

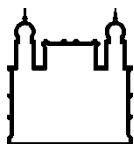
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

EFEITO DA BIOATIVIDADE DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS
ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE LARVAS E ADULTOS DE *Musca*
domestica (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE) E *Chrysomya*
putoria (WIEDEMANN, 1818) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EM
LABORATÓRIO

LORRANE DE ANDRADE PEREIRA

Rio de Janeiro
Maio de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

LORRANE DE ANDRADE PEREIRA

Efeito da bioatividade de estirpes de bactérias entomopatogênicas sobre larvas e adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae) em laboratório

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

Orientadora: Prof. Dra. Viviane Zahner

RIO DE JANEIRO

Maio de 2019

de Andrade Pereira, Lorrane.

Efeito da bioatividade de estirpes de bactérias entomopatogênicas sobre larvas e adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae) em laboratório / Lorrane de Andrade Pereira. - Rio de Janeiro, 2019.

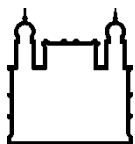
89 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2019.

Orientadora: Viviane Zahner.

Bibliografia: f. 74-89

1. Controle biológico. 2. Bactérias entomopatogênicas. 3. Dípteros muscoides. 4. *Musca domestica*. 5. *Chrysomya putoria*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

AUTOR: Lorrane de Andrade Pereira

EFEITO DA BIOATIVIDADE DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE LARVAS E ADULTOS DE *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE) E *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1818) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EM LABORATÓRIO

Orientadora: Prof. Dr^a Viviane Zahner

Aprovada em: 27/ 05/ 2019

EXAMINADORES:

Presidente Prof. Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados

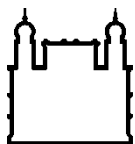
Prof. Dra. Suzana Côrte-Real Faria

Prof. Dra. Deise Maria Fontana Capalbo

Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Prof. Dr. José Mario D´Almeida

Rio de Janeiro, 27 de Maio de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Reinaldo e Luciene, pois sem eles eu nunca teria chegado até aqui. Agradeço o esforço financeiro que meu pai fez para que eu pudesse concluir meus estudos e realizar o meu sonho de cursar Ciências Biológicas, agradeço por todo incentivo e motivação que me fizeram ter mais forças para conquistar meus sonhos. Agradeço também ao meu companheiro de todos os momentos (Allan), que sempre me apoia em tudo, entendeu meus momentos de ausência, de nervosismo, me ouviu sempre que necessário e sempre esteve ao meu lado dando todo seu carinho e atenção.

Em especial agradeço minha orientadora, Dra Viviane Zahner que em todos esses anos de orientação tem feito um papel muito além do que o de uma orientadora, desde a iniciação científica até hoje, sempre me colocou pra cima, fazendo com que eu me sentisse capaz e me apaixonar pelo que faço, teve paciência para me ensinar, sempre me aconselhou em tudo como uma mãe atenciosa, seus ensinamentos foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional, obrigada Viviane por tudo e mais um pouco. Agradeço também a Dra Margareth Queiroz por me receber tão bem no laboratório, pelos ensinamentos, por me fazer gostar tanto de moscas e principalmente por sua ajuda com a minha timidez, pois as dicas, os conselhos foram fundamentais em cada apresentação. Gostaria de agradecer a Isabel Carramaschi por ter sido uma ótima orientadora durante a iniciação científica, me ensinando, aconselhando e principalmente me incentivando nesta caminhada. Agradeço a todos que fazem parte e que já fizeram parte do LEMEF, agradeço as amigas que ganhei: Isabel, Raquel, Leiane, Thiany, Jéssica e Marina. Agradeço ao Lucas Cortinhas por todas as dicas e principalmente pela ajuda com a estatística.

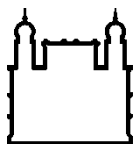
Agradeço a Dra Suzana Côrte-Real por toda ajuda com a microscopia eletrônica, por todo ensinamento desde o processamento do material até a análise, por todas as conversas agradáveis, o carinho e a parceria maravilhosa que foi essencial para este trabalho.

Agradeço toda Secretaria Acadêmica do IOC, pois exercem um trabalho muito organizado e agilizado, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde por ter me recebido no programa, por sanar todas as minhas dúvidas com muita atenção e carinho. Agradeço as disciplinas maravilhosas que cursei, com professores de

excelência, ensinamento de qualidade, aos quais ajudaram demais no meu trabalho, trazendo parcerias e ideias novas para o meu projeto.

Agradeço a revisora Dra Marina Vianna Braga por toda atenção e cuidado na correção deste trabalho. Agradeço de coração a todos que fizeram parte direta e indiretamente da minha vida acadêmica, que contribuíram com ensinamentos, conselhos, palavras positivas, orações e muito carinho.

Por fim, gostaria de agradecer ao Criador, ao meu Deus, pois sem ele eu nada seria e nada sou, pois és a minha inspiração maior, a minha fé em dias melhores, a minha fonte de alegria, Aquele que me sustenta. Obrigada meu Deus por tudo que sou e por tudo o que tenho, pois mais do que qualquer coisa material que eu venha a ter, o Senhor me deu pessoas maravilhosas para amar e para me amar, tem me dado forças para alcançar meus ideais, têm colocado profissionais excelentes em minha jornada, amigos fiéis e tem renovado a minha fé a cada dia, pois sem fé nada disto que estou vivendo hoje estaria acontecendo porque a fé é a minha força.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

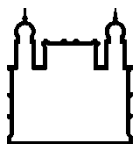
EFEITO DA BIOATIVIDADE DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS SOBRE LARVAS E ADULTOS DE *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE) E *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1818) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EM LABORATÓRIO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Lorrane de Andrade Pereira

Os dípteros muscoides apresentam ampla distribuição geográfica, são altamente sinantrópicos e são encontrados em grandes populações pois o seu desenvolvimento é favorecido devido ao acúmulo e mau remanejamento dos resíduos orgânicos, uma vez que as larvas se alimentam de matéria orgânica em decomposição. Hábitos peculiares de moscas como *Musca domestica* e *Chrysomya putoria* que defecam e regurgitam sobre a alimentação humana e animal, assim como a endofilia levaram ao reconhecimento de seu papel como vetores de patógenos, sendo capazes de carrear vírus, protozoários e bactérias, além de causarem miíase secundária em humanos e animais. Portanto, devem ser alvo de estudos de biocontrole. No Brasil, o controle destes dípteros é realizado quase que exclusivamente por inseticidas químicos, que podem gerar danos ambientais, tanto por serem tóxicos aos seres vivos, quanto por induzirem resistência nos insetos. Neste sentido, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a atividade entomopatogênica de estirpes de *Brevibacillus laterosporus* e de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* Btk176 sobre *M. domestica* e *C. putoria*. As moscas foram coletadas em caçambas de lixo, identificadas e as respectivas colônias foram adaptadas às condições de laboratório (câmara climatizada com umidade e temperatura regulada). Os testes foram realizados a partir de fermentação bacteriana obtida na fase esporulada. As suspensões, em diferentes concentrações, foram oferecidas às neo larvas e aos adultos. O experimento foi analisado diariamente e as larvas foram contadas, pesadas e acompanhadas até a pupação e emergência dos adultos. As neo larvas tratadas com as estirpes nas maiores concentrações (10^8 UFC/mL) apresentaram até 100% de letalidade após 48h de tratamento. Algumas estirpes ocasionaram efeitos subletais como: redução do peso larval e pupal, e atraso no desenvolvimento pós-embrionário. Foram observados efeitos histopatológicos como a desorganização citoplasmática, formação de vacúolos e microvilosidades irregulares no intestino das larvas tratadas com suspensões de esporos da estirpe Btk176. O teste com adultos resultou em eficácia de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* para este tipo de controle, alcançando mortalidade de até 85% e 80%, respectivamente. Portanto, é possível afirmar que estas estirpes bacterianas são promissoras tanto para o controle de larvas, quanto para o controle de adultos e este estudo pode fornecer subsídios ao aprimoramento de técnicas de controle biológico eficiente e seguro para o homem e o ambiente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT OF THE BIOACTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA STRAINS ON LARVES AND ADULTS OF *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE) AND *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1818) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) IN LABORATORY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Lorrane de Andrade Pereira

Muscoïd dipterans have a wide geographical distribution and are highly synanthropic. They found in large populations because their development is favored due to the accumulation and poor manage of the organic residues, once the larvae feed on decomposing organic matter. Particular habits of flies such as *Musca domestica* and *Chrysomya putoria* that defecate and regurgitate on human and animal feeding, as well as endophilia, lead to the recognition of their role as vectors of pathogens, being able to carry viruses, protozoa, and bacteria, in addition, to cause secondary myiasis in humans and animals. Therefore, they should be a target for biocontrol studies. In Brazil, the control of these dipterans is carried out almost exclusively using chemical insecticides, which can generate environmental damages, as they are toxic to living beings and induce resistance in insects. In this sense, the present study aimed to evaluate the entomopathogenic activity of strains of *Brevibacillus laterosporus* and *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* on *M. domestica* and *C. putoria*. The flies were collected in the garbage, identified, and the respective colonies adapted to the laboratory conditions (a climatized chamber with humidity and regulated temperature). The tests were carried out from bacterial fermentation obtained in the sporulation phase. The suspensions, in different concentrations, were offered to neo larvae and adults. The experiment was analyzed daily, and larvae were counted, weighed and monitored until pupation and emergence of adults. Neo larvae treated with the strains at the highest concentrations (10^8 CFU/ml) had up to 100% lethality after 48h of treatment. Some strains caused sublethal effects such as reduction of pupal and larval weight and delayed post-embryonic development. There were histopathological effects such as cytoplasmic disorganization, vacuoles formation and irregular microvilli in the intestine of larvae treated with spore suspensions of the Btk176 strain. Adult testing resulted in an effectiveness of *B. laterosporus* and *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* for this type of control, achieving mortality of up to 85% and 80%, respectively. Therefore, it is possible to state that these bacterial strains are promising both for larval and adult control. This study may provide support for the improvement of efficient and safe biological control techniques for man and the environment.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	25
2.1. Geral.....	25
2.2. Específicos	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Coleta e manutenção das colônias de <i>Musca domestica</i> e <i>Chrysomya putoria</i>	26
3.2. Manutenção das colônias bacterianas	26
3.2.1. Obtenção do crescimento bacteriano, preparação das suspensões, diluições e contagem de UFC/mL	27
3.3. Bioensaios	28
3.3.1. Bioensaio com neo larvas.....	28
3.3.2. Bioensaio com adultos	28
3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
3.4.1. Dissecção das larvas	29
3.4.2. Processamento das amostras (trato digestório).....	30
3.4.3. Processamento das amostras (bactérias).....	30
3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.5.1. Preparo das amostras bacterianas	31
3.6. Análise dos dados	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Efeitos subletais.....	32
4.1.1. <i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758).....	32
4.1.2. <i>Chrysomya putoria</i> (Wiedemann, 1818).....	38
4.2. Letalidade nos estágios de desenvolvimento e CL50	42
4.2.1. <i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758).....	42
4.2.2. <i>Chrysomya putoria</i> (Wiedemann, 1818).....	50
4.3. Atividade adulticida.....	56
4.3.1. <i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758).....	56

4.3.2. <i>Chrysomya putoria</i> (Wiedemann, 1818).....	61
4.4. Análises histopatológicas do trato digestório de <i>Musca domestica</i>.....	64
4.5. Análise das células bacterianas.....	68
5. CONCLUSÕES	73
BIBLIOGRAFIA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Musca domestica</i>	23
Figura 2: <i>Chrysomya putoria</i>	23
Figura 3: Coleta ativa em caçamba de lixo localizada na comunidade do Amorim, RJ (22°52'32.2"S 43°15'01.9"W).....	26
Figura 4: Dieta à base de carne bovina moída putrefata para o bioensaios com neo larvas.....	28
Figura 5: Gaiolas do bioensaio com adultos recém emergidos.....	29
Figura 6: Dissecção do trato digestório de <i>Musca domestica</i> - L: larva; i: intestino....	30
Figura 7: Ciclo de vida das moscas	37
Figura 8: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> NRS 590 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	43
Figura 9: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707 nas concentrações de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,6 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,6 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	43
Figura 10: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 712 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	44
Figura 11: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Shi 3 nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	44
Figura 12: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. kyushuensis Btk176 nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) nos períodos de 24, 48 e 72 h de crescimento sobre <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	47

Figura 13: Mortalidade corrigida com a fórmula de Abbott (Abbott, 1925) de <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae) alimentada com suspensões de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kyushuensis</i> e <i>Brevibacillus laterosporus</i> nas concentrações de 10^8 UFC/mL, em condições de laboratório.....	48
Figura 14: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> NRS 590 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Chrysomya putoria</i> em condições de laboratório.....	51
Figura 15: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707 nas concentrações de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 1), $1,8 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 2) e $1,8 \times 10^5$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Chrysomya putoria</i> em condições de laboratório.....	51
Figura 16: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 712 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Chrysomya putoria</i> em condições de laboratório.....	52
Figura 17: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Shi 3 nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre <i>Chrysomya putoria</i> em condições de laboratório.....	52
Figura 18: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kyushuensis</i> Btk 176 nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) no período de 72 h de crescimento sobre <i>Chrysomya putoria</i> em condições de laboratório.....	53
Figura 19: Mortalidade corrigida com a fórmula de Abbott (Abbott, 1925) de <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae) alimentada com suspensões de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kyushuensis</i> e <i>Brevibacillus laterosporus</i> nas concentrações de 10^8 UFC/mL e 10^7 UFC/mL, em condições de laboratório	54
Figura 20: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> NRS 590 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	57
Figura 21: Efeito letal da suspensão de esporos de <i>Brevibacillus laterosporus</i> Bon 707 nas concentrações de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $2,6 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de <i>Musca domestica</i> em condições de laboratório.....	58

- Figura 22:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório..... 58
- Figura 23:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório..... 59
- Figura 24:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e do sobrenadante (SN) nos períodos de 24h, 48h e 72h de crescimento sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório..... 60
- Figura 25:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 62
- Figura 26:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 707** nas concentrações de $1,8 \times 10^9$ UFC/mL (concentração 1) e $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 62
- Figura 27:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 63
- Figura 28:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 63
- Figura 29:** Efeito letal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e do sobrenadante (SN) no período de 72h de crescimento sobre adultos recém-emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 64
- Figura 30:** Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 6h; (B) Células epiteliais tratadas por 6h com

esporos de Btk176- M: mitocôndrias, Mv: microvilosidades, N: núcleo, Re: retículo endoplasmático, Vd: vacúolo digestivo – x 6200 65

Figura 31: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 12h; (B) Células epiteliais tratadas por 12h com esporos de Btk176- Mv: microvilosidades, N: núcleo, C: citoplasma, Mp: matriz peritrófica, L: lúmen – x 7800..... 65

Figura 32: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 24h; (B) Células epiteliais tratadas por 24h com esporos de Btk176 – C: citoplasma, V: vacúolos – x 6200 66

Figura 33: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 48h; (B) Células epiteliais tratadas por 48h com esporos de Btk176 – M: mitocôndria, Mv: microvilosidades, C: citoplasma, L: lúmen, Ec: extrusão citoplasmática – x 9300 67

Figura 34: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com o sobrenadante (SN) de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 48h; (B) Células epiteliais tratadas por 48h com o sobrenadante – M: mitocôndrias, Mv: microvilosidades – x 9300. 68

Figura 35: Microscopia eletrônica de varredura de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** – (A) C: cristal; E: esporo – (B) Bactérias..... 69

Figura 36: Microscopia eletrônica de transmissão de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** – (A) C: cristal; E: esporo – (B) C: cristal 70

Figura 37: Microscopia eletrônica de transmissão de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** – E: esporo; Cp: corpo parasporal 71

Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** – E: esporo 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Levantamento bibliográfico das bactérias com atividade entomopatogênica contra *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) 22
- Tabela 2:** Levantamento bibliográfico das bactérias com atividade entomopatogênica contra dípteros muscoides da família Calliphoridae 24
- Tabela 3:** Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo e suas respectivas origens 27
- Tabela 4:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório..... 33
- Tabela 5:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 707** nas concentrações de $2,6 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,6 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório 34
- Tabela 6:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório..... 34
- Tabela 7:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório..... 35
- Tabela 8:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis estirpe **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) no período 72h de crescimento sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório. 36
- Tabela 9:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 39
- Tabela 10:** Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 707** nas concentrações de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 1), $1,8 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 2) e $1,8 \times 10^5$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do

desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 40

Tabela 11: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 40

Tabela 12: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 41

Tabela 13: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* estirpe **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) no período 72h de crescimento sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório..... 41

Tabela 14: Concentrações letais 50 (CL₅₀) de diferentes suspensões de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* e *Brevibacillus laterosporus* adicionadas na dieta de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório..... 49

Tabela 15: Concentrações letais 50 (CL₅₀) de diferentes suspensões de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* e *Brevibacillus laterosporus* adicionadas na dieta de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), em condições de laboratório..... 56

1. INTRODUÇÃO

Os insetos em geral são capazes de percorrer diferentes ambientes, sendo assim, os dípteros muscoides, principalmente os sinantrópicos, participam ativamente do carreamento de microrganismos entre esses ambientes, devido ao seu desenvolvimento, capacidade de dispersão, deslocamento irrestrito, modo de alimentação (regurgitação) e atração por humanos (1,2). No Brasil, em áreas carentes de zonas urbanas e em zonas rurais as parasitoses intestinais e bacterioses são muito frequentes, levando pacientes ao atendimento hospitalar. As moscas sinantrópicas das famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae são amplamente divulgadas como responsáveis pela transmissão principalmente de bactérias envolvidas em diarreias infantis (1,3). Além disto, são vetores mecânicos de helmintos, vírus, enterobactérias e até mesmo bactérias portadoras de genes de resistência a diferentes antibióticos (4–9).

O alto grau de sinantropia destes dípteros e os danos que causam incentivam as pesquisas de controle populacional em áreas urbanas, onde seu desenvolvimento é favorecido devido às más condições sanitárias e ao acúmulo de lixo mal remanejado (10,11). Métodos alternativos ao controle químico têm sido estudados, entre eles: metabólitos secundários de plantas, hormônios, inimigos naturais e bactérias entomopatogênicas (12).

Entre as bactérias entomopatogênicas utilizadas tanto como agentes no controle de pragas da agricultura como de insetos vetores de importância na saúde pública estão *Bacillus thuringiensis* (13) e *Brevibacillus laterosporus* (14).

Brevibacillus laterosporus é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, apresenta corpos paraesporais em forma de canoa aderidos aos esporos, e que tem apresentado ao longo da história amplo potencial biotecnológico (15). Estirpes desta bactéria já foram isoladas a partir de águas doce e salgada, de solo, corpos de insetos, folhas, sementes e diferentes tipos de alimentos, principalmente aqueles ricos em amido (14–19), foi visto que estirpes de *B. laterosporus* podem abrigar inúmeros fatores putativos de virulência, tais como: toxinas mosquitocidas e antifúngicas, genes antibióticos, variedade de peptídeos antimicrobianos e fatores suplementares de virulência contra insetos (15,20,21).

Devido à produção de vários metabolitos, a bioatividade de *B. laterosporus* não se limita aos insetos, aos fungos e as bactérias, pois entre outras possíveis aplicações, os efeitos patogênicos contra algas nocivas pertencentes a diferentes gêneros também foram demonstrados (22,23). Assim como, os antibióticos inibidores da trombina (bacitracinas) (24), o inibidor da aminopeptidase M (leuhistina) (25), o antibiótico antitumoral spergualina (26) e a enzima acilase cefalosporina (cefalosporinas e derivados) (27), também são produzidos por *B. laterosporus*.

Brevibacillus laterosporus ainda é relatado como probiótico para aves e mamíferos, ao ser administrado como alimento (28). Foi observado que a administração oral de esporos desta bactéria pode melhorar a conversão alimentar e o ganho de peso das aves (29,30). Algumas cepas de *B. laterosporus* também tem sido utilizadas na biodegradação e na remoção de poluentes e contaminantes (15), pois são capazes de promover a desintoxicação de metais em sistemas de águas residuais (31,32), de degradar taninos vegetais (33), fenol (34), álcool polivinílico e acetato (35), e de realizar a biossorção de metais tóxicos de soluções aquosas (36).

Zubasheva et al. (37) relataram estirpes de *B. laterosporus* produtoras de proteínas cristalinas com atividade inseticida. Entretanto, o cristal não é uma característica comum e nem condição necessária para a entomopatogenicidade, uma vez que diversos autores (14,38–41) demonstraram a atividade patogênica de cepas acristalogênicas contra diferentes insetos.

Em 2001, Floris et al. (42) patentearam uma metodologia para controle de dípteros, especialmente *M. domestica*, utilizando *B. laterosporus*. Em 2007 Ruiu et al. (40) relataram a eficácia de *B. laterosporus* para o controle também com adultos de *M. domestica*. Mais tarde então foram publicados trabalhos pelo grupo do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, sobre a atividade desta bactéria contra diferentes dípteros muscoides de importância médica-veterinária: *Lucilia cuprina* (43), *Chrysomya megacephala* (38,44), *M. domestica* (39) e *Chrysomya putoria* (41).

A atividade entomopatogênica de *B. laterosporus* está relacionada à ingestão pelo inseto da bactéria em sua fase esporulada (15), o que provoca lesões nas microvilosidades das células epiteliais do inseto, além de outras anomalias no citoplasma (38,39,45).

Bacillus thuringiensis é uma espécie bastante conhecida por sua aplicação no controle de pragas (46). É Gram-positiva, capaz de produzir uma inclusão proteica em forma de cristal, conhecida como δ -endotoxina ou proteína inseticida, que apresenta elevada toxicidade contra diferentes espécies de insetos pragas na agricultura e de importância na transmissão de doenças em humanos e animais (46–48).

Essas endotoxinas são produzidas durante a fase de esporulação e podem possuir atividade patogênica contra lepidópteros, coleópteros, himenópteros, dípteros, até mesmo contra alguns nematoides e ácaros (49).

Há dois tipos desta δ -endotoxina, que são as proteínas Cry e as proteínas Cyt. As proteínas Cyt não são homólogas às proteínas Cry, pois possuem atividade citolítica relacionada à afinidade aos ácidos graxos insaturados que se encontram na porção lipídica da membrana celular (50). Apresentam toxicidade contra alguns insetos, especialmente contra os mosquitos (51–53). Ainda são capazes de aumentar a atividade inseticida de certas toxinas Cry atuando em sinergia (53).

As proteínas Cry se apresentam como pró-toxinas, que exibem duas regiões distintas, conhecidas como a porção amino-terminal, associada à toxicidade (geralmente variável), e a outra, porção carboxi-terminal, relacionada com a formação, estrutura e a solubilização do cristal (mais conservada) (49,54,55).

As pró-toxinas precisam ser ativadas por proteases para que exerçam os efeitos tóxicos. Desta forma, quando o cristal contendo as proteínas Cry é ingerido pelo inseto ocorre o processo de solubilização da pró-toxina no pH alcalino do intestino médio da maioria das larvas de insetos que são suscetíveis (dípteros, lepidópteros e alguns coleópteros) (47,56). Após a solubilização a pró-toxina é processada por proteases que se encontram no intestino médio do inseto, liberando então a toxina ativa (57). Um fator importante que contribui para a determinação da especificidade é a clivagem proteolítica. A principal protease digestiva em insetos suscetíveis é a serino-protease, presente em dípteros e lepidópteros. Já em coleópteros as principais proteases são a cisteína e a aspártico-protease (58). Depois de ativadas, as toxinas ligam-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades intestinais do intestino médio das larvas, de forma que haja uma inserção da toxina na membrana, induzindo sua abertura ou a formação de poros que irão aumentar a permeabilidade da célula, desestabilizando seu gradiente osmótico, levando à morte celular (47,56).

Além das δ -endotoxinas, *B. thuringiensis* também produz uma diversidade de toxinas com atividade inseticida contra diferentes insetos, tais como: α -exotoxina, β -exotoxina, exoenzima, VIP (Proteína Inseticida Vegetativa) e hemolisina (59,60).

Bacillus thuringiensis var. *kyushuensis* (61) possui atividade mosquitocida (51) onde CytB, a proteína responsável por esta atividade entomopatogênica, é encontrada em inclusão parasporal (62,63) e é composta principalmente por peptídeos entre 15 kDa até 150 kDa (64). Essas inclusões ou cristais paraesporais aparecem de forma irregular quando as células esporuladas são analisadas por microscopia eletrônica, apresentando revestimentos grossos, aderentes e eletrodensos (64).

A atividade desta toxina foi demonstrada contra *Culex tritaeniorhynchus* (61), *Aedes aegypti* (51,64) e *Aedes albopictus* (52), em contrapartida, não foi tóxica contra larvas de lepidópteros (51,61). Held et al. (64) observaram que as larvas de *Manduca sexta* quando tratadas com cristais de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* alcançaram peso médio larval inferior ao das larvas não tratadas, sendo apenas 5,7 mg, em comparação com 22,7 mg para as larvas do grupo controle. No entanto, a mortalidade foi relativamente baixa. Isto sugere que os cristais de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* têm baixo nível de toxicidade para as larvas desta espécie ou inibem a alimentação em concentrações muito altas (64).

***Musca domestica* (Diptera: Muscidae)**

Musca domestica é um díptero pertencente à família Muscidae (Figura 1), considerada praga mundial desde a década de 50 (65), apresenta ampla distribuição geográfica, é altamente sinantrópica e incômoda. Seu desenvolvimento é favorecido em regiões tropicais devido ao clima quente e também por suas larvas se desenvolverem a partir de matéria orgânica em decomposição (65–67).

Hábitos peculiares dessas moscas como defecar e regurgitar sobre a alimentação animal e humana, assim como seus hábitos endofílicos levou ao reconhecimento precoce de seu papel como vetor de patógenos humanos e animais, especialmente os responsáveis por doenças entéricas (68,69). A diversidade de doenças relacionadas à contaminação levou ao estudo de insetos potenciais vetores de tais patógenos, onde *M. domestica* se destaca por carrear uma diversidade de patógenos como: fungos (70), vírus (6,71), protozoários (72,73), grande variedade de bactérias (7,74) incluindo aquelas resistentes a diferentes antibióticos (8,9,75). Esta espécie também é causadora

de miíases secundárias tanto em humanos quanto em animais (76–79), podendo ainda ser carreadoras de ovos de *Dermatobia hominis* que são dípteros causadores de miíases primárias (80,81).

As moscas domésticas são notórias por sua capacidade de desenvolver mecanismos comportamentais e metabólicos para evitar e se desintoxicar dos inseticidas químicos, pois a resistência ao DDT (diclorodifeniltricloroetano) foi notada poucos anos após sua introdução no mercado (82). Ao longo do tempo novos produtos químicos foram lançados e as moscas continuaram a adquirir resistência, até mesmo ao inseticida regulador de crescimento (ciromazina), pois Bloomcamp et al. (83) constataram que em *M. domestica* o inseticida não surtia efeito. Inseticidas de última geração como imidaclorapida (84), Spinosad (85), Indoxacarb (86) e Malathion (87) também apresentaram ineficácia em populações de *M. domestica*.

Tabela 1: Levantamento bibliográfico das bactérias com atividade entomopatogênica contra *Musca domestica* (Diptera: Muscidae).

Bactéria	Concentração	Mortalidade larval (%)	Mortalidade adulto (%)	Meio de crescimento	Referência
<i>B. laterosporus</i>	1,3x10 ⁹ UFC/g	100%	100%	Meio LB	Ruiu et al. (40)
<i>B. laterosporus</i>	7,76x10 ⁸ esporos/g	70%	-	Ágar Nutriente	Ferreira et al. (39)
<i>B. laterosporus</i>	1,10 ⁹ UFC/mL	53%	-	Meio NYSM	Zimmer et al. (88)
<i>B. thuringiensis thuringiensis</i>	20mg/g	83%	-	Meio NYSM	Stein (89)
<i>B. thuringiensis kenya</i>	20mg/g	97%	-	Meio NYSM	Stein (89)
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	1,10 ⁹ UFC/mL	40%	-	Meio NYSM	Zimmer et al. (88)
<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	1,10 ⁹ UFC/mL	34%	-	Meio NYSM	Zimmer et al. (88)
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	10 ⁹ UFC/mL	70%	-	Caldo nutritivo suplementado com sais	Lonc et al. (90)
<i>B. thuringiensis</i>	1,0 µl/g	87,5%	-	Meio LB	Merdan (91)
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	10 ⁸ esporos /mL	86%	-	Caldo de soja tripticase	Mwamburi et al. (92)
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	0,43 mg/mL	100%	-	Meio LB	Mehrabi et al. (93)
<i>B.thuringiensis var kurstaki</i>	500 µl/ml	15%	90%	Meio NYS	Indrasith et al. (94)

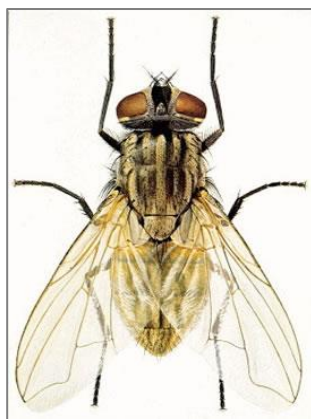


Figura 1: *Musca domestica* (Fonte: Agriculture and Agri-food Canada).

A fim de reduzir a densidade populacional de *M. domestica*, devido aos danos econômicos (69) e relacionados à saúde pública (6,8,77), uma variedade de biopesticidas tem sido estudada e implementada no mercado (95), incluindo cepas entomopatogênicas de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* (Tabela 1).

***Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae)**

Chrysomya putoria faz parte do grupo de moscas conhecidas popularmente como moscas varejeiras (Figura 2), é exótica e apresenta alto grau de sinantropia (96,97), é necrobiontófaga, pois suas larvas são causadoras de miíases secundárias (98,99).

Esta espécie ainda está associada à transmissão de patógenos, pois através de seu hábito alimentar, sua relação com ambientes antrópicos e comportamento endofílico (3), pousa em locais contaminados e posteriormente nos alimentos, assim como diretamente sobre animais e humanos. Além disso, *C. putoria* é um vetor mecânico potencial de parasitas e patógenos, inclusive: ovos de helmintos (4), vírus e bactérias (5,100), pode também carrear patógenos enterovirulentos envolvidos em doenças diarreicas (3), que segundo a UNICEF (101) são responsáveis por matar mais de 1,5 milhão de crianças por ano.



Figura 2: *Chrysomya putoria* (Fonte: Marcelo Consolo - iNaturalist.org).

Devido às características de importância na saúde pública supracitadas e as características negativas dos inseticidas químicos, que além de induzirem resistência nos insetos são tóxicos para os seres vivos e para o meio ambiente, juntamente ao elevado custo dos produtos de última geração demonstram que o controle feito com essas substâncias pode, a longo prazo, se tornar ineficiente (87,102,103). Com isto, métodos de controle alternativos ao químico têm sido empregados, e as bactérias entomopatogênicas já são utilizadas em programas de controle biológico contra diversos grupos de insetos, em sua maioria, através de inseticidas formulados a partir de estirpes de *B. thuringiensis*. Muitos estudos também demonstraram a capacidade entomocida de *B. laterosporus*, no entanto, ainda são poucos os estudos em dípteros muscoides (Tabela 2).

Tabela 2: Levantamento bibliográfico das bactérias com atividade entomopatogênica contra dípteros muscoides da família Calliphoridae.

Mosca	Bactéria	Concentração	Mortalidade larval (%)	Meio de crescimento	Referência
<i>C. megacephala</i>	<i>B. laterosporus</i> (Shi 3)	1x10 ⁸ UFC/mL	70%	Meio NYSM	Carramaschi et al. (38)
<i>L. cuprina</i>	<i>B. laterosporus</i> (NRS 590)	1,63x10 ⁵ UFC/mL	48%	Ágar Nutriente	Pessanha et al. (43)
<i>C. putoria</i>	<i>B. thuringiensis</i> (LFB-FIOCRUZ 907)	326 mg/g	18%	Caldo nutritivo suplementado com glicose e metais	Oliveira et al. (104)
<i>C. megacephala</i>	<i>B. thuringiensis</i> (LFB-FIOCRUZ 907)	326 mg/g	62,7%	Caldo nutritivo suplementado com glicose e metais	Cavados et al. (105)

Neste sentido, em função do potencial de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* para o controle destes insetos (Tabelas 1 e 2), os bioensaios foram ampliados e o presente estudo tem como objetivo testar diferentes concentrações de suspensões de esporos de estirpes de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* que apresentaram potencial entomopatogênico em testes preliminares, sobre larvas e adultos

de *M. domestica* e de *C. putoria*. Através de microscopia eletrônica de transmissão foram acompanhados os efeitos histopatológicos, nas larvas alimentadas com dieta tratada com essas suspensões.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a bioatividade de suspensões de esporos e do sobrenadante de bactérias entomopatogênicas sobre larvas e adultos de *Musca domestica* e de *Chrysomya putoria*.

2.2. Específicos

- Determinar os efeitos das aplicações de suspensões de esporos das quatro estirpes de *Brevibacillus laterosporus* e uma de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*, quanto ao peso larval e pupal, ao tempo de duração e a mortalidade dos estágios larval, pupal e de neo larva a adulto de *Musca domestica* e de *Chrysomya putoria*;
- Avaliar os efeitos do sobrenadante (SN) de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* Btk176, quanto ao peso larval e pupal, ao tempo de duração e a mortalidade dos estágios larval, pupal e de neo larva a adulto de *M. domestica* e de *C. putoria*;
- Observar através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) os efeitos histopatológicos da estirpe bacteriana com maior potencial de mortalidade sobre as células epiteliais de larvas;
- Analisar através de MET e microscopia eletrônica de varredura (MEV) as células bacterianas de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*;
- Calcular a concentração letal 50% (CL50) de cada tratamento bacteriano;
- Determinar a mortalidade de adultos de *M. domestica* e de *C. putoria* alimentados com as suspensões de esporos bacterianos.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta e manutenção das colônias de *Musca domestica* e *Chrysomya putoria*

As coletas foram realizadas em caçambas de lixo localizadas na comunidade do Amorim, RJ (22°52'32.2"S 43°15'01.9"W) (Figura 3). Após coletadas, as moscas foram levadas para o Laboratório de Entomologia Médica e Forense – LEMEF/IOC/FIOCRUZ, onde foram identificadas com o auxílio de chaves de identificação específicas e as colônias de *M. domestica* e *C. putoria* foram adaptadas às condições de laboratório. Durante o período de experimentação as colônias foram mantidas em câmara climatizada regulada a 27 ± 1 °C, umidade relativa do ar $70 \pm 10\%$ e com fotofase de 12h. Os insetos foram alimentados com solução açucarada (80% de açúcar) e quando necessário, foi oferecida carne putrefata para maturação dos óvulos e estímulo à postura.



Figura 3: Coleta ativa em caçamba de lixo localizada na comunidade do Amorim, RJ (22°52'32.2"S 43°15'01.9"W).

3.2. Manutenção das colônias bacterianas

As estirpes bacterianas encontram-se em estoque no LEMEF e estão mantidas em Ágar Nutriente inclinado com óleo mineral a temperatura ambiente e em BHI-glicerol a -20 °C. A partir de testes preliminares com diferentes estirpes de *B. laterosporus* que apresentaram mortalidade significativa nos testes de Oliveira et al. (14), foram selecionadas quatro estirpes desta espécie e uma de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*, totalizando cinco estirpes (Tabela 3), todas com atividade entomopatogênica contra *M. domestica* e *C. putoria*.

Tabela 3: Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo e suas respectivas origens*.

Estirpes	Origem da estirpe	Fonte de Isolamento
NRS 590 – <i>Brevibacillus laterosporus</i>	American Type Culture Collection	Não identificada
Bon 707 – <i>Brevibacillus laterosporus</i>	Instituto de Higiene, Universidade de Aarhus, Aarhus C, Dinamarca	Não identificada
Bon 712 – <i>Brevibacillus laterosporus</i>	Instituto de Higiene, Universidade de Aarhus, Aarhus C, Dinamarca	Não identificada
Shi 3 – <i>Brevibacillus laterosporus</i>	Laboratório de Abelhas Bioambientais (USDA), Beltsville, MD	Não identificada
Btk 176 – <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kyushuensis</i>	Instituto Pasteur, Japão Código:CCGB0727	<i>Bombyx mori</i>

* Maiores detalhes sobre as estirpes encontram-se no catálogo de linhagens CCGBC: Coleção de culturas do gênero *Bacillus* e gêneros correlatos (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz).

3.2.1. Obtenção do crescimento bacteriano, preparação das suspensões, diluições e contagem de UFC/mL

A suspensão de esporos foi obtida a partir de crescimento bacteriano em caldo NYSM (106) estéril. Seguindo a fermentação em agitador a 200rpm, 31°C por 72h. Este crescimento foi acompanhado por microscopia óptica. Quando o crescimento atingiu mais de 90% de células esporuladas, o mosto fermentado foi submetido à centrifugação refrigerada a 4°C, 3600 rpm por 40 min.

O sobrenadante de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* (Btk176) foi estocado e tratado de acordo com Johnson et al. (107) para ser utilizado nos bioensaios com neo larvas e adultos a fim de se investigar a presença de β -exotoxina.

Já o mosto fermentado contendo as células esporuladas foi estocado em frasco âmbar onde o pH foi ajustado com ácido propiônico para 5.0. Ao final, os frascos com todas as bactérias foram estocados a 4°C. As suspensões foram diluídas em água destilada estéril para obtenção das diferentes concentrações. Para a contagem de esporos, foi calculada a UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias/mL) que para tal, 1mL do induto de crescimento foram aliquotados e transferidos para tubo de ensaio com tampa de atarraxar contendo 9mL de água destilada estéril. Após homogeneização a

diluição seguiu até 10^{-5} e 10^{-6} de onde foram retiradas três alíquotas de 0,1mL para o plaqueamento e conseqüente cálculo da UFC/mL.

3.3. Bioensaios

3.3.1. Bioensaio com neo larvas

Diferentes suspensões de esporos bacterianos foram oferecidas às neo larvas. Estas suspensões foram misturadas na dieta à base de carne bovina moída putrefata com farelo de trigo (2,5g) para *M. domestica*. Para *C. putoria* dieta à base de carne bovina moída putrefata (5g), ambas em copinhos plásticos onde foram colocadas 10 neo larvas em cada respectiva dieta (Figura 4). O experimento foi observado diariamente, e as larvas e as pupas contadas e pesadas. Em paralelo as larvas foram coletadas para microscopia eletrônica. As larvas maduras foram alocadas em tubos de ensaio contendo vermiculita que foram tampados com algodão hidrófobo para pupação, emergência dos adultos e observação das alterações morfológicas. Os experimentos foram conduzidos em câmara climatizada tendo a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e 12h de fotofase. Os resultados são as médias de dois bioensaios, cada um com 5 repetições.



Figura 4: Dieta à base de carne bovina moída putrefata para o bioensaios com neo larvas.

3.3.2. Bioensaio com adultos

Três gaiolas para cada grupo tratado e controle, cada uma contendo cinco adultos recém-emergidos foram utilizadas (Figura 5). A partir de então foram oferecidos ao grupo tratado 2,5mL de suspensão bacteriana misturados a 2,5mL de solução 50% de açúcar. Para o grupo controle foram oferecidos 2,5mL de água destilada misturada a

2,5mL de solução 50% de açúcar. O bioensaio foi acompanhado diariamente durante quatro dias para a verificação da mortalidade de acordo com Indrasith et al. (94). Os resultados são as médias de dois bioensaios, cada um com 3 repetições.

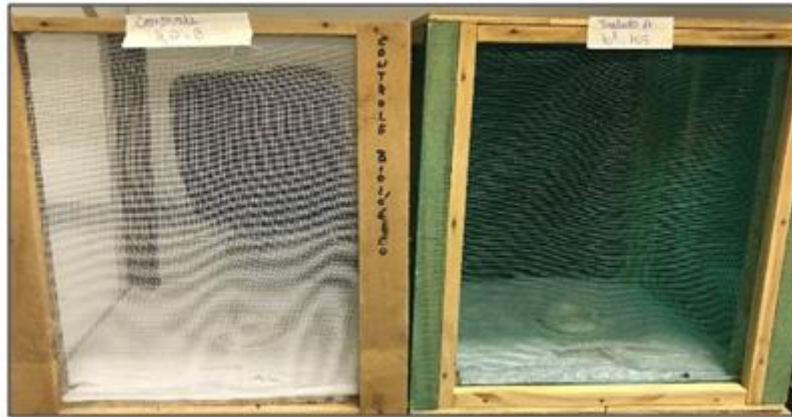


Figura 5: Gaiolas do bioensaio com adultos recém emergidos.

3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As alterações ultraestruturais ocorridas no intestino das larvas devido à ingestão de esporos bacterianos foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

As células bacterianas utilizadas neste estudo também foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, a fim de analisar detalhes de sua ultraestrutura.

3.4.1. Dissecção das larvas

Para dissecção do trato digestório foram extraídas larvas com 6h, 12h, 24h e 48h de alimentação na dieta bacteriana e no controle (Figura 6). A seção utilizada foi a porção posterior do intestino médio, como descrito por Ruiu et al. (45), identificada pela proximidade dos túbulos de Malpighi.

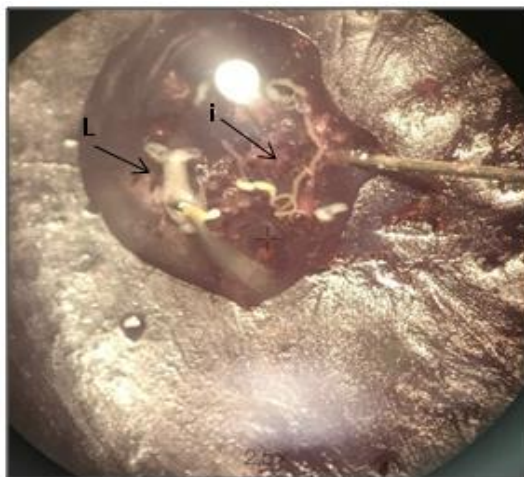


Figura 6: Dissecção do trato digestório de *Musca domestica*
L: larva; i: intestino.

3.4.2. Processamento das amostras (trato digestório)

O material dissecado foi fixado com glutaraldeído (G.A.) a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M suplementado com sacarose e estocado em tubos Eppendorf® na geladeira a 4°C por volta de 72h. Posteriormente o material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M suplementado com sacarose 0,1M por três vezes consecutivas, cada uma por 10 min, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 40 min no escuro (1:1), lavado por três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e desidratado em série ascendente de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% cada etapa com duração de 15 min e 100% por três vezes consecutivas. Em seguida o material foi infiltrado com uma mistura de acetona 100% e resina Epoxi (Epon) (proporção 2:1) por 4h, posteriormente na proporção de 1:1 *overnight* (aproximadamente por 12h), e em Epon puro por 6h, incluído em Epon e polimerizado em estufa por 72h a 60°C. Os blocos polimerizados foram levados à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth (IOC/Fiocruz) para os cortes ultrafinos em ultramicrótomo Leica Ultracut S, contrastação com acetato de uranila a 5% em escuridão total e em seguida com citrato de chumbo a 2%. Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol JEM-1011.

3.4.3. Processamento das amostras (bactérias)

O *pellet* bacteriano foi fixado com glutaraldeído (G.A.) a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio suplementado com sacarose (pH 7,2) e estocado em tubos Falcon na

geladeira a 4°C por volta de 1h. Posteriormente o material foi centrifugado a 4500 rpm por 10 min, depois foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M suplementado com sacarose 0,1M por três vezes consecutivas. A cada etapa o material foi vortexado e centrifugado a 4500 rpm por 10 min.

As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 30 min no escuro (1:1), lavado por três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e desidratado em série ascendente de acetona a 30%, 50%, 70%, 90%. Em cada uma das etapas o material foi vortexado e centrifugado a 4500 rpm por 10 min, e em acetona 100% por três vezes consecutivas. Em seguida o material foi infiltrado com uma mistura de acetona 100% e resina Epoxi (Epon) (proporção 2:1) por 4h, posteriormente na proporção de 1:1 *overnight* (aproximadamente por 12h), e em Epon puro por 4h, incluído em Epon e polimerizado em estufa por 72 h a 60°C. Os blocos foram levados à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth (IOC/Fiocruz) para os cortes ultrafinos em ultramicrotomo Leica Ultracut S, contrastação com acetato de uranila a 5% em escuridão total e em seguida com citrato de chumbo a 2%. Os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol JEM-1011.

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As bactérias utilizadas neste estudo foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação de suas estruturas morfológicas, assim como a formação de esporos e cristais.

3.5.1. Preparo das amostras bacterianas

O *pellet* bacteriano foi fixado e pós-fixado conforme o preparo das amostras bacterianas para MET.

O material foi aderido em lamínulas revestidas com poli-L-lisina por 48h em placa de Elisa. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série ascendente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% por 10 min, e em etanol 100% por três vezes consecutivas. Em seguida o material foi encaminhado para Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth (IOC/Fiocruz) para secagem ao ponto crítico (40 min). Posteriormente as lamínulas foram aderidas com fita dupla face nos suportes metálicos

stubs, e foram novamente encaminhadas à plataforma de microscopia eletrônica para metalização com ouro, e análise em microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM-6390LV.

3.6. Análise dos dados

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA: $P \leq 0,05$) e o teste de Tukey ($P \leq 0,05$) foi utilizado para a análise da significância estatística. Já o desvio padrão foi calculado através da média dos experimentos. O pacote estatístico Graphpad® InStat foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos. A mortalidade do estágio larval foi contabilizada pelas larvas que não se tornaram pupas, a mortalidade pupal foi contabilizada através das pupas que não se tornaram adultos e a mortalidade de neo larva a adulto foi contabilizada pelas larvas que não chegaram a adultos. A mortalidade foi calculada seguindo a fórmula (Mortalidade%=100–Viabilidade%). A fórmula de Abbott (108) foi aplicada para a correção dos resultados de mortalidade. A concentração da preparação que induz a morte de 50% dos insetos em teste (CL_{50}) foi determinada após 48h de exposição e foi expressa na diluição final da concentração letal ou UFC/mL e os resultados foram analisados pelo programa Probit e os valores de CL_{50} e teste de normalidade ($<0,05$) foram médias de dois experimentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos subletais

4.1.1. *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)

Os efeitos subletais causados pelas estirpes de *B. laterosporus*, incluem atraso no desenvolvimento pós-embrionário e redução no peso das pupas, quando comparados ao grupo controle.

Ruiu et al. (40,109) aplicaram *B. laterosporus* no controle de *M. domestica* e observaram um aumento significativo no tempo de desenvolvimento larval dos insetos, redução no peso das pupas e redução na taxa de emergência de adultos, quando as larvas

foram tratadas com concentrações subletais de esporos em sua dieta. Também observamos uma redução no peso das pupas tratadas com a concentração de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (Tabela 7) e um aumento significativo na duração em dias do desenvolvimento pós-embrionário de todos os estágios analisados (larval, pupal e de larva ao adulto (total) quando as larvas de *M. domestica* foram tratadas com suspensões de esporos da mesma bactéria, porém com estirpes diferentes (Tabelas 4, 6 e 7).

Ferreira et al. (39) observaram em seu estudo que a estirpe Bon 707 não alterou o peso das pupas, corroborando com nossos resultados sobre esta estirpe (Tabela 5). Porém, a mesma estirpe causou um pequeno atraso no desenvolvimento de larva ao adulto (Tabela 5).

Em relação ao atraso no desenvolvimento pós-embrionário ocasionado pelas estirpes de *B. laterosporus* em estudo, foi visto que isto ocorreu nas concentrações subletais, ou seja, as concentrações com menor índice de letalidade que são as menores concentrações: 10^7 e 10^6 UFC/mL (Tabelas 4, 5, 6 e 7). O mesmo foi observado por Zimmer et al. (88) quando as larvas de *M. domestica* foram tratadas com concentrações subletais ($1,0 \times 10^7$ UFC/mL) de *B. laterosporus*, pois em sua maioria os períodos mais longos foram associados às concentrações mais baixas.

Tabela 4: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* NRS590 nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório.

Tratamento (1ml/2,5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso pupal
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP (mg)
Controle com água	4,73 ± 0,44 _a	4 – 5	5,72 ± 0,45 _a	5 – 6	12,02 ± 0,18 _a	12 – 12	11,50 ± 1,52 _a
$3,3 \times 10^7$ UFC/mL	5,10 ± 0,31 _{b,c}	5 – 5	6,10 ± 0,31 _{b,c}	6 – 6	11,94 ± 0,41 _a	11 – 12	10,71 ± 1,96 _a
$3,3 \times 10^6$ UFC/mL	6,03 ± 0,19 _{c,b} ***	6 – 6	7,00 ± 0,27 _{c,b} ***	7 – 7	11,45 ± 1,57 _c ***	11 – 13	11,03 ± 2,60 _a

As letras a, b, c são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão.

Tabela 5: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon707** nas concentrações de $2,6 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,6 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório.

Tratamento (1ml/2,5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso pupal Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	4,07 ± 0,44 _a	4 – 4	5,23 ± 0,76 _a	5 – 6	11,03 ± 1,29 _a	11 – 12	9,87 ± 0,22 _a
2,6 x 10 ⁷ UFC/mL	4,11 ± 0,93 _a	4 – 5	5,72 ± 0,33 _a	5 – 6	12,42 ± 0,93 _b	12 – 13	9,00 ± 0,98 _a
2,6 x 10 ⁶ UFC/mL	5,01 ± 0,08 _a	5 – 5	5,98 ± 0,19 _a	5 – 6	11,29 ± 0,87 _a	11 – 12	9,15 ± 1,01 _a

As letras a, b são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.
VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão.

Tabela 6: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon712** nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embriônico e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório.

Tratamento (1ml/2,5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso pupal Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	4,48 ± 0,61 _a	4 – 5	5,78 ± 0,23 _a	5 – 6	11,14 ± 0,08 _a	11 – 11	11,39 ± 1,55 _a
3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	5,10 ± 0,81 _{b,c} ***	5 – 6	6,10 ± 0,51 _{b,c} ***	6 – 7	11,94 ± 0,41 _{b,c}	11 – 12	10,70 ± 1,96 _a
3,3 x 10 ⁶ UFC/mL	6,37 ± 0,69 _{c,b} ***	6 – 7	7,00 ± 0,27 _{c,b} ***	7 – 7	11,75 ± 1,57 _{c,b} ***	12 – 13	11,03 ± 2,01 _a

As letras a, b, c são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.
VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Tabela 7: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* Shi 3 nas concentrações de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório.

Tratamento (1ml/2,5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso pupal
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP (mg)
Controle com água	4,73 ± 0,44 _a	4 – 5	5,72 ± 0,45 _{a,b}	5 – 6	12,02 ± 0,68 _a	12 – 12	11,50 ± 1,52 _a
2,2 x 10 ⁷ UFC/mL	6,21 ± 0,83 _{b,c} ***	6 – 7	6,80 ± 0,40 _{b,c} ***	6 – 7	13,42 ± 0,91 _{b,c} ***	13 – 14	8,67 ± 2,88 _b ***
2,2 x 10 ⁶ UFC/mL	5,64 ± 0,67 _{c,b}	5 – 6	6,62 ± 0,49 _{c,b} ***	6 – 7	13,29 ± 0,96 _{c,b} ***	13 – 14	12,51 ± 2,94 _a

As letras a, b, c são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Houve redução estatisticamente significativa sobre o peso pupal e aumento significativo na duração em dias do desenvolvimento pós-embrionário quando se usou a suspensão de esporos (Tabela 8). No entanto, não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa dentro dos grupos controle (com água e com meio de cultura NYSM), nem do sobrenadante (SN) em nenhum dos períodos analisados: 24h, 48h e 72h (Tabela 8).

Zimmer et al. (88) avaliaram em seu estudo a bioatividade de *B. thuringiensis israelensis* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *M. domestica* e observaram um atraso significativo nos estágios larval e pupal. Neste estudo também observamos um atraso estatisticamente significativo nos estágios larval e pupal quando os insetos foram tratados com as duas concentrações subletais (Tabela 8). No entanto, apenas a menor concentração de $2,4 \times 10^6$ UFC/mL causou atraso em todos os estágios de desenvolvimento analisados: larval, pupal e de larva ao adulto (Tabela 8).

Em relação ao peso das pupas, foi observado um aumento estatisticamente significativo sobre o peso das pupas tratadas com as duas concentrações subletais

(Tabela 8). Em contraste, Zimmer et al. (88) não observaram nenhuma alteração sobre o peso pupal.

Estes dados, assim como de outros estudos, sugerem que o efeito tóxico bacteriano pode retardar significativamente o desenvolvimento das larvas, desse modo levando a um período larval e pupal prolongado (88,110).

Tabela 8: Efeito subletal da suspensão de esporos *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) no intervalo de 72h de crescimento sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso pupal de *Musca domestica* em condições de laboratório.

Tratamento (1ml/2,5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso pupal Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	4,16 ± 0,37 _a	4 - 5	4,98 ± 0,55 _a	4 - 5	10,55 ± 0,69 _a	10 - 11	11,45 ± 2,31 _a
2,4 x 10 ⁷ UFC/mL	6,55 ± 4,40 _{b,c}	6 - 10	6,78 ± 3,93 _{b,c}	6 - 10	10,46 ± 0,67 _a	10 - 11	14,46 ± 2,36 _{b,c}
2,4 x 10 ⁶ UFC/mL	6,64 ± 4,78 _{c,b***}	6 - 11	7,12 ± 3,33 _{c,b***}	7 - 10	10,47 ± 1,69 _b	10 - 12	13,51 ± 1,08 _{c,b}
Controle NYSM	4,69 ± 1,35 _a	4 - 6	5,30 ± 1,04 _a	5 - 6	10,20 ± 0,53 _a	10 - 11	10,13 ± 1,08 _a
SN 24h	5,16 ± 1,34 _a	5 - 6	5,71 ± 1,14 _a	5 - 6	10,30 ± 0,58 _a	10 - 11	11,22 ± 1,32 _a
SN 48h	5,66 ± 1,09 _a	5 - 6	6,02 ± 1,31 _a	6 - 7	10,50 ± 0,67 _a	10 - 11	11,12 ± 1,34 _a
SN 72h	5,63 ± 1,27 _a	5 - 6	6,25 ± 0,98 _a	6 - 7	10,51 ± 0,79 _a	10 - 11	11,14 ± 1,79 _a

As letras a, b, c são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Poderíamos especular sobre os motivos que levaram a esses efeitos subletais: mudanças hormonais? Microbiota? Interação entre microbiota e hormônio?

Os dípteros muscoides são insetos holometábolos (Figura 7), que passam por intensa metamorfose ao longo do seu desenvolvimento. Os principais hormônios envolvidos no desenvolvimento, na metamorfose e na reprodução são os neuro-hormônios, o hormônio juvenil e a ecdisona (111,112). A ecdisona é o hormônio que controla a muda de todos os artrópodes em interação com o hormônio juvenil, é secretada por determinadas glândulas e circula pela hemolinfa dos insetos agindo diretamente sobre as células epidérmicas (112).

Desta forma, qualquer alteração na ação dos hormônios durante este período de metamorfose pode resultar na interrupção ou na anormalidade do desenvolvimento e da reprodução dos insetos, através de descontroles ou disfunções hormonais (113).



Figura 7: Ciclo de vida das moscas (Fonte: areaprojectojns.blogspot.com/2009/11/ciclo-de-vida)

Nosso conhecimento atual sobre as funções microbianas no intestino de insetos ainda é limitado em relação à imensa diversidade de espécies existentes. Há evidências convincentes de que as bactérias intestinais podem promover o crescimento sistemático e o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*, sendo capazes de modular a sinalização hormonal de seus hospedeiros (114,115). No entanto, alterações na microbiota que podem ser geradas pela invasão de um novo microrganismo ou pela perda de microrganismos que são habitantes naturais (mutualísticos), podem afetar o inseto de forma positiva ou não (116). Ainda foi observado que a microbiota nativa de *D. melanogaster* influencia a homeostase das células e que a resposta do hospedeiro

depende da carga bacteriana e da composição da comunidade bacteriana no intestino médio do inseto (116,117).

Isto nos leva a questionar até que ponto os microrganismos intestinais comensais das moscas utilizadas no presente estudo poderiam estar sendo afetados pela introdução massiva das estirpes bacterianas aplicadas nas dietas, afetando assim os resultados obtidos.

Maior foco aos estudos que relacionam as alterações na microbiota, no metabolismo e nos hormônios dos insetos, entre outros fatores, precisa ser estimulado para que então possamos revelar os reais fatores envolvidos nas alterações do desenvolvimento pós-embriônico dos insetos tratados com concentrações subletais de bactérias entomopatogênicas.

4.1.2. *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818)

Oliveira et al. (104) avaliaram o potencial de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 907 e observaram uma redução no peso das larvas maduras quando *C. putoria* foi alimentada com concentrações subletais. De tal forma nossos resultados apresentaram redução significativa sobre peso das larvas maduras quando as neo larvas de *C. putoria* foram tratadas com suspensões de esporos tanto de *B. laterosporus* (Tabelas 10 a 12) quanto de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* (Tabela 13) sugerindo inibição da alimentação.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em todos os estágios do desenvolvimento pós-embriônico analisados: larval, pupal e de larva ao adulto (total).

O atraso no desenvolvimento larval, pupal e de larva ao adulto foi avaliado no tratamento com a estirpe Bon 707, apenas na maior concentração testada que foi de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (Tabela 10). No tratamento com as demais estirpes de *B. laterosporus* o atraso no desenvolvimento pós-embriônico ocorreu nas concentrações subletais: 10^7 UFC/mL e 10^6 UFC/mL (Tabelas 11 e 12). No tratamento com a estirpe Btk 176 foi observado um pequeno atraso no desenvolvimento larval quando as neo larvas foram tratadas com a concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (Tabela 13). Não foi avaliada alteração sobre o desenvolvimento pupal. No entanto, houve um atraso significativo no

desenvolvimento de larva ao adulto em todas as concentrações de esporos testadas quando comparadas ao grupo controle (Tabela 13).

Na Tabela 9 é possível observar uma pequena aceleração no desenvolvimento pupal das moscas tratadas com esta estirpe na concentração de $3,3 \times 10^6$ UFC/mL, enquanto que a concentração de 10^7 UFC/mL não diferenciou estatisticamente do grupo controle (Tabela 9).

Ferreira et al. (39) e Carramashi et al. (38), observaram que a estirpe Bon 707 não influenciou a atividade alimentar de *M. domestica* e *C. megacephala*. Uma vez que a natureza específica da entomopatogenicidade de *B. laterosporus* não está totalmente esclarecida, ainda é prematuro determinar se a inibição da alimentação observada é uma característica específica desta linhagem.

Tabela 9: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* NRS590 nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Tratamento (3ml/5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso larval
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP (mg)
Controle com água	3,86 ± 0,40 _a	3 - 4	5,22 ± 0,70 _a	5 - 6	10,50 ± 0,59 _a	10 - 11	33,47 ± 4,09 _a
$3,3 \times 10^7$ UFC/mL	4,04 ± 0,04 _a	4 - 4	5,00 ± 0,98 _a	5 - 6	10,15 ± 0,79 _a	10 - 11	31,72 ± 6,86 _a
$3,3 \times 10^6$ UFC/mL	3,79 ± 0,40 _a	3 - 4	4,74 ± 0,44 _b	4 - 5	10,48 ± 0,50 _a	10 - 11	34,14 ± 4,71 _a

As letras a, b são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão.

Tabela 10: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon707** nas concentrações de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 1), $1,8 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 2) e $1,8 \times 10^5$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Tratamento (3ml/5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso larval Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	4,56 ± 0,91 _a	4 - 6	5,46 ± 0,55 _a	5 - 6	9,49 ± 1,56 _a	9 - 11	48,16 ± 7,90 _a
1,8 x 10 ⁷ UFC/mL	6,93 ± 0,97 _b ^{***}	7 - 8	7,68 ± 0,91 _b ^{***}	7 - 9	10,73 ± 2,96 _b ^{***}	11 - 13	32,39 ± 8,76 _b ^{***}
1,8 x 10 ⁶ UFC/mL	4,42 ± 0,87 _a	4 - 6	5,41 ± 0,76 _a	5 - 6	9,61 ± 0,56 _a	9 - 11	51,91 ± 9,40 _a
1,8 x 10 ⁵ UFC/mL	5,05 ± 1,41 _a	5 - 6	5,94 ± 1,39 _a	6 - 7	9,69 ± 0,81 _a	9 - 11	44,32 ± 12,57 _a

As letras a, b, c, d são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Tabela 11: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon712** nas concentrações de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Tratamento (3ml/5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso larval Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	3,48 ± 0,50 _a	3 - 4	4,48 ± 0,50 _a	4 - 5	9,30 ± 0,47 _a	9 - 9	36,12 ± 4,37 _a
3,3 x 10 ⁷ UFC/mL	3,61 ± 0,58 _a	3 - 4	4,81 ± 0,74 _a	4 - 5	10,22 ± 0,94 _{b,c} ^{***}	10 - 11	32,87 ± 6,49 _{b,c}
3,3 x 10 ⁶ UFC/mL	3,92 ± 0,98 _b	3 - 5	5,44 ± 0,66 _b ^{***}	5 - 6	9,97 ± 1,05 _{c,b}	10 - 11	30,13 ± 6,25 _{c,b} ^{***}

As letras a, b, c são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Tabela 12: Efeito subletal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Tratamento (3ml/5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso larval Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	3,61 ± 0,42 _a	3 - 4	4,77 ± 0,39 _a	4 - 5	10,01 ± 1,37 _a	10 - 11	37,01 ± 3,44 _a
$2,2 \times 10^8$ UFC/mL	3,62 ± 0,49 _a	3 - 4	4,73 ± 0,91 _a	4 - 5	10,73 ± 2,96 _b ***	11 - 13	35,99 ± 4,86 _a
$2,2 \times 10^7$ UFC/mL	3,59 ± 0,49 _a	3 - 4	5,41 ± 0,76 _{b,c}	5 - 6	9,61 ± 0,56 _a	9 - 11	34,89 ± 4,63 _a
$2,2 \times 10^6$ UFC/mL	3,92 ± 1,09 _b	3 - 5	5,94 ± 0,99 _{c,b}	5 - 7	9,69 ± 0,81 _a	9 - 11	30,84 ± 5,11 _b ***

As letras a, b, c são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Tabela 13: Efeito subletal da suspensão de esporos *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) no intervalo de 72h de crescimento sobre a duração (em dias) do desenvolvimento pós-embrionário e o peso larval de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Tratamento (3ml/5g de dieta)	Estágio de desenvolvimento						Peso larval Média ± DP (mg)
	Larval		Pupal		Larva ao adulto (total)		
	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	Média ± DP	VI	
Controle com água	3,67 ± 0,47 _a	3 - 4	4,64 ± 0,48 _a	4 - 5	9,19 ± 0,10 _a	9 - 9	36,99 ± 6,63 _a
$2,4 \times 10^8$ UFC/mL	3,76 ± 0,67 _a	3 - 4	4,57 ± 0,50 _a	4 - 5	9,87 ± 0,99 _{b,c,d} ***	10 - 11	31,55 ± 3,46 _{b,c,d} ***
$2,4 \times 10^7$ UFC/mL	4,18 ± 0,80 _b	4 - 5	4,95 ± 0,74 _a	4 - 5	10,22 ± 1,73 _{c,b,d} ***	10 - 12	33,13 ± 9,07 _{c,b,d}
$2,4 \times 10^6$ UFC/mL	3,71 ± 0,54 _a	3 - 4	4,80 ± 0,51 _a	4 - 5	10,14 ± 0,82 _{d,b,c} ***	10 - 11	32,90 ± 7,17 _{d,b,c}
Controle NYSM	3,61 ± 0,49 _a	3 - 4	4,56 ± 0,50 _a	4 - 5	9,41 ± 0,49 _a	9 - 10	37,14 ± 5,28 _a
SN 72h	3,68 ± 0,46 _a	3 - 4	4,72 ± 0,51 _a	4 - 5	9,46 ± 0,50 _a	9 - 10	34,88 ± 6,15 _a

As letras a, b, c, d são usadas para demonstrar diferenças estatísticas calculadas por ANOVA 1, ($P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1981) seguidos por teste de Tukey.

VI = variação de intervalo em dias. Valores são médias ± DP= Desvio padrão. Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

4.2. Letalidade nos estágios de desenvolvimento e CL50

4.2.1. *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)

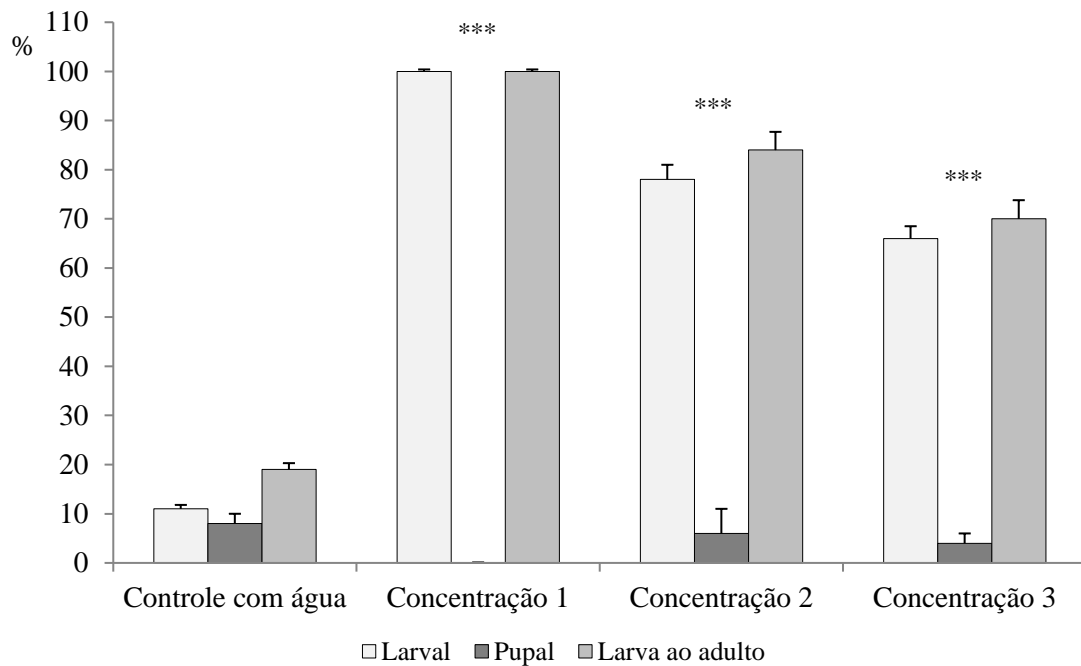
Os bioensaios com as quatro estirpes de *B. laterosporus* testadas: NRS 590 (Figura 8), Bon 707 (Figura 9), Bon 712 (Figura 10) e Shi 3 (Figura 11) contra as neo larvas de *M. domestica* mostraram sua atividade entomopatogênica, ocasionando mortalidade larval, pupal e de larva ao adulto (total) estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle.

A estirpe NRS 590 causou mortalidade de 100% das larvas tratadas com a suspensão esporulada na concentração de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 8), corroborando os resultados de Ruiu et al. (40) que também observaram 100% de mortalidade nas larvas de *M. domestica* quando estas foram tratadas com esporos de *B. laterosporus* na concentração de $1,3 \times 10^9$ UFC/g.

Ferreira et al. (39) avaliaram o efeito letal da estirpe Bon 707 sobre as larvas de *M. domestica* e obtiveram 70% de mortalidade quando as mesmas foram tratadas com a concentração de $7,76 \times 10^8$ esporos/g. Também avaliamos o potencial desta estirpe sobre *M. domestica* e no tratamento com a maior concentração testada ($2,6 \times 10^8$ UFC/mL= $1,04 \times 10^8$ esporos/g) a letalidade larval foi de 96% e a total somando 98%. No tratamento com a concentração 2 ($2,6 \times 10^7$ UFC/mL) a mortalidade larval foi de 56% e a total foi 59%, e no tratamento com a concentração 3 ($2,6 \times 10^6$ UFC/mL) a mortalidade larval foi de 32% e a total chegou a 50% (Figura 9).

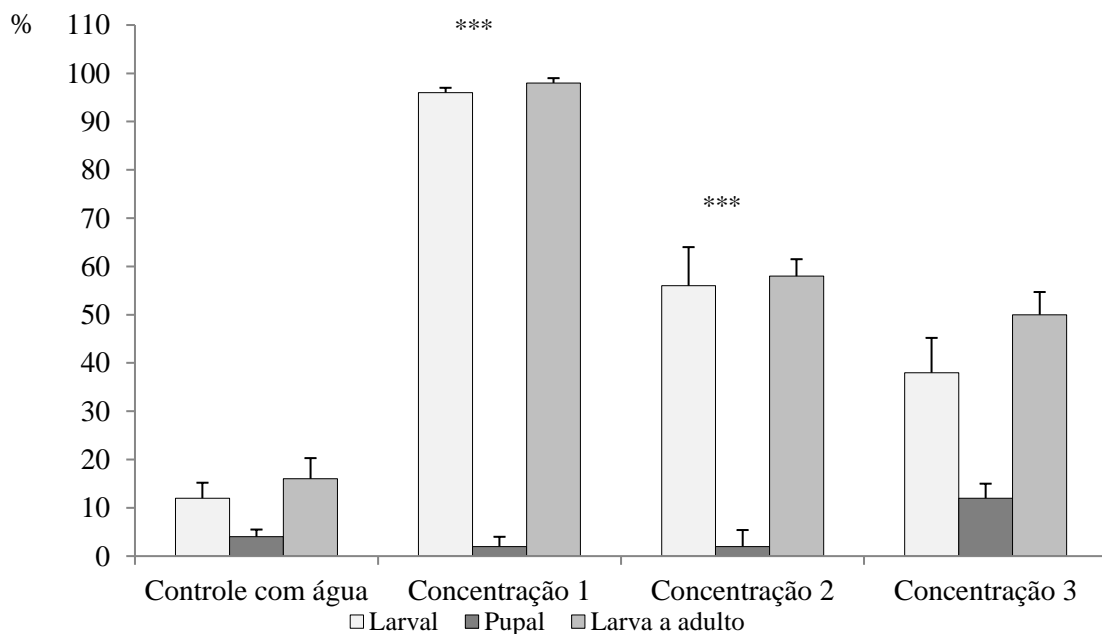
No bioensaio com a estirpe Bon 712 a mortalidade larval foi de 99% (Figura 10) e com a estirpe Shi 3 a mortalidade larval chegou a 98,5% (Figura 11), ambas na maior concentração testada (10^8 UFC/mL) e na segunda concentração (10^7 UFC/mL) a mortalidade de ambas foi superior a 60%.

Zimmer et al. (88) observaram em seu estudo que *B. laterosporus* matou 53% das larvas de *M. domestica*, quando 35mL de suspensão bacteriana na concentração de 1×10^9 UFC/mL foi misturada a com 30g de dieta composta de pó de carne desidratada e serragem (proporção de 2: 1), sendo 1g de dieta por larva (n=30).



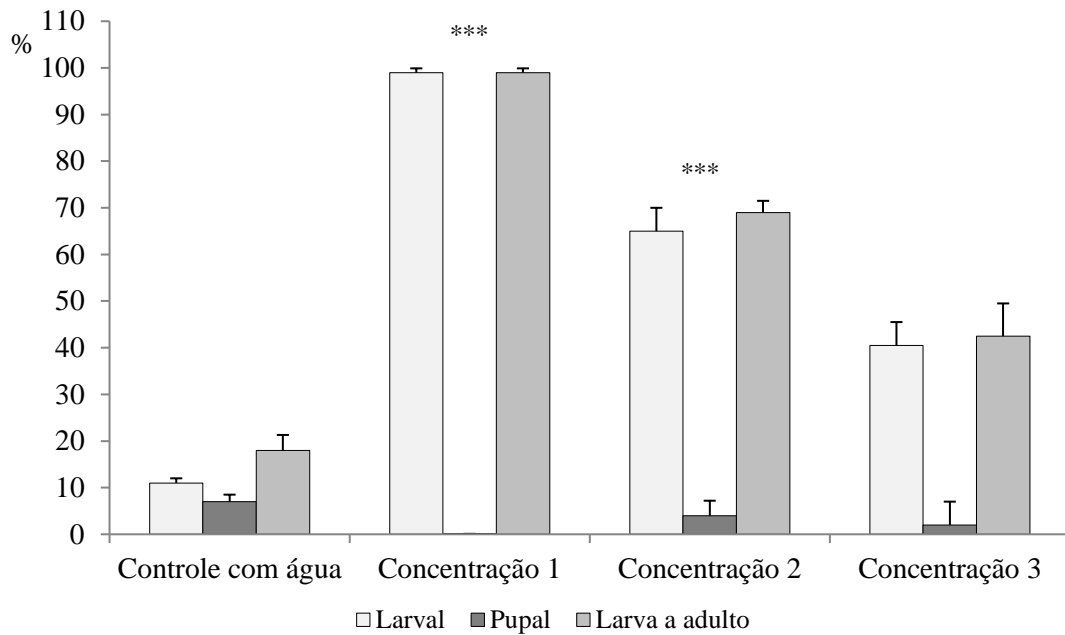
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 8: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Musca domestica* em condições de laboratório.



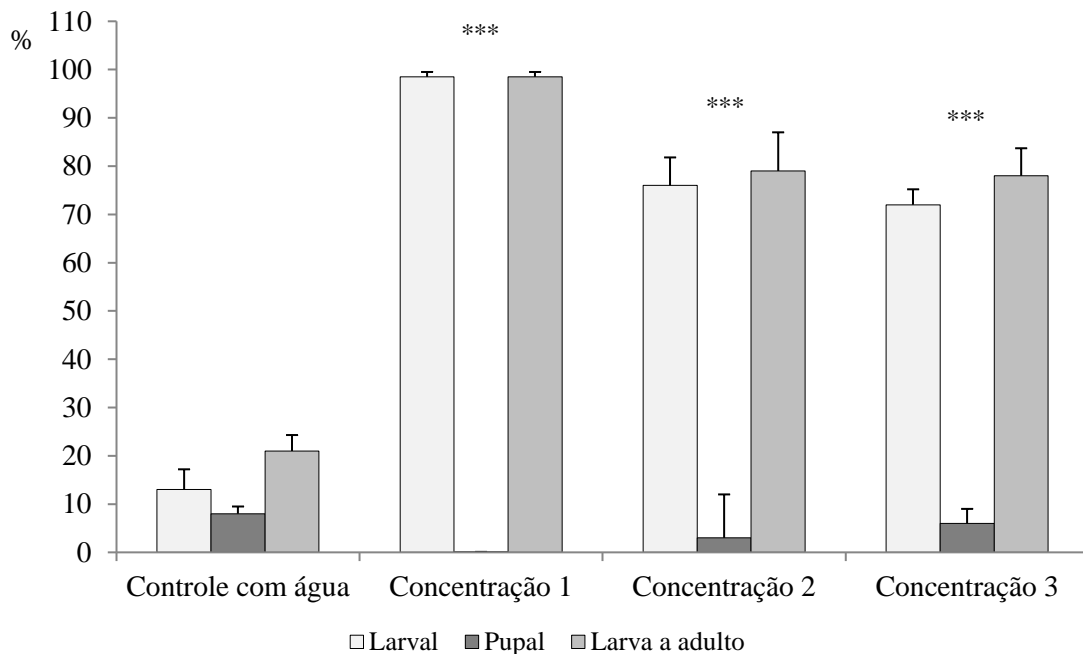
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 9: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 707** nas concentrações de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,6 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,6 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Musca domestica* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 10: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Musca domestica* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 11: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Musca domestica* em condições de laboratório.

O teste com a estirpe esporulada Btk 176 resultou em eficácia desta espécie bacteriana sobre *M. domestica* (Figura 12). O grupo controle (controle com água e controle com meio NYSM) não apresentou diferenças estatísticas quando comparados entre si (Figura 12).

Johnson et al. (107) em 1998 observaram que o sobrenadante do crescimento de sorotipos de *B. thuringiensis* induziram mortalidade significativa em *M. domestica* tratadas após 48h. Em contraste, o controle negativo com a cepa não produtora de β -exotoxina não causou mortalidade. Neste estudo o sobrenadante (SN) não causou mortalidade estatisticamente significativa nem para as larvas, nem para os adultos de *M. domestica* (Figuras 12 e 24), sugerindo então que a estirpe Btk 176 de *B. thuringiensis* var *kyushuensis* não é produtora de β -exotoxina, pois o sobrenadante foi tratado de acordo com Johnson et al. (107), sendo autoclavado para eliminação das demais toxinas, no intuito de selecionar apenas a β -exotoxina, que, de acordo com Sharma e Sahu (118), é uma exotoxina termoestável secretada no sobrenadante. Estudos indicam que alguns isolados de *B. thuringiensis* com potencial de ação sobre larvas e adultos de *M. domestica* são produtores de β -exotoxina (107,119). β -exotoxina, também conhecida como thuringiensina (*thu*) possui toxicidade contra diferentes ordens de insetos (120). No entanto, esta exotoxina também possui atividade hemolítica e citolítica contra organismos não-alvo, vertebrados e inclusive contra humanos (121–124), pois sua atividade inseticida é derivada da sua semelhança com o ATP (trifosfato de adenosina) (123,125). Deste modo a thuringiensina atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo ATP, causando efeitos teratogênicos e mutagênicos também em vertebrados (126).

Por isto, desde a década de 90 a Organização Mundial de Saúde recomenda não utilizar estirpes produtoras de thuringiensina na formulação de biopesticidas (121,127). Sendo assim, a produção de thuringiensina é um fator limitante na seleção de novas linhagens de *B. thuringiensis* com potencial bioinseticida (120,128).

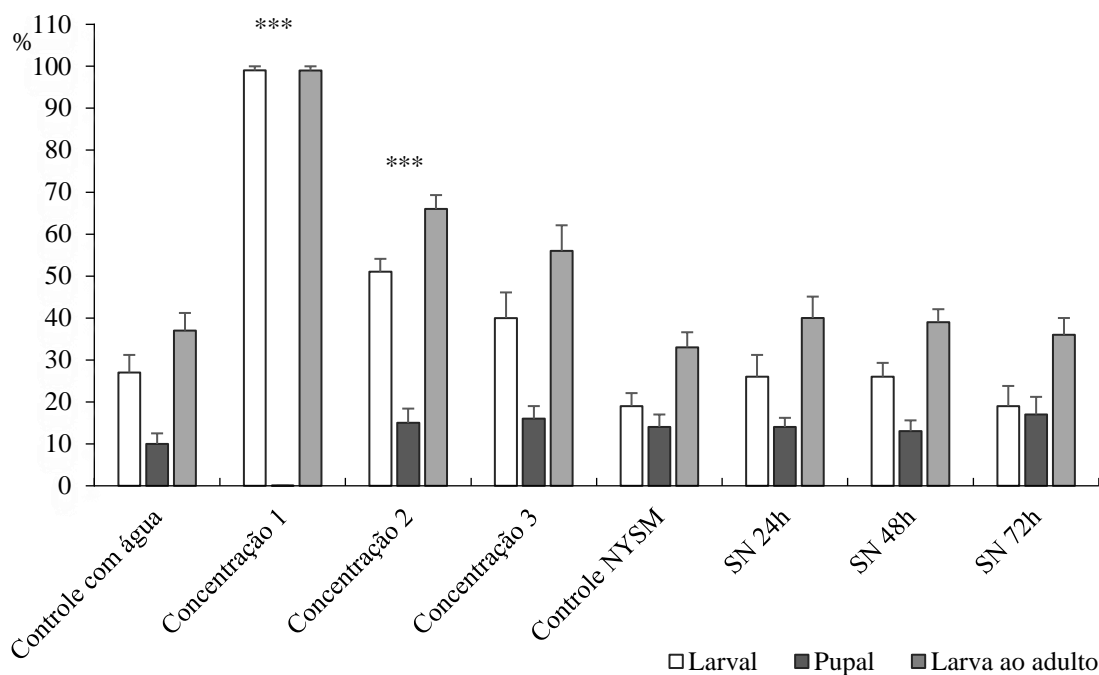
Merdan (91) avaliou 87,5% de mortalidade sobre as larvas de *M. domestica* alimentadas com fezes de galinha contaminadas por *B. thuringiensis* (preparação laboratorial) a 1,0 μ l/g. Uma mortalidade semelhante foi avaliada por Mwamburi et al. (92), onde 86% das larvas foram mortas quando *M. domestica* foi alimentada com dieta

contendo 100g da formulação de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, uma concentração de 10^8 esporos/mL. A mortalidade só chegou a 86% no sétimo dia de tratamento.

Zimmer et al. (88) testaram a eficácia de *B. thuringiensis* var. israelensis e *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre larvas de *M. domestica* e a mortalidade larval foi de 40% e 34% respectivamente, ambas na concentração de 1×10^9 UFC/mL. Já a mortalidade pupal foi avaliada nas concentrações mais baixas (10^8 e 10^7 UFC/mL), todas com mortalidade inferior a 40%.

Neste estudo a mortalidade larval na maior concentração testada ($2,4 \times 10^8$ UFC/mL) foi de 99%, 51% no tratamento com a concentração 2 e a total foi 66%. Já no tratamento com a concentração 3 a mortalidade larval foi de 40% e a total chegou a 56% (Figura 12). Esses dados corroboram os demais estudos que avaliaram a atividade de sorotipos de *B. thuringiensis*. Lonc et al. (90) relataram 70% de mortalidade larval em seu estudo quando *M. domestica* foi tratada com esporos de *B. thuringiensis* israelensis na concentração de 10^9 UFC/mL.

Bacillus thuringiensis thuringiensis e *Bacillus thuringiensis* kenyae foram testados em larvas de *M. domestica* em uma dosagem de 20mg/g e causaram mortalidade de 83% e 97% respectivamente (89). Ainda neste estudo foi observado que a mortalidade larval chegou a 83% e a 97% quando os esporos de *B. thuringiensis* thuringiensis e de *B. thuringiensis* kenyae não foram liofilizados, pois segundo Angelo et al. (129) o processo de liofilização é capaz de diminuir a concentração de toxinas e/ou ocasionar a perda de uma variedade de toxinas que podem atuar sinergicamente para eficácia do tratamento.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 12: Efeito letal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) nos períodos de 24, 48 e 72h de crescimento sobre *Musca domestica* em condições de laboratório.

Com base nos dados de estudos anteriores, acredita-se que a letalidade desses agentes entomopatogênicos esteja correlacionada com a quantidade de esporos ingeridos pelos insetos (40,88). Essa hipótese também foi corroborada pelo estudo de Ferreira et al. (39) em que os níveis de mortalidade de *M. domestica* tratadas com a estirpe Bon 707 variaram de acordo com a concentração de esporos consumidos por neo larvas. Os maiores níveis de bioatividade tanto de estirpes de *B. laterosporus* quanto de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* Btk176 foram registradas na maior concentração utilizada (10^8 UFC/mL), ambas as espécies bacterianas permanecendo com níveis altos de letalidade mesmo após os resultados serem corrigidos com o grupo controle (Figura 13).

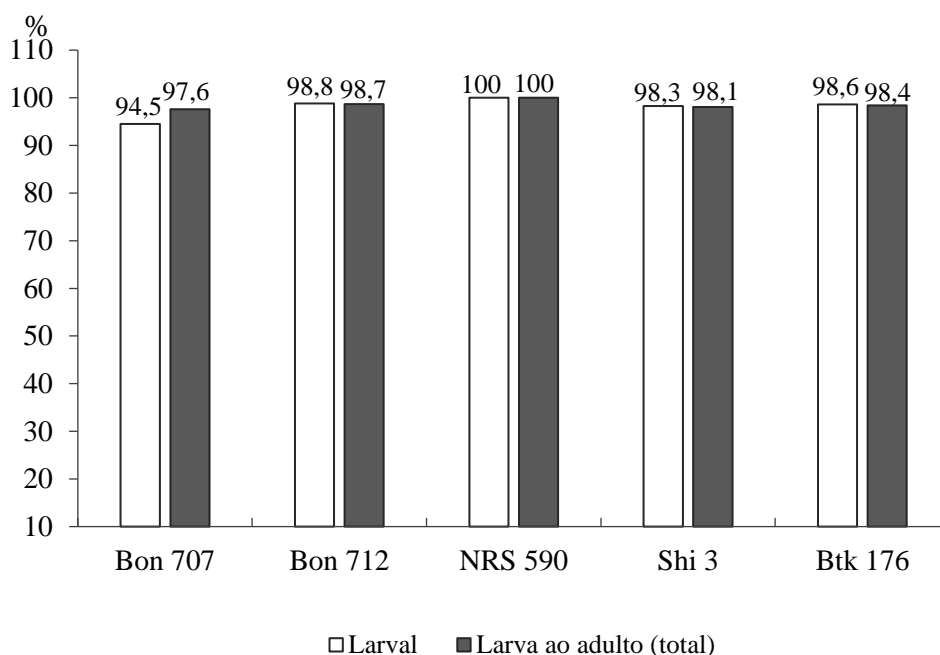


Figura 13: Mortalidade corrigida com a fórmula de Abbott (Abbott, 1925) de *M. domestica* (Diptera: Muscidae) alimentada com suspensões de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* e *Brevibacillus laterosporus* nas concentrações de 10^8 UFC/mL, em condições de laboratório.

Avaliando que as concentrações de esporos utilizadas no presente estudo ainda são inferiores quando comparadas com as de outros trabalhos, que o meio de crescimento é simples e a mortalidade foi alcançada em um tempo menor em comparação a outros testes, é possível concluir que as estirpes deste estudo (Figuras 8 a 12) têm potencial superior para o controle de *M. domestica*, especialmente quando comparamos com alguns trabalhos presentes na Tabela 1.

A concentração letal que induz a morte de 50% das larvas (CL_{50}) foi calculada no intuito de verificar o potencial das estirpes para utilização como larvicida (Tabela 14).

Ruiu et al. (109) avaliaram a CL_{50} de *B. laterosporus* no valor de $0,72 \times 10^8$ e $1,72 \times 10^8$ para larvas de *M. domestica*.

Ferreira et al. (39) encontraram um valor de $1,66 \times 10^8$ para CL_{50} da estirpe Bon707 sobre as larvas de *M. domestica* alimentadas com suspensões de esporos. Os valores de CL_{50} encontrados tanto por Ferreira et al. (39) quanto por Ruiu et al. (109)

são um pouco maiores do que os valores de CL₅₀ das estirpes de *B. laterosporus* encontrados neste estudo (Tabela 14).

A CL₅₀ de estirpes de *B. thuringiensis* foram avaliadas em 125µg (93), 63,77µg (89) e 70,7µg (92).

Neste estudo as concentrações foram calculadas em UFC, portanto, não podem ser comparadas com outros estudos que utilizaram massa seca, onde os cálculos foram feitos pelo peso (µg). Os testes de normalidade para concentração de 10⁷UFC/mL obtiveram valores de P<0,05 em todas as estirpes analisadas (Tabela 14).

Tabela 14: Concentrações letais 50 (CL₅₀) de diferentes suspensões de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* e *Brevibacillus laterosporus* adicionadas na dieta de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório.

Tratamento	Teste de normalidade 10⁷ UFC/mL (P<0,05)	CL₅₀ em UFC/mL
NRS 590	SIM	2,95 x10 ⁷
Bon 707	SIM	2,26 x 10 ⁷
Bon 712	SIM	3,10 x 10 ⁷
Shi 3	SIM	1,85 x 10 ⁷
Btk 176	SIM	2,41 x 10 ⁷

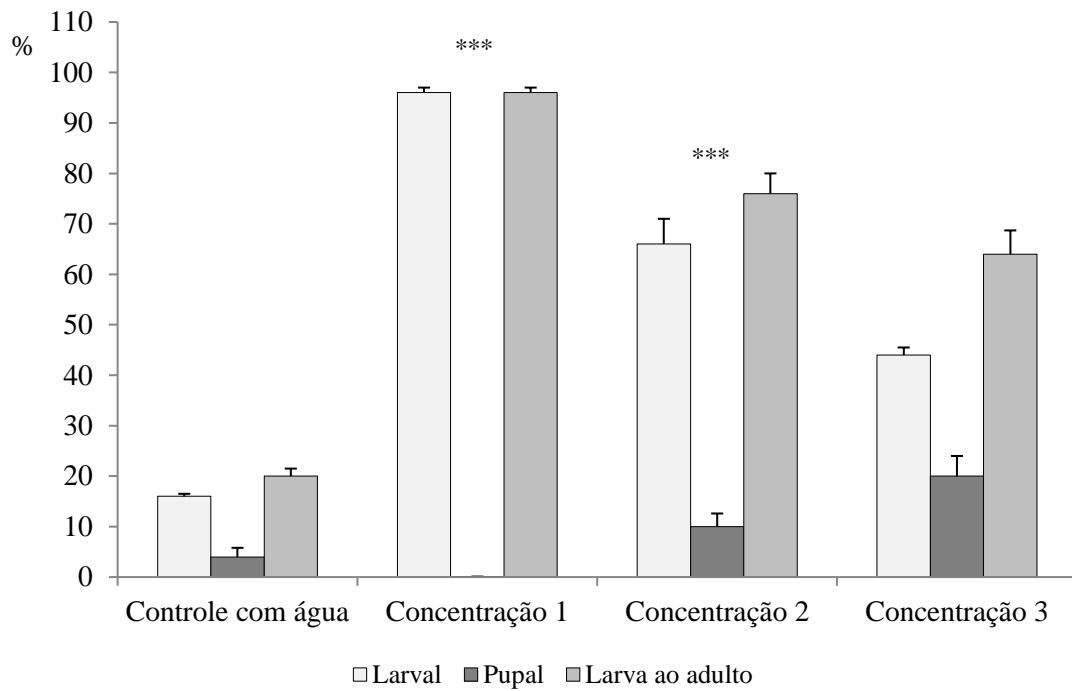
4.2.2. *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818)

Estirpes de *B. laterosporus* foram utilizadas em outras moscas varejeiras, como: *Lucilia cuprina* (43) e *Chrysomya megacephala* (38,44) e alcançaram mortalidade estatisticamente significativa. Em relação a *C. putoria* nosso estudo mostra que todas as quatro estirpes de *B. laterosporus* testadas apresentaram mortalidade estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle (Figuras 14 a 17).

Neste estudo observamos uma mortalidade estatisticamente significativa da estirpe NRS 590, quando as neo larvas foram tratadas com a suspensão de esporos na concentração de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL, causando mortalidade larval de 96% (Figura 14). As concentrações 2 e 3 obtiveram 66% e 44% de mortalidade larval, respectivamente. A mortalidade de larva ao adulto (total) foi de 76% na concentração 2 e de 64% na concentração 3 (Figura 14). No bioensaio com as estirpes Bon 707 e Bon 712 obtivemos mortalidade larval de 41% e 97% respectivamente. A mortalidade de larva ao adulto chegou a 72% com a estirpe Bon 707, e com a estirpe Bon 712 foi de 98%, ambas as estirpes em sua maior concentração testada, Bon 707 na concentração de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL e Bon 712 na concentração de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (Figuras 15 e 16).

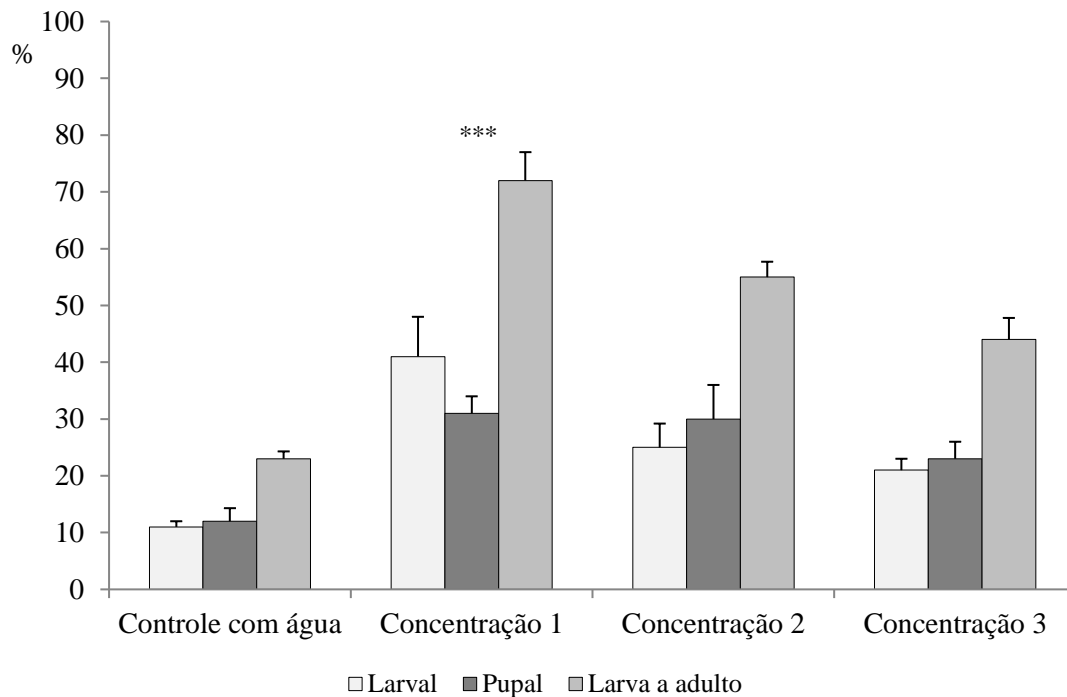
Carramaschi et al. (38) observaram 70% de letalidade da estirpe Shi 3 na concentração de 1×10^8 UFC/mL sobre as neo larvas de *C. megacephala* que é um muscoide pertencente à mesma família de *C. putoria*, a família Calliphoridae.

Quando as neo larvas de *C. putoria* foram alimentadas com suspensão de esporos da estirpe Shi 3 na concentração 1 ($2,2 \times 10^8$ UFC/mL), a mortalidade larval foi de 74% e a total foi de 80% (Figura 17). Estes resultados mostram que a estirpe Shi 3 é um potencial princípio ativo no controle de moscas varejeiras.



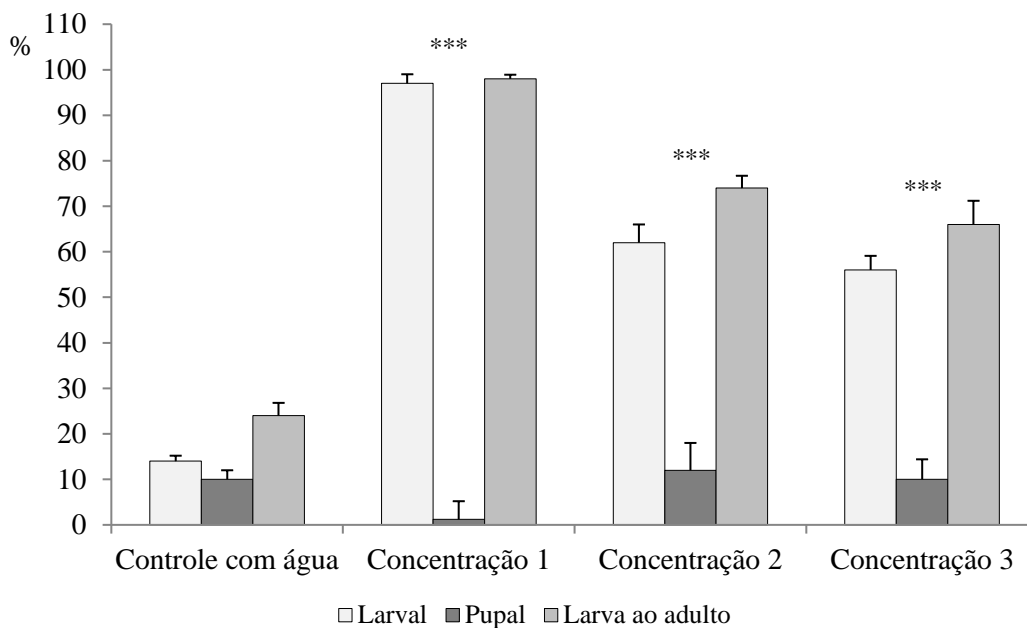
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 14: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* NRS 590 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.



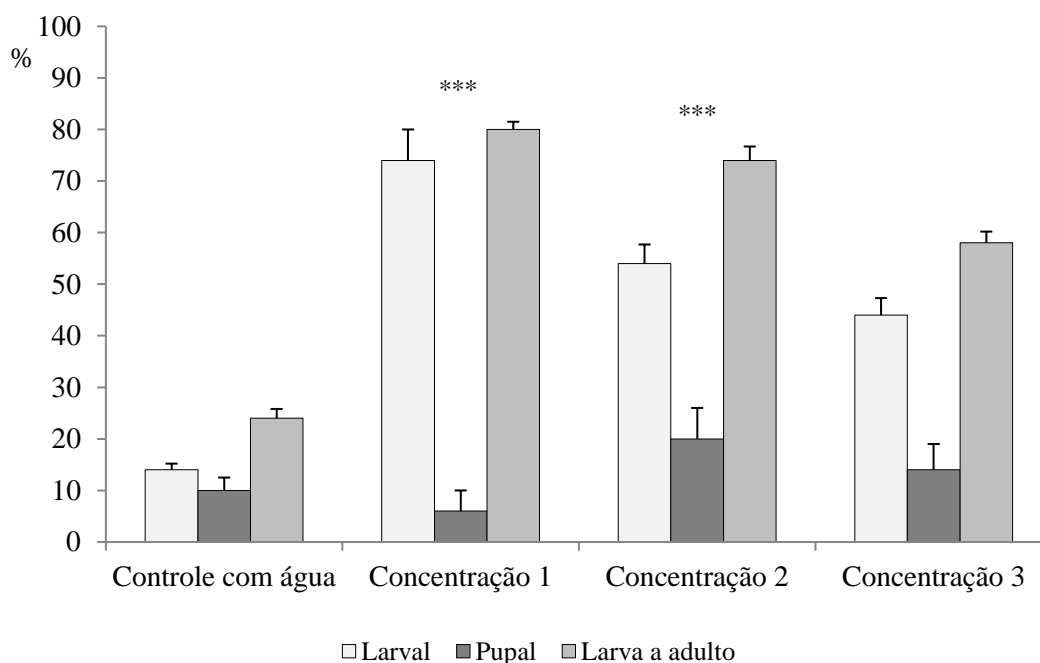
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 15: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* Bon 707 nas concentrações de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 1), $1,8 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 2) e $1,8 \times 10^5$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 16: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $3,3 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

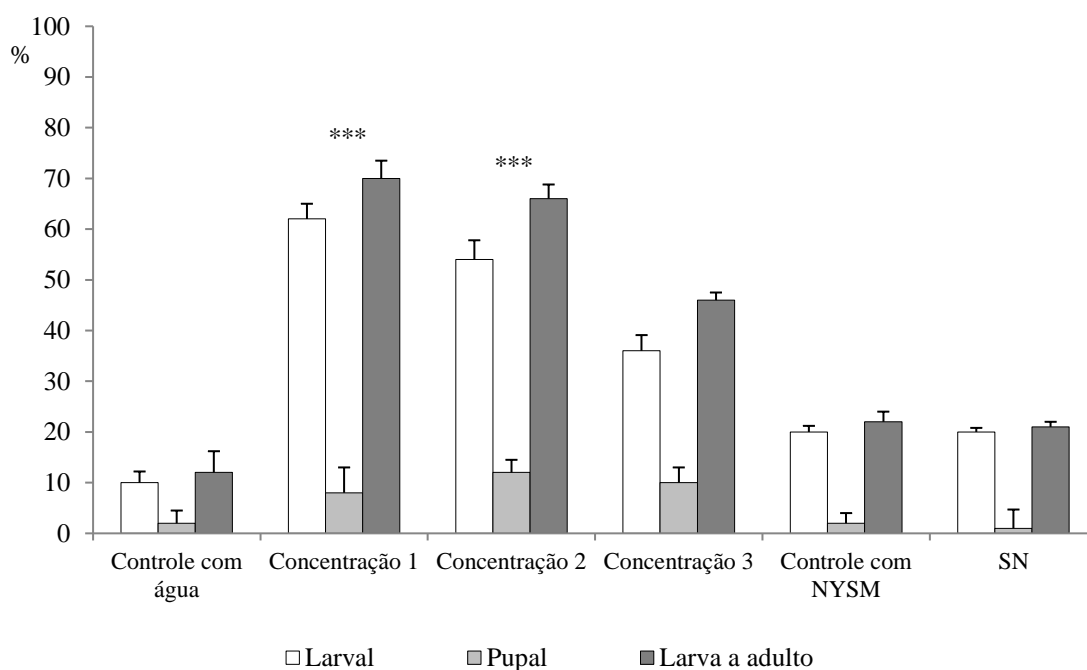


Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 17: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) sobre *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

No tratamento com a estirpe esporulada Btk176 foi possível observar mortalidade estatisticamente significativa (Figura 18). O teste com o sobrenadante (SN) não apresentou mortalidade estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (controle com água e controle com meio de cultura NYSM), pois a mortalidade dos grupos controle foi relativamente baixa e não diferenciou estatisticamente entre si (Figura 18).

Oliveira et al. (104) demonstraram uma pequena atividade larvicida de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 907 sobre *C. putoria*, onde a mortalidade larval foi 18%. Nossos resultados apontam que a estirpe *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* Btk176 também possui atividade entomopatogênica sobre *C. putoria*, onde a mortalidade larval do tratamento na maior concentração testada (concentração 1) foi de 62% e a total (de larva ao adulto) chegou a 70%. Na concentração 2 a mortalidade larval foi 54% e a total 66%, na menor concentração testada (concentração 3) 36% das larvas foram mortas e 46% foi a mortalidade de larva ao adulto (Figura 18).



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 18: Efeito letal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL (concentração 3) e do sobrenadante (SN) no período 72h de crescimento sobre *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Mais uma vez observamos a correlação da mortalidade com a quantidade de esporos ingeridos por diferentes espécies de moscas, como visto por Zimmer et al. (88), Ferreira et al. (39), Carramaschi et al. (38) e Pereira et al. (41). Observamos que os níveis de mortalidade das larvas de *C. putoria* quando tratadas com esporos tanto de *B. laterosporus* quanto de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis*, variaram de acordo com a concentração de esporos oferecidos. Os maiores níveis de bioatividade dessas bactérias foram registrados na maior concentração utilizada 10^8 UFC/mL (Figuras 14, 16, 17 e 18) e na concentração de 10^7 UFC/mL (Figura 15), todas apresentando níveis altamente significativos de mortalidade.

A mortalidade corrigida comprova a eficácia das estirpes em estudo, pois permaneceram com mortalidade significativa mesmo após a correção com o grupo controle, principalmente as estirpes NRS 590, Bon 712 e Shi 3 onde a mortalidade corrigida foi superior a 75% (Figura 19).

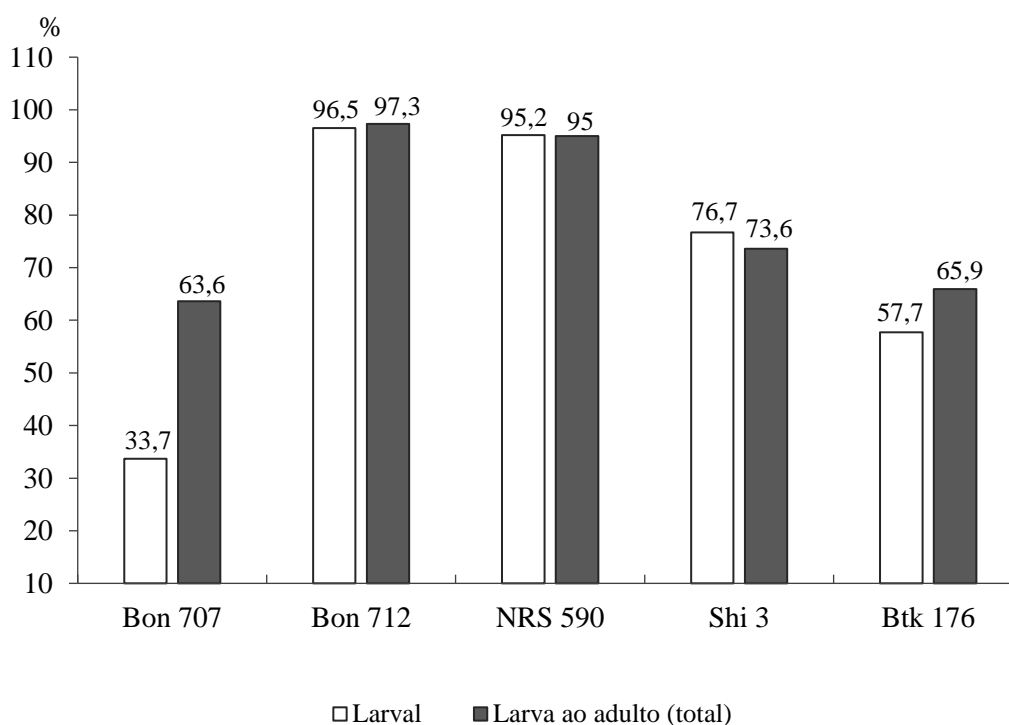


Figura 19: Mortalidade corrigida com a fórmula de Abbott (Abbott, 1925) de *C. putoria* (Diptera: Calliphoridae) alimentada com suspensões de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* e *Brevibacillus laterosporus* nas concentrações de 10^8 UFC/mL e 10^7 UFC/mL, em condições de laboratório.

Observando a Tabela 2 podemos avaliar que a mortalidade larval deste estudo é superior àqueles que utilizaram *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* para o controle de califorídeos (Tabela 2), uma vez que os índices de mortalidade de algumas estirpes foram estatisticamente significativos.

No intuito de avaliar a possibilidade de utilização das estirpes em estudo para o controle biológico das larvas de *C. putoria* a concentração letal (CL₅₀) foi calculada através das concentrações testadas (Tabela 15).

Oliveira et al. (104) avaliaram a concentração letal (CL₅₀) de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 907 em 382,82mg/g sobre as larvas de *C. putoria*. Partindo do princípio que a maior concentração testada foi 326mg/25g de dieta e causou 18% de mortalidade larval, o valor da CL₅₀ é relativamente alto quando comparado com os valores encontrados por Cavados et al. (105).

Para as larvas de *C. megacephala* a CL₅₀ da mesma estirpe bacteriana utilizada por Oliveira et al. (104) foi de 6,1 mg/g (105) e com 326mg/25g de dieta a estirpe LFB-FIOCRUZ 907 causou 62,7% de mortalidade larval.

As concentrações deste estudo foram calculadas em UFC, portanto, também não podem ser comparadas com outros estudos que utilizaram massa seca, onde os cálculos foram feitos pelo peso (mg) e não em UFC como neste estudo (Tabela 15).

No teste de normalidade, a estirpe Bon 707 obteve valor de P superior a 0,05, pois o índice de mortalidade foi relativamente baixo, diferenciando bastante do resultado esperado. As demais estirpes obtiveram os valores $P < 0,05$ no teste de normalidade (Tabela 15).

Tabela 15: Concentrações letais 50 (CL₅₀) de diferentes suspensões de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* e *Brevibacillus laterosporus* adicionadas na dieta de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), em condições de laboratório.

Tratamento	Teste de normalidade 10 ⁶ UFC/mL (P<0,05)	CL ₅₀ em UFC/mL
NRS 590	SIM	3,10 x 10 ⁶
Bon 707	NÃO	3,72 x 10 ⁶
Bon 712	SIM	3,02 x 10 ⁶
Shi 3	SIM	2,14 x 10 ⁶
Btk 176	SIM	2,36 x 10 ⁶

4.3. Atividade aduítica

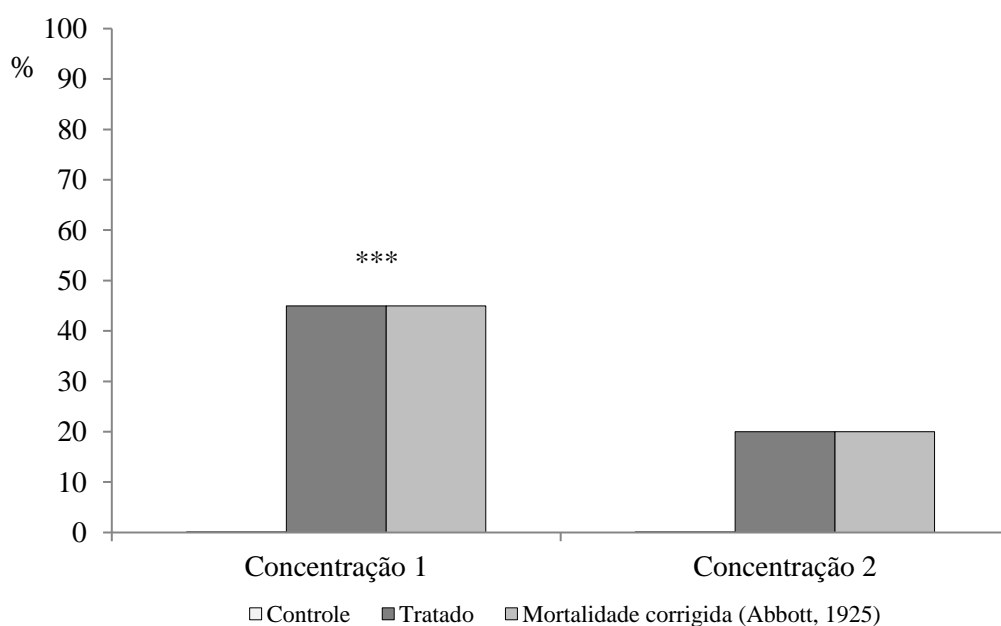
4.3.1. *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)

Ruiu et al. (40) avaliaram a toxicidade de *B. laterosporus* contra adultos de *M. domestica* e comprovaram o potencial desta espécie para este tipo de controle. Este dado foi corroborado por nossos resultados obtidos a partir de diferentes estirpes desta bactéria (Figuras 20 a 23).

A atividade aduítica da estirpe NRS 590 foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle, pois a mortalidade na maior concentração testada (concentração 1) foi de 45% e na segunda concentração a mortalidade foi 20% (Figura 20).

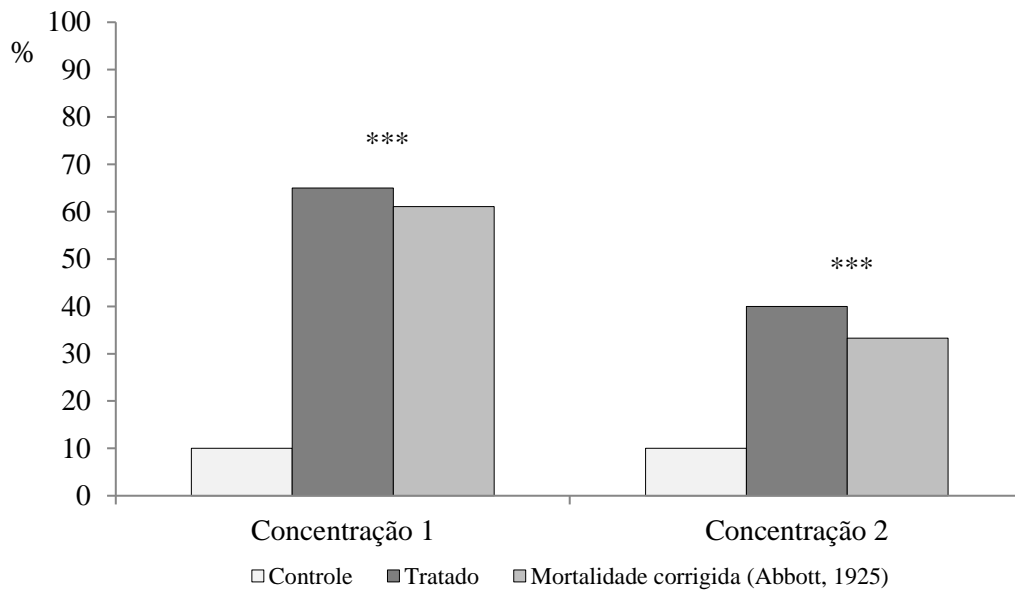
No tratamento com a estirpe Bon 707 a mortalidade também foi estatisticamente significativa, onde a concentração 1 matou 65% dos adultos, e a mortalidade corrigida ficou em 61,1%. Na concentração 2 a mortalidade desta estirpe chegou a 40% e a mortalidade corrigida foi 33,3% (Figura 21).

A mortalidade do tratamento com a estirpe Bon 712 foi de 72% e na concentração 2 a mortalidade foi de 20% (Figura 22). Já no tratamento com a estirpe Shi 3 a mortalidade na maior concentração testada (concentração 1) foi de 55% e na menor concentração testada (concentração 2) a mortalidade foi de 18% (Figura 23). Nos testes com as estirpes onde a mortalidade do grupo controle foi zero, não houve diferença no cálculo da mortalidade corrigida, portanto, o valor de mortalidade da estirpe permaneceu o mesmo (Figuras 20, 22 e 23).



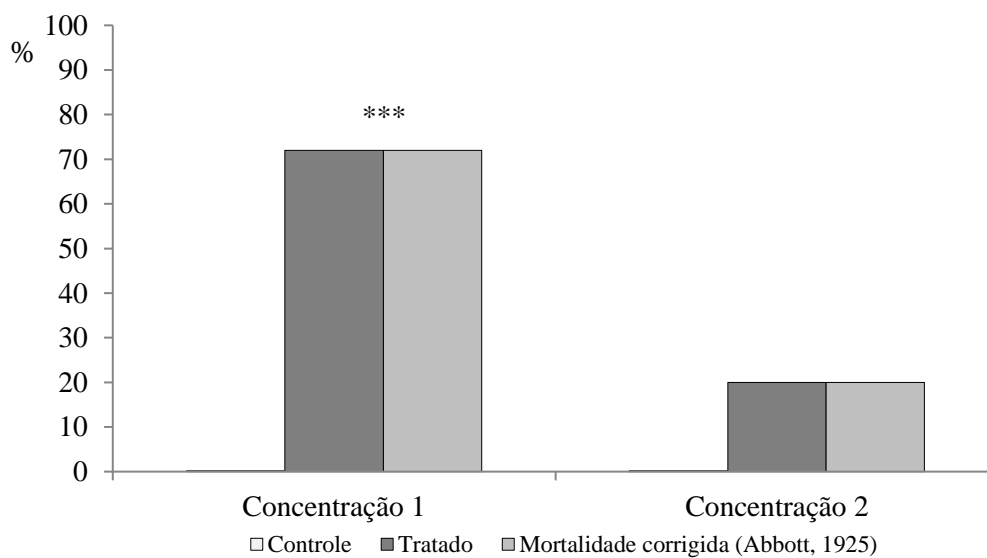
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 20: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* NRS 590 nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório.



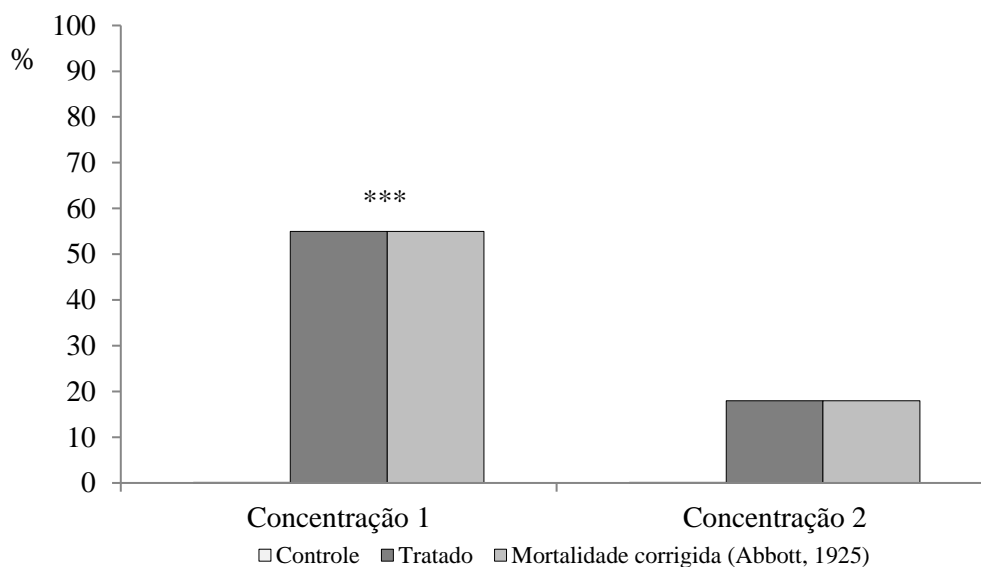
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 21: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 707** nas concentrações de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $2,6 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 22: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 23: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* Shi 3 nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório.

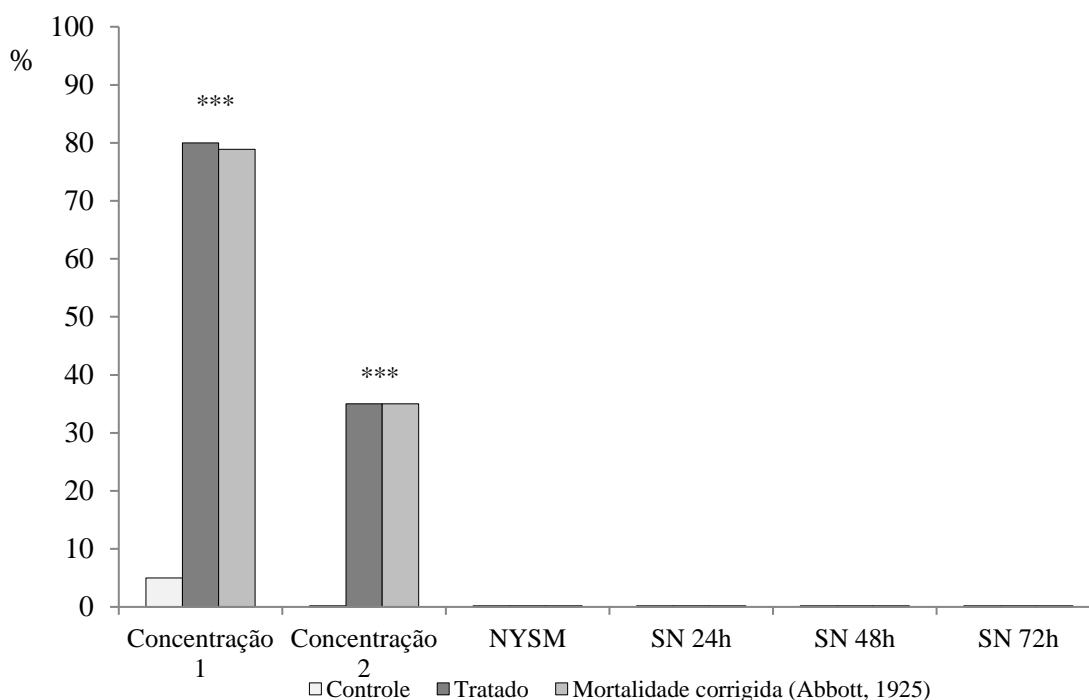
Nos bioensaios com adultos recém emergidos de *M. domestica* a estirpe Btk 176 mostrou-se bastante promissora para este tipo de controle (Figura 24).

Indrasith et al. (94) observaram que cepas de algumas variedades de *B. thuringiensis* foram eficazes para o controle de adultos de *M. domestica*. Testamos suspensões de esporos e o sobrenadante (SN) de *B. thuringiensis* var. kyushuensis sobre os adultos de *M. domestica*, e observamos que não houve mortalidade para os adultos tratados com o sobrenadante retirado de diferentes estágios de crescimento da cultura Btk 176 (24h, 48h e 72h), havendo mortalidade estatisticamente significativa somente sobre os adultos tratados com as suspensões de esporos (Figura 24).

Johnson et al. (107) observaram que o sobrenadante de *B. thuringiensis* induziu mortalidade de 80% em *M. domestica*. No controle negativo com a cepa não produtora de exotoxina a viabilidade dos insetos tratados com o sobrenadante foi de 95%.

A Figura 24 apresenta a atividade aduicida da estirpe Btk 176 que foi avaliada quando os adultos foram tratados com a maior concentração testada ($2,4 \times 10^8$ UFC/mL). A mortalidade foi de 80% e a mortalidade corrigida ficou em 78,9%, ambas diferenciando estatisticamente quando comparadas ao grupo controle. Na concentração 2 a mortalidade chegou a 35%.

No estudo de Indrasith et al. (94) foram utilizadas toxinas de *B. thuringiensis* var kurstaki HD-1 e HD-73 ativadas por tripsina e quimotripsina que causaram uma mortalidade média de 90% dos adultos de *M. domestica* tratados por 4 dias. As duas toxinas ativadas foram eficazes, no entanto, quando estas não foram ativadas, o experimento mostrou uma atividade reduzida, tendo a mortalidade média em torno de 35%. Embora os estudos de atividade aduicida em *M. domestica* ainda sejam poucos, estirpes de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* tem mostrado seu potencial de ação (Tabela 1).



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 24: Efeito letal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e do sobrenadante (SN) nos períodos de 24h, 48h e 72h de crescimento sobre adultos recém emergidos de *Musca domestica* em condições de laboratório.

4.3.2. *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818)

Adultos recém emergidos de *C. putoria* também foram sensíveis quando expostos a uma dieta composta de solução açucarada contendo suspensões de esporos de *B. laterosporus* e de *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* (Figuras 25 a 29).

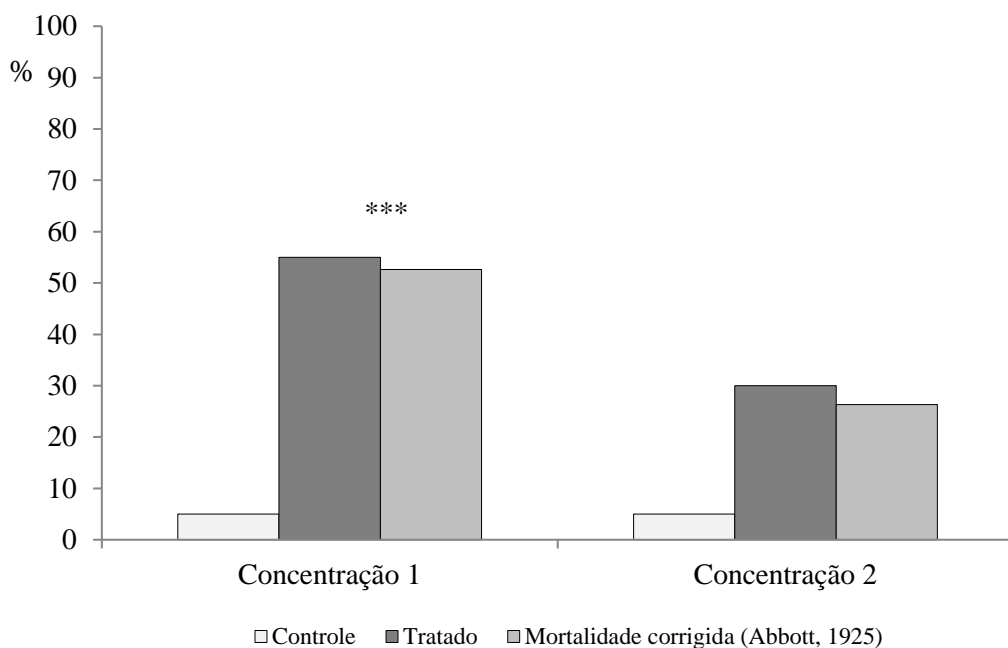
No tratamento com a estirpe NRS 590, em sua maior concentração testada (concentração 1) a mortalidade foi de 55%, a mortalidade corrigida ficou em 52,6% e na segunda concentração a mortalidade chegou a 30% e a mortalidade corrigida a 26,3% (Figura 25).

A atividade aduicida da estirpe Bon 707 foi avaliada na maior concentração testada ($1,9 \times 10^9$ UFC/mL), pois a mortalidade nesta concentração foi de 80% e a mortalidade corrigida 75%. Na concentração 2 a mortalidade foi de 50% e a mortalidade corrigida sendo 44,4%, todas diferenciando estatisticamente quando comparadas ao grupo controle (Figura 26).

A letalidade das estirpes Bon 712 e Shi 3 foram relativamente baixas, mas ainda eficazes quando comparadas com a mortalidade do grupo controle, que foi de 0% (Figuras 27 e 28). No tratamento com a estirpe Bon 712 a mortalidade na concentração 1 foi de 32%, não havendo mortalidade no tratamento com a concentração 2 (Figura 27). No teste com a estirpe Shi 3, a mortalidade foi de 33% quando os adultos foram tratados com a maior concentração testada ($2,2 \times 10^8$ UFC/mL) e na concentração 2 a mortalidade chegou a 10% (Figura 28).

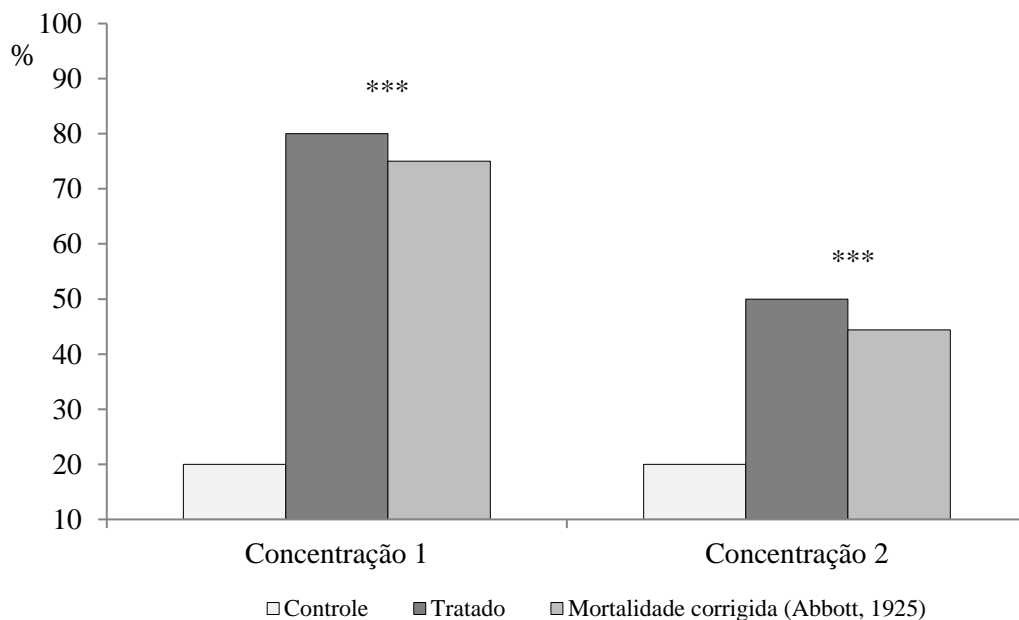
A estirpe Btk 176 possui baixa atividade contra os adultos de *C. putoria*, pois a mortalidade na maior concentração testada (concentração 1) chegou a 45%, a mortalidade corrigida ficou em 42,1%. Na segunda concentração testada ($2,4 \times 10^7$ UFC/mL) a mortalidade foi de 25% e a corrigida ficou em 21% (Figura 29).

No tratamento com as estirpes Bon 712 e Shi 3 a mortalidade do grupo controle foi zero, portanto, não havendo diferença no cálculo da mortalidade corrigida, por isto, o valor de mortalidade das estirpes permaneceu o mesmo (Figuras 27 e 28).



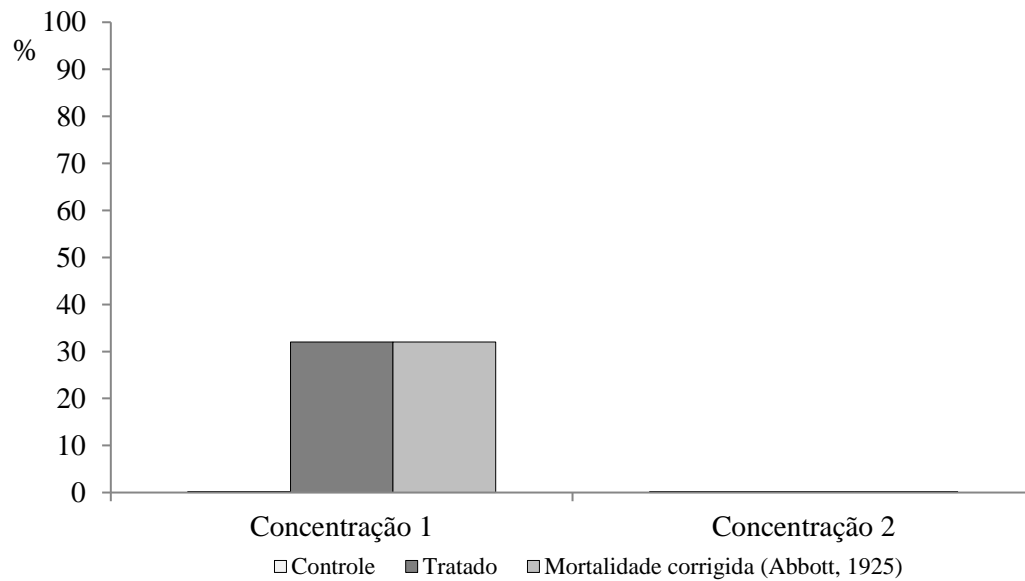
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 25: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **NRS 590** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.



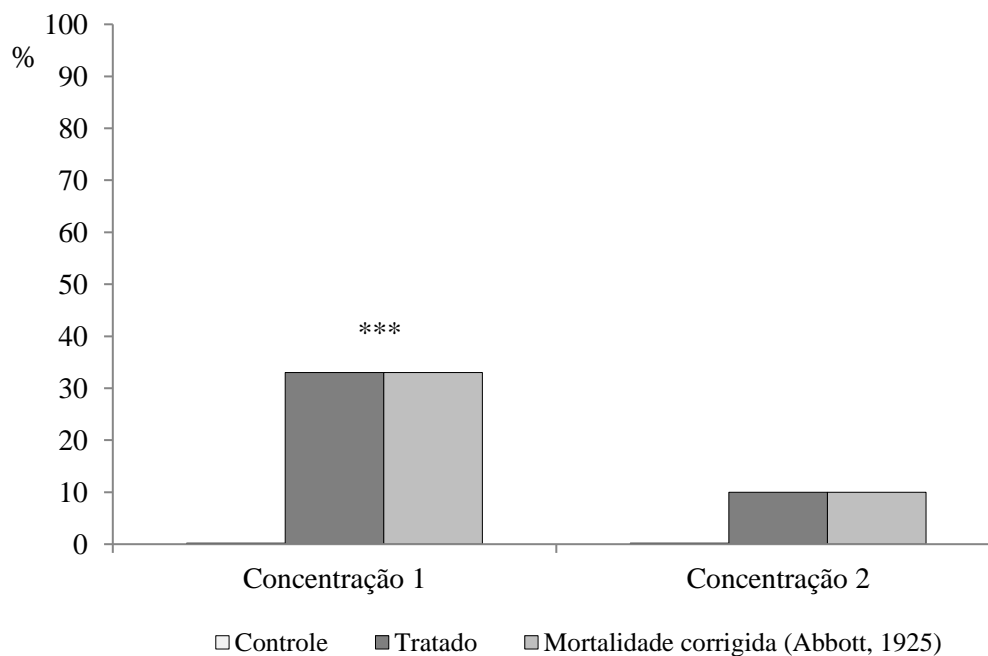
Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 26: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 707** nas concentrações de $1,8 \times 10^9$ UFC/mL (concentração 1) e $1,8 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 27: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Bon 712** nas concentrações de $3,3 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.



Os níveis de significância maior são representados como *** $P < 0,001$ vs grupo controle.

Figura 28: Efeito letal da suspensão de esporos de *Brevibacillus laterosporus* **Shi 3** nas concentrações de $2,2 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1) e $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

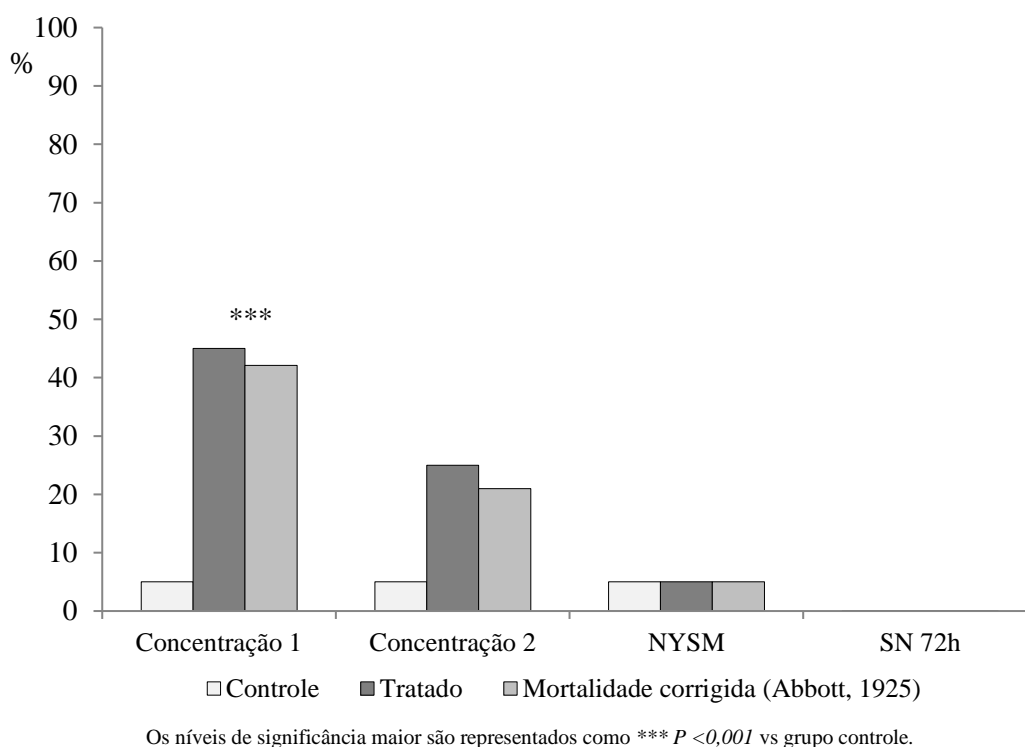


Figura 29: Efeito letal da suspensão de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** nas concentrações de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL (concentração 1), $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (concentração 2) e do sobrenadante (SN) no período de 72h de crescimento sobre adultos recém emergidos de *Chrysomya putoria* em condições de laboratório.

Observamos nos testes com adultos uma mortalidade dose-dependente como no bioensaio com as neo larvas de ambas as espécies de moscas. Acreditamos que a baixa mortalidade em adultos se deve à baixa concentração de esporos, pois a solução açucarada foi misturada com a suspensão de esporos numa proporção de 1:1, reduzindo então (teoricamente) pela metade a concentração de esporos oferecidos aos adultos.

4.4. Análises histopatológicas do trato digestório de *Musca domestica*

De acordo com Copping e Menn, (130) e Ruiu et al. (45) a atividade tóxica primariamente causa lesões no tecido epitelial do intestino do inseto-alvo, até levá-lo à morte. Neste estudo, os efeitos histopatológicos registrados incluem, o aumento de vacúolos digestivos após 6h de ingestão dos esporos (Figura 30B), enquanto que no grupo controle o número de vacúolos digestivo é bastante reduzido, e as

microvilosidades estão regulares e alongadas (Figura 30A). Com 12h de tratamento as microvilosidades estão com aspecto anormal e há desorganização estrutural do citoplasma (Figura 31B) e a membrana nuclear encontra-se com aspecto irregular (Figura 31B setas escuras). No grupo controle o citoplasma e as microvilosidades são regulares, aparentemente normais (Figura 31A).

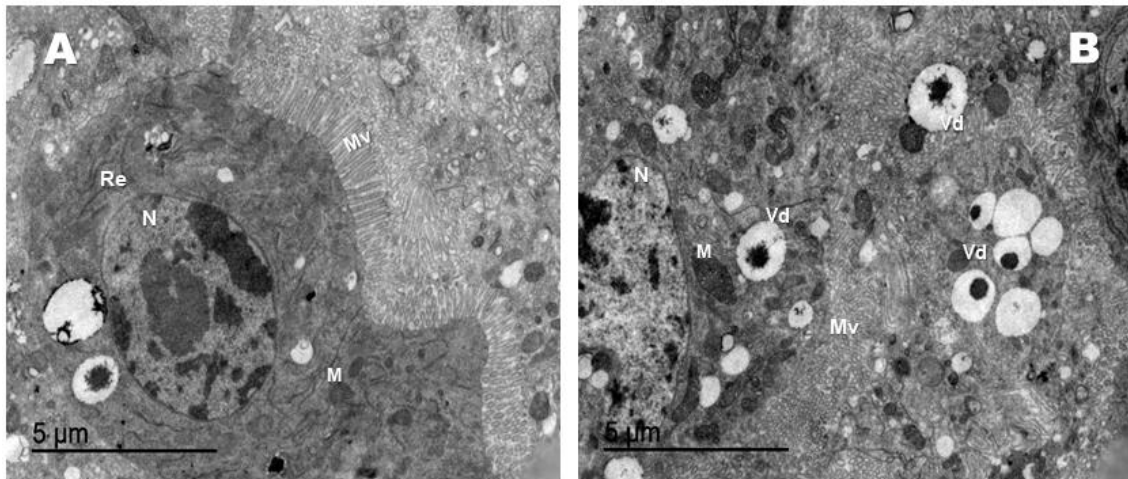


Figura 30: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 6h; (B) Células epiteliais tratadas por 6h com esporos de Btk176- M: mitocôndrias, Mv: microvilosidades, N: núcleo, Re: retículo endoplasmático, Vd: vacúolo digestivo – x 6200.

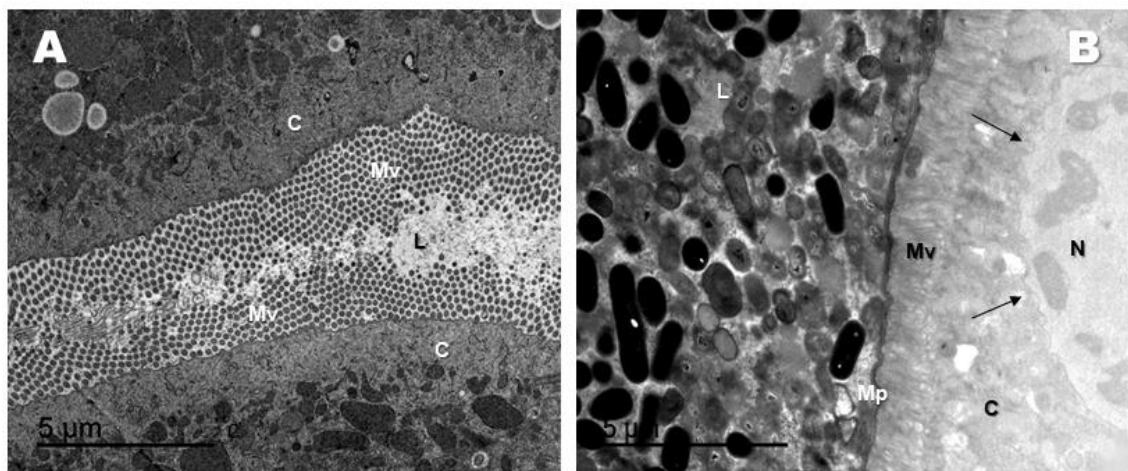


Figura 31: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. kyushuensis **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 12h; (B) Células epiteliais tratadas por 12h com esporos de Btk176- Mv: microvilosidades, N: núcleo, C: citoplasma, Mp: matriz peritrófica, L: lúmen – x 7800.

Yu et al. (131) também observaram a formação de vacúolos nas células epiteliais das larvas de lepidópteras, quando estas foram tratadas com toxinas de *B. thuringiensis*.

Ao longo do tempo, com 24h de tratamento com Btk176 as alterações foram se agravando (Figura 32).

As células do grupo controle apresentam microvilosidades com aspecto regular e contínuo, o citoplasma se mantém íntegro e sem formação de vacúolos (Figura 32A). No tratamento com Btk176, as microvilosidades aparecem com aspecto irregular, descontínuas, não acompanhando integralmente a borda da célula (Figura 32B). É possível observar a formação de grandes vacúolos ao longo do citoplasma, assim como a intensa desorganização citoplasmática (Figura 32B).

As células epiteliais das larvas de *Simulium pertinax* (Diptera: Simuliidae) também sofreram alterações como a desorganização do citoplasma, do núcleo e das microvilosidades quando estes insetos foram tratados com esporos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (132).

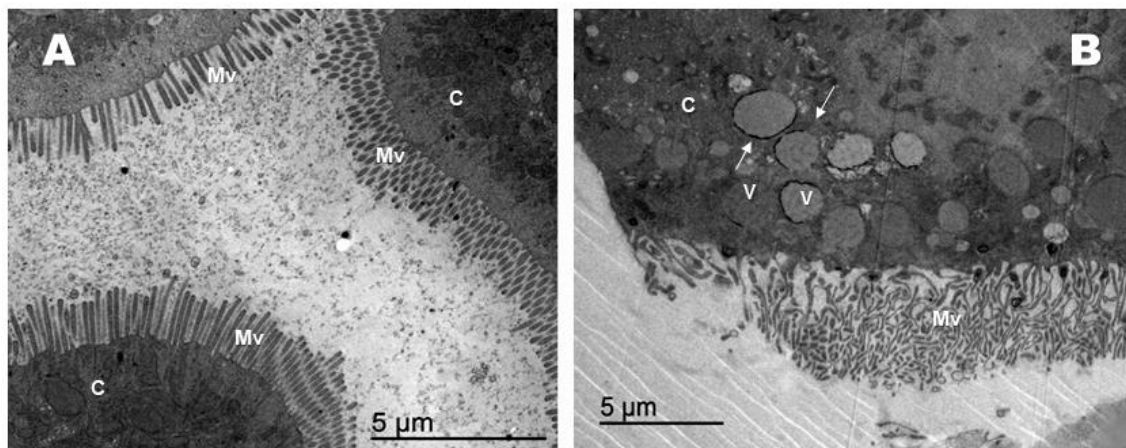


Figura 32: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 24h; (B) Células epiteliais tratadas por 24h com esporos de Btk176– C: citoplasma, V: vacúolos – x 6200.

Com 24h e 48h de tratamento além das alterações já vistas nos tempos de tratamento anteriores, as microvilosidades aparecem totalmente irregulares, não acompanhando o contorno da célula (Figuras 32B e 33B).

As alterações histopatológicas após 48h de tratamento incluem a desorganização do citoplasma e a extrusão do conteúdo citoplasmático para o lúmen (Figura 33B). As microvilosidades estão completamente irregulares e descontínuas, não acompanhando grande parte do contorno da célula (Figura 33B). No grupo controle as microvilosidades estão regulares, mantendo o aspecto normal, permanecendo alongada e com distribuição uniforme, o citoplasma se mantém íntegro e organizado (Figura 33A). A extrusão do citoplasma, fazendo com que o conteúdo citoplasmático extravasasse para o lúmen (Figura 33B), é um tipo de lesão causada às células epiteliais que também foi observado por Percy e Fast (133) e parece ser o principal mecanismo responsável pelas alterações fisiológicas causadas por toxinas bacterianas, consequentemente levando o inseto-alvo a morte (56). Seguindo o raciocínio de Copping e Menn (130) as toxinas se ligam a receptores específicos que estão presentes nas microvilosidades intestinais das larvas, formam poros que irão aumentar a permeabilidade da célula, desestabilizando seu gradiente osmótico, fazendo-a inchar e romper.

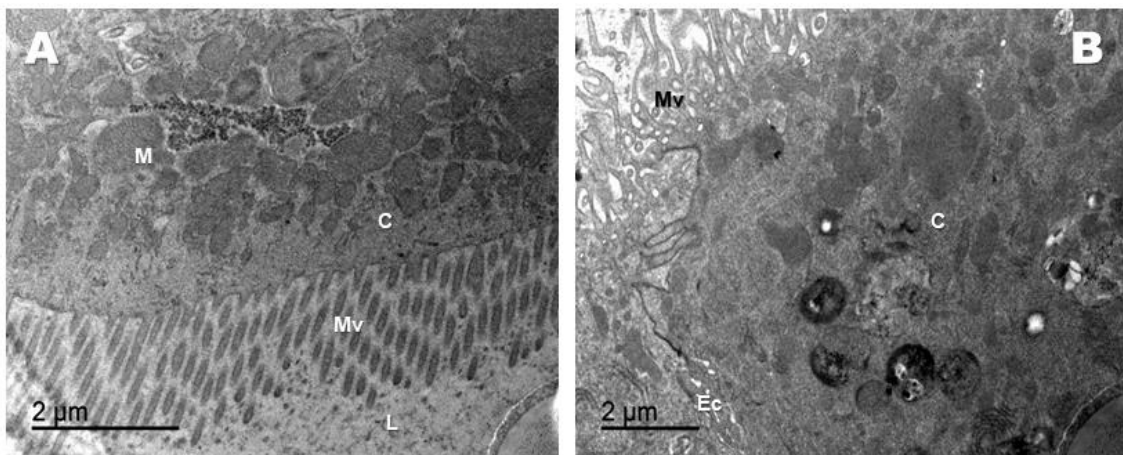


Figura 33: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** na concentração de $2,4 \times 10^7$ UFC/mL - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 48h; (B) Células epiteliais tratadas por 48h com esporos de Btk176– M: mitocôndria, Mv: microvilosidades, C: citoplasma, L: lúmen, Ec: extrusão citoplasmática – x 9300.

Ruiu et al. (45) também observaram alteração na membrana celular acompanhada de extrusão do conteúdo citoplasmático e danos estruturais às microvilosidades quando *M. domestica* foi tratada com esporos de *B. laterosporus*.

Analisando as células epiteliais das larvas tratadas com o sobrenadante (SN), não houve nenhuma alteração histopatológica (Figura 34B), pois as células são semelhantes às do grupo controle (Figura 34A).

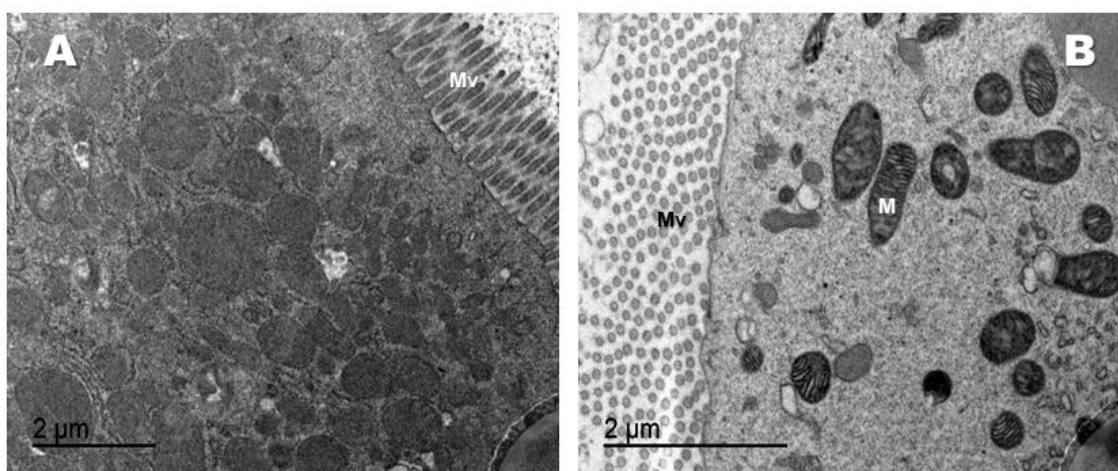


Figura 34: Microscopia eletrônica de transmissão da célula epitelial do intestino médio de larvas de *Musca domestica* tratadas com o sobrenadante (SN) de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** - (A) Células epiteliais do grupo controle com água tratadas por 48h; (B) Células epiteliais tratadas por 48h com o sobrenadante– M: mitocôndrias, Mv: microvilosidades – x 9300.

As alterações histopatológicas observadas neste estudo coincidem com os danos celulares causados pelas toxinas de diversos sorotipos de *B. thuringiensis* em diferentes ordens de insetos-praga (132,134–136).

4.5. Análise das células bacterianas

Bacillus thuringiensis var. *kyushuensis* Btk176 (Figura 35 e 36) foi avaliada como produtora de proteína cristalina, estes resultados sugerem ainda que a atividade de Btk176 foi atribuída à pró-toxina Cry1Ba e/ou outras endotoxinas, uma suposição

suportada pelo fato desta estirpe ter sido positiva para amplificação do gene *cryIBa* (Pereira, L. A).

Essa toxina possui atividade contra algumas ordens de insetos (137), incluindo *M. domestica* (138), entre outros dípteros (138,139). Portanto, a atividade entomopatogênica da estirpe em estudo pode estar diretamente relacionada à tal toxina, uma vez que a mortalidade foi estatisticamente significativa (Figuras 12, 18, 24 e 29), a amplificação por PCR do gene *cryIBa* foi positiva e a inclusão cristalina foi observada por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (Figuras 35A e 36B).

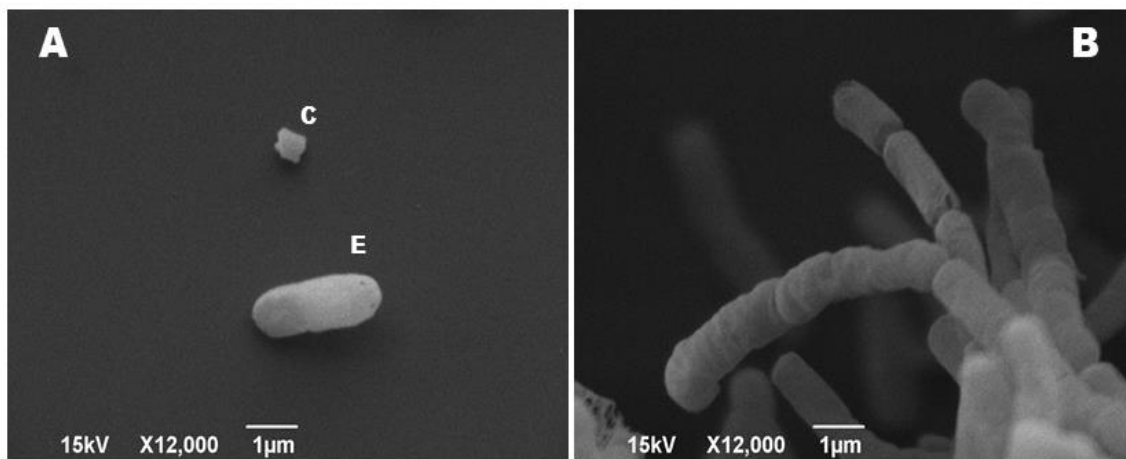


Figura 35: Microscopia eletrônica de varredura de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** - (A) C: cristal; E: esporo - (B) Bactérias.

Os genes *cry* que codificam as proteínas Cry, se encontram em plasmídeos e a maioria desses plasmídeos possuem a função de produzir as inclusões cristalinas (49). É durante a esporulação que ocorre a produção de inclusões cristalinas, esses cristais proteicos vão sendo acumulados no compartimento da célula-mãe (Figura 36A) e ao fim da esporulação o cristal é liberado juntamente com o esporo (Figuras 35A e 36B) (60). A forma do cristal é determinada pela estrutura e composição das δ -endotoxinas presentes, desse modo, podem se apresentar nas formas ovóide, bipiramidal, rombóide, esférica, cubóide ou até mesmo sem uma determinada forma definida (64,140,141).

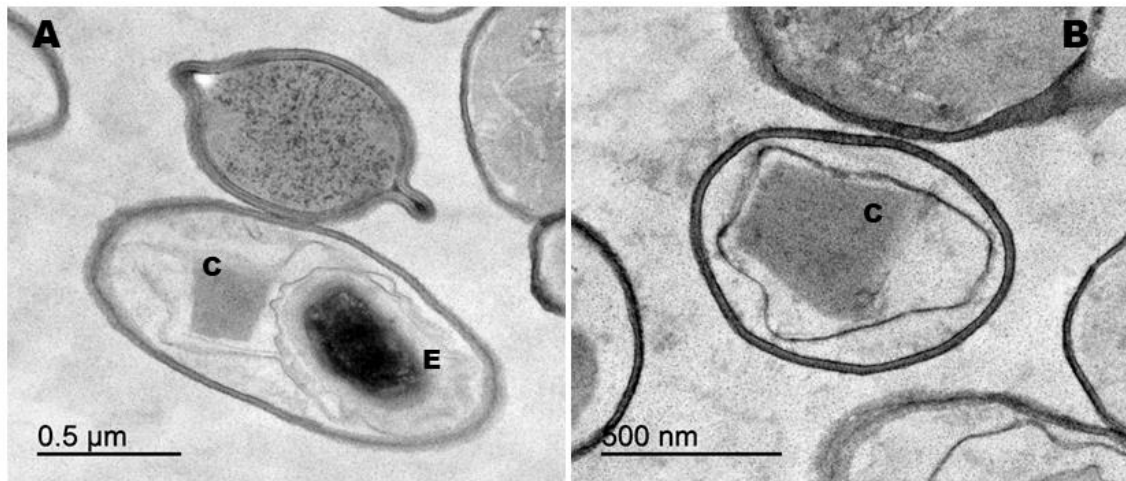


Figura 36: Microscopia eletrônica de transmissão de *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis* **Btk176** - (A) C: cristal; E: esporo - x 13100 - (B) C: cristal - x 15000.

Brevibacillus laterosporus é caracterizada pela produção de um corpo paraesporal em forma de canoa, que se encontra ao lado do esporo (Figura 37 Cp), em algumas estirpes, ainda há a produção de inclusões citoplasmáticas contendo proteínas cristalinas com potencial inseticida (37). Mesmo que as proteínas cristalinas com atividade inseticida tenham sido relatadas, estirpes de *B. laterosporus* não produtoras de cristais proteicos também têm demonstrado sua atividade entomopatogênica, quando os insetos foram tratados apenas com esporos (Figuras 37 e 38) (38,39,41), suportando então o envolvimento de outras substâncias na atividade inseticida.

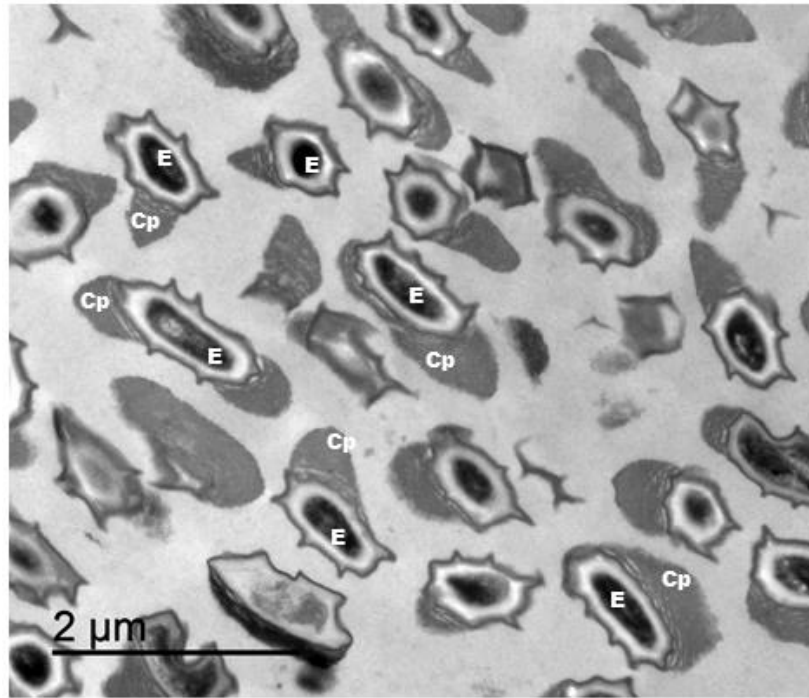


Figura 37: Microscopia eletrônica de transmissão de *Brevibacillus laterosporus* NRS 590 - E: esporo; Cp: corpo parasporal - x 9700

Estudos demonstraram uma baixa variação genética entre isolados de *B. laterosporus*, mas ao mesmo tempo um extenso espectro de toxicidade entre a pequena coleção de cepas de *B. laterosporus* examinadas (14,142). O potencial de *B. laterosporus* para o controle biológico, assim como seus possíveis fatores tóxicos foram descritos por Ruiu (15). *B. laterosporus* apresenta um amplo espectro de bioatividade associada a uma grande variedade de estirpes entomopatogênicas e a diferentes propriedades com potenciais biotecnológicos, que, portanto, não estão presentes em todas as estirpes.

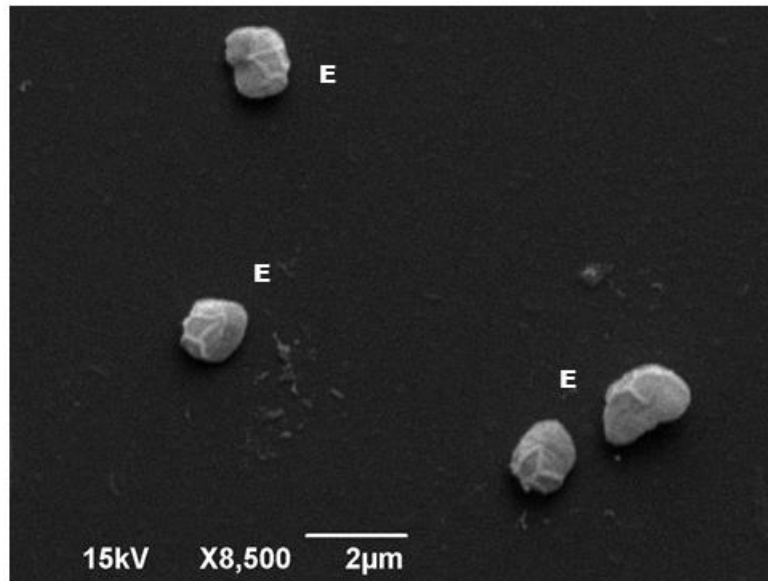


Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura de *Brevibacillus laterosporus* NRS 590 - E: esporo.

De acordo com Marche et al. (21,143), além dos inúmeros fatores putativos de virulência, algumas estirpes de *B. laterosporus* podem abrigar os genes para as proteínas de superfície de esporo, que são sugeridas como associadas a fatores suplementares de virulência em insetos. Estes fatores virulentos foram identificados na superfície do esporo, e estão relacionados com a produção do corpo parasporal.

Desta forma a estratégia para obtenção de novos produtos para o controle de insetos, precisa ser baseada no isolamento e no uso de novas espécies bacterianas. O objetivo é evitar o uso de defensivos químicos, que além de poluir, geram desequilíbrios ecológicos e promovem o surgimento de insetos resistentes. Existem muitas espécies e diferentes estirpes com potencial inseticida descrito contra diferentes ordens de insetos. O potencial de *B. thuringiensis* como agente no controle de pragas já é muito bem descrito e conhecido amplamente. No entanto, a avaliação de novas estirpes que podem superar problemas como resistência, crescimento lento ou difícil, eficiência limitada da expressão de toxinas e a presença de thuringiensina, amplia o número de opções de agentes entomocidas.

Embora o nosso conhecimento sobre a atividade inseticida de *B. laterosporus* esteja aumentando, ainda falta determinar se é a diversidade das toxinas ou dos fatores suplementares, como as proteínas de superfície de esporo, ou se é a presença de

possíveis receptores associados ao hospedeiro, que são de fato responsáveis pela ampla gama de efeitos letais e subletais observados sobre os dípteros muscoides.

5. CONCLUSÕES

- Os bioensaios deste trabalho demonstraram que *B. laterosporus* e *B. thuringiensis* var. *kyushuensis* Btk176 têm efeito tóxico sobre larvas e adultos de *M. domestica* e *C. putoria*, com concentrações de esporos inferiores a maioria dos trabalhos presentes na literatura;
- A estirpe Btk176 é promissora uma vez que não é produtora de thuringiensina. Sua patogenicidade pode estar relacionada ao corpo parasporal, visualizado sob microscopia óptica e eletrônica, que pode ser constituída pela toxina Cry1Ba. A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou os efeitos histopatológicos como aqueles já descritos na literatura;
- *Musca domestica* e *C. putoria* são dípteros de importância médica-veterinária e sanitária tanto na fase larval quanto na adulta. Desta forma este estudo poderá fornecer subsídios ao aprimoramento de técnicas de controle biológico eficazes e segura para o homem e o ambiente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

BIBLIOGRAFIA

1. Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. 820 p.
2. Brusca RC, Brusca GJ. Invertebrados. Segunda edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. 968 p.
3. Lindsay SW, Lindsay TC, Duprez J, Hall MJR, Kwambana BA, Jawara M, et al. *Chrysomya putoria*, a Putative Vector of Diarrheal Diseases. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2012 [citado 19 de setembro de 2018];6(11). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486903/>
4. Oliveira VC de, Mello RP de, d'Almeida JM. Muscoid dipterans as helminth eggs mechanical vectors at the zoological garden, Brazil. Rev Saúde Pública. 2002;36(5):614–20.
5. Furlanetto SMP, Campos MLC, Harsi CM, Buralli GM, Ishihata GK, Furlanetto S, et al. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Rev. Microbiol. 1984; 15: 170–174.
6. Sawabe K, Tanabayashi K, Yamada A, Kurahashi H, Saito T, Tsuda Y, et al. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(2):327–32.
7. Nazni WA, Seleena B, Lee HL, Jeffery J, Rogayah T a. R, Sofian MA. Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica* (L.). Trop Biomed. 2005;22(2):225–31.
8. Rahuma N, Ghenghesh KS, Ben Aissa R, Elamaari A. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. Ann Trop Med Parasitol. 2005;99(8):795–802.

9. Zhang J, Wang J, Chen L, Yassin AK, Kelly P, Butaye P, et al. Housefly (*Musca domestica*) and Blow Fly (*Protophormia terraenovae*) as Vectors of Bacteria Carrying Colistin Resistance Genes. *Appl Environ Microbiol.* 2017;84(1):12–5.
10. Perez JM, Granados JE, Ruiz-Martines I. Etiologia y biologia [Miasis]. *Ovis Espanha.* 1997;v.49(Ovis. Espanha):13–31.
11. Gadelha B, Ferraz A, Aguiar-Coelho V. A importância dos Mesembrinelíneos (Diptera: Calliphoridae) e seu potencial como indicadores de preservação ambiental. *Oecologia Bras.* 2009;13(4):664.
12. Silva PC, Guimarães FL, Ferreira FNC. Controle de vetores – Procedimento de segurança. 1º ed. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
13. Crialesi-Legori PCB, Davolos CC, Lemes ARN, Marucci SC, Lemos MVF, Fernandes OA, et al. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. *Pesqui Agropecuária Bras.* 2014;49(2):79–87.
14. Oliveira EJ, Rabinovitch L, Monnerat RG, Passos LKJ, Zahner V. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potential Use in Biological Control. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6657–64.
15. Ruiu L. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *Insects.* 2013;4(3):476–92.
16. White GF (Gershom F, United States. Bureau of Entomology, United States. Dept. of Agriculture. The cause of European foul brood [Internet]. Washington, D.C. : U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Entomology; 1912 [citado 25 de março de 2019]. 28 p. Disponível em: <http://archive.org/details/causeofeuropeanf2157whit>
17. Román-Blanco C, Sanz-Gómez JJ, López-Díaz TM, Otero A, García-López ML. Numbers and species of *Bacillus* during the manufacture and ripening of Castellano cheese. *Milchwissenschaft.* 1999;54:385–8.

18. Suslova MYu, Lipko IA, Mamaeva EV, Parfenova VV. Diversity of cultivable bacteria isolated from the water column and bottom sediments of the Kara Sea shelf. *Microbiology*. 2012;81(4):484–91.
19. Ghazanchyan NL, Kinosyan MH, Tadevosyan PE, Khachaturyan NS, Afrikian EG. *Brevibacillus laterosporus* as perspective source of new bioinsecticides. *Ann Agrar Sci*. 2018;16(4):413–5.
20. Djukic M, Poehlein A, Thurmer A, Daniel R. Genome Sequence of *Brevibacillus laterosporus* LMG 15441, a Pathogen of Invertebrates. *J Bacteriol*. 2011;193(19):5535–6.
21. Marche MG, Mura ME, Falchi G, Ruiu L. Spore surface proteins of *Brevibacillus laterosporus* are involved in insect pathogenesis. *Sci Rep*. 2017;7:43805.
22. Kuznetsova NI, Azizbekyan RR, Konyukhov IV, Pogosyan SI, Rubin AB. Inhibition of photosynthesis in cyanobacteria and plankton algae by the bacterium *Brevibacillus laterosporus* metabolites. *Dokl Biochem Biophys*. 2008;421(1):181–4.
23. Jia W, Huang X, Li C. A Preliminary Study of the Algicidal Mechanism of Bioactive Metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in Prawn Ponds. *Sci World J*. 2014;2014:1–11.
24. Kamiyama T, Umino T, Nakamura Y, Itezono Y, Sawairi S, Satoh T, et al. Bacithrocins A, B and C, novel thrombin inhibitors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1994;47(9):959–68.
25. Aoyagi T, Yoshida S, Matsuda N, Ikeda T, Hamada M, Takeuchi T. Leuhistin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BMI156-14F1. *J Antibiot (Tokyo)*. 1991;44(6):573–8.
26. Umezawa K, Takeuchi T. Spergualin: a new antitumour antibiotic. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 1987;41(5):227–32.

27. Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M, Iwami M, Yokota Y, Kojo H, et al. Isolation of soil strains producing new cephalosporin acylases. *J Ferment Bioeng.* 1991;72(4):227–31.
28. Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(4):813–35.
29. Porubcan R. Administering *Bacillus laterosporus* to increase poultry feed conversion and weight gain [Internet]. US20030099624A1, 2003 [citado 3 de abril de 2019]. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US20030099624A1/en>
30. Wolfenden RE, Pumford NR, Morgan MJ, Shivaramaiah S, Wolfenden AD, Pixley CM, et al. Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and *Salmonella* reduction in commercial turkey brooding houses. *Poult Sci.* 2011;90(11):2627–31.
31. Holail H, Al-Bahadly A, Olama Z. Detoxification of hexavalent chromium Cr (VI) by *Bacillus laterosporus* and its application in Lebanese waste water. In 2011. p. 233–42.
32. Mohapatra RK, Pandey S, Thatoi H, Panda CR. Reduction of Chromium(VI) by Marine Bacterium *Brevibacillus laterosporus* Under Varying Saline and pH Conditions. *Environ Eng Sci.* 2017;34(9):617–26.
33. Jeyaseelan A, Sivashanmugam K, Jayaraman K. Comparative applications of bioreactor and shake flask system for the biodegradation of tannin and biotreatment of composite tannery effluents. *Pollut Res.* 2008;27:371–5.
34. Reda AB, Ashraf T a. H. Optimization of bacterial biodegradation of toluene and phenol under different nutritional and environmental conditions. *J Appl Sci Res.* 2010;(6):1086–95.
35. Lim J-G, Park D-H. Degradation of Polyvinyl Alcohol by *Brevibacillus laterosporus*: metabolic Pathway of Polyvinyl Alcohol to Acetate. *J Microbiol Biotechnol.* 2001;11(6):928–33.

36. Zouboulis AI, Loukidou MX, Matis KA. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem.* 2004;39(8):909–16.
37. Zubasheva MV, Ganushkina LA, Smirnova TA, Azizbekyan RR. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus*. *Appl Biochem Microbiol.* 2010;46(8):755–62.
38. Carramaschi IN, de Andrade Pereira L, dos Santos Baia V, dos Santos Mallet JR, de Carvalho Queiroz MM, Zahner V. Laboratory evaluation of *Brevibacillus laterosporus* strains as biocidal agents against *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) larvae. *J Invertebr Pathol.* 2017;146:69–72.
39. Ferreira V dos SB, Barcellos I da S, Carramaschi IN, Santos-Mallet JR, Queiroz MMC, Zahner V. Larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), treated with *Brevibacillus laterosporus* (Laubach) spore suspensions. *J Invertebr Pathol.* 2016;137:54–7.
40. 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.* 2007;43(1):136–43.
41. Pereira L de A, Junqueira RM, Carramaschi IN, Queiroz MMC, Zahner V. Bioactivity under laboratory conditions of *Brevibacillus laterosporus* towards larvae and adults of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *J Invertebr Pathol.* 2018;158:52–4.
42. Floris I, Ruiu L, Satta A, Delrio G, Rubino S, Paglietti B, et al. *Brevibacillus laterosporus* strain compositions containing the same and method for the biological control of dipters [Internet]. EP2079314B1, 2010 [citado 19 de setembro de 2018]. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/EP2079314B1/en>
43. Pessanha RR, Carramaschi IN, dos Santos Mallet JR, 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*. *J Invertebr Pathol.* 2015;128:44–6.
44. Carramaschi IN, Pereira L de A, Queiroz MM de C, Zahner V. Preliminary screening of the larvicidal effect of *Brevibacillus laterosporus* strains against the blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(4):427–31.
 45. Ruiu L, Satta A, Floris I. Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after *Brevibacillus laterosporus* ingestion. *J Invertebr Pathol.* 2012;111(3):211–6.
 46. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4^o ed. São Paulo: Atheneu; 2004. 718 p.
 47. Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* 2007;49(4):423–35.
 48. Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(4):547–59.
 49. Schnepf E, Crickmore N, Rie JV, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):775–806.
 50. Thomas WE, Ellar DJ. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci.* 1983;60(1):181–97.
 51. Knowles BH, White PJ, Nicholls CN, Ellar DJ. A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1992;248(1321):1–7.
 52. Earp DJ, Ellar DJ. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27kDa crystal protein. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(8):3619.

53. Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*. 2013;41:87–93.
54. Chestukhina GG, Kostina LI, Mikhailova AL, Tyurin SA, Klepikova FS, Stepanov VM. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch Microbiol*. 1982;132(2):159–62.
55. Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL. Chapter Two - Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: Dhadialla TS, Gill SS, organizadores. *Advances in Insect Physiology* [Internet]. Academic Press; 2014 [citado 6 de abril de 2019]. p. 39–87. (*Insect Midgut and Insecticidal Proteins*; vol. 47). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001974000026>
56. Knowles BH. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -Endotoxins. In: Evans PD, organizador. *Advances in Insect Physiology* [Internet]. Academic Press; 1994 [citado 4 de abril de 2019]. p. 275–308. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065280608600855>
57. Tojo A, Aizawa K. Dissolution and Degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin by Gut Juice Protease of the Silkworm *Bombyx mori*. *Appl Env Microbiol*. 1983;45(2):576–80.
58. Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annu Rev Genet*. 2003;37(1):409–33.
59. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*. 2014;6(12):3296–325.
60. Lima GM de S. PROTEÍNAS BIOINSETICIDAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis*. *An Acad Pernambucana Ciênc Agrônômica Recife*. 2010;7(0):119–37.

61. Ohba M, Aizawa K. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J Invertebr Pathol.* 1979;33(3):387–8.
62. Ishii T, Ohba M. The 23-kilodalton CytB protein is solely responsible for mosquito larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *kyushuensis*. *Curr Microbiol.* 1994;29(2):91–4.
63. Li J, Koni PA, Ellar DJ. Structure of the Mosquitocidal δ -Endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and Implications for Membrane Pore Formation. *J Mol Biol.* 1996;257(1):129–52.
64. Held GA, Kawanishi CY, Huang YS. Characterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J Bacteriol.* 1990;172(1):481–3.
65. West LS. The housefly. Its natural history medical importance and control. Ithaca, NY: Comstock Publishing Company; 1951. 584 p.
66. Marchiori CH, Castro MEV, Paiva TCG, Teixeira FF, Silva C. Dípteros muscóides de importância médica e veterinária e seus parasitóides em Goiás. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec.* 2000;52:350–3.
67. Mian LS, Maag H, Tacal JV. Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol.* 2002;27(1):82–5.
68. Howard LO. The house fly, disease carrier; an account of its dangerous activities and of the means of destroying it [Internet]. New York,: Frederick A. Stokes Company; 1911 [citado 18 de março de 2019]. 374 p. Disponível em: <http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/5708>
69. 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(4):453–69.
70. Sales M de SN, Costa GL da, Bittencourt VREP. Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) captured at two natural breeding

grounds in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(8):1107–10.

71. Barin A, Arabkhazaeli F, Rahbari S, Madani SA. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field. Med Vet Entomol. 2010;24(1):88–90.
72. Umeche N, Mandah LE. *Musca domestica* as a carrier of intestinal helminths in Calabar, Nigeria. East Afr Med J. 1989;66(5):349–52.
73. Cárdenas M, Martínez R. Parasite protozoa of importance in public health picked up by *Musca domestica* Linnaeus in Lima, Peru. Rev Peru Biol. 2004;11:149–52.
74. Nayduch, D, Stutzenberger, F. The housefly (*Musca domestica*) as a vector for emerging bacterial enteropathogens. Recent Research Developments in Microbiology. 2001;(Recent Research Developments in Microbiology):5: 205-209.
75. Macovei L, Miles B, Zurek L. Potential of houseflies to contaminate ready-to-eat food with antibiotic-resistant enterococci. J Food Prot. 2008;71(2):435–9.
76. Can Ucan M, Erol B, Balacan F, Atilgan S, Yaman F, Arslanoglu Z, et al. Myiasis Caused by *Musca domestica* Larvae in a Child: A Case Study. J Anim Vet Adv. 2011;10(16):2149–52.
77. Rahman A, Ishfaq A, Arshad Azmi M, Khatoon N. Cutaneous myiasis of scalp in a young girl related to *Musca domestica*. Dermatol Online J. 2015;21(11).
78. Dehghani R, Sedaghat M, Bidgoli MS. Wound Myiasis due to *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Persian Horned Viper *Pseudocerastes persicus* (Squamata: Viperidae). J Arthropod-Borne Dis. 2012;6(1):86–9.
79. DiK B, İlhan C, Ceylan O, Uzunlu EO. The first case of traumatic myiasis caused by *Musca domestica* in a dog in Konya, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2018;42(5):492–5.
80. Maia AAM, Gomes AG. Vetores de *Dermatobia hominis*, Linnaeus Jr., 1761 (Diptera: cuterebridae) na região de Uberaba, Minas Gerais. Rev Fac Med Veterinária E Zootec Universidade São Paulo. 1988;25(1):47–51.

81. Kuşcu F, Özsoy KM, Ulu A, Kurtaran B, Kömür S, İnal AS, et al. Furuncular Myiasis Caused by *Dermatobia hominis* in a Traveler Returning from the Amazon Jungle. *Turk Parazitoloji Derg.* 2017;41(3):173–6.
82. Varzandeh M, Bruce WN, Decker GC. Resistance to Insecticides as a Factor influencing the Biotic Potential of the House Fly. *J Econ Entomol* [Internet]. 1954 [citado 19 de setembro de 2018];47(1). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19541000340>
83. Bloomcamp CL, Patterson RS, Koehler PG. Cyromazine resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol.* 1987;80(2):352–7.
84. Wen Z, Scott JG. Cross-Resistance to Imidacloprid in Strains of German Cockroach (*Blattella germanica*) and House Fly (*Musca domestica*). *Pestic Sci.* 1997;49(4):367–71.
85. Shono T, Scott JG. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pestic Biochem Physiol.* 2003;75(1–2):1–7.
86. Shono T, Zhang L, Scott JG. Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic Biochem Physiol.* 2004;80(2):106–12.
87. Zhang Y, Li J, Ma Z, Shan C, Gao X. Multiple mutations and overexpression of the MdaE7 carboxylesterase gene associated with male-linked malathion resistance in housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Sci Rep.* 2018;8:1–9.
88. Zimmer CR, Dias de Castro LL, Pires SM, Delgado Menezes AM, Ribeiro PB, Leivas Leite FP. Efficacy of entomopathogenic bacteria for control of *Musca domestica*. *J Invertebr Pathol.* 2013;114(3):241–4.
89. Stein AEK. *Bacillus thuringiensis* para controle de *Musca domestica*: seleção de estirpes e avaliação do perfil de hemócitos em larvas [Internet] [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro)]. [Goiânia]: Universidade Federal de Goiás; 2017 [citado 8 de fevereiro de 2019]. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/7731>

90. Lonc ET, Lachowicz M, Jedryka U. Insecticidal activity of various strains of *Bacillus* against larvae of house flies (*Musca domestica*). *Wiad Parazytol.* 1991;37:357–65.
91. Merdan BA. *Bacillus thuringiensis* as a feed additive to control *Musca domestica* associated with poultry houses. *J Basic Appl Zool.* 2012;65(1):83–7.
92. Mwamburi LA, Laing MD, Miller R. Laboratory and Field Evaluation of Formulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a Feed Additive and Using Topical Applications for Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Larvae in Caged-Poultry Manure. *Environ Entomol.* 2011;40(1):52–8.
93. Mehrabi MR, Zoghimofrad L, Mazinani M, Akbarzadeh A, Rahimi A. A study of the effect of *Bacillus thuringiensis* serotype H14 (subspecies *israelensis*) delta endotoxin on *Musca* larva. *Turk J Med Sci.* 2015;45(4):794–9.
94. Indrasith LS, Suzuki N, Ogiwara K, Asano S, Hori H. Activated insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovars killed adult house flies. *Lett Appl Microbiol.* 1992;14(4):174–7.
95. Geden CJ. Status of biopesticides for control of house flies. *JBiopest* 5 Suppl. 2012;1–11.
96. Guimarães JH, Prado KPLA, Linhares AX. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). 1978 [citado 19 de setembro de 2018]; Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=f2076a59-3c9e-4e0e-8b08-d8dd0acd04f1>
97. Guimarães JH, Prado AP do, Buralli GM. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol.* 1979;23(4):245–55.
98. Zumpt F. *Myiasis in Man and Animals in the Old World: A Textbook for Physicians, Veterinarians, and Zoologists.* London: Butterworths; 1965. 292 p.

99. Ferraz ACP, Bosisio DD, Aguiar-Coelho VM. Dieta para Larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). EntomoBrasilis. 2011;4(3):125–9.
100. Mariluis JC. Notes about metallic flies, its sanitary importance and ecology (Diptera: Calliphoridae). Rev Soc Entomológica Argent [Internet]. 1999 [citado 14 de abril de 2019];58(1–2). Disponível em: <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/32785>
101. UNICEF, Organización Mundial de la Salud. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. New York: United Nations Children’s Fund; 2009.
102. Georghiou GP, Lagunes-Tejeda A. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. (FAO AGPP/MISC/91-1) Roma: FAO. 1991.
103. Ansari MS, Moraiet MA, Ahmad S. Insecticides: Impact on the Environment and Human Health. In: Malik A, Grohmann E, Akhtar R, organizadores. Environmental Deterioration and Human Health: Natural and anthropogenic determinants [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [citado 21 de março de 2019]. p. 99–123. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7890-0_6
104. Oliveira MS, Nascimento MA, Cavados CFG, Chaves JQ, Rabinovitch L, Lima MM, et al. Biological activity of *Bacillus thuringiensis* strains against larvae of the Blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Neotrop Entomol. 2006;35(6):849–52.
105. 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). Isr J Entomol. 1998;32:117–23.
106. Favret ME, Yousten AA. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. J Invertebr Pathol. 1985;45(2):195–203.

107. Johnson C, Bishop AH, Turner CL. Isolation and Activity of Strains of *Bacillus thuringiensis* Toxic to Larvae of the Housefly (Diptera: Muscidae) and Tropical Blowflies (Diptera: Calliphoridae). *J Invertebr Pathol.* 1998;71(2):138–44.
108. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *J Am Mosq Control Assoc.* 1987;3(2):302–3.
109. Ruiu L, Delrio G, Ellar DJ, Floris I, Paglietti B, Rubino S, et al. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). *Entomol Exp Appl.* 2006;118(2):137–44.
110. Hanski I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol Entomol.* 1987;12(3):257–66.
111. Wigglesworth VB. *The Principles of Insect Physiology.* 7^o ed. London: Chapman e Hall; 1972. 832 p.
112. Ruppert EE, Barnes RD. *Zoologia dos invertebrados.* 6^o ed. São Paulo: Roca; 1996. 1029 p.
113. Hoffmann KH, Lorenz MW. Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica.* 1998;26(4):323–30.
114. Shin SC, Kim S-H, You H, Kim B, Kim AC, Lee K-A, et al. *Drosophila* Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. *Science.* 2011;334(6056):670–4.
115. Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* Promotes *Drosophila* Systemic Growth by Modulating Hormonal Signals through TOR-Dependent Nutrient Sensing. *Cell Metab.* 2011;14(3):403–14.
116. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(5):699–735.
117. Buchon N, Broderick NA, Chakrabarti S, Lemaitre B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2009;23(19):2333–44.

118. Sharma CBSR, Sahu RK. Cytogenetic hazards from agricultural chemicals: I. A preliminary study on the responses of root meristems to exotoxin from *Bacillus thuringiensis* a constituent of a microbial insecticide, thuricide. *Mutat Res Mutagen Relat Subj.* 1977;46(1):19–26.
119. Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. *Bacillus thuringiensis* is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. *Insects.* 2013;5(1):62–91.
120. Wiest SLF, Júnior HLP, Fiuza LM. Thuringiensin: a toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Bt Res [Internet].* 2015 [citado 10 de janeiro de 2019];6(0). Disponível em: <http://biopublisher.ca/index.php/bt/article/view/1920>
121. Belder E, Elderson J. The introduction of Integrated Pest Management in the Ethiopian Horticultural Sector. *Plant Res Int Part Wagening UR.* 2010;1–13.
122. Zhou J, Xu Z, Chen S. Simulation and prediction of the thuringiensin abiotic degradation processes in aqueous solution by a radius basis function neural network model. *Chemosphere.* 2013;91(4):442–7.
123. Tsai S-F, Yang C, Liu B-L, Hwang J-S, Ho S-P. Role of oxidative stress in thuringiensin-induced pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;216(2):347–53.
124. Iatsenko I, Nikolov A, Sommer RJ. Identification of Distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 Nematicidal Factors Using the Model Nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*. *Toxins.* 2014;6(7):2050–63.
125. Liu X-Y, Ruan L-F, Hu Z-F, Peng D-H, Cao S-Y, Yu Z-N, et al. Genome-wide Screening Reveals the Genetic Determinants of an Antibiotic Insecticide in *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* 2010;285(50):39191–200.
126. Charles JF, Delécluse A, Roux CN. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application.* Springer Science & Business Media; 2013. 532 p.
127. WHO. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. Report of the WHO informal consultation in Geneva [Internet]. WHO. 1999

[citado 10 de janeiro de 2019]. Disponível em:
https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpc_whopes_99_2/en/

128. Arango JA, Romero M, Orduz S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *J Appl Microbiol.* 2002;92(3):466–74.
129. Angelo EA, Vilas-Bôas GT, Castro-Gómez RJH. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. *E A.* 2010;31(4):945–58.
130. Copping LG, Menn JJ. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag Sci.* 2000;56(8):651–76.
131. Yu CG, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG, Estruch JJ. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(2):532–6.
132. Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo-Coutinho C, Rabinovitch L. Histopathological and ultrastructural effects of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(5):493–8.
133. Percy J, Fast PG. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J Invertebr Pathol.* 1983;41(1):86–98.
134. Silva VC, Pinheiro NL, Scherer PO, Falcão SS, Ribeiro VR, Mendes RMM, et al. Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Microsc Res Tech.* 2008;71(9):663–8.
135. Abdelkefi-Mesrati L, Boukedi H, Dammak-Karray M, Sellami-Boudawara T, Jaoua S, Tounsi S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. *J Invertebr Pathol.* 2011;106(2):250–4.
136. Song P, Wang Q, Nangong Z, Su J, Ge D. Identification of *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) midgut putative receptor for

- Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry7Ab3 toxin. J Invertebr Pathol. 2012;109(3):318–22.
137. Frankenhuyzen K van. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. J Invertebr Pathol. 2009;101(1):1–16.
138. Zhong C, Ellar DJ, Bishop A, Johnson C, Lin S, Hart ER. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Which Is Toxic to Insects in Three Orders. J Invertebr Pathol. 2000;76(2):131–9.
139. Heath ACG, Broadwell AH, Chilcott CN, Wigley PJ, Shoemaker CB. Efficacy of Native and Recombinant Cry1B Protein Against Experimentally Induced and Naturally Acquired Ovine Myiasis (Fly Strike) in Sheep. J Econ Entomol. 2004;97(6):1797–804.
140. Polanczyk R, Alves S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. Agrocienca - Sitio En Repar. 2003;7(2):1-9–9.
141. Silva N da, Thuler AMG, Abreu IL de, Davolos CC, Polanczyk RA, Lemos MVF. Characterization and selection of *Bacillus thuringiensis* isolates effective against *Sitophilus oryzae*. Sci Agric. 2010;67(4):472–8.
142. Zahner V, Rabinovitch L, Suffys P, Momen H. Genotypic Diversity among *Brevibacillus laterosporus* Strains. Appl Environ Microbiol. 1999;65(11):5182–5.
143. Marche MG, Camiolo S, Porceddu A, Ruiu L. Survey of *Brevibacillus laterosporus* insecticidal protein genes and virulence factors. J Invertebr Pathol. 2018;155:38–43.