenção desses dípteros em laboratório, assim como a dieta utilizada nos bioensaios, foi composta de carne bovina moída putrefata. De forma a garantir a padronização do estágio de putrefação da dieta oferecida às larvas nos experimentos, o substrato foi mantido congelado em “freezer” a -80C e deixados durante 48 horas em temperatura ambiente, antes dos bioensaios.

Apesar da dieta natural (carne bovina moída putrefata), após dois ou três dias de uso, apresentar mau cheiro, liberação de substâncias que atraem outros insetos e gerar contaminação (Barbosa et al. 2004), sua manutenção nos experimentos ocorreu com o objetivo de reprodução, da melhor maneira possível, dos substratos naturais de criação das larvas destes dípteros no ambiente. Além disso, o uso da dieta natural minimiza as variáveis em relação à mortalidade natural e ao período em dias de desenvolvimento pós-embrionário desses insetos que possuem hábitos necrófagos.

Muitos estudos já foram realizados avaliando dietas alternativas para a criação de imaturos de *C. megacephala* em laboratório. Sousa et al. (2010) analisaram o desenvolvimento pós-embrionário desse díptero utilizando dieta alternativa à base de fígado de frango comparada à dieta composta de carne bovina. Foi constatado que a sobrevivência dos estágios larvais e de neolarvas a adulto diferiram significativamente e foram superiores quando utilizaram a dieta natural. Em outros estudos, os autores concluíram que a dieta baseada em carne bovina foi mais eficiente do que as dietas artificiais, em relação a parâmetros como peso larval, período de desenvolvimento pós-embrionário e emergência de adultos (D'Almeida e Oliveira 2002; Mendonça e d'Almeida 2004; Mendonça et al. 2009).

De acordo com Greenberg (1973), larvas de mosca varejeira podem se desenvolver igualmente bem em carne livre de micróbios ou contaminada, enquanto larvas de mosca doméstica rapidamente morrem, se criadas em meios livres de microrganismos. Tais microrganismos oferecem nutrientes essenciais ao desenvolvimento das larvas. Segundo o mesmo autor, não era claro se, em meio natural, como, por exemplo, fezes ou material vegetal em decomposição, larvas de mosca doméstica subsistem em grande parte devido à microflora, aos nutrientes que estes microrganismos produzem ou em função dos produtos de decomposição do meio. No entanto, suspeitava-se de que os três fatores eram igualmente importantes para o desenvolvimento larval.

Torna-se cada vez mais claro que a maioria dos animais necessita de associações com microrganismos para alcançar desenvolvimento e nutrição adequados, e o mesmo ocorre com larvas de moscas. As bactérias são fundamentais na matéria em decomposição, pois secretam enzimas importantes para a degradação dos tecidos, células, matriz e, assim, liberam nutrientes que serão consumidos pelas larvas (Thompson et al. 2013). No entanto, pouco se sabe sobre tais relações.

Bactérias pertencentes aos gêneros *Proteus*, *Provincia*, *Escherichia*, *Ochrabactrum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, e *Morganella* já foram isoladas de moscas necrófagas e de várias fontes alimentares (Greenberg 1968, 1969; Förster et al. 2007; Dharne et al. 2008).

No presente estudo, cepas dos gêneros *Myroides* sp, *Lysinibacillus* sp, *Serratia* sp e *Citrobacter* sp foram isoladas da dieta larval utilizada no bioensaio com a cepa IGM 16-92. De acordo com Dharne et al. (2008), isolado de *Myroides* sp. do intestino de moscas do gênero *Sarcophaga* sp (Diptera: Sarcophagidae) exibiu atividade antibacteriana contra outros isolados intestinais da mosca, como *Serratia* sp e *Bacillus* sp. Possivelmente *Myroides* sp exerce ação protetora em moscas contra microrganismos patogênicos, o que pode ter influenciado o resultado do bioensaio com a cepa IGM 16-92.

No experimento realizado com a cepa Bon 707, foram isoladas e identificadas cepas pertencentes aos gêneros *Buttiauxella* sp, *Klebsiella* sp e *Enterobacter hormaechei* (Tabela 8). Estudo de Ahmad (2006) demonstrou que quatro espécies de bactéria influenciam o desenvolvimento da mosca *C. macellaria*. *Provincia* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Enterococcus faecalis*, *Ochrobactrum* SP, quando inoculadas em placas de Agar sangue para criação das larvas, causaram diminuição no tempo de desenvolvimento e redução das taxas de sobrevivência das moscas (Ahmad 2006).

A toxicidade de cepas de *B. laterosporus* já foi relacionada a proteínas associadas ao esporo, a toxinas binárias produzidas por células vegetativas ou devido a proteínas cristais inseticidas presentes no corpo para esporal. No entanto, tais mecanismos de ação ainda não foram totalmente compreendidos (Ruiu 2013). A cepa de *B. laterosporus* UNISS 18 já teve seu mecanismo de ação comparado ao mecanismo de ação de *B. thuringiensis*, causando deterioração do epitélio intestinal das larvas (Ruiu et al. 2012).

Assim como em outros animais, o canal alimentar em artrópodes é formado por órgãos vitais importantes para as principais funções fisiológicas, como digestão e absorção de nutrientes, regulação do pH e da composição iônica da hemolinfa, detoxificação e produção de compostos semioquímicos como feromônios (Boonsriwong et al. 2006). Para esses pesquisadores, o canal alimentar de larvas de terceiro instar de *C. megacephala* é um sistema longo e tubular, dividido em intestino anterior (“foregut”), intestino médio (“midgut”) e intestino posterior (“hindgut”). O intestino médio é a porção mais longa do trato digestivo, sendo dividido em porção anterior, mediana e posterior.

O intestino médio de larva de *C. megacephala* tem início onde se inserem quatro longos cecos gástricos em formato tubular. A cavidade interna do intestino médio anterior é revestida por uma camada de membrana peritrófica e por uma única camada de células epiteliais cuboides contendo elevado número de grânulos secretórios, de tamanho variável (Boonsriwong et al. 2006). A porção mediana do intestino médio é mais dilatada e apresenta internamente a mesma estrutura do intestino médio anterior. Além disso, esta região contém células de gordura entre as células epiteliais. Estas células epiteliais possuem longas microvilosidades que cobrem suas superfícies apicais, importantes para a secreção e a absorção (Boonsriwong et al. 2006).

De acordo com Taha et al. (2010), o intestino médio de *C. megacephala* é formado por células colunares que possuem microvilosidades, esferas de lipídios, diversos grânulos secretórios, vesículas lisossomiais grandes e vesículas do retículo endoplasmático rugoso envoltas por inúmeras mitocôndrias.

No presente estudo, foi analisada a região posterior do intestino médio de larvas de terceiro instar de *C. megacephala*. Esta região se localiza após a região mediana dilatada do intestino médio e anterior à inserção dos quatro túbulos de Malpighi, conforme ilustrado na Figura 5 (Ruiu et al. 2012).

A figura 11 mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos da porção posterior do intestino médio de larvas de terceiro instar do grupo controle. É possível perceber a presença de células epiteliais contendo grânulos, vacúolos digestivos, diversas organelas, tecido epitelial bem preservado e espessa camada de microvilosidades, conforme já demonstrado em trabalhos anteriores (Boonsriwong et al. 2006; Taha et al. 2010).

Na Figura 12 é possível perceber alterações no intestino médio ocasionadas pela ingestão dos esporos da cepa Bon 707, quando comparamos com as imagens obtidas do grupo controle (Figura 11). Tais alterações consistem em vacuolização do interior do tecido, desorganização da membrana peritrófica, interrupção da camada de microvilosidades e perfis de membrana liberados para o meio extracelular. Além disso, foi possível identificar com clareza a presença de esporos no lúmen e epitélio intestinal (Figura 12).

A Figura 13 mostra as imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos cortes ultrafinos da porção posterior do intestino médio de *C. megacephala*, após bioensaio com a cepa IGM 16-92. É possível observar que não houve desorganização da base do epitélio, onde estão localizadas a musculatura, as traqueias e a membrana basal, porém há a formação de vacúolos próximos à região apical do tecido. Além disso, há a presença de alguns esporos da cepa IGM 16-92 no lúmen intestinal, entre células com as microvilosidades intactas e outras aparentemente destruídas (Figura 13).

Ruiu et al. (2012) relataram que 12 horas após ingestão de esporos da cepa de *B. laterosporus* UNISS 18, o epitélio intestinal de *M. domestica* começou a apresentar alterações, como vacuolização e a presença de esporos no lúmen intestinal. Após 24 horas da ingestão, ocorreu ruptura, dano das microvilosidades e redução no número de ribossomos no citoplasma.

Por fim, após 48 horas, o processo tornou-se mais eficiente e algumas células se romperam liberando seu conteúdo citoplasmático no lúmen intestinal (Ruiu et al. 2012). Os autores também observaram que as células afetadas estavam sempre próximas à células aparentemente não afetadas. A região basal das células afetadas foram observadas desestruturadas. De acordo com Ruiu et al. (2012), as análises ultraestruturais indicam claramente que o epitélio intestinal é o local de ação de *B. laterosporus*. Além disso, as visíveis alterações histopatológicas no epitélio e a presença de esporos no espaço endoperitrófico, apoiam a hipótese de um processo mediado por toxinas.

Cepas de *B. laterosporus* já foram descritas como produtoras de toxinas solúveis, termo lábeis, presentes no sobrenadante de culturas e que causam a formação de poros em células alvo (WAS e MIS) (Schnepf et al. 2003) e também de toxinas inseticidas secretadas de ação sinérgica ISP1A e ISP2A (Boets et al. 2004), com atividade contra Coleoptera. Outras cepas podem apresentar como mecanismo de ação a produção de cristais mosquitocidas semelhantes aos de *B. thuringiensis* (Orlova et al. 1998). Outro estudo sugeriu a presença das toxinas inseticidas na superfície do esporo ou do corpo paraesporal, em cepa não produtora de cristal (Ruiu et al. 2007a).

Estudos prévios publicados pelo nosso grupo demonstraram com clareza o potencial inseticida de *B. laterosporus* contra diferentes ordens de insetos (Oliveira et al. 2004), incluindo a espécie de mosca varejeira *L. cuprina* (Pessanha et al. 2015). Além disso, a ação de *B. laterosporus* sobre *M. domestica* já está bem documentada (Zimmer et al. 2013; Ruiu 2013). Em comum com outros alvos invertebrados, as taxas de mortalidade larval foram variáveis, porém significantes, dependendo especificamente da cepa bacteriana utilizada. Dessa forma, o presente estudo mostra que determinadas cepas de *B. laterosporus* possuem potencial ação inseticida contra larvas de *C. megacephala*, podendo constituir uma das possíveis estratégias de controle desse díptero de importância para a saúde pública.

7 Conclusões

As cepas Bon 707, Shi 3 e IGM 16-92 de *B. laterosporus* apresentaram maior toxicidade para larvas de *C. megacephala* do que as outras cepas testadas nos bioensaios preliminares.

O fato de o crescimento em meio sólido ter apresentado melhor resultado inseticida, comparado aos resultados obtidos a partir do crescimento em meio líquido, sugere que a metodologia de crescimento bacteriano possivelmente influencie na toxicidade das cepas de *B. laterosporus*.

A mistura de água na dieta larval altera a consistência da mesma, deixando-a mais diluída. Essa mudança provavelmente altera o padrão de alimentação das larvas, resultando em larvas de terceiro instar com média de peso inferior à média de peso das larvas do grupo controle puro.

Foi possível observar microbiota cultivável diferente isolada a partir da carne utilizada nos bioensaios. No bioensaio completo realizado com a cepa IGM 16-92 foi identificada uma cepa de *Myroides* sp, que pode exercer ação protetora nas larvas de *C. megacephala* e inibir a ação de outras bactérias patogênicas para esse inseto.

A presença de esporos das cepas Bon 707 e IGM 16-92 no lúmen e epitélio intestinal, observada por microscopia eletrônica de transmissão, é sugestiva de ser a causa das alterações no intestino médio de *C. megacephala*.

As cepas Bon 707, Shi 3 e IGM 16-92 de *Brevibacillus laterosporus* demonstraram ter potencial para utilização em estratégias de controle de *Chrysomya megacephala* aliadas a outros métodos de controle, como os inseticidas químicos.

8 Referências Bibliográficas

- Adenusi AA, Adewoga TOS. Studies on the potential and public health importance of non-biting synanthropic flies in the mechanical transmission of human enterohelminths. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013; 107: 812–818.
- Ahmad A, Broce A, Zurek L. Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 2006; 43: 1129–1133.
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc Toxicol* 2009; 21: 1–12
- Aldridge WN. Insecticides, past, present and future: practice and the understanding of mechanisms. *Ann occup Hyg* 1979; 22: 407-09.
- Arnaut G, Boets A, Damme N, Van Rie J. Toxins. U.S. Patent 7,919,609, 5 April 2011.
- Asolkar R, Huang H, Koivunen M, Marrone P. *Chromobacterium* bioactive compositions and metabolites.- 2012 US Patent Application Publication, 2012/0100236 A1.
- Barbosa LS, Jesus DML and Aguiar-Coelho VM. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligolítica. *Rev Bras Zoo* 2004; 6: 207-217.
- Barros-Cordeiro KB, Pujol-Luz JR. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. *Pap Avulsos Zool (São Paulo)* 2010; 50: 709-717.
- Baumgartner DL, Greenberg B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 1984; 21: 105-113.
- Beard J. DDT and human health. *Sci Total Environ* 2006; 355:78–89.
- Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins* 2014; 6: 1222-1243.
- Berg H.van den Global Status of DDT and Its Alternatives for Use in Vector Control to Prevent Disease. *Environ Health Persp* 2009; 117: 1656–1663.
- Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek A, de Heer L , Husman AMR, Schets, FM. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) -Producing *Escherichia coli* on Flies at Poultry Farms. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 239-246.
- Boets A, Arnaut G, Van Rie J, Damme N, 2004. Toxins. US Patent No. 6,706,860. Bayer BioScience NV, Ghent, BE.

Boonsriwong W, Sukontason K, Vogtsberger RC, Sukontason KL. Alimentary canal of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): an emphasis on dissection and morphometry. *J Vector Ecol* 2011; 36: 2-10.

Braack LEO. Spread in South Africa of the oriental latrine fly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), an introduced species closely resembling *Chrysomya bezziana* Villeneuve. *Onderstepoort J Vet* 1991; 58: 311–312

Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 196–199

Brodeur J. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evol Appl* 2012; 5: 470–480.

Cabral MMO, Mendonça PM, Barbosa-Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974) (Diptera: Calliphoridae). *Fitoterapia* 2007; 78: 20-24.

Carramaschi IN, Pereira LA, Queiroz MMC, Zahner V. Preliminary screening of *Brevibacillus laterosporus* strains for use as a larvicidal agent against the blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) under laboratory conditions. *Rev Soc Bras Med Trop*; 2015 (in press).

Carvalho AR, de D'almeida JM, de Mello RP. Mortalidade de larvas e pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) e seu parasitismo por microhimenópteros na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Neotrop Entomol* 2004; 33: 505-509.

Cavados CFG, Chaves JQ, Queiroz MMC, Serra-Freire NM, Rabinovitch L. An assessment of the biological activity of *Bacillus thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 907 in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Israel J Entomol* 1998; 32: 117-23.

Chaiwong T, Srivoramas T, Sueabsamran P, Sukontason K, Sanford MR, Sukontason KL. The blow fly, *Chrysomya megacephala*, and the house fly, *Musca domestica*, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand. *Trop Biomed* 2014; 31: 336-46.

Chavasse DC, Shier RP, Murphy OA, Huttly SR, Cousens SN, Akhtar T. Impact of fly control on childhood diarrhoea in Pakistan: community-randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 22-5.

D' Almeida JM & Oliveira VC. Dietas artificiais para a criação, em laboratório, de *Chrysomya* (*C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria*) (Diptera: Calliphoridae). *Entomol Vectores* 2002; 9: 79-91.

Delrio G, Ellar DJ, Floris I, Paglietti B, Pantaleoni RA, Rubino S, Ruiu L, Satta A. *Brevibacillus laterosporus* strain compositions containing the same and method for the biological control of Dipters. U.S. Patent 8,076,119, 13 December 2011.

Dharme MS, Gupta AK, Rangrez AY, Ghate HV, Patole MS, Shouche YS. Antibacterial activities of multi drug resistant *Myroides odoratimimus* bacteria isolated

- from adult flesh flies (Diptera: sarcophagidae) are independent of metallo beta-lactamase gene. *Braz J Microbiol* 2008; 39: 397–404.
- Dias LS, Santarém VA, Almeida MSR, Medina AO, da Silva AV. Biodiversidade de moscas Calliphoridae no lixão urbano de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol* 2009; 76: 659-663.
- Djukic M, Poehlein A, Thürmer A, Daniel R. Genome sequence of *Brevibacillus laterosporus* LMG 15441, a pathogen of invertebrates. *J Bacteriol* 2011; 193: 5535–36.
- Favret EM, Yousten AA. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J Invertebr Pathol* 1985; 45: 195–203.
- Federici BA. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol* 2005; 89: 30–38.
- Fernandes LF, Pimenta FC, Fernandes FF. First report of human myiasis in Goiás state, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. *J Parasitol* 2009; 95: 32-38.
- 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 Med Entomol* 2010; 47:487-490.
- Ferraz ACP, Almeida VRG, de Jesus DM, de Rotatori GN, Nunes R, Proença B, Aguiar-Coelho VM & Lessa CSS. Epidemiological study of myiasis in the Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, including reference to an exotic etiological agent. *Neotrop Entomol* 2011; 40: 393-397.
- Ferreira MJM, Lacerda PV. Muscóides sinantrópicos associados ao lixo urbano em Goiânia, Goiás. *Rev Bras Zool* 1993; 10: 185-95.
- Foil LD, Hogsette JA. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev Sci Tech Oie* 1994; 13: 1125-1158.
- Förster M, Klimpel S, Mehlhorn H, Sievert K, Messier S, Pfeffer K. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitol Res* 2007; 101: 243–246.
- Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM, Ishihata GK. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Rev Microbiol* 1984; 15: 170-174.
- Gangavaramu LP. A chitinase from *Brevibacillus laterosporus*, its production and use thereof. WO2013050867A2. 2013.
- Glare TR and O'Callaghan M. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. 2000 John Wiley and Sons Ltd, Chichester, U.K.

- Graczyk TK Knight R, Gilman RH, Cranfield MR. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect* 2001; 3: 231-5.
- Greenberg B. Model for destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *J Med Entomol* 1968; 5: 31–38.
- Greenberg B. *Salmonella* suppression by known populations of bacteria in flies. *J Bacteriol* 1969; 99:629–635.
- Greenberg B. Flies and Disease. Vol. II: Biology and Disease Transmission. New Jersey: Princeton University Press 1973; 447 pp.
- Greenberg, B. *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) collected in North America and notes on *Chrysomya* species present in the New World. *J Med Entomol* 1988; 25: 199–200.
- Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 1978; 22: 53-60.
- Guimarães JH, Prado AP e Buralli GM. Dispersal and distribution of the three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 1979; 23: 245–255.
- Hall M & Wall R. Myiasis of human and domestic animals. *Adv Paras* 1995; 35: 257-334.
- Hassi M, El Guendouzi S, Haggoud A, David S, Ibensouda S, Houari A, Iraqui M. Antimycobacterial activity of a *Brevibacillus laterosporus* strain isolated from a Moroccan soil. *Braz J Microbiol* 2012; 43: 1516–1522.
- Huang XW, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L, Zhang K. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res Microbiol* 2005; 156: 719–727.
- James MT. The Flies That Cause Myiasis in Man. U.S. Department of Agriculture, Washington DC, 1947, USA, Pages: 175.
- James MT. A Catalogue of the Diptera of Americas south of the United States: Family Calliphoridae. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1970; 102: 1-28.
- Jia W, Huang X, Li C. A preliminary study of the algicidal mechanism of bioactive metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in prawn ponds. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 1-11.
- Johnson C, Bishop AH, Turner CL. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the house fly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). *J Invertebr Pathol* 1998; 71: 138–144.
- Kumarasinghe SP, Karunaweera ND, Ihalamulla RL. A study of cutaneous myiasis in Sri Lanka. *Int J Dermatol* 2000; 39:689-94.

- Linhares AX e Avancini R. Ovarian development in the blowflies *Chrysomya putoria* and *Chrysomya megacephala* on natural diets. *Med Vet Entomol* 1989; 3: 283-295.
- Liu Y, Yang Y, Zhao F, Fan X, Zhong W, Qiao D, Cao Y. Multi-drug resistant gram-negative enteric bacteria isolated from flies at Chengdu Airport, China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013; 44: 988-96.
- Macedo RS, Carraro VM, Espindola CB, Cabral MMO. Ocorrência de Dípteros Muscóides (Calliphoridae) no Município de Vassouras, RJ. *Rev Elet Teccen* 2011; 4: 5-16.
- Malik A, Singh N, Satya S. House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. *J Environ Sci Health B* 2007; 42: 453-69.
- Mariconi FAM. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. Vol. 1, 4a. edição, 1980, Editora Nobel, SP, 305 pp.
- Mariluis JC. Nuevos Calliphoridae para la Argentina, Bolívia y Ecuador (Diptera). *Rev Soc Entomol Argent* 1981; 40: 103-105.
- Marquez AT, Mattos MS, Nascimento SB. Myiasis associated with some socioeconomic factors in five urban areas of the State of Rio de Janeiro. *Rev da Soc Bras de Med Trop* 2007; 40: 175-180.
- Mello RP. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) encontradas no Brasil. *Entomol Vect* 2003; 10: 255-68.
- Mendonça PM and D'Almeida JM. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) em dietas artificiais à base de leite. *Entomol Vect* 2004; 11: 50-67.
- Mendonça PM, Queiroz MMC, D'Almeida JM. Rearing *Chrysomya megacephala* on artificial diets composed of varying concentrations of albumin. *Braz arch biol technol*. 2009; 52: 421-426.
- Mendonça PM, Lima MG, Albuquerque LR, Carvalho MG, Queiroz MM. Effects of latex from "Amapazeiro" *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. *Vet Parasitol*. 2011; 178: 379-82.
- Mihara M, Kurahashi H. Base-line susceptibility of the oriental latrine fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), to five insecticides. *Med Vet Entomol*. 1991; 5: 51-4
- Milward-de-Azevedo EMV, Carraro MV, Martins C, Moreira OI, Cruz M, Serafin I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. *Arq Biol Tec* 1996; 39: 793-798.
- Mondal M, Biswas T, Banerji N, Bose S, Biswas B, Mandal PK. Umbilical myiasis with sepsis in a neonate. *Asi Jour of Med Scien* 2014; 5.

- Moya Borja GE. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? *Pesq Vet Bras* 2003; 23: 131-8.
- Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D, Givaudan A. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 220-231.
- Nóbrega DB, Brocchi M. An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences. *J Infect Dev Ctries*. 2014 13; 8:954-60.
- Oliveira-Costa J, Mello-Patiu CA, Carvalho LM, Thyssen PJ, Gomes L, Queiroz MMC, Milano S, Fontes LR, Celino TB, Dias GS, Pessanha RR, Santana DO. 2007. *Entomologia Forense - Quando os insetos são vestígios*. 2 ed. Campinas, SP: Millenium. 420p.
- Oliveira EJ, Rabinovitch L, Monnerat RG, Passos LK, Zahner V. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6657–64.
- Oliveira VC, D’Almeida JM, Abalem de Sá IV, Mandarino JR, Solari CA. Enterobacteria associated to adults of *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) at the Zoo of Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58.
- Orlova MV, Smirnova TA, Ganushkina LA, Yacubovich VY, Azizbekyan RR. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *App Env Microb* 1998; 64: 2723–25.
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins* 2014; 6: 3296-3325.
- Panda AK, Bisht SS, De Mondal S, Kumar NS, Gurusubramanian G, Panigrahi AK. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014; 105: 623-639.
- Parra, JRP, Botelho PSM, Correa –Ferreira BS, Bento JMS. *Controle Biológico no Brasil: Predadores e Parasitoides*. 2002 1ª Edição. Barueri-SP: Editora Manole Ltda,. 635p.
- Patra S, Purkait R, Basu R, Konar MC, Sarkar D. Umbilical Myiasis Associated with *Staphylococcus Aureus* Sepsis in a neonate. *J Clin Neonatol* 2012; 1: 42–43.
- Patton WS. Notes on the myiasis-producing Diptera of man and animals. *Bull of Ent Res* 1922; 12: 239-261.
- Pessanha RR, Carramaschi IN, Mallet JRS, Queiroz MMC, Zahner V. Evaluation of larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae), treated with *Brevibacillus laterosporus*. 2015; doi:10.1016/j.jip.2015.04.006.
- Peter RJ, Van den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. Tick, fly, and mosquito control—Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasit* 2005; 132: 205–215.

- Pires SM, Cárcamo MC, Zimmer CR, Ribeiro PB. Influência da dieta no desenvolvimento e investimento reprodutivo de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). Arq do Inst Biol 2009; 76: 1-47.
- Poopathi S, Abidha S. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. J Physiol 2010; 1: 22–38.
- Prado AP, Guimarães JH. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). Rev Bras de Ent 1982; 26: 225-231.
- Prasanna L, Eijsink VGH, Meadow R. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. Appl Microbiol Biotechnol 2013; 97: 1601-1611.
- Prins AJ. Morphological and biological notes on six South African blow-flies (Diptera: Calliphoridae) and their immature stages. Ann S Afr Mus 1982; 90: 201–217.
- Programme for the Prevention of Blindness and Deafness, World Health Organization. Future approaches to trachoma control: report of a global scientific meeting. Geneva: World Health Organization; 1997.
- Ramírez-Lepe M, Ramírez-Suero M. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Insecticides - Pest Engineering, Dr. Farzana Perveen 2012 (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3.
- Raymond B, Johnston PR, Wright DJ, Ellis RJ, Crickmore N, Bonsall MB. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. Environ Microbiol. 2009; 11: 2556-63.
- Regis L, Silva SB, Melo-Santos MAV. The Use of Bacterial Larvicides in Mosquito and Black Fly Control Programmes in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 207-210.
- Ribas-Fito N, Torrent M, Carrizo D, Munoz-Ortiz L, Julvez J, Grimalt JO, et al. In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. Am J Epidemiol 2006; 164:955–962.
- Rivers DB, Vann CN, Zimmack HL, Dean DH. Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. J Invertebr Pathol 1991; 58: 444–47.
- Ruiu L. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad Spectrum Antimicrobial Species. Insects 2013; 4:476-92.
- Ruiu L, Delrio G, Ellar DJ, Floris I, Paglietti B, Rubino S, Satta A. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). Entomol Exp 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*. Biol Control 2007a; 43: 136–143.

- Ruiu L, Satta A, Floris I. Susceptibility of the house fly pupal parasitoid *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Brevibacillus laterosporus*. *Bio Control* 2007b; 4: 188-194.
- Ruiu L, Satta A, Floris I. Immature house fly (*Musca domestica*) control in breeding sites with a new *Brevibacillus laterosporus* formulation. *Env Ent* 2008; 37: 505-509.
- Ruiu L, Satta A, Floris I. Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after *Brevibacillus laterosporus* ingestion. *J Invertebr Pathol* 2012; 111: 211–6.
- Saikia R, Gogoi DK, Mazumder S, Yadav A, Sarma RK, Bora TC, Gogoi BK. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3 a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam India. *Microbiol Res* 2011; 166: 216–225.
- Sandeman RM, Levot GW, Heath AC, James PJ, Greeff JC, Scott MJ, Batterham P, Bowles VM. Control of the sheep blowfly in Australia and New Zealand- are we there yet? *Int J Parasitol* 2014; 44: 879-
- Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, et al. Blow Flies Were One of the Possible Candidates for Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus during the 2004 Outbreaks in Japan. *Infl Res and Treat* 2011;8
- Schnepf, H.E.; Narva, K.E.; Stockhoff, B.A.; Lee, S.F.; Walz, M.; Sturgis, B. Pesticidal toxins and genes from *Bacillus laterosporus* strains. U.S. Patent 6,956,116, 18 October 2005.
- Shida H, Takagi K, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 939–946.
- Singh S, Kumar K. Sensitivity of last larval stadium of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) to anti-allatin ageratochromene Precocene II. *Indian J Exp Biol* 2011; 49: 600-8.
- Siriwattananarungsee S, Sukontason KL, Olson JK, Chailapakul O, Sukontason K. Efficacy of neem extract against the blowfly and housefly. *Parasitol Res* 2008; 103: 535- 44.
- Smirnova TA, Minenkova IB, Orlova MV, Lecadet M-M, Azizbekyan RR. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. *Res Microbiol* 1996; 147: 343-350.
- Song Z, Liu K, Lu C, Yu J, Ju R, Liu X. Isolation and characterization of a potential biocontrol *Brevibacillus laterosporus*. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5: 2675–2681.
- Sousa AGP, Ferraz ACP, Nascimento ALO, Aguiar-Coelho VM. Alternative natural diet for the creation of immature oriental latrine flies under controlled conditions. *Rev Bras de Zoo* 2010; 12: 133-140.
- Sripakdee D, Sukontason KL, Piangjai S, Ngern-Klun R, Sukontason K. Effect of microwave irradiation on the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Se Asian J Trop Med* 2005; 36: 893-5.

Sukontason KL, Boonchu N, Sukontason K, Choochote W. Effects of eucalyptol on house fly (diptera: muscidae) and blow fly (diptera: calliphoridae). Rev Inst Med Trop S Paulo 2004; 46: 97-101.

Sukontason K, Chaiwong T, Tayutivutikul J, Somboon P, Choochote W, Piangjai S, Sukontason KL. Susceptibility of *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* to Permethrin and deltamethrin in Thailand. J Med Entomol 2005; 5:812-4.

Taha N, Abdel-Meguid A, El-ebiarie A, Tohamy AA. Ultrastructure of the Midgut of the Early Third Larval Instar of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). J Am Sci 2010; 6: 1-6.

Tellam RL, Bowles VM. Control of blowfly strike in sheep: current strategies and future prospects. Int J Parasitol 1997; 27: 261-73.

Theodore CM, Stamps BW, King JB, Price LSL, Powell DR, et al. Genomic and Metabolomic Insights into the Natural Product Biosynthetic Diversity of a Feral-Hog-Associated *Brevibacillus laterosporus* Strain. PLoS ONE 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0090124.

Thompson CR, Brogan RS, Scheifele LZ, Rivers DB. Bacterial Interactions with Necrophagous Flies. Ann Ent Soc Am 2013; 106: 799-809.

Tian B, Yang J, Lian L, Wang C, Li N, Zhang KQ. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 74: 372–380.

Usta C (2013). Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors), Current Progress in Biological Research. INTECH Open Access Publisher.

Vilas boas AM, Paccola MLD, Lima LAEA. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. Arq de Biol e Tec 1992; 35: 749-761.

Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S, Rouy Z, Barbe V, Acosta C, Cattolico L, Jubin C, Lajus A, Segurens B, Vacherie B, Wincker P, Weissenbach J, Lemaitre B, Médigue C, Boccard F. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. Nat Biot 2006; 24: 673-679.

Von Zuben CJ. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). An Soc Entomol Brasil 1998; 4: 525-533.

Zahner V, Rabinovitch L, Suffys P, Momen H. Genotypic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 5182-5.

Zhao J, Guo L, Zeng H, Yang X, Yuan J, Shi H, Xiong Y, Chen M, Han L, Qiu D. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60. Peptides 2012; 33: 206-211.

Zimmer CR, De Castro LLD, Pires SM, Menezes AMD, Ribeiro PB, Leite FPL. Efficacy of entomopathogenic bacteria for control of *Musca domestica*. J Invertebr Pathol 2013; 114: 241-44.

Zubasheva MV, Ganushkina LA, Smirnova TA, Azizbekyan RR. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus*. Appl Biochem Microbiol 2010; 46: 755-62.

Zumpt, F., 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. London, Butterworth, 267p.

Zurek L, Ghosh A. Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits. Appl Environ Microbiol 2014; 80: 3562-7.