

Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus, (Díptera: Culicidae)

Marcio Akio Ootani^{1*}, Antonio Carlos Costa Ramos¹, Emiliano Bradão de Azevedo¹, Bruno de Oliveira Garcia¹, Suetonio Fernandes dos Santos¹ e Raimundo Wagner de Sousa Aguiar¹

¹Departamento de Agronomia; Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; Gurupi - TO - Brasil.

ABSTRAT

This work was aimed at to select and to identify strain of *Bacillus thuringiensis* (Bt) obtained of samples of soil in the state of Tocantins that presented toxicity for the mosquito *Aedes aegypti*. It was obtained isolated of Bt of the samples of obtained soils and with larger number of colonies in soils with high clay tenor and organic matter. The poisonous activity among the isolated ones obtained it varied by 14.7 to 98% of mortality to larvas of 2^o stadium of *A. aegypti*, with prominence for the isolated TO-392. They were accomplished analyzes for SDS-PAGE where there was the presence of a peptides of approximately 80 kDa, wasn't visualized us too much isolated, the ancestry A-392 had 98% of mortality about larvas of *A. aegypti* was tested i, in the period of 48 hours, using a concentration of 1 and 2 % □ of the bacterial .broth. It is verified that *B. Thuringiensis* isolated of the state of Tocantins presents promising results for they can be used in the production of a bioinsecticide against the larvas of this mosquito.

Key words: Dengue fever; bio-insecticide, control biological

INTRODUÇÃO

Aedes aegypti Linneus, 1762 (Díptera: Culicidae) é um inseto de ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, está restrito às vilas e cidades que apresentam características favoráveis ao desenvolvimento do mosquito e, raramente é encontrado em ambientes onde a densidade populacional é baixa. Este mosquito é o único vetor do vírus da dengue e da febre amarela urbana, sendo considerado um dos vetores mais importantes na veiculação desse vírus em humanos (Brasil, 2009). O reaparecimento dessa doença se tornou um sério problema de saúde pública no Brasil.

Por ser uma técnica efetiva, de baixo custo e de fácil manejo, o controle químico tem sido a forma mais usada no controle de *A. aegypti* em todos estados brasileiros. No entanto, devido à ineficiência dos produtos químicos em controlar esse inseto, o uso sistematizado tem ocasionado o aparecimento de populações resistentes de *A. aegypti* a esses produtos (Guzman e Kouri, 2002; Lima et al., 2003; Carvalho et al., 2004; Poupardina et al., 2008; Chang et al., 2009) além do aumento do risco ambiental e o custo de

controle, por ser realizado varias aplicações para garantir um resultado satisfatório.

Dessa forma, há necessidade do desenvolvimento de novas alternativa menos danosa. Os bioinseticidas aparecem como resposta à crescente preocupação com o meio ambiente, se mostrando eficiente no controle de insetos vetores, mas com poucos danos ao ambiente (Marcoris et al, 2003) A descoberta da bactéria de solo Gram positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt), produtora de toxina que possuem propriedade altamente tóxica, principalmente para as larvas de dípteros da família Culicidae, possuindo vantagens como não poluir o meio ambiente, não ser tóxico aos animais, possibilitou o desenvolvimento de novos bioinseticidas que se tornou uma alternativa segura. Principalmente devido à grande produção de proteínas (denominadas de proteínas Cry) com atividade entomopatogênica durante a fase de esporulação, formando inclusões cristalinas (Shnepf et al., 1998; Araújo et al., 2007; Tikar et al., 2009).

Formulações de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* vêm sendo comercializadas em vários países do mundo para o controle de vetores

Author for correspondence: ootani667@uft.edu.br

de doenças humanas (Petry et al., 2004; Vilarinhos e Monnerat, 2004; Espíndola et al., 2008), representando atualmente de 80 a 90% do mercado de agentes biológicos para o controle de mosquito em todo o mundo. O *B. thuringiensis* possui diversas proteínas Cry ativas contra díptero, que são codificadas por diferentes genes *cry* e estão distribuídos em várias classes. O número de cópias de cada gene *cry* presente em uma determinada estirpe é um fator fundamental na determinação da toxicidade de uma estirpe de *B. thuringiensis*, assim como, na produção relativa de cada tipo de proteína Cry e, conseqüentemente, no espectro de atividade entomocida (Vilarinhos et al., 1998; Petry et al., 2004; Espíndola et al., 2008).

A presente pesquisa tem como objetivo selecionar estirpes de *B. thuringiensis* com atividade tóxica para *Aedes Aegypti* Linneus (Díptera: Culicidae) amostra de solo do estado do Tocantins.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo os trabalhos foram conduzidos nos laboratórios de manejo integrado de pragas (MIP) do Campus Universitário de Gurupi - Universidade Federal do Tocantins. Para a realização desse projeto foram efetuadas as seguintes etapas e procedimentos metodológicos.

Criação massal de *A. aegypti*

Foram utilizadas posturas de *A. aegypti* obtidas junto à criação desse inseto presente no laboratório de Manejo Integrado de Pragas instalado no Campus Universitário de Gurupi/TO. Para a obtenção das diferentes fases de desenvolvimento do inseto, a serem utilizadas nos bioensaios, as posturas coletadas da criação massal de *A. aegypti* foram colocadas em bandejas com água e acondicionadas em uma câmara incubadora tipo *Biological Oxygen Demand* (B.O.D), regulada para $28 \pm 0,5$ °C, $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase. A partir da primeira muda, as larvas foram utilizadas nos bioensaios seletivos, com diferentes isolados de *Bt* obtidos de solos do estado do Tocantins.

Isolamento de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solos

Para o isolamento, foram utilizadas amostras de solos coletadas de diferentes localidades do estado do Tocantins. Nesse procedimento, os métodos utilizados para obter os isolados foram os mesmos desenvolvidos por Monnerat et al. (2001), onde cada amostra de 1 g de solo será homogeneizado

em 10 mL de solução salina (0,006 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01mM $\text{CaCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,07 mM $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,006 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0) e foi colocada para crescer em um período de 24 h. Uma alíquota de 1 mL será transferida para tubo de microcentrífuga tipo “*ependorf*” e, após choque térmico (80 °C por 12 min) para eliminar as células vegetativas, serão diluídas 10 vezes em solução salina. Uma alíquota de 100 µl da última diluição será distribuída em uma placa de Petri contendo agar nutritivo (0,5% de extrato de levedura; 0,1% de tripton; 0,17 M NaCl e 0,15% de agar bacteriológico. O material foi mantido em B.O.D., $30 \pm 0,5$ °C durante 48 h. As colônias foram selecionadas em meio seletivo para *B. thuringiensis*, contendo ampicilina G a 100 mg/L e as mesmas foram avaliadas quanto à morfologia (forma, bordo, elevação, estrutura, tamanho e coloração), utilizando-se um contador de colônias (Jung et al., 1998). Os isolados inoculados foram mantidos 24 h a $30 \pm 0,5$ °C e 180 rpm em um agitador orbital. Após este período, cada amostra foi individualmente analisada quanto ao crescimento do microorganismo. Em seguida, foram preparadas lâminas e observadas em microscopia de contraste de fase (1000 x), para a verificação da presença de corpos de inclusões parasporais (cristais) que permitiram a diferenciação entre *B. thuringiensis* (com cristais) e *B. cereus* (sem cristais). Foi calculado o índice de Bt (*Bti*), que corresponde ao número de isolados de *Bt* obtidos em relação ao número de colônias examinadas em cada amostra.

Análise SDS-PAGE

Esse procedimento foi realizado com estirpes selecionadas nos bioensaios seletivos, tóxicos. A análise das proteínas presentes nas estirpes foi determinada através de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) que permitiu conhecer o perfil e a massa molecular das toxinas produzidas pelas estirpes. As proteínas produzidas por *B. thuringiensis* foram extraídas de acordo com Lecadet et al. (1991). As estirpes selecionadas foram crescidas em meio NYSM (Yousten, 1984) 30 °C por 48 h a 180 rpm em um agitador orbital. Em seguida, 1 mL do cultivo de cada estirpe foi colocado em “*ependorf*”, previamente autoclavado, e centrifugado por 5 min a 12.800g. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado com 1 ml de NaCl 0,15M e centrifugado novamente a 12.800g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento

ressuspendido em 1ml de PMSF 1 mM. Após nova centrifugação (12.800g por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 250 µl de PMSF 1 mM para estoque em freezer (-20 °C). As amostras foram ressuspendidas em tampão de proteína 5X (1,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol, SDS, 2β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) fervidas a 100°C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE numa concentração de 10%. O gel foi corado em solução "Comassie Blue corante" (40% de metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por 12 h e descorado em solução descorante (40% de metanol e 10% de ácido acético) até visualização das bandas de proteínas que correspondem às toxinas presentes. Para comparação dos resultados obtidos das estirpes selecionadas, foram utilizadas como padrões estirpes de *B. thuringiensis israelensis* e *B. thuringiensis aizawai*.

Bioensaios

Os bioensaios foram feitos seguindo os padrões previamente propostos com os isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de 2º ínstar de *A. aegypti*. Para a realização do bioensaios seletivo, foi colocado 1 e 2% de caldo bacteriano crescido em meio NYSM (Yousten, 1984) por 48 h a 28°C sob agitação de 200 rpm, foi colocado em 100 ml de água em 4 copos descartáveis, contendo grupos de 25 larvas de 2º ínstar de *A. aegypti*. Foram

feitas quatro repetições e com a testemunha sem a cultura bacteriana. Após 48h, realizou-se a leitura do número de sobreviventes. Determinando as estirpes tóxicas para larvas de *A. aegypti*, após 48 h de contato de acordo com a metodologia desenvolvidas por Monnerat et al. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos um total de 101 colônias a partir de cinco amostras de solos coletadas de diferentes localidades do Estado do Tocantins. O número de isolados obtidos em relação à amostra de solos foi diferenciado (Tabela 1). Entre amostras de solos A-392, A-3118 e A-3452 obtiveram os maiores números de colônias, enquanto A-100 e A-100 e A-5451, obtiveram o menor número de colônias de *Bt* (tabela 1). A variação do número de colônias bacterianas obtidas entre as amostras de solo pode está relacionado com tipos de solos, de acordo com estudos relacionados à ocorrência do *Bt* é relatada em todos os ambientes terrestres, principalmente devido à sua capacidade de sobrevivência em condições adversas e fácil transporte pelo vento, chuva e animais, dificulta comparações entre tipos de solos, especialmente entre regiões geograficamente diferentes, com condições climáticas e solos distintos (Cox et al., 2007).

Tabela 1. Características das amostras dos solos coletados e os isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos para *Aedes aegypti*.

Amostra de Solo	Tipo de solo	Nº de Amostra	Medias (NC)
A-3188	argiloso	01	18
A-100	argiloso	01	12
A-5451	(+/-) argiloso	01	13
A-392	argiloso	01	31
A-3452	argiloso	01	27

NC-Número de colônias de *Bt*

Embora o *Bt* seja uma bactéria esporulante, os esporos permanecem em latência no solo entre 3 e 16 meses (Goldberg e Margalit 1977; Couch, 2000; Becker, 2002). No entanto, o crescimento e a germinação dos esporos podem ser prejudicados em função das características do solo. Dessa forma, solos arenosos, devido a pouca quantidade de nutrientes e água sempre apresentam menor quantidade de isolados de *Bt* (Glare e O'callaghan, 2000). Mas, em ambientes favoráveis, como, por exemplo, em insetos alvo, e solos argilosos a

bactéria ocorre naturalmente, pode ocorrer relação simbiótica com plantas como bactéria endofítico (Uribe et al., 2003; Monnerat et al., 2009).

Na identificação das estirpes de *Bt* selecionadas em meio seletivo NYSM (Yousten, 1984) adicionado de 100 mg/L de penicilina, após um período de 48 horas foram observados a presença de cristal produzido pelas estirpes selecionadas em microscopia de contraste de fase, da mesma forma foi observada em algumas estirpes havia somente a presença de esporos e células vegetativa sem

crystal, sendo caracterizada com *Bacillus cereus* (Tabela 1). Monerrat et al. (2001) observou que um dos processos de diferenças entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* esta relacionado com a produção de cristal por *B. thuringiensis* e a não presença de cristal em *B. cereus* sendo confirmado em microscopia de luz em contraste de fase.

Quanto à morfologia das colônias de *Bt* obtidas, verificaram-se poucas variações, sendo que a maioria apresenta forma circular e bordos ondulados. Na sua totalidade, as colônias apresentaram-se sem pigmentação, opacas e com estrutura densa. Esses dados estão de acordo com dados obtidos por Sosa-Gomes et al. (1998), os quais descreveram as colônias típicas dos bacilos com ausência de pigmentação, bordos ondulados e opacos. Por outro lado, cabe ressaltar que Habib e Andrade (1998) mostraram que critérios morfológicos não podem ser empregados na diferenciação e identificação dos bacilos, indicando assim a necessidade de outras avaliações para inferir no processo de diferenciação e identificação das espécies e subespécies de *Bacillus*.

Com relação ao perfil protéico produzido pelas estirpes selecionadas em análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos cristais purificados das estirpes com atividade tóxica para *A. aegypti* mostrou dois polipeptídios principais de aproximadamente de 75 kDa (Figura 1) correspondente ao tamanho do polipeptídios produzidos pelas estirpes de *B. thuringiensis subespécie israelense* que produz alta toxicidade para *A. aegypti*.

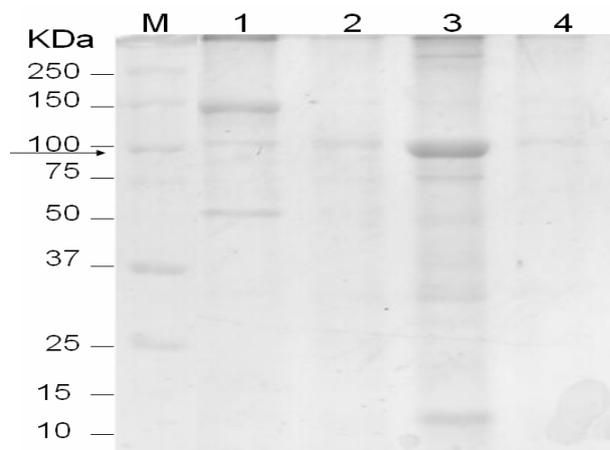


Figura 1- Análise do perfil protéico das estirpes isoladas de solo do estado do Tocantins. **A e B** SDS-PAGE a 12% das proteínas Cry produzida pelas diferentes estirpes de *Bt* selecionadas com toxicidades

para larvas de *A. aegypti* sendo M- marcado molecular Kaleidoscope Bio-Rad, **1-** estirpe 3453, **2-** estirpe A-3188, **3** A-392, e **4-** A-5451.

Segundo trabalhos desenvolvidos por Espíndola et al. (2008) relataram que as toxinas descritas como eficazes para dípteros possuem peso molecular de 75 kDa e 81 kDa, o que pode explicar a toxicidade para larvas de *A. aegypti*. Dessa maneira, uma possível explicação para a elevada toxicidade de A-392 para *A. aegypti* pode esta relacionado com presença das toxinas, os quais conferem potencial tóxico significativamente para larvas de *A. aegypti* (Espíndola et al., 2008), ou com à interação entre as toxinas produzida por este isolado.

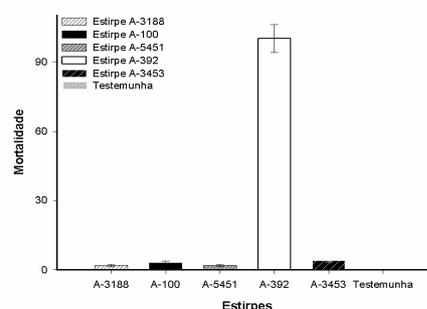


Figura 2- Análise de toxicidade das estirpes selecionadas para larvas de *Aedes aegypti* selecionadas de amostras de solos. Após o período de 48 horas de exposição às bactérias isoladas.

Nos testes de patogenicidade, os isolados testados somente um (1) foi capaz de causar alta mortalidade das larvas de *A. aegypti* após o período de 48 horas (Figura 3). Neste caso destacou-se o isolado A-392 obtido do laboratório de solos do Campus Universitário de Gurupi/UFT. Para os demais isolados, a mortalidade das larvas de *Aedes* foi inferior a 10 % (Figura 1). De acordo com Vilarinhos et al. (1998) a eficiência das formulações varia de 96% a 100% até um período de 72h após a aplicação dos produtos. Com esta alta eficiência, apesar da *Bti* atuar somente sobre larvas, ele restringe o nível populacional do *A. aegypti* de tal modo que o inseto seja incapaz de causar epidemia. De um modo geral, em 2002, aproximadamente 360 toneladas de *Bti* foram usadas no combate de vetores no Brasil (Brasil, 2009), consumindo US\$ 2,2 milhões.

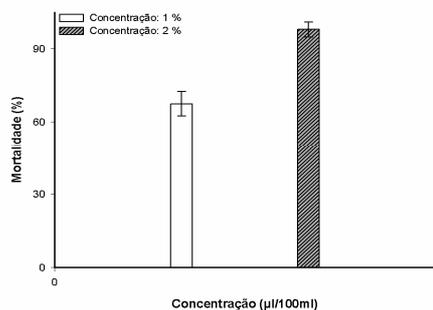


Figura 3- Análise de toxicidade da estirpe A-392 para larvas de 1º estágio de *Aedes aegypti* em duas concentrações após o período de 48 horas de exposição à toxina da bactéria.

A patogenicidade de isolados de *B. thuringiensis* está relacionada com número de cópias dos genes *cry*, assim como, a diferença entre a composição gênica, associado a esse fato, o espectro de atividade entomocida pode ser ampliada em função desta característica (Petry et al., 2004; Prabakaran et al., 2008). Por ser um microorganismo promissor, atualmente há uma enorme procura por novos isolados de *B. thuringiensis* com elevado potencial tóxico para larvas de *A. aegypti*.

A dificuldade de obtenção de novos isolados de *Bt* eficazes contra larvas de *A. aegypti*, constatada nesse trabalho, também foi relatada por Jung et al. (1998). Os autores testaram 352 isolados do Brasil e somente um causou mortalidade entre 70 a 80%, enquanto 149 deles mostraram resultados entre 0 e 10%. Hofte e Whiteley (1989), testou 52 isolados e somente dois proporcionaram 100% de mortalidade. Dessa maneira, verificou a toxicidade de diferentes isolados de *B. thuringiensis* para larvas de *A. aegypti*, com alta variabilidade genética nessas populações que resulta em grupos que não possui receptores para uma determinada toxina Cry, tornando inacessível a ligação das toxinas de *B.thuringiensis* aos receptores específico, tornando insetos resistentes a uma determinada combinação de toxinas de *B. thuringiensis* ou uma proteína Cry.

Diversos insetos da ordem díptera possuem suscetibilidade às proteínas Cry de *Bt*, tais como: *Culex quiquefasciatus* e *aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). Independente da fonte de obtenção do microrganismo, seja ela isolada de fontes naturais como solo ou inseto, ou obtida por manipulação

genética, todos os novos isolados obtidos deverão seguir a etapa de otimização antes de poder ser utilizados na formulação do bioinseticidas. Atualmente são empregados como método de controle de insetos vetores em diversos países, principalmente em países da África Ocidental, como componentes do Programa de Controle de Oncocercose e atualmente passou a ser usada como uma alternativa para inseticidas químicos sintéticos em muitos programas de controle de mosquitos (Who, 1999).

A busca de novas alternativas para o controle de *A. aegypti*, principalmente na redução de insetos resistentes a inseticidas convencionais, a utilização de *Bti* tem sido alvo de inúmeras pesquisas, com uso de *Bti* no controle de *A. aegypti* em diversos países como Peru, Equador e na região Amazônica do Peru (Kroeger et al., 1995). Dez semanas após a aplicação, foi observada uma redução média de 60% na população de adultos. Em 1981, a campanha de erradicação de *A. Aegypti*, realizada em Cuba, combinou a redução de criadouros do mosquito com modificações nos tanques de estoque de água com uma série de medidas legislativas, educação ambiental, controle químico e biológico (Gusman e Kouri, 2002; Gluber, 2004).

CONCLUSÕES

Entre os isolados com *Bacillus thuringiensis* obtidos o A-392 foi mais tóxico para larvas de 2º instar de *A. aegypti* com mortalidade superior a 90% das larvas de *Aedes*.

Entre os resultados obtidos verifica a necessidade de buscar novos isolados com toxicidade para larvas de *A. aegypti*, que possui potencialidade para produção de bioinseticidas eficiente contra esse inseto.

RESUMO

Este trabalho objetivou-se selecionar e identificar estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) obtidos de amostras de solo do estado de Tocantins que apresentaram toxicidade para o mosquito *Aedes aegypti*. Obteve-se isolados de *Bt* das amostras de solos obtidos e com maior número de colônias em solos com alto teor de argila e matéria orgânica. A atividade tóxica entre os isolados obtidos variou de 14,7 a 98% de mortalidade para larvas de 2º estágio de *A. aegypti*, com destaque para o isolado A-392. Foram realizadas análise de SDS-PAGE onde houve a presença de um peptídeos de aproximadamente 80 kDa, não sendo visualizado nos demais isolados, o a estirpe A-392 teve 98% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* testadas, no

período de 48 horas, utilizando uma concentração de 20 µL/mL do caldo bacteriano. Verifica-se que *B. Thuringiensis* isoladas do estado do Tocantins apresenta resultados promissores para serem utilizadas na fabricação de um bioinseticidas contra as larvas deste mosquito.

Palavras-chave: Dengue, bio-inseticida, controle biológico

REFERÊNCIAS

- Araujo, A. P.; Melo-Santos, M. A. V.; Carlos, S. O.; Rios, E. M. M.; Regis, L. (2007), Evolution of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *Israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, **41**, 339-347.
- Becker, N. (2002), Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by γ radiation. *Journal American Mosquito Control Association*, **18**, 57-62.
- Brasil. Ministério da Saúde, (2009), Reunião de avaliação do monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do Brasil. Ministério da Saúde, Brasília.
- Carvalho, M. S. L.; Caldas, E. D.; Degallier, N.; Vilarinhos, P. T. R.; De Souza, L. C. K. R.; Yoshizawa, M. A. C.; Knox, M. B.; Oliveira, C. (2004), Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, **38**, 623-629.
- Couch, T. L. (2000), Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-Leroux, C. (Eds.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 297-314p.
- Chang, C.; Shen, W. K.; Wang, T. T.; Lin, Y. H.; Hsu, E. L.; Dai, S. M. (2009), A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**, 272-278.
- Cox, J.; Grillet, M. E.; Ramos, O. M.; Amador, M.; Barrera, R. (2007), Habitat segregation of dengue vectors along an urban environmental gradient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**, 820-826.
- Espíndola, C. B.; Guedes, R. N.; De Souza, R. C. (2008), Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório. *EntomoBrasilis*, **1**, 10-13.
- Goldberg, L. J. and Margalit, J. (1977), A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia uguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, **37**, 355-361.
- Glare, T. R. and O'Callaghan, M. (2000), *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: *John Wiley*, 350p.
- Gluber, D. J. (2004), The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **27**, 319-330.
- Guzman, M. G. and Kouri, G. (2002), Dengue: ans update. *Journal of Infectious Diseases*, **2**, 33-42.
- Habib, M. E. M.; Andrade, C. F. S. (1998), Bactérias entomopatogênicas In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, **12**, 383-446p.
- Hofte, H. and Whiteley, H. R. (1989), Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews*, **53**, 242-255.
- Jung, Y. C.; Kim, S. U.; Côte, J. C.; Lecadet, M. M.; Chung, Y. S.; Bok, S. H. (1998), Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. *Higo* strain isolated from rice bran in korea. *Journal of invertebrate pathology*, **71**, 95-96.
- Kroeger, A.; Horstick, O.; Riedl, C.; Kaiser, A.; Becker, N. (1995), The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in Peru and Ecuador. *Acta Tropical*, **60**, 47-57.
- Lecadet, M. M.; Chaufaux, J.; Ribier, J. E.; Lereclus, D. (1991), Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 840-849.

- Lima, J. B. P.; Cunha, M. P. Da; R. C.; Silva, Jr. Da; Galardo, A. K. R.; Soares, S. S. Da; Braga, I. A.; Ramos, R. P. & Valle, D. (2003), Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, **68**, 329-333.
- Macoris, M. L. G.; Andrighetti, M. T. M.; Takaku, L.; Glasser, C. M.; Garbeloto, V. C.; Bracco, J. E. (2003), Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 703-708.
- Monnerat, R. G.; Soares, C. M. S. ; Gomes, A. C. M.; Jones, G.; Martins, E.; Praça, L.; Berry, C. (2009), Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. *Microbial Biotechnology*, **2**, 1560-1562.
- Monnerat, R. G.; Silva, S. F.; Silva-Werneck, J. (2001), O catálogo do banco de germoplasma de bactéria entomopatogênica do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65p.
- Petry, F.; Lozovei, A. L.; Ferraz, M. E.; Santos Neto, L. G. (2004), Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **48**, 127-132.
- Poupardin, R.; Reynaud, S.; Strobe, C.; Ranson, H.; Vontas, J.; David, J. P. (2008), Crossinduction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 540-551.
- Prabakaran, G.; Hoti, S. L.; Manonmani, A. M.; Balaraman, K. (2008), Coconut water as a cheap source for the production of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. *Acta Tropica*, **105**, 35-38.
- Sosa-Gómez, D. R.; Tigano, M. S.; Alves, S. B. (1998), Caracterização de entomopatógenos In: Alves, S.B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, **22**, 731-764.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R.; Dean, D. H. (1998), *Bacillus thuringiensis* and its pesticide crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 775-806.
- Tikar, S. N.; Kumar, A.; Prasad, G. B.; Prakash, S. (2009), Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitology. Reserch*, **105**, 57-63.
- Uribe, D.; Marinez, W.; Cerón, J. (2003), Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, **82**, 119-127.
- Vilarinhos, P. T. R.; Dias, J. M. C. S.; Andrade, C. F. S.; Araújo- Coutinho, C. J. P. C. (1998), Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: Alves, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, **80**-447p.
- Vilarinhos, P. T. R. and Monnerat, R. G. (2004), Larvicidal persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations to control *Aedes aegypti* larvae. *Journal of Ayub Medical College*, **20**, 311-314.
- Yousten, A. A. (1984), *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Advances in Biotechnology Processes*, **3**, 315-343.
- WHO [World Health Organization]. (1999), Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 217p.