

REVISIÓN***Bacillus thuringiensis*: UMA BREVE REVISÃO**Polanczyk, R.¹, Alves, S.²

Recibido: 17/02/04 Aceptado:

RESUMO

Neste relato são abordados alguns aspectos relacionados à bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*. Esses aspectos incluem a interação desse patógeno com o ambiente e os insetos e com mais detalhes o modo de ação, nomenclatura, caracterização e utilização deste patógeno no manejo de pragas. Para finalizar é feita uma abordagem sobre os possíveis efeitos prejudiciais deste microrganismo sobre o meio e organismos não-alvo.

PALAVRAS CHAVE: entomopatógeno, insetos, toxinas Cry, manejo de pragas.

SUMMARY***Bacillus thuringiensis*: A SHORT REVISION**

In this review are discussed some aspects related to the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis*. This includes its interaction with the environment and insects and with more details its action mode, nomenclature, characterization and utilization in the pest management context. To conclude, it was discussed the possible deleterious effects of this microorganism in the environment and non target organisms.

KEY WORDS: entomopathogen, insects, Cry toxins, pest management.

1. INTRODUÇÃO

A microflora bacteriana dos insetos, confinada no intestino, é rica, diversa e compreende bactérias Gram positivas e negativas. Entre as bactérias Gram positivas algumas auxiliam na digestão dos alimentos, porém outras são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisadores devido ao seu magnífico potencial para o controle de pragas agrícolas e urbanas (Priest, 2000). Entre estes patógenos destaca-se *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Bacillaceae), bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (Glare & O'Callaghan, 2000).

O *Bt* foi pela primeira vez descrito por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde

o primeiro inseto infectado foi encontrado. Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome de *Bacillus thuringiensis*, não foi o primeiro isolamento deste patógeno. Em 1901, o biólogo S. Ishiwata isolou a bactéria que era o agente causal da "sotto-disease". Em 1908, Iwabuchi a denominou como *B. sotto* Ishiwata, que posteriormente foi considerado nome inválido e o nome mais recente (*Bacillus thuringiensis*) foi mantido (Glare & O'Callaghan, 2000).

Embora geralmente o termo *Bacillus thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, levando em consideração aspectos taxonômicos esta bactéria pertence a um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *Bt* e *B. weihenstephanensis*). Este complexo é denominado *B. cereus*.

Bt e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (Luthy &

¹ Prof. Substituto, Dr. Centro de Ciências Agrárias – CCA, Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, s/n. Caixa Postal 16. Alegre-ES. Brasil. 29500-000. rapolanc@esalq.usp.br.

² Prof. Titular, Dr. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos. Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ – USP), Avenia Pádua Dias, 11. Piracicaba, SP. Brasil. 13418-900. sebalves@esalq.usp.br.

Wolfersberger, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase, embora este seja um critério com pouco valor taxonômico (Lysenko, 1983). Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídeos, comparação da sequência 16S rRNA, entre outros, mostram que estas duas espécies são, na verdade, somente uma. Esta semelhança é devida à transferência de plasmídeos que codificam as dendotoxinas de *Bt* para *B. cereus* e, por outro lado, o *Bt* pode perder a capacidade de produzir estas toxinas, “tornando-se” *B. cereus*. Portanto, a distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (Glare & O’Callaghan, 2000; Hansen & Salamitou, 2000; Schnepf et al., 1998).

2. PRESENÇA, PERSISTÊNCIA E TRANSMISSÃO DE *Bacillus thuringiensis* NO AMBIENTE

O *Bt* ocorre em diversos ambientes e é facilmente isolado a partir de diferentes substratos por métodos relativamente simples e eficientes (Glare & O’Callaghan, 2000). O número de células de *Bt* obtidas varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 UFC cm^{-2} (Damgaard, 2000).

Esse microrganismo não é considerado um entomopatógeno com grande agressividade e nem sempre esporula em insetos antes ou após sua morte. Por esse motivo, este entomopatógeno dificilmente é encontrado causando epizootias naturais em insetos, porém alguns trabalhos (Brownbridge & Onyango, 1992; Burges & Hurst, 1977; Meadows et al., 1992; Porcar & Caballero, 2002; Rajagopal et al., 1988; Talalae, 1956; Vankova & Purrini, 1979) relatam este fato, especialmente em lepidópteros, inclusive em local onde o *Bt* nunca foi aplicado. De acordo com Damgaard (2000), estas epizootias ocorrem sob certas condições específicas em campo, em criações de insetos e em ambientes onde são armazenados grãos. Baseado nestas e em outras observações Hansen & Salamitou (2000) sugerem que essa bactéria, embora apresente uma capacidade de multiplicação limitada, pode ocasionalmente tornar-se epizootica em escala limitada.

Este patógeno pode se multiplicar em microhabitats favoráveis como, por exemplo, os insetos-alvo, embora possa crescer e esporular em solos ricos em nutrientes. No entanto, devido à sua baixa ocorrência epizootica, é pouco provável que a principal fonte de toxinas e esporos sejam os insetos colonizados. Também existe a hipótese que esse patógeno tenha algum tipo de relação simbiótica, talvez

com as plantas, para explicar a produção de toxinas tão específicas e eficientes (Aronson & Shai, 2001).

As informações sobre o destino das toxinas de *Bt* no solo são limitadas e estimativas da persistência de sua atividade no ambiente variam muito. Alguns trabalhos mostram que suas toxinas unem-se a ácidos húmicos, suplementos orgânicos ou com partículas de solo que as protegem da degradação por microrganismos sem, no entanto, perder sua atividade inseticida. Nas folhas, a meia-vida de esporos de *Bt* é muito menor que no solo (100-200 dias), variando, geralmente, de menos de um dia até três dias. Uma vez que os cristais são mais resistentes à radiação ultravioleta que os esporos, a atividade larvicida reflete a atividade dos cristais, embora o número de esporos viáveis possa ser reduzido. Existem várias teorias que tentam explicar o nicho ecológico do *Bt*. Diferente da maioria dos entomopatógenos, a reciclagem deste patógeno é pobre no solo, levando à hipótese deste patógeno ser essencialmente um microrganismo com atividade inseticida acidental (Martin & Travers, 1989). O fato desta bactéria ser normalmente encontrada no ambiente, independentemente da presença ou não de insetos, dá suporte a esta teoria. Meadows (1993) sugere quatro possíveis explicações para a presença de *Bt* no solo: 1 – *Bt* raramente desenvolve-se no solo, mas é depositado neste substrato por insetos, folhas, etc, dessa forma o solo atua como um reservatório de esporos, que poderiam, posteriormente, ser transportados a longas distâncias pelo vento; 2 – *Bt* pode ser patogênico a insetos de solo com reduzida importância econômica, com os quais poucos estudos foram realizados; 3 – *Bt* pode desenvolver-se no solo quando existem nutrientes suficientes, obtidos principalmente, de resíduos orgânicos em decomposição e, 4 – afinidade com *B. cereus*, com o qual *Bt* pode trocar material genético, possibilitando sua permanência no ambiente.

3. ATIVIDADE TÓXICA DE *Bacillus thuringiensis*

O *Bt* desenvolve-se, em condições aeróbicas, em meios artificiais bastante simples. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária. No início da esporulação *Bt* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, por isso são denominadas Cry (Yamamoto & Dean, 2000). Estas toxinas são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto a

porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal (Li *et al.*, 1991).

Os genes *cry* podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (González *et al.*, 1982; Sanchis *et al.*, 1998). Sua expressão é regulada por dois mecanismos: o primeiro é dependente de fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry*, e outro independente do processo de esporulação, como o gene *vip3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Inglis *et al.*, 1998). Algumas cepas de *Bt* apresentam um único gene codificador (*Bt kurstaki* HD-73), enquanto outras apresentam genes diferentes, porém relacionados (*Bt aizawai* 7.29) (Lereclus *et al.*, 1993; Sanchis *et al.*, 1998).

A inclusão cristalina pode ser responsável por mais de 25% do peso seco das células. A quantidade de toxina produzida em laboratório (aproximadamente 0,5 mg de proteína/mL de meio de cultura) e o tamanho dos cristais indicam que cada célula tem que sintetizar de 10^6 a 2×10^6 moléculas de δ -endotoxina para formar o cristal (Agaisse & Lereclus, 1995).

Após a ingestão do *Bt* pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, liberando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas (proteínases) são convertidas em 4 ou mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas). Essas toxinas hidrolizadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção o inseto cessa a alimentação (Copping & Menn, 2000).

As proteinases, junto com as peptidases e dipetidases, formam o grupo das proteases que são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. As proteínas clivam ligações peptídicas internas em proteínas, as peptidases atacam as ligações de oligopeptídeos a partir do resíduo N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) e as dipeptidases hidrolisam dipeptídeos (Panizzi & Parra, 1991).

De acordo com Knowles (1994), o intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos ingeridos do patógeno. Porém as δ -endotoxinas causam a paralisia do intestino, restando os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e

fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria. Copping & Menn (2000) ressaltam que diferentes toxinas ligam-se a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a especificidade destas toxinas. Devido à importância do esporo na patogenicidade desta bactéria, a maioria dos produtos comercializados possui os esporos e as toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica.

Knowles (1994) descreve as etapas da patologia de *Bt* sobre insetos: aumento da absorção de glicose e início dos sintomas histopatológicos (1-5 minutos); paralisia do intestino médio, cessa a alimentação, membrana apical permeável a corantes, aumento do volume e formação de vesículas nas células, aumento do pH da hemolinfa e redução do pH do lúmen (5-10 minutos); aumento do fluxo e concentração de K^+ da hemolinfa, diminuição do transporte de glicose e leucina para a hemolinfa, colapso metabólico celular (10-30 minutos); lise celular e ruptura da membrana basal, paralisia geral ocorre em 1 a 7 horas; morte por falta de alimento ou septicemia (1-3 dias).

Uma determinada cepa de *Bt* pode produzir um ou mais cristais e estes, por sua vez, podem conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. Por exemplo, *Bt kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70 kDa), enquanto que *Bt tenebrionis* produz uma única toxina com peso molecular de 67 kDa. A forma do cristal é determinada pelo número de δ -endotoxinas presentes, e uma relação parcial entre composição da proteína e sua estrutura molecular foi estabelecida por Glare & O'Callaghan (2000) e Lereclus, *et al.* (1993).

As estruturas terciárias de 3 toxinas (Cry1Aa, Cry3Aa e Cry2Aa) foram determinadas por cristalografia de raio X. Assim verificou-se a presença de 3 diferentes regiões estruturais, cada uma com cerca de 200 resíduos de aminoácidos. A “região 1” é responsável pela inserção da toxina na membrana, a “região 2” contém os receptores responsáveis pela ligação toxina-membrana e a “região 3” protege a molécula da digestão por proteinases e também tem papel de receptor (Schnepf *et al.*, 1998; Yamamoto & Dean, 2000).

A ligação ao receptor é um processo que ocorre em duas etapas, envolvendo processos reversíveis e irreversíveis. No primeiro caso, a toxina em questão (Cry1Ab) não possui a “região 1”, e apesar da toxina se ligar ao receptor, esta ligação é insuficiente para conferir ação tóxica contra o inseto. O segundo caso envolve uma ligação forte da toxina com o receptor e a inserção da toxina na membrana apical, com o conseqüente

desenvolvimento da doença no inseto (Schnepf *et al.*, 1998).

Várias cepas de *Bt* também produzem outras endotoxinas, de menor peso molecular (25-28 kDa), denominadas de endotoxinas citolíticas (Cyt). Diferente das endotoxinas, as Cyt possuem um maior espectro de ação contra insetos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Os genes que codificam estas toxinas estão contidos em plasmídeos grandes com 125 kb, que também contêm genes que codificam as toxinas Cry (Glare & O'Callaghan, 2000).

Além das toxinas do cristal, essa bactéria pode produzir outras toxinas, como a β -exotoxina, também denominada thuringiensina. Essa toxina é termoestável, sendo produzida por várias cepas deste patógeno e possui atividade inseticida contra uma ampla gama de insetos, porém devido à sua toxicidade para vertebrados, a maioria dos bioinseticidas à base de *Bt* utiliza subespécies ou isolados que não produzem a β -exotoxina. *Bt* também produz muitas exoenzimas que são patogênicas para insetos. Estas toxinas podem destruir a membrana peritropical do inseto, danificando o epitélio intestinal. Recentemente, foi descoberta uma nova classe de toxinas, as VIPs ou proteínas vegetativas, com elevada toxicidade para lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua* e *S. frugiperda* (Glare & O'Callaghan, 2000). As referidas toxinas causam paralisia do intestino e lise das células do epitélio do intestino médio, de modo semelhante às proteí-

nas Cry (Yu *et al.*, 1997). De acordo com Rice (1999), análises do DNA feitas por PCR mostram que o gene que codifica a toxina VIP3A é encontrado em cerca de 30% dos isolados de *Bt*.

Embora os produtos comerciais disponíveis restrinjam-se ao controle de lepidópteros, dípteros e coleópteros, Glare & O'Callaghan (2000) citam que mais de 1.000 espécies de insetos, pertencentes a diversas ordens de insetos, são suscetíveis a este patógeno (Tabela 1). A suscetibilidade de insetos a esse patógeno pode variar de acordo com a origem geográfica da população da praga. Neste sentido, López-Edwards et al. (1999) estimaram diferentes CL₅₀ de um mesmo isolado de *Bt* para diferentes populações de *S. frugiperda*, coletadas em 5 regiões do México.

Além da patogenicidade e virulência desse patógeno contra insetos-praga, outros aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, embora difíceis de detectar, certamente ocorrem e representam um importante parâmetro, que auxilia na avaliação de sua atividade tóxica. Também é pouco estudada a interação com outros entomopatógenos, pois além de incrementar a eficácia desta tática de controle biológico, também fornece indícios sobre o impacto ambiental de *Bt*. Embora existam muitos estudos sobre as interações entre parasitóides, predadores e patógenos, poucos são aqueles que tratam da interação entre patógenos, principalmente quando envolvem espécies-praga de difícil controle.

Tabela 1. Espécies de insetos suscetíveis a *Bacillus thuringiensis* (Glare & O'Callaghan, 2000).

Ordem	Número de espécies
Diptera	266
Hemiptera	48
Hymenoptera	62
Isoptera	5
Coleoptera	106
Lepidoptera	572
Neuroptera	4
Orthoptera	6
Siphonaptera	7
Thysanoptera	3
TOTAL	1.079

4. NOMENCLATURA E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*

No final da década de 80, Hofte & Whiteley (1989) propuseram uma classificação para as toxinas de *Bt*, baseada na combinação de suas seqüências de aminoácidos e espectro inseticida. Nesta classificação 38 toxinas foram agrupadas em 14 classes diferentes. As quatro principais classes continham toxinas com atividade contra Lepidoptera (I), Lepidoptera e Diptera (II), Coleoptera (III) e Diptera (IV). No entanto, essa classificação mostrou certas limitações, pois tentou relacionar toxinas com seqüências de aminoácidos similares, com diferentes atividades inseticidas. Durante a década de 90 uma nova classificação foi proposta por Crickmore *et al.* (1998), baseada somente nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Esta mudança permitiu uma alta relação entre as toxinas e eliminou a necessidade de bioensaios contra um grande número de insetos. Até o momento mais de 250 genes cry foram seqüenciados

(http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) e agrupados em 40 grupos de toxinas Cry.

A sorotipagem é o método mais comumente utilizado para diferenciar grupos de *Bt*, mas a determinação do sorotipo nem sempre fornece indícios sobre a atividade inseticida de um isolado. Atualmente, 82 sorotipos são conhecidos, porém a reação cruzada com alguns isolados de *B. cereus* dificultam a interpretação dos resultados. Além disso, cepas autoaglutinantes e também algumas cepas de *Bt* que, por não produzirem cristais, são consideradas como *B. cereus* (Lecadet *et al.*, 1999).

A caracterização bioquímica é difícil, principalmente porque *Bt* mostra variações nas respostas e devido aos resultados obtidos nem sempre corresponderem aos resultados de sorotipagem. Os meios seletivos também têm sido desenvolvidos para o isolamento de *Bt* a partir de diferentes substratos. Entretanto, estes somente são capazes de separar *Bacillus* spp. e sua utilização não implica na obtenção de um número maior de isolados do que aquele obtido com métodos mais simples.

Os avanços recentes na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *Bt*. Tais métodos podem diferenciar cepas e isolados e podem também ser empregados para determinar a presença/ausência de determinados genes *cry*.

Descrita na década de 80 (Mullis & Faloona, 1987), a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA, obedecendo às seguintes etapas: a) extração do DNA que contém a região a ser amplificada, b) escolha do segmento a ser amplificado e obtenção de “primers” (iniciadores) específicos para o reconhecimento desse segmento, c) amplificação que dará origem a várias cópias, fazendo-se uso de um termociclador e, por fim, d) leitura do produto amplificado após eletroforese e coloração.

Para *Bt*, esta técnica tem muitas utilidades e pode ser empregada com a finalidade de amplificar regiões conhecidas do DNA, para comparar geneticamente isolados de *Bt* pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (Bravo *et al.*, 1998; Carozzi *et al.*, 1991; Porcar & Juárez-Pérez, 2003).

5. UTILIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* NA AGRICULTURA

A eficácia e especificidade das cepas de *Bt* e suas toxinas no controle de insetos praga, favoreceu a formulação de biopesticidas à base deste patógeno e, desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de 100 formulações foram colocados no mercado mundial, sendo

atualmente responsáveis por mais de 90% do faturamento com bioinseticidas. O continente americano é responsável por 50% deste mercado, principalmente os Estados Unidos e Canadá e a América Latina representa apenas 8 a 10% do total (Tamez-Guerra *et al.*, 2001). Hansen & Salamitou (2000) estimaram que a aplicação mundial anual de *Bt* é de 13.000 toneladas.

O produto à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é o Dipel (*Bt kurstaki* HD-1). Este produto, pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente para 170 lepidópteros-praga (Beegle & Yamamoto, 1992; Glare & O’Callaghan, 2000).

Além do *Bt* ser à base da formulação dos bioinseticidas com maior sucesso comercial no mundo, marca o início da substituição dos inseticidas convencionais em várias áreas. Na década de 80, o surgimento de novas técnicas, especialmente aquelas voltadas para a tecnologia do DNA recombinante, e manifestações públicas a respeito do uso abusivo dos inseticidas convencionais, levaram a um aumento cada vez mais crescente do interesse dos órgãos de pesquisa e indústrias sobre a utilização do *Bt* na agricultura e saúde pública (van Frankenhuyzen, 1993).

A liderança destes biopesticidas no mercado há mais de 40 anos, gerou um acúmulo grande de informações sobre aspectos determinantes na eficiência destes produtos: idade larval mais suscetível, comportamento alimentar do inseto, limitações ambientais, segurança, método de aplicação e formulação (Navon, 2000a).

No entanto, nem sempre os resultados obtidos no laboratório correspondem aos de campo. O comportamento alimentar do inseto, distribuição espacial/temporal dos insetos benéficos e outros fatores que influenciam a intensidade do contato entre *Bt* e organismos não-alvo podem reduzir o impacto destes biopesticidas sobre o inseto alvo (Glare & O’Callaghan, 2000).

Na América do Norte, produtos à base de *Bt* são muito utilizados para o controle de pragas florestais, principalmente: *Lymantria dispar*, *Choristoneura fumiferana* e *C. occidentalis*. Nos EUA, de 1980 até 1995, cerca de 2 milhões de hectares de florestas foram tratados com *Bt kurstaki* para o controle de *L. dispar*, em alguns casos resultando na erradicação da praga; porém este inseto ainda é o principal alvo de aplicações de *Bt* em florestas. A partir da década de 90, a aplicação contra *C. fumiferana* nos EUA e Canadá praticamente cessou, devido ao sucesso obtido na década anterior. Na Austrália produtos formulados com *Bt* são utilizados para controle de pragas em algodão, frutíferas, ornamentais, fumo, entre outras culturas (Glare & O’Callaghan, 2000; van Frankenhuyzen, 2000).

Na América Latina, Cuba e México lideram a utilização dos bioinseticidas à base de *Bt*, especialmente para o con-

trole de pragas nas culturas do algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho, pastagens. Esses são os únicos países que têm produção própria destes biopesticidas, tornando-os competitivos em relação aos produtos químicos. No Brasil utilizam-se produtos à base de *Bt* para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos são aplicados é apenas a terça parte do México e semelhante à de Cuba, ou seja, cerca de 150.000 hectares. As principais limitações são o elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores público e privado, no desenvolvimento e formulação destes produtos.

Na China produtos à base de *Bt* são muito utilizados em cerca de 30 províncias do centro-sul do país, em uma área com cerca de um milhão de hectares contra pragas de grandes culturas, florestas e hortaliças. No Egito, a partir de 1990, estes biopesticidas são utilizados, principalmente, no controle de pragas do algodão. Em outros países como Israel, Indonésia, Malásia, Índia e países da África Ocidental, a utilização deste entomopatógeno no controle de pragas está em fase inicial de pesquisa e implementação (Salama & Morris, 1993).

Gelernter & Schab (1993) e Navon (2000b) afirmam que diversos fatores limitam a utilização dos referidos biopesticidas: o seu custo, que na maioria das vezes é superior ao dos inseticidas químicos; a baixa persistência em campo da maioria das formulações; o baixo espectro de ação, a ineficácia contra pragas de solo e endofíticas. Os autores enfatizam que estão sendo desenvolvidas pesquisas para minimizar essas desvantagens. Os trabalhos estão principalmente voltados para: identificação de novos genes *cry*, desenvolvimento de novas formulações, plantas expressando genes *cry* e ampliação dos conhecimentos das interações com outros entomopatógenos, predadores, parasitoides e mesmo inseticidas químicos.

Os genes *cry* introduzidos em *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *Pseudomonas fluorescens* ampliaram as possibilidades de utilização de *Bt* na agricultura. Processos fermentativos com pseudomonas recombinantes têm sido utilizados para produzir formulações contendo inclusões cristalinas encapsuladas por células mortas. Este tipo de formulação aumenta a persistência em campo destes biopesticidas devido à proteção contra a radiação ultravioleta (Schnepf *et al.*, 1998). Raun & Jackson (1966) e Tamez-Guerra *et al.* (2000) mostraram a eficácia das formulações encapsuladas e microencapsuladas, pois verificaram um aumento da persistência do *Bt* e o conseqüente incremento na mortalidade dos insetos alvo.

O aumento do espectro de ação das toxinas foi obtido por Gonzales *et al.* (1982), Klier *et al.* (1983) e Park *et al.* (2001), por meio de métodos de recombinação para reordenar a composição protéica do cristal. Esta técnica elimina as toxinas com baixa atividade inseticida e incorpora outras com maior potencial. Os trabalhos anteriormente mencionados, além de agrupar toxinas mais eficientes também têm como objetivo explorar o sinergismo entre as toxinas.

A partir da metade da década de 80, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *Bt* na cultura do fumo e em tomate (Dias, 1992). Segundo Ely (1993), mais de 50 espécies de plantas sofreram transformações deste tipo com resultados satisfatórios. Vários trabalhos demonstram a importância das plantas transgênicas, expressando genes de *Bt* como instrumento no manejo integrado de pragas (Kozziel *et al.*, 1993; Pilcher *et al.*, 1997; Vaeck *et al.*, 1987).

6. IMPACTO DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE O AMBIENTE E ORGANISMOS NÃO-ALVO

Apesar dos produtos à base de *Bt* corresponderem a menos de 1% do mercado mundial de inseticidas, Glare & O'Callaghan (2000) salientam a importância de estudos sobre o impacto ambiental deste entomopatógeno, visando principalmente mostrar sua capacidade de substituir ou interagir com os inseticidas convencionais, minimizando os riscos ambientais. Os mesmos autores ressaltam que generalizações nestes aspectos são difíceis devido ao grande número de isolados existentes (mais de 60.000) e que cada caso deve ser analisado separadamente.

Em relação aos mamíferos, Hansen & Salamitou (2000) ressaltam que embora tenha sido verificado algum efeito de algumas subespécies de *Bt* sobre animais em laboratório, estes resultados são variáveis. Glare & O'Callaghan (2000) afirmam que os casos de *Bt* causando doença em humanos são extremamente raros, apesar de sua utilização por mais de 60 anos. O mesmo pode ser observado para os inimigos naturais (parasitoides, patógenos e predadores), que raramente são afetados. Além disso, existem relatos na literatura de interação positiva entre estes entomopatógenos. Também sua reduzida persistência no ambiente, diminui ainda mais a possibilidade de efeitos prejudiciais sobre o mesmo. Hansen & Salamitou (2000) afirmaram que os riscos em utilizar *Bt* devem ser sempre comparados aos riscos em utilizar agrotóxicos, com impacto reconhecidamente maior sobre o ambiente. Porém

devido às semelhanças desta espécie com *B. cereus*, que é uma bactéria que pode contaminar alimentos consumidos por animais e humanos, deve-se estar sempre atento sobre o efeito de formulações de *Bt* sobre organismos não-alvo.

REFERÊNCIAS

- AGAISSÉ, H.; LERECLUS, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v.177, n.21, p.6027-6032.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v.195, n.1, p.1-8.
- BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, v.124, n.3, p.587-616.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PENA, G.; NÚÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.12, p.4965-4972.
- BROWNBIDGE, M.; ONYANGO, J. 1992. Screening of exotic and locally isolated *B. thuringiensis* (Berliner) strains in Kenya for toxicity to the spotted stem borer, *Chilo partellus* (Swinhoe). **Tropical Pest Management**, v.38, n.1, p.7-91.
- BURGESS, H. D.; HURST, J. A. 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.30, n.2, p.131-139.
- CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.11, p. 3057-3061.
- COPPING, L. G.; MENN, J.J. 2000. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v.56, n.5, p.651-676.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.807-813.
- DAMGAARD, P.H. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.23-40.
- DIAS, J.M.C.de S. 1992. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.1, p.59-76.
- ELY, S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, cap. 5, p.105-124.
- GELERTNER, W.; SCHWAB, G. E. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, cap. 4, p. 89-104.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. 2000. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 350 p.
- GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academic of Science**, v. 79, n.10, p.6951-6955.
- HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.41-64.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n.3, p.242-255.
- KLIER, A.; BOURGOUIN, C.; RAPPOPORT, G. 1983. Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. **Molecular and General Genetics**, v.191, n.2, p.257-262.
- KNOWLES, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v.24, n.2, p.275-308.
- KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, v.11, n.2, p.194-200.
- LECADET, M. M.; FRACHON, E.; DUMANOIR V.C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.;

- THIERY, I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.3, p.660-672.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.; HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, p.37-70.
- LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. 1991. Crystal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v.353, n.7, p.815-821.
- LÓPEZ-EDWARDS, M.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, M.J.L.; PESCADOR-RUBIO, A.P.; MOLINA-OCHOA, J.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; HAMM, J.J.; WISEMAN, B.R. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, v.82, n.2, p. 254, 262.
- LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. 2000. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.167-180.
- LYSENKO, O. 1983. *Bacillus thuringiensis*: evolution of a taxonomic conception. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.41, n.2, p.295-298.
- MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.8, p. 2437-2442.
- MEADOWS, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, p.193-220.
- MEADOWS, M. P. ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRET, P.; BURGESS, H.D. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.4, p.1344-1350.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.55, n. 2, p.335-350.
- NAVON, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**, v.19, n.8/10, p.669-676.
- NAVON, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.355-367.
- PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. 1991. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no Manejo de Pragas**. São Paulo: Manole, 359 p.
- PARK, H. W.; DELÉCLUSE, A.; FEDERICI, B. A. 2001. Construction and characterization of a recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* strain that produces Cry11B. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, n.1, p.37-44.
- PILCHER, C. D.; RICE, M. E.; OBRYCKI, J. J. 1997. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, n.2, p.669-678.
- PORCAR, M.; CABALLERO, P. 2002. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during an natural epizootic. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n.4, p.309-316.
- PORCAR, M.; JUARÉZ-PÉREZ, V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, n.5, p. 419-432.
- PRIEST, F.G. 2000. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.1-22.
- RAJAGOPAL, D.; MALLIKARJUNAPPA, S.; GOWDA, J. 1998. Occurrence of natural enemies of the groundnut leaf miner, *Aproaerema modicella* Deventer (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Biological Control**, v.2, n.1, p.129-130.
- RAUN, E. S.; JACKSON, R. D. 1966. Encapsulation as a technique for formulating microbial and chemical insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.59, n.3, p.612-622.
- RICE, W. C. 1999. Specific primers for the detection of vip3A insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. **Letters and Applied Microbiology**, v.28, n.5, p. 378-382.
- SALAMA, H. S.; MORRIS, O. N. 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, cap. 11, p.237-253.

- SANCHIS, V.; LERECLUS D.; MENOU, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. 1998. Multiplicity of d endotoxinas genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, v.2, n.2, p.393-404.
- SCHNEPF, E.; CRIKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806.
- TALALAEV, E. V. 1956. Septicemia of the caterpillars of the Siberian silkworm. **Mikrobiologiya**, v.25, n.1, p.99-102.
- TAMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M. R.; BEHLE, R. W.; SHASHA, B. S.; WONG, L. J. G. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.2, p.219-225.
- TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L.J.; MEDRANO-ROLDÁN, H.; GARCIA-GUTIÉRREZ, C.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; GOMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R.S. 2001. Bioinseticidas: su empleo, producción y comercialización en México. **Ciencia UANL**, v.4, n.2, p.143-152.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUKELLER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M. Van MONTAGU, M.; LEEMANS, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v.328, n.1, p.33-37.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. EMBRAPA: Jaguariúna, p. 102-225.
- Van FRANKENHUYZEN, K. 1993. The Challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, cap. 1, p.1-35.
- Van FRANKENHUYZEN, K. 2000. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 371- 381.
- VANKOVA, J.; PURRINI, K. 1979. Natural epizootics caused by bacilli of the species *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, v.88, n.2, p.216-221.
- YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. 2000. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 81-100.
- YU, C. C.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses epithelial cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.2, p.532-536.

