

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



PATOGENIA DE *Bacillus thuringiensis* E *Brevibacillus laterosporus* EM LARVAS DE *Musca domestica* (DIPTERA, MUSCIDAE), EM LABORATÓRIO

DUARTE, Jucelio Peter^{1*}; CÁRCAMO, Marcial Corrêa^{1,2}; ZIMMER, Cristine Ramos³; RIBEIRO, Paulo Bretanha¹; LEITE, Fábio Pereira Leivas¹

¹ Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP/IB/UFPel) * juceliod@hotmail.com; ² Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, bolsista CAPES; ³ Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Conjunto Agropecuário Visconde da Graça (CAVG)

1. INTRODUÇÃO

A *Musca domestica* (Diptera, Muscidae) apresenta grande interesse sanitário devido a seu caráter sinantrópico, sua endofilia, abundância na região urbana, alto poder reprodutivo e por ser vetor de patógenos ao homem e outros animais (MENDES & LINHARES, 1993).

Os programas de controle desta praga são baseados na utilização de larvicidas e adulticidas químicos. Porém, existem riscos potenciais tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana e ainda há o problema do desenvolvimento de resistência (MARÇON et al., 2003; DARBRO & MULLENS, 2004; KRISTENSEN et al., 2004), desta forma, existe uma constante busca por estratégias alternativas ao controle químico, incluindo a utilização de agentes microbianos..

Várias espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas como bioinseticidas no controle de pragas (RODRIGUES et al., 1988). Existe hoje uma vasta literatura sobre o efeito inseticida do *B. thuringiensis* e a eficácia de alguns isolados sobre a mosca doméstica têm sido demonstrada (JOHNSON et al., 1998; ZHONG et al., 2000; RUIU et al., 2006, 2008).

De acordo com KONGSUWAN et al (2005), quando um inseto suscetível ingere δ -endotoxina, toxina responsável pela ação da bactéria, esta é ativada no intestino e induz a formação de um poro lítico na membrana da célula epitelial do intestino médio do mesmo, conduzindo a um aumento da permeabilidade da membrana, causando paralisia intestinal, cessando a alimentação e acarretando na morte da larva. Existem dois tipos de δ -endotoxinas, sendo que as citolíticas proteínas Cry são específicas de Diptera. A bactéria *B. laterosporus* (Laubach), também tem demonstrado propriedades inseticidas sobre diferentes ordens de insetos, inclusive sobre a mosca doméstica (RUIU et al., 2006; 2008).

A identificação de linhagens bacterianas inseticidas contra a mosca doméstica é de grande importância para o estabelecimento de medidas alternativas de controle desta praga sinantrópica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade patogênica das bactérias *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, e *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*, sobre o desenvolvimento das formas imaturas de *M. domestica* em meio artificial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se para a realização do experimento uma colônia de *M. domestica* já adaptada às condições de laboratório. Durante todo o período de experimentação, a colônia foi mantida em câmara climatizada com temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar acima de 75% e com fotofase de 12 horas, no Laboratório de Biologia de Insetos no Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os insetos foram criados conforme Ribeiro et al., (2000).

Nos bioensaios foram utilizadas as bactérias entomopatogênicas *Brevibacillus laterosporus*; *Bacillus thuringiensis var israelensis*, *Bti*; *B. thuringiensis var kurstaki*, *Btk*) pertencentes ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia /IB/UFPel.

As bactérias destinadas aos bioensaios foram cultivadas em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio NYSM líquido (YOUSTEN, 1984), incubadas em agitador orbital a 150 rpm e mantidas em temperatura de 30°C por 48 horas. Após o período de incubação amostras foram retiradas para verificação de esporulação através de esfregaço por coloração de Wirtz-Cocklin, as suspensões foram incubadas em banho-maria a 80°C por 15 min para eliminar as formas vegetativas. Após foi efetuado a contagem por diluições logarítmicas e semeadura em meio agar NYSM em placas de Petri e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após a quantificação bacteriana suspensões foram preparadas nas concentrações $1,0 \cdot 10^7$ e $1,0 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Todo procedimento foi realizado em cabine de biossegurança com fluxo laminar classe 2.

Grupos de trinta larvas recém eclodidas foram colocadas em frascos com 30g de dieta, composta por farinha de carne e serragem na proporção de 2:1, respectivamente, misturadas a 35ml da suspensão bacteriana. Os frascos foram acondicionados no interior de recipientes maiores com serragem úmida, para obtenção das larvas L3 sobreviventes, que diariamente eram contadas e colocadas em vidros com serragem úmida e cobertas com tecido tipo "organza" para pupariação e posteriormente a emergência de adultos. Para cada concentração, foram feitas três repetições e no controle, utilizou-se a mesma dieta descrita acima, umedecida com 35ml de água destilada. O experimento foi mantido em estufa incubadora a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar acima de 75% e com fotofase de 12 horas.

Os indivíduos sobreviventes foram acompanhados até a emergência dos adultos. A mortalidade larval foi avaliada diariamente, sendo contabilizadas as larvas que conseguiram abandonar o substrato e constatada também a viabilidade pupal das mesmas através da emergência das moscas adultas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade de *M. domestica* manteve uma tendência proporcional ao aumento das concentrações bacterianas (Tabela 1). Em relação a mortalidade larval, a menor taxa obtida foi com *B. laterosporus* com 17,78% na concentração $1,0 \cdot 10^8$ UFC/mL e a maior taxa ocorreu para *Bti* com 47,78% na concentração $1,0 \cdot 10^8$ UFC/mL.

Ruiu et al., (2006) trabalhando com *B. laterosporus* sobre *M. domestica*, observaram que uma maior suscetibilidade esta associada às larvas jovens, por

ingerirem uma maior quantidade de alimento, devido ao prolongado tempo de exposição à dieta tratada com a bactéria. No presente estudo foi verificada a mortalidade larval total, e não nos diferentes instares larvais, porém uma alta mortalidade larval foi observada com as bactérias entomopatogênicas *Bti* e *Btk*, e não em *B. laterosporus* (Tabela 1) como os autores supracitados verificaram.

Tabela 1 - Mortalidade (expressa em porcentagem) de larvas e pupas de *Musca domestica* em função da ação de bactérias entomopatogênicas em condições de laboratório. (T^o: 25°C, UR: 80% e fotofase de 12 horas)

Mortalidade (%)	Controle	<i>Bti</i>		<i>Btk</i>		<i>B. laterosporus</i>	
		10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸
Larval	10,00	44,44	47,78	26,67	46,67	23,33	17,78
Pupal	4,94	16,00	12,76	22,73	8,33	26,09	63,51
Acumulada	14,94	60,44	60,54	49,40	55,00	49,42	81,29

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*; *Btk* – *Bacillus thuringiensis kurstaki*; *B. laterosporus* – *Brevibacillus laterosporus*

A mortalidade pupal tanto para *Bti* como *Btk* apresentou uma taxa superior na concentração 1,0.10⁷ UFC/mL, o que não ocorreu com *B. laterosporus* em que a mortalidade foi de 26,09% na concentração 1,0.10⁷ UFC/mL e 63,51% na concentração 1,0.10⁸ UFC/mL.

Segundo KNOWLES & ELLAR (1987), as proteínas Cry causam a morte das células epiteliais intestinais ao inativarem o sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica. A consequência final da destruição do intestino médio e a proliferação de bactérias na hemolinfa é a morte dos insetos por inanição ou septicemia (SOBERÓN & BRAVO, 2002).

Verificando-se a mortalidade acumulada, das diferentes bactérias avaliadas, observa-se que para as duas concentrações testadas a taxa de mortalidade foi superior a 49% para as três bactérias (Tabela 1), índice muito expressivo por tratar-se de um agente de controle biológico.

Portanto, considerando o efeito cumulativo de mortalidade, constata-se que a patogenicidade das bactérias foi efetiva, visto que, o controle biológico não se caracteriza por apresentar uma “resposta de choque” como o controle químico, uma vez que, a preservação dos inimigos naturais faz parte da estratégia, sendo importante à presença de hospedeiros e presas no agroecossistema, em baixa densidade. Cabe ressaltar que o controle biológico alcança sua máxima efetividade quando associado a outros métodos, inseridos no Manejo Integrado de Pragas.

4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que as bactérias entomopatogênicas *B. laterosporus*, *Bti* e *Btk* apresentam ação patogênica no desenvolvimento de *M. domestica*.

5. REFERÊNCIAS

DARBRO, J. M., AND B. A. MULLENS. Assessing insecticide resistance and aversion to methomyl-treated toxic baits in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)

populations in southern California. **Pest Management Science**, v.60, p. 901-908, 2004.

JOHNSON, C.; BISHOP, A. H.; TURNER C. L. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Journal Invertebrate Pathology**, v.71, p.138–144, 1998.

KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochemical and Biophysical Acta** v.924, p.509-518,1987.

KONGSUWAN, K.; GOUGH, J.; KEMP, D.; MCDEVITT, A.; AKHURST, R. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* endotoxin, Cry47Aa, from strains that are toxic to the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n 1, p. 127-136, 2005.

KRISTENSEN, M.; JESPERSEN, J.B.; KNORR, M. Crossresistance potential of fipronil in *Musca domestica*. **Pest Management Science**, v.60, p.894-900, 2004.

MARÇON, P.C.; THOMAS, G.D.; SEIGFRIED, B.D., J. B. CAMPBELL, AND S. R. SKODA. Resistance status of house flies (Diptera: Muscidae) from southeastern Nebraska beef cattle feedlots to selected insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.96, p.1016-1020, 2003.

MENDES, J.; LINHARES, A.X. Atratividade por iscas, sazonalidade e desenvolvimento ovariano em várias espécies de Muscidae (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.37, p. 289-297, 1993.

RIBEIRO, P. B.; CARVALHO, C. J. B.; CHERNAKI, A.M.; COSTA, P.R.P. Longevidade, oviposição e viabilidade pupal de *Ophyra aenescens* Wiedemann, 1830 (Diptera, Muscidae, Azeliinae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, n. 6, v.3, p.264-268, 2000.

RODRIGUES, I.B. et al. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 441-444, 1988.

RUIU, L.; SATTA, A.; FLORIS, I. Immature House Fly (*Musca domestica*) Control in Breeding Sites With a New *Brevibacillus laterosporus* Formulation. **Environmental Entomology**, v.37, n.2, 2008.

RUIU L., L. et al. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.118, p. 137–144, 2006.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas inseticidas. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

YOUSTEN, A.A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advanced Biotechnology. Process**, v.3, p.315–343, 1984.

ZHONG,C.et al. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.76, p.131–139. 2000.

