

Boletim de Pesquisa 211

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 340 Dezembro, 2007

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULÁSICA E QUITINÁSICA DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS CONTRA *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Anthonomus grandis*.

Chitinases and Cellulases from *Bacillus thuringiensis* Active Against *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* and *Anthonomus grandis*



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 211

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULÁSICA E
QUITINÁSICA DE ESTIRPES DE *Bacillus
thuringiensis* ATIVAS CONTRA *Spodoptera
frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e
Anthonomus grandis.**

**Chitinases and Cellulases from *Bacillus
thuringiensis* Active Against *Spodoptera
frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* and
*Anthonomus grandis***

Vinícius Fiuza Dumas
Clarissa dos Santos Goldenberg
Francislete Rodrigues de Melo
Érica Soares Martins
Lílian Botelho Praça
Rose Gomes Monnerat

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 945 Avaliação da atividade celulásica e quitinásica de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Anthonomus grandis*. / Vinícius Fiuza Dumas ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

15 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 211)

1. Controle biológico. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Bactéria. 4. *Spodoptera frugiperda*. 5. *Anticarsia gemmatalis*. 6. Lagarta. 7. *Anthonomus grandis*. 8. Bicudo. I. Dumas, Vinícius Fiuza. II. Série.

632.96 – CDD 21.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULÁSICA E QUITINÁSICA DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS CONTRA *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Anthonomus grandis*.

Chitinases and Cellulases from *Bacillus thuringiensis* Active Against *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* and *Anthonomus grandis*

Vinícius Fiuza Dumas¹
Clarissa dos Santos Goldenberg²
Francislete Rodrigues de Melo³
Érica Soares Martins⁴
Lílian Botelho Praça⁵
Rose Gomes Monnerat⁶

RESUMO

Nas últimas décadas, o cultivo agrícola mundial vem crescendo exponencialmente. Culturas como a de milho, soja e algodão, recebem destaque por influenciarem na movimentação de divisas e gerarem empregos em todo mundo. Porém, essas culturas estão vulneráveis a diversas pragas, que provocam grandes perdas econômicas, todos os anos. Dentre estas, destacam-se a lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) e o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Uma alternativa viável para o controle dessas pragas é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria caracterizada pela produção de inclusões protéicas, ativas especificamente, contra insetos alvo. Essa bactéria é capaz de produzir enzimas como quitinase e celulase, que podem auxiliar na sua dispersão pelo ambiente e no seu modo de ação contra os insetos. O objetivo deste trabalho foi analisar a produção de quitinase e celulase de dez estirpes de Bt, pertencentes ao banco de *Bacillus spp.* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ativas contra *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis*. Os ensaios de quitinase e celulase foram realizados com a cultura das estirpes crescidas por 16h, 24h, 48h e 72h, a fim de se avaliar a relação entre crescimento celular e produção enzimática. A atividade enzimática foi determinada a partir de um método colorimétrico e a produção de N-acetil glucosamina (NAG) foi dosada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Todas as estirpes testadas apresentaram produção de quitinase e celulase a partir de 16 h de crescimento. Porém, as curvas de atividade enzimática das estirpes não apresentaram diferenças significativas quando comparadas, mostrando assim que essas enzimas não influenciam na diferença de toxicidade apresentada pelas estirpes.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, quitinase e celulase.

¹ Biólogo - Graduando - Universidade de Brasília - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Engenheira Agrônoma - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bióloga - PhD - União Pioneira de Integração Social

⁴ Bióloga - Doutoranda - Universidade de Brasília - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Engenheira Agrônoma - Mestre em Ciências Agrárias - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶ Bióloga - PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

In the last few decades, the agricultural worldwide culture has grown exponentially. Cultures such as of maize, soy and cotton, attract more attention for generating more revenue and creating jobs all over the world. However, these cultures are vulnerable to various plagues, which incur in great economic losses. Amongst these, some are distinguished: the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) and the boll weevil (*Anthonomus grandis*). A viable alternative to control these plagues is the use of biological control agents, such as the *Bacillus thuringiensis* (Bt), which is an entomopathogenic bacterium characterized by its production of protein inclusions, specifically active against target insects. These bacteria are capable of producing enzymes, such as chitinase and cellulase, which assists in the way the bacteria disperses and acts against the insects. The objective of this work was to analyze the production of chitinase and cellulase in strains of Bt that are active against *S. frugiperda*, *A. gemmatilis* and *A. grandis*. The bacteria strains used in testing belong to the *Bacillus spp.* Bank, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. In order to evaluate the relationship between cellular growth and the production of chitinase, the assays were carried through with bacteria cultures grown for 16h, 24h, 48h and 72h. Chitinase and cellulase activity was determined by a colorimetric method. The amount of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) or its equivalent was measured by development of color in acid medium. All strains presented enzymatic production after 16h of cellular growth. However, the curves obtained of enzymatic activity for these strains didn't show us any significant difference. According to these results, was not possible to associate chitinase and cellulase activity with toxicity of Bt strains. Thus, it is possible that toxic activity observed could be attributed to cry toxins, and the chitinase possess a secondary insecticidal function.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*, chitinase and cellulase.

INTRODUÇÃO

Em todo mundo, a preocupação com os impactos causados as culturas de milho, soja e algodão, devido aos ataques de insetos-praga, tem sido crescente. Essas monoculturas são atacadas por diversas pragas que podem provocar danos econômicos significativos. Dentre suas principais pragas, destacam-se a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), a *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) e o *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843).

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é conhecida também por lagarta dos milharais, lagarta militar ou “lagarta do cartucho”. É o principal inseto-praga da cultura do milho no Brasil. Além disso, pode atacar e causar danos a várias outras culturas de importância econômica, como o sorgo, trigo, arroz, feijoeiro, tomateiro e algodoeiro (Cruz *et al*, 1999). A lagarta mede aproximadamente 35 mm de comprimento no último instar, sendo sua coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e sub-ventral, apresentando nesta última parte manchas de coloração marrom-avermelhada (Cruz, 1995).

Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) é conhecida por ser a principal lagarta infestante da soja, sendo a maior causadora da desfolha, podendo muitas vezes destruir completamente a planta (Praça, 2003). O adulto é uma mariposa de coloração pardo-acinzentada, que mede cerca de 40 mm de envergadura. Todo o período reprodutivo da lagarta da soja ocorre no período noturno e o ciclo de vida é de aproximadamente 30 dias dependendo a temperatura. (Praça, 2003; Pratisoli, 2006).

Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae), também conhecido como bicudo do algodoeiro, é um inseto que mede normalmente de quatro a nove milímetros de comprimento e sete milímetros de envergadura, possuindo coloração castanho-ferruginosa e cinza quando se torna mais velho. A variação do tamanho do bicudo é influenciada por uma série de fatores, destacando-se entre eles, a quantidade de alimento no estágio larval (Praça *et al*, 2004).

O uso massivo de inseticidas químicos no controle dessas pragas, muitas vezes de forma inadequada, tem causado desequilíbrios nos ecossistemas, por poluir o meio ambiente, atuar sobre os inimigos naturais e promover o surgimento de populações de insetos resistentes. A importância dada ao controle de pragas e o aumento da consciência da população para os efeitos diretos e indiretos dos pesticidas, na saúde pública e no ambiente em geral, têm demandado a utilização de novas formas de controle de pragas, que sejam mais econômicas e menos danosas ao meio ambiente. Sendo assim, uma alternativa viável para o combate de insetos-praga é a utilização de entomopatógenos, que incluem vírus, bactérias e fungos (Moraes & Capalbo, 1986).

Entre os agentes microbianos com atividade entomopatogênica, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria aeróbia, gram-positiva, da família Bacillaceae caracterizada pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões protéicas cristalinas, que são tóxicas para vários grupos de insetos (Feitelson *et al*, 1992). Estas proteínas são produzidas sob forma de protoxinas, sendo transformadas em peptídeos tóxicos, no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A proteína ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (Aronson *et al*, 1986).

Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas. Desta forma, esta bactéria não possui efeito poluente ao meio ambiente, pois é inócua aos mamíferos, outros invertebrados e às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986; OMS, 1987). Experimentos *in vivo*, nos quais se administram altas doses de proteínas Cry a outros organismos, que não insetos, têm demonstrado nenhuma alteração na atividade metabólica dos mesmos, comprovando sua inocuidade aos demais organismos (Shimada *et al*, 2003).

Outra vantagem apresentada por essas bactérias é capacidade de produzir enzimas como quitinase e celulase, que podem auxiliar na sua dispersão pelo ambiente e no seu modo de ação contra os insetos. As propriedades dessas enzimas e sua importância no controle biológico têm despertado grande interesse. Assim como ocorre no sistema celulolítico, os sistemas quitinolíticos mais bem estudados são aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*, porém já é amplamente aceito que o potencial biotecnológico dessas enzimas não está restrito às enzimas de fungos. Uma ampla gama de genes de quitinases e celulases de várias espécies de bactérias está sendo caracterizada por diversos pesquisadores em todo o mundo. Assim, o aprimoramento do conhecimento acerca dos estudos relacionados permite o entendimento de mecanismos enzimáticos e do papel biológico dessas enzimas.

O objetivo deste trabalho foi analisar a produção de quitinase e celulase de dez estirpes de Bt, pertencentes ao banco de *Bacillus spp.* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Monnerat *et al*, 2001), ativas contra *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Origem das estirpes e condições de crescimento das culturas

As estirpes 550, 845 e 1905, tóxicas a *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, e as estirpes 601, 906, 907, 908 e 1806, tóxicas a *A. grandis*, foram obtidas no banco de Germoplasma de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas linhagens são originárias de amostras de água e solo de diferentes regiões do país

(Monnerat *et al*, 2001). Além disso, foram utilizadas duas outras estirpes para os testes, a 1450 (*Bacillus thuringiensis kurstaki*) e a 1122 (*Bacillus thuringiensis tenebrionis*), que são estirpes de referência para Lepidópteros e Coleópteros, respectivamente. As estirpes foram crescidas em meio líquido NYSM (Yousten, 1984) a 200 rpm, 28 °C, durante 72h.

2. Ensaio enzimático

Os ensaios de quitinase e celulase foram realizados com a cultura das estirpes crescidas por 16h, 24h, 48h e 72h, a fim de se avaliar a relação entre crescimento celular e produção enzimática.

O ensaio de quitinase baseou-se no crescimento das estirpes ativas contra *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis* sem a adição de quitina no meio de cultura. A atividade quitinásica foi determinada pelo método colorimétrico conforme descrito por Reissig *et al*, 1955. Para cada estirpe, 300 μ l do meio de cultura crescido foram reagidos com 500 μ l de tampão acetato (100 nM e pH 5.0), contendo quitina regenerada 0,5%, em um tubo de ensaio. Além disso, para cada amostra testada foi preparado um branco pelo mesmo método descrito acima, porém ocorrendo uma substituição do tampão por água destilada. Os eppendorfs foram incubados a 37 °C durante 8 horas. Após disso, foram reagidos 250 μ l do produto da incubação com 750 μ l de ácido dinitrosalicílico (DNS) em eppendorfs. Logo em seguida, esses tubos foram colocados no banho-maria, contendo água a 100 °C, por 10 minutos. A quantidade de N-acetilglucosamina (GlcNAc) formada foi determinada pela utilização do espectrofotômetro previamente calibrado e ajustado para a faixa de absorvância de 550 nm. Por fim, calculou-se a atividade enzimática de cada uma das estirpes de bactérias fazendo-se a média dos três tubos e subtraindo-se o branco. O valor obtido corresponde à atividade quitinásica em UA (unidade de atividade enzimática). Uma leitura de 0.100 nm foi considerada como correspondendo a 1 UA, sendo este valor arbitrário e adotado neste protocolo.

O ensaio de celulase caracterizou-se no crescimento das estirpes ativas contra *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis* sem a adição de celulose no meio de cultura. A atividade celulásica baseou-se na determinação de endoglucanases, exoglucanases e β -D-glucosidases, uma vez que todas conseguem hidrolisar a celulose sinergicamente. Em tubos de hemólise, foram reagidos 250 μ l do meio de cultura crescido, uma tira de papel filtro Whatman No. 1, possuindo 1 x 4 cm, e 500 μ l de tampão citrato de sódio (50mM e pH 4.5). Para cada estirpe, foi preparado um branco contendo o meio de cultura crescido e o tampão citrato de sódio sem o acréscimo de celulose. Os tubos de hemólise foram incubados a 50 °C durante 60 minutos. Após incubação, foram acrescidos ao produto formado 1,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS). Logo em seguida, os tubos foram colocados no banho-maria, contendo água a 100 °C, por 5 minutos. A quantidade de N-

acetilglucosamina obtida foi determinada pela utilização do espectrofotômetro previamente calibrado e ajustado para a faixa de absorvância de 550 nm. Por fim, calculou-se a atividade enzimática do mesmo modo descrita para o ensaio de quitinase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de quitinase produzida nos diferentes tempos de crescimento celular foi determinada e comparada entre as estirpes testadas. Assim como em alguns trabalhos que analisam a produção de quitinase por estirpes de *B. thuringiensis* (Sampson e Goodway, 1998; Thamthiankul *et al.*, 2001; Sirichotpakorn *et al.*, 2001), os resultados, também, comprovaram a produção de quitinase por todas as estirpes. Em relação às estirpes tóxicas a *A. grandis*, ocorreu produção de quitinase a partir de 16h de crescimento, alcançando o máximo de produtividade no tempo de 72h (figura 1). As estirpes 601, 906, 907 e 908 apresentaram a curva de atividade quitinásica contínua e crescente antes de 48h de crescimento celular. A partir desse momento, a produção de quitinase tornou-se estável. As estirpes 1806 e Btt, diferentemente das anteriores, apresentaram uma curva de atividade quitinásica contínua e crescente durante todo o tempo do crescimento celular. Todas as estirpes ativas contra *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* apresentaram atividade quitinásica desde 16h de crescimento, porém nem todas mostraram produção máxima de quitinase no tempo de 72h (figura 2). Em condições específicas de crescimento, o Btk pode apresentar alta produtividade de quitinase (Wiwat *et al.*, 2000), entretanto isso não aconteceu no experimento. Isso sugere que algumas mudanças podem ser feitas visando uma melhor produtividade de quitinase pelas estirpes.

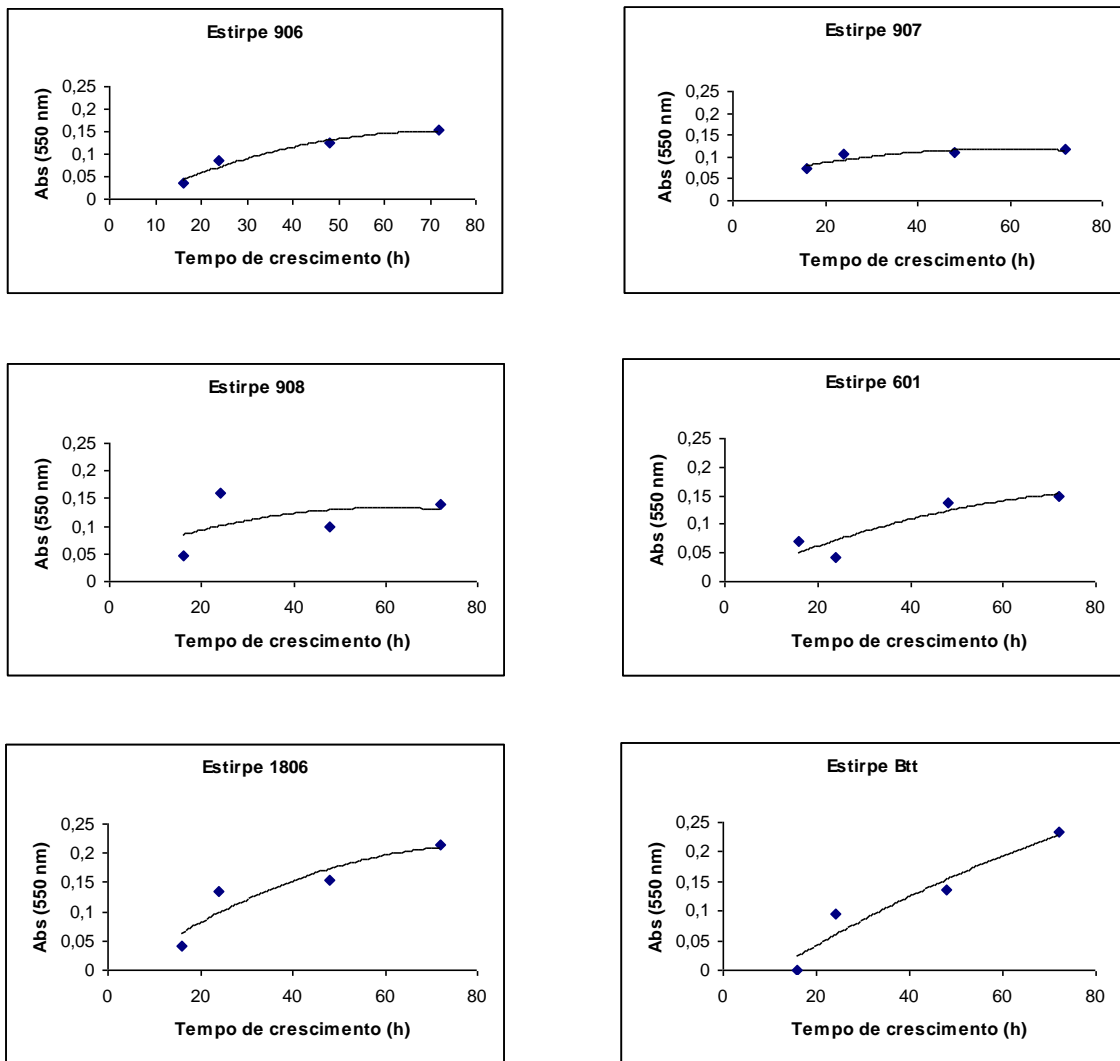


Figura 1. Atividade quitinásica em relação ao tempo de crescimento de estirpes tóxicas a *A. grandis*.

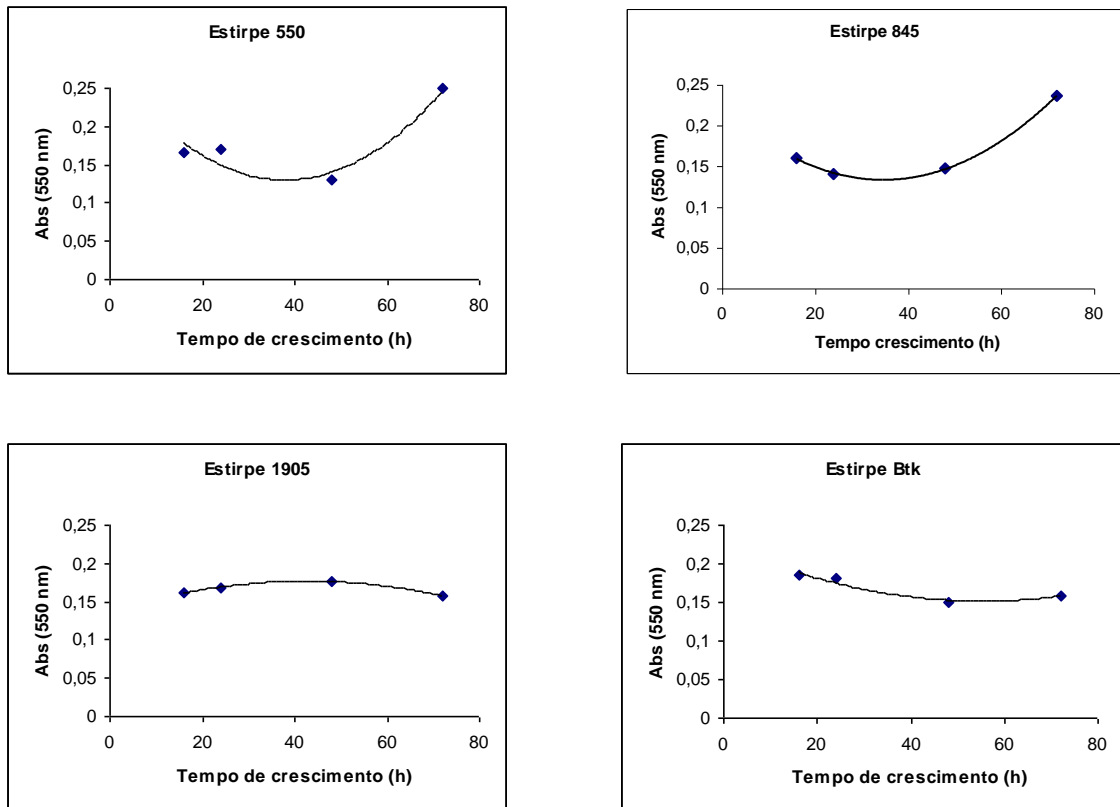


Figura 2. Atividade quitinásica em relação ao tempo de crescimento de estirpes tóxicas a *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

A produção de celulase por todas as estirpes demonstrou-se baixa quando comparada à produção de celulase de espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus*, que englobam as principais espécies de fungos produtores da maioria das celulases vendidas no mercado (Cherry e Fidantsef, 2003; Esterbauer *et al.*, 1991; Kirk *et al.*, 2002). Apesar dessa baixa atividade, todas as estirpes tóxicas a *A. grandis* apresentaram atividade celulásica a partir de 16h de crescimento celular (figura 3). As estirpes 601 e 907 apresentaram atividade enzimática máxima em 16h, enquanto as estirpes 906 e 908 em 24h e as estirpes 1806 e Btt em 48h de crescimento. Apesar dessa diferença, o padrão de atividade celulásica dessas estirpes foi bastante parecido, com exceção do Btt.

Em relação às estirpes tóxicas a *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, os resultados demonstraram que a atividade celulásica dessas estirpes, de uma forma geral, foi bastante similar (figura 4). Todas elas apresentaram atividade enzimática desde 16h de crescimento, possuindo uma curva contínua e crescente durante todo o tempo do crescimento celular.

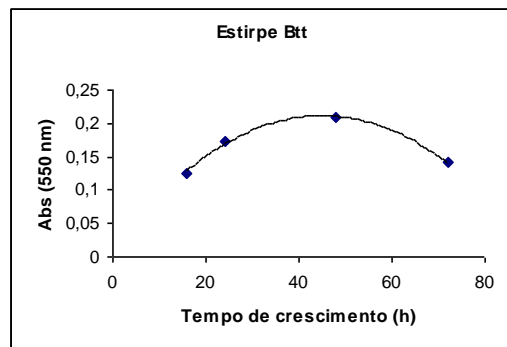
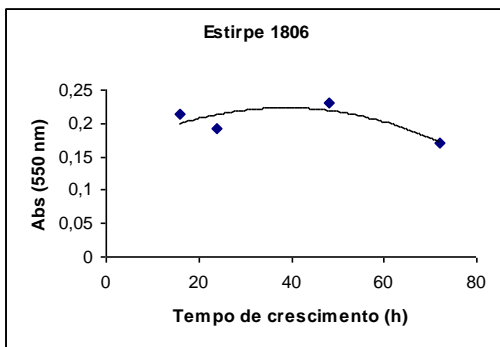
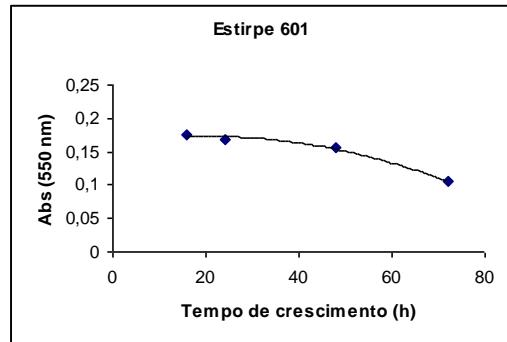
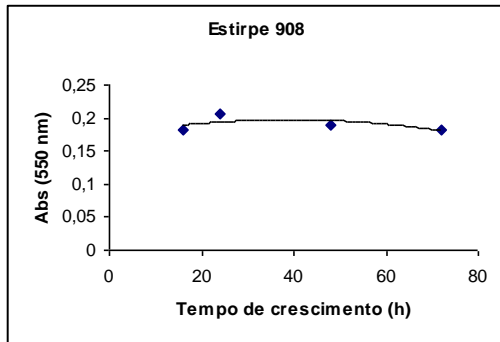
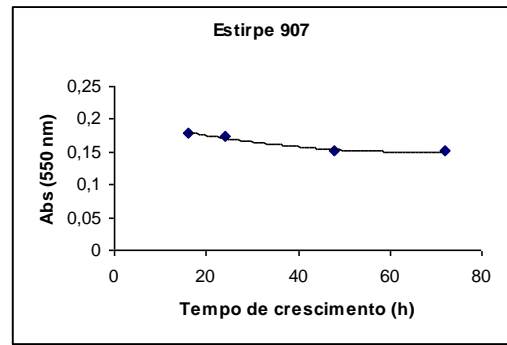
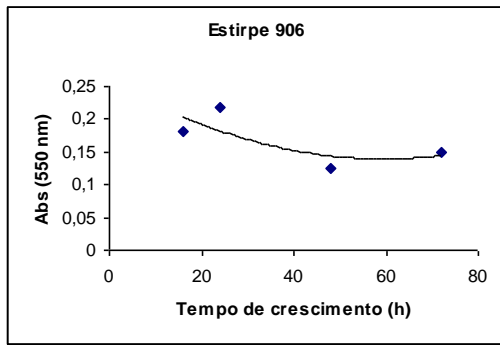


Figura 3. Atividade celulásica em relação ao tempo de crescimento de estirpes tóxicas a *A. grandis*.

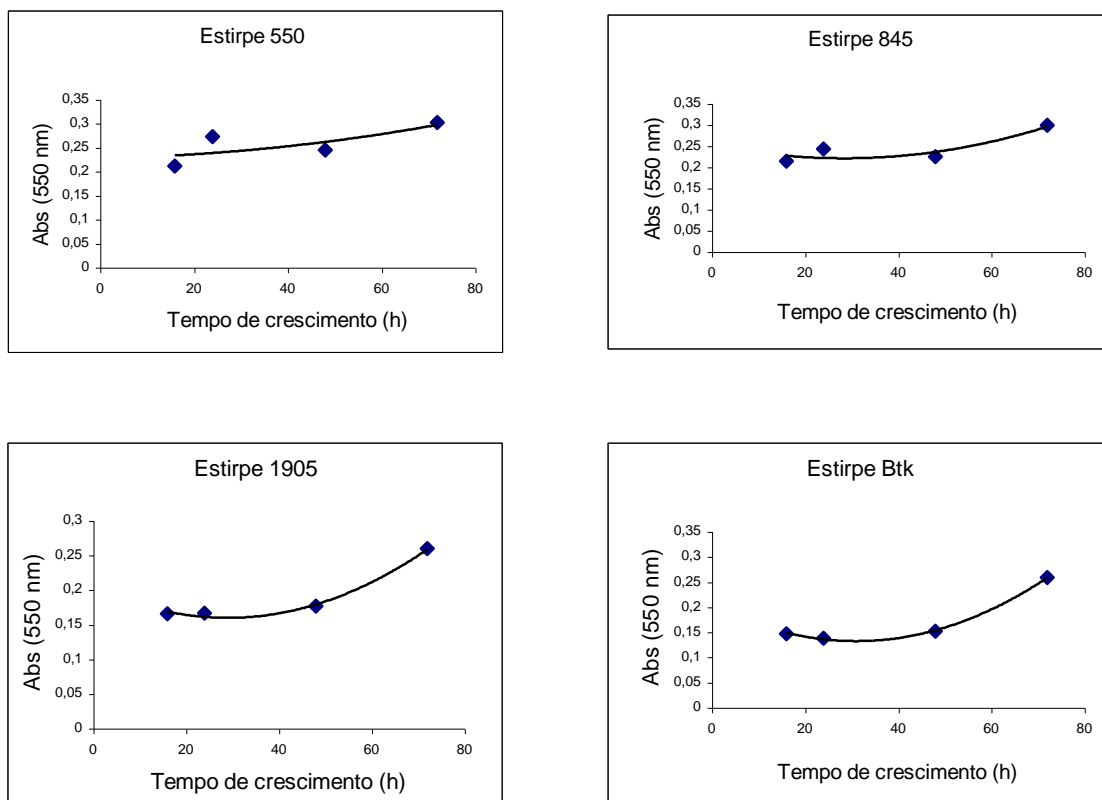


Figura 4. Atividade celulásica em relação ao tempo de crescimento de estirpes tóxicas a *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

CONCLUSÕES

Os ensaios enzimáticos apresentados nesse trabalho mostraram que todas as estirpes de *B. thuringiensis* testadas possuem atividade celulásica e quitinásica. Porém, as curvas de atividade enzimática das estirpes não apresentaram diferenças significativas, mostrando assim que não foi possível estipular uma correlação evidente entre produção enzimática e toxicidade das estirpes. Desta forma, é muito provável que a atividade tóxica dessas bactérias pode ser atribuída somente a ação das proteínas *cry*.

REFERÊNCIAS

ARONSON, A.I., BECKMAN, W. I. & DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiology Review, v.50, p. 1-24, 1986.

CHERRY, J. R. & FIDANTSEF, A. L. Directed evolutions of industrial enzymes: an update. Curr Opin Biotechnol. v. 14: 438 – 443, 2003.

CRUZ, I. A Lagarta - do - cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).

CRUZ, I., FIGUEIREDO, M. L. C., MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos de *Trichogramma*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1999. 40p. (Circular Técnica, 30).

ESTERBAUER, H., STEINER, W., LABUDOVA, I., HERMANN, A. & HAYN, M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol.* v. 36: 51 – 65, 1991.

FEILTELSON, J. S., PAYNE, J., KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. *Biotechnology*, v 10, p. 217 – 275, 1992.

KIRK, O., BORCHERT, T. V. & FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* v. 13: 345 – 351, 2002.

MONNERAT, R. G., SILVA, S. F., SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p.

MORAES, I. O. & CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas (Cap 16). In: Controle Microbiano de Insetos. Sérgio B. Alves. Ed: Manole, 1986.

OMS. Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of diseases vectors. UNDP: World Bank: Who. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3. 41 p., 1987.

PRAÇA, L.B. Prospecção de estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. 2003. 117p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

PRAÇA, L. B., MARTINS, E. S., GOMES, A. C. M. M., FALCÃO, R., MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 1, p 11 – 16, 2004.

PRATISSOLI, D. Pragas e Doenças. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br>

REISSIG, J. L., STROMINGER J. L., LELOIR L. F. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. 1955. *J. Biol. Chem.* 217, 959 – 966.

SAMPSON, M. N. & GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. 1998. *Microbiology.* 144, 2189–2194

SHIMADA, N., KIM, Y. S., MIYAMOTO, K., YOSHIOKA, M. & MURATA, H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ab Toxin on Mammalian Cells. *J. Vet. Sci.* v. 65 (2): 187 – 191, 2003

SIRICHOTPAKORN, N., RONGNOPARUT, P., CHOOSANG, K. & PANBANGRED, W. Coexpression of Chitinase and the *cry11Aa1* Toxin Genes in *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis*. *Journal of Invertebrate Pathology.* v. 78, 160 – 169, 2001.

THAMTHIANKUL, S., SUAN-NGAY, S., TANTIMAVANICH, S. & PANBANGRED W. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Pakistani*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* v. 56 (3-4): 395 – 401, 2001.

WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *An. Rev. Microbiol.*, 40, 549-576. 1986.

WIWAT, C., THAITHANUN, S., PANTUWATANA, S. & BHUMIRATANA, A. Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 76 (4): 270 - 277, 2000.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. *Advances in Biotechnology Processes*, n. 3, pg 315 – 343, 1984.