

**Interação da bactéria entomopatogênica *Photorhabdus temperata*
K122 com insetos modelos das ordens Coleoptera, Hemiptera e
Lepidoptera**

CÍNTIA NEVES BARRETO CARNEIRO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO UENF
Campos dos Goytacazes – RJ
Março – 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Interação da bactéria entomopatogênica *Photorhabdus temperata*
K122 com insetos modelos das ordens Coleoptera, Hemiptera e
Lepidoptera**

CÍNTIA NEVES BARRETO CARNEIRO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO UENF
Campos dos Goytacazes – RJ
Março – 2008**

**Interação da bactéria entomopatogênica *Photorhabdus temperata*
K122 com insetos modelos das ordens Coleoptera, Hemiptera e
Lepidoptera**

Cíntia Neves Barreto Carneiro

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção de título de doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 14 de março de 2008

Comissão Examinadora:

Prof. Francisco José Alves Lemos – Doutor Ciências Biológicas (Bioquímica) – CBB/UENF

Prof. Renato Augusto DaMatta – Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) – CBB/UENF

Prof. Milton Erthal Júnior – Doutor em Produção Vegetal – ISTCA/ FAETEC

Prof. Carlos Peres Silva – Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) – CBB - UENF

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Dr. Carlos Peres Silva pela orientação, estímulo, esclarecimentos e discussões construtivas durante o doutorado.

Ao Dr. Richard Ian Samuels, pela gentileza em aceitar-me co-orientar nos últimos anos dessa tese, compartilhar comigo suas idéias e experiências com insetos.

À Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes por aceitar ser a revisora deste trabalho.

Ao Dr. Renato Augusto DaMatta pela colaboração com a parte de microscopia deste trabalho e pelo incentivo.

Ao Centro Federal de Tecnologia e Educação por ter me oferecido o apoio necessário para minha dedicação ao doutorado. Aos bolsistas do laboratório de Química do CEFET pela força, apoio e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal Rural por terem cedido as larvas de *Diatraea saccharalis*.

Aos colegas de laboratório LQFPP pelo companheirismo e alto astral: João, Inês, Elaine, Mrian, Carla, Marcela, Adriana, Thaís, Flávia, Beto, Wendel, Marco Antônio, Márcio, Josiane, Jorge, Léo, Alexandra, Viviane. Vocês não só me ajudaram na discussão dos resultados e novas idéias, mas também foram grandes amigos nestes anos todos de trabalho.

Aos colegas do laboratório do Richard: Milton, Adriano, Paulo César, Eliane, Valeska. Obrigada pelo auxílio e alto-astral.

Aos funcionários dos laboratórios do LQFPP e do LBCT: Cristóvão, Isabela, Jucélia, Geovana, Beatriz, Márcia Adriana, Adrianinha. Vocês me auxiliaram não só com apoio técnico, mas com palavras de incentivo.

Ao meu marido Luciano pela paciência e incentivo e aos meus filhos Lucas e Diana pelo amor, beijinhos e abraços que tanto me ajudaram.

Durante a elaboração desta tese, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPERJ e CNP_q.

“De tudo ficam três coisas
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminarmos
Fazer da interrupção um caminho novo
Da queda um passo de dança,
Do medo uma escada,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro”.

Fernando Sabino

Dedico este trabalho ao meu marido LUCIANO,
aos meus filhos LUCAS e DIANA, aos meus pais
CLÍNIO e DALVA, a ALMIR NEVES e MARIA
ELÇA NEVES porque se cheguei até aqui, foi
graça a todos vocês.

Com amor, CÍNTIA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
I - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Considerações iniciais.....	1
1.2 - Nematóides entomopatogênicos (NEPs).....	3
1.3 - Família Heterorhabditidae (Poinar, 1976).....	9
1.4 - O gênero <i>Photorhabdus</i> (Enterobacteriaceae).....	10
1.5 - Como as bactérias simbiontes dos NEPs matam o inseto?.....	11
1.6 - Características das espécies estudadas.....	12
1.6.1 - <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)	12
1.6.1.1 - Controle da broca-da-cana (<i>Diatraea saccharalis</i>).....	16
1.6.2 - <i>Tenebrio molitor</i> Linnaeus, 1785 (Coleoptera: Tenebrionidae).....	18
1.6.2.1 - Controle de pragas de grãos armazenados.....	21
1.6.3 - <i>Dysdercus peruvianus</i> (Hemiptera: Hyrrhocoridae).....	23
1.6.3.1 - Controle de percevejos sugadores de sementes.....	25
1.7 - Associação entre microrganismos e insetos.....	26
II - OBJETIVOS	32
III - MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 - Obtenção dos insetos.....	34
3.2 - Determinação da curva de crescimento da <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	34
3.3 - Preparo do inóculo.....	35
3.4 - Desinfecção dos insetos.....	35

3.5 -	A infecção dos animais.....	36
3.6 -	Gráficos de dose-resposta e taxa de mortalidade.....	36
3.7 -	Colonização dos diferentes tecidos dos insetos pela <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	37
3.8 -	Contagem da <i>Photorhabdus temperata</i> K122 nos diferentes compartimentos dos insetos	38
3.9 -	Preparo das amostras para os ensaios de atividade enzimática.....	38
3.10 -	Dosagem de proteínas.....	39
3.11 -	Ensaio de atividade por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	39
3.12 -	Condições dos ensaios enzimáticos.....	40
3.13 -	Técnicas de microscopia usadas para descrever a infecção dos insetos com <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	42
3.14 -	Isolamento dos microrganismos do conteúdo luminal dos insetos.....	43
3.15 -	Observação em microscópio de luz dos microrganismos isolados do conteúdo luminal dos insetos.....	44
3.16 -	Teste de virulência da <i>Photorhabdus</i> contra as bactérias isoladas do conteúdo luminal dos insetos.....	44
3.17 -	Detecção da atividade antimicrobiana nos compartimentos dos insetos infectados por <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	45
3.18 -	Teste de efeito antimicrobiano da cultura de <i>Photorhabdus temperata</i> em caldo Luria Bertani.....	45
3.19 -	Teste do efeito da infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122 sobre o número total de hemócitos dos insetos <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Dysdercus peruvianus</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	46
IV -	RESULTADOS	47
4.1 -	Determinação da curva de crescimento da <i>Photorhabdus temperata</i> K122 em caldo Luria Bertani	47
4.2 -	Características culturais da <i>Photorhabdus temperata</i> K122	47
4.3 -	Gráficos de dose-resposta e taxa de mortalidade.....	50
4.4 -	Sintomatologia externa da infecção dos insetos por <i>Photorhabdus temperata</i> K122	54

4.5 -	Colonização dos diferentes tecidos dos insetos pela <i>Phororhabdus temperata</i> K122	57
4.6 -	Efeito da infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122 no número total de hemócitos na hemolinfa dos insetos <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Dysdercus peruvianus</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	63
4.7 -	Efeito da infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122 nas atividades enzimáticas dos insetos <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Dysdercus peruvianus</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	65
4.8 -	Descrição da biologia da infecção dos insetos com <i>Photorhabdus temperata</i> K122 através de microscopia	77
4.9 -	Microrganismos isolados do conteúdo luminal dos insetos.....	92
4.10 -	Teste de efeito antimicrobiano da hemolinfa, do epitélio intestinal e do conteúdo luminal dos insetos infectados com <i>Photorhabdus temperata</i> K122 sobre a flora intestinal	99
4.11 -	Teste do efeito antimicrobiano da cultura em meio líquido da <i>Photorhabdus temperata</i> K122 sobre bactérias da flora intestinal	99
V -	DISCUSSÃO	101
VI -	CONCLUSÃO	112
VII -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	ANEXO I	130
	ANEXO II	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo de vida do nematóide entomopatogênico <i>Heterorhabditidis</i>	10
Figura 2:	Ciclo de vida da <i>Diatraea saccharalis</i>	14
Figura 3:	Ciclo de vida do <i>Tenebrio molitor</i>	20
Figura 4:	Estádios de vida do <i>Dysdercus peruvianus</i>	25
Figura 5:	Representação esquemática do intestino médio de <i>Dysdercus peruvianus</i>	42
Figura 6:	Curva de crescimento de <i>Photorhabdus temperata</i> K122 em caldo Luria Bertani	48
Figura 7:	Crescimento de <i>Photorhabdus temperata</i> K122 em meios de cultivo.....	49
Figura 8:	Efeito da concentração do inóculo bacteriano sobre a mortalidade dos insetos num período de 48 horas.....	52
Figura 9:	Determinação da mortalidade de <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Dysdercus peruvianus</i> e <i>Tenebrio molitor</i> quando infectados com <i>Photorhabdus temperata</i> K122	53
Figura 10:	Larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> e de <i>Tenebrio molitor</i> . A e C: Larvas não infectadas. B e D: Larvas infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122, período de 48 horas.....	56
Figura 11:	Larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> . C: larva controle não infectada. Os valores 18, 36 e 48, correspondem ao tempo em horas de infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122	56
Figura 12:	Determinação das concentrações de <i>Photorhabdus temperata</i> K122 em diferentes compartimentos e o seu efeito sobre a flora intestinal das larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> ao longo da infecção.....	60
Figura 13:	Determinação da concentração de <i>Photorhabdus temperata</i> K122 em diferentes compartimentos e o seu efeito sobre a flora intestinal de <i>Dysdercus peruvianus</i> ao longo da infecção.....	61
Figura 14:	Determinação da concentração de <i>Photorhabdus temperata</i> K122 em diferentes compartimentos e o seu efeito sobre a flora intestinal das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> ao longo da infecção.....	62
Figura 15:	Contagem de hemócitos da hemolinfa dos insetos infectados com <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	64
Figura 16:	Efeito da infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122 sobre as atividades das carboidrases de larvas do 4 ^o instar da <i>Diatraea saccharalis</i>	71

Figura 17:	Efeito da infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122 sobre as atividades das α -amilases e proteases de larvas do 4 ^o instar da <i>Diatraea saccharalis</i>	72
Figura 18:	Efeito da infecção por <i>Photorhabdus temperata</i> K122 sobre as atividades das carboidrases e proteinases de larvas do 4 ^o instar da <i>Tenebrio molitor</i>	75
Figura 19:	Foto de microscopia eletrônica de varredura de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122, 18 horas de infecção.....	80
Figura 20:	Foto de microscopia do intestino de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122, 24 horas de infecção.....	81
Figura 21:	Fotografia de microscopia eletrônica de varredura do intestino de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122, 36 horas de infecção.....	82
Figura 22:	Foto de microscopia do intestino de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122, 48 horas de infecção.....	83
Figura 23:	Fotografias do intestino de <i>Dysdercus peruvianus</i> infectados por 18 horas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	84
Figura 24:	Fotografias do intestino de <i>Dysdercus peruvianus</i> infectado com <i>Photorhabdus temperata</i> K122 por 24 horas.....	85
Figura 25:	Fotografia de microscopia eletrônica de varredura do intestino de adultos de <i>Dysdercus peruvianus</i> infectados com <i>Photorhabdus temperata</i> K122 por 36 horas.....	86
Figura 26:	Fotografias de microscopia do intestino de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122, 18 horas de infecção.....	87
Figura 27:	Fotografias de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122, 24 horas de infecção.....	88
Figura 28:	Fotografia da região anterior do intestino de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas por 36 horas por <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	89
Figura 29:	Foto de microscopia eletrônica de varredura da região posterior do intestino de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122 por 36 horas.....	90
Figura 30:	Foto de microscopia eletrônica de varredura do intestino de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122 por 48 horas.....	91

Figura 31:	Caracterização morfológica dos microrganismos isolados do intestino de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	96
Figura 32:	Caracterização morfológica dos microrganismos isolados do intestino de larvas de <i>Dysdercus peruvianus</i>	97
Figura 33:	Caracterização morfológica dos microrganismos isolados do intestino de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	98
Figura 34:	Efeito de compostos antimicrobianos produzidos pela <i>Photorhabdus temperata</i> sobre bactéria da flora intestinal de insetos.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nematóides steinernematídeos e heterorabditídeos encontrados e isolados na América Latina e Caribe.....	8
Tabela 2: Atividades enzimáticas no intestino de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	73
Tabela 3: Atividades enzimáticas no intestino de larvas de <i>Dysdercus peruvianus</i> infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	74
Tabela 4: Atividades enzimáticas no intestino de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>Photorhabdus temperata</i> K122.....	76

LISTA DE ABREVIÇÕES

- APC** → agar para contagem de microrganismos
- Bf** → biofilme
- BHI** → caldo infusão de fígado e cérebro
- PBS** → tampão fosfato salino
- CI** → células intestinais
- DL₅₀** → dose letal que mata 50% dos indivíduos
- DMSO** → dimetilsulfóxido
- DNS** → ácido 3,5 dinitrosalicílico
- EMB** → agar eosina azul de metileno
- Fru** → frutose
- Gal** → galactose
- Glc** → glicose
- H** → hemócitos
- IJs** → nematóides juvenis infectivos
- Lac** → fermentação da lactose
- LB** → caldo Luria Bertani
- Lb** → lâmina basal
- Mb** → membrana basal
- MCF** → ("makes cartepillars floppy")
- ML** → músculos longitudinais
- MU α Gal** → 4 metilumbeliferil- α -D-glicosídeo
- MU α Glu** → 4 metilumbeliferil- α -D-glicosídeo
- NEPs** – nematóides entomopatogênicos
- NP α Glu** → p-nitrofenil- α -D-glucosídeo
- P** → *Photorhabdus*
- PAGE** → eletroforese em gel de poliacrilamida
- SDS** → dodecil sulfato de sódio
- SH** → sacarose hidrolase
- T** → traquéia
- TL₅₀** → tempo letal que mata 50% dos indivíduos
- TL₉₀** → tempo letal que mata 90% dos indivíduos
- Tris** → tris-(hidroximetil) aminometano
- TTC** → cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
- UFC** → unidade formadora de colônia
- V1, V2, V3, V4** → regiões do intestino médio de *Dysdercus peruvianus*

Resumo

Photorhabdus temperata é uma bactéria entomopatogênica que vive associada simbioticamente a nematóides da família Heterorhabditidae. Este estudo investigou os efeitos da infecção por *Photorhabdus temperata* K122 nas atividades das enzimas digestivas e da microbiota intestinal da *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*. A histopatologia da infecção também foi investigada usando-se microscópio eletrônico de varredura, de transmissão e microscopia de luz. Nos estágios iniciais da infecção, principalmente no horário de 18 horas pós-infecção, as colônias foram localizadas entre a lâmina basal e a membrana basal na região anterior do intestino dos insetos investigados. Através de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que em larvas de *D. saccharalis* e *T. molitor*, o início da formação do biofilme era mais compacto na região anterior que na posterior. Através de método de contagem “Pour Plate” foi possível verificar que o número de UFC de *P. temperata* em V1 foi maior do que nas demais regiões do intestino de *D. peruvianus*. Grupos de 20 insetos foram infectados pela injeção de 50 células bacterianas diretamente na hemolinfa. Depois de diferentes períodos de infecção, os insetos foram dissecados e o homogeneizado do intestino médio foi usado para determinação de proteínas e atividade enzimática. Os primeiros sinais da toxicidade iniciam-se com 12 horas pós-infecção, horário em que as atividades enzimáticas começam a diminuir. Nas larvas de *D. saccharalis*, *T. molitor* e ninfas de *D. peruvianus* a média das atividades enzimáticas após 12 horas foi de 83%, 88% e 78% em relação aos controles. 48 horas após a infecção, a atividade remanescente de algumas enzimas digestivas diminuiu cerca 5-15% em média. As α -amilases das larvas de *D. saccharalis* mantiveram uma atividade residual de 37% e as α -amilases de larvas de *T. molitor*, 21% no período de 48 horas pós-infecção. Neste período, a maioria das bactérias nativas cultiváveis morre. Bioensaios mostraram que atividades antibacterianas estão associadas apenas ao epitélio do intestino médio dos insetos e não ao conteúdo luminal. O objetivo da população de *P. temperata* K122 em controlar a microbiota intestinal foi discutido.

Abstract

Photorhabdus temperata is an entomopathogenic bacteria that lives in association with nematodes of the Heterorhabditidae family in a symbiotic relationship. This study investigated the effects of *Photorhabdus temperata* K122 infections on the activity of digestive enzymes and the intestinal microbiota of three insect species *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*. A study of the hisopathology of the infection was also carried out using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy and light microscopy. During the initial stages of infection, principally 18h post-infection, it was only possible to locate bacterial colonies between the basal lamina and the basal membrane in the anterior region of the insect intestine. Using SEM it was possible to observe the formation of a “bio-film” in *Diatraea saccharalis* and *Tenebrio molitor* larvae that was more compact in the anterior region than in the posterior region. Using a “Pour Plate” counting method it was possible to verify the number of colony forming units (CFUs) of *Photorhabdus temperata* in the V1 region was higher than that of any other intestinal region in *Dysdercus peruvianus*. Groups of 20 insects were infected by injection of 50 bacterial cells directly into the hemolymph. Following different times post-infection, the insects were dissected and the midgut was homogenized in order to determine protein concentrations and enzyme activities. The first symptoms of toxicity to the intestinal physiology was observed 12h post-infection, at which time the enzymatic activities started to fall. In *Diatraea saccharalis* larvae the mean level of activity was 83% at this time whilst, those of *Dysdercus peruvianus* was 78% and *Tenebrio molitor* was 88%. Investigating the effects of the bacteria 48h post-infection, it was observed that most of the enzyme activities were reduced drastically, with a means of 5-15% residual activity. The α -amylases of *Diatraea saccharalis* maintained a residual activity of 37% and the α -amylases of *Tenebrio molitor* 21%. At this time, the native cultivable intestinal microbiota had died. Bioassays showed that the antibacterial activity of *Photorhabdus temperata* K122 was associated with the midgut epithelium and not detected in the lumen contents. It is probable that the population of *Photorhabdus temperata* K122 associated with the midgut inhibited the native microbiota to reduce competition for resources.

I - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações iniciais

A agricultura moderna é caracterizada por um alto uso de insumos químicos, cuja vasta maioria tem a finalidade de garantir o que se chama de "sanidade" dos produtos agrícolas. Esta é ameaçada pelo que se convencionou chamar de "pragas", assim como doenças causadas por microrganismos que, neste caso, passam a ser denominados de "fitopatógenos". As pragas nada mais são do que insetos que, na ausência de inimigos naturais e na abundância de alimento, proliferam, causando prejuízo econômico ao produtor. Isto é uma clara consequência do desequilíbrio ecológico causado pela transformação do ambiente natural em ambiente agrícola (Panizzi & Parra, 1991).

O desenvolvimento tecnológico ocorrido no século XX, principalmente da indústria química, resultou na formulação de produtos para o controle das pragas e doenças mais frequentes e danosas para a agricultura. Os inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas e nematicidas passaram a ser aplicados em larga escala em todo o mundo desenvolvido e nas propriedades agrícolas de países em desenvolvimento que dispunham de capital suficiente para a tecnificação da produção (Panizzi & Parra, 1991).

Na época em que os agrotóxicos começaram a ser aplicados nas lavouras para controle de pragas, os resultados obtidos eram surpreendentemente bons. Com o passar do tempo, todavia, essa eficiência aparentemente começou a cair. Descobriu-se que alguns insetos-alvo haviam desenvolvido resistência aos pesticidas. Para controlar essas pragas resistentes, as doses dos produtos químicos tiveram que ser aumentadas, e as aplicações tiveram que ser feitas com maior frequência, ou ainda exigiam a substituição por outros produtos. Além disso, começaram a surgir outros problemas ecológicos como a eliminação dos inimigos naturais, multiplicação descontrolada de pragas (resurgência), poluição das águas e do solo. Ainda, percebeu-se que os pesticidas químicos deixavam resíduos tóxicos nos produtos agrícolas destinados ao consumo humano e animal. Tais produtos também causavam intoxicação dos trabalhadores rurais (Alves *et al.*, 1998).

O desencanto da população em todo o mundo com os pesticidas químicos, levou a comunidade científica a recomendar a substituição do controle químico pelo

controle biológico. Esse controle vinha sendo utilizado desde a antiguidade pelos agricultores, e durante o período de uso de controle químico, continuou a ser aplicado embora em menores proporções (Melo & Azevedo, 1998).

Os altos custos ambientais e econômicos derivados do uso de agrotóxicos na agricultura resultaram num maior esforço de pesquisa direcionada ao desenvolvimento de sistemas de controle de pragas e doenças através de agentes biológicos. As vantagens mais difundidas da adoção de controle biológico pelos agricultores são um impacto ambiental menor e maior segurança ao homem, tanto para aquele que aplica os produtos quanto para o consumidor dos alimentos tratados. Sem falar nos sistemas de produção dos biopesticidas, menos poluentes que as indústrias químicas dos agrotóxicos. Outra vantagem dos agentes de controle biológico é sua maior seletividade, quando comparados com os agrotóxicos (Panizzi & Parra, 1991). O controle biológico é o uso de organismos vivos para combater as pragas (Melo & Azevedo, 1998).

Entre os agentes de controle biológico existem:

- os predadores que são animais (vertebrados e invertebrados) que se alimentam dos insetos-praga;
- os parasitóides que infestam as pragas causando-lhes a morte por enfraquecimento;
- os microrganismos entomopatogênicos como os vírus, fungos, bactérias, protozoários e nematóides entomopatogênicos.

O controle biológico microbiano é o uso de microrganismos para o controle de pragas. Os microrganismos entomopatogênicos podem ser introduzidos em pequenas quantidades nas lavouras, que é a introdução inoculativa, realizada com a expectativa de que eles se multipliquem e efetivem o controle biológico. Quando se liberam na cultura altas quantidades de microrganismos entomopatogênicos, tem-se a introdução inundativa (Alves *et al.*, 1998).

A utilização de agentes antagônicos a insetos alvo já se tornou uma realidade. Juntamente aos vários outros inimigos naturais de pragas, tais como bactérias, fungos, vírus e insetos, os nematóides têm despontado como uma excelente forma de controle biológico (Alves *et al.*, 1998).

Nematóides em geral são conhecidos pelos agricultores como prejudiciais às culturas, especialmente aqueles denominados comumente como nematóides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*. Nematóides entomopatogênicos (NEPs), entretanto, são inócuos às plantas, visto que não são providos de estilete, estrutura do corpo através da qual os parasitos de plantas se alimentam do conteúdo das células vegetais. São denominados nematóides entomopatogênicos porque vivem e atuam em associação com bactérias simbióticas, as quais são patogênicas aos insetos (Alves *et al.*, 1998).

1.2 - Nematóides entomopatogênicos (NEPs)

Há estudos que demonstram que as interações entre nematóides e insetos já ocorrem desde, provavelmente, 300 milhões de anos, período Carbonífero (Ferraz, 1998). A primeira publicação foi feita por Aldrovandus (1623), quando o autor relatou o encontro de vermes alongados, emergindo dos corpos de gafanhotos mortos.

Segundo Van Driesche & Bellows Jr (1996), embora sejam conhecidas mais de 30 famílias de nematóides associados com insetos, apenas nove contêm espécies com potencial para serem usadas como agentes de controle biológico sendo elas: Tetradonematidae, Mermithidae, Steinernematidae, Heterorhabditidae, Phaenopsitylenchidae, Lotonchiidae, Allantonematidae, Parasytylenchidae e Sphaerulariidae.

Dentre estas, mais atenção tem sido dada a duas famílias: Steinernematidae, que contém 2 gêneros, *Steinernema* Travassos, 1927 com 33 espécies, e *Neosteinernema* Nguyen & Smart, 1994, com apenas uma espécie e Heterorhabditidae que contém um gênero, *Heterorhabditis* com 9 espécies (Koppenhofer & Fusy, 2003).

Os estudos têm avançado bastante nos últimos 30 anos, especialmente no tocante a descoberta de novas espécies/isolados e a produção massal. Atualmente, estão disponíveis no mercado pelo menos 5 espécies de nematóides para o controle biológico de pragas, *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1975); *H. megidis* (Poinar *et al.*, 1987); *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1995); *S. feltiae* (Filipjev, 1934) e *S. riobravis* Cabanillas *et al.*, 1994 (Alves *et al.*, 1998).

Na América Latina, as pesquisas com esses nematóides têm se restringido a descrição de algumas espécies novas, ao relato de ocorrências de espécies já

conhecidas e a alguns resultados de experimentos no controle de pragas. Esses inimigos naturais têm sido produzidos em pequena escala visando estudos de laboratório e parcelas experimentais em campo (Leite *et al.*, 2004).

Nematóides do gênero *Steinernema* são associados com bactérias do gênero *Xenorhabdus*. Já os de *Heterorhabditis* são associados com as do gênero *Photorhabdus* (Georgis & Manweiler, 1994; Burnell & Stock, 2000). Tais nematóides na verdade atuam apenas como veículos para essas bactérias, que são altamente patogênicas quando introduzidas na cavidade do corpo dos insetos hospedeiros, onde provocam rápida septicemia, levando-os a morte. Posteriormente, com a vasta e rápida multiplicação da bactéria no cadáver do inseto, os nematóides passam a alimentar-se delas. Constitui-se em uma relação mutualística, bastante especializada entre os nematóides e suas respectivas bactérias, sendo ambos beneficiados. A bactéria não consegue subsistir em ambiente aberto, ficando protegida no interior da cavidade do intestino do nematóide até ser transferida ao interior do corpo do inseto, onde se multiplica; portanto, o nematóide lhe é essencial à sobrevivência. Em contrapartida, o nematóide utiliza-se da bactéria como fonte de alimento básico, desenvolvendo-se e multiplicando com sucesso (Ferraz, 1998).

Em ambos os casos, o ciclo no hospedeiro se inicia pelos juvenis infectivos (JIs) de terceiro estágio, os quais não se alimentam e carregam suas bactérias mutualísticas específicas nos seus intestinos (Poinar, 1979).

Para os dois nematóides, os juvenis infectivos entram em seus insetos hospedeiros através das aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) e penetram na hemocele. No entanto, os juvenis infectivos de *Heterorhabditis* podem penetrar também diretamente pelo tegumento (Kaya & Gaugler, 1993). Uma vez dentro da hemocele do hospedeiro os juvenis liberam células da bactéria que se propagam e por meio de suas toxinas matam o hospedeiro em 48 h (Burmam, 1982).

Os nematóides se alimentam da bactéria e tecido do hospedeiro e se reproduzem em 2 a 3 gerações e emergem dos cadáveres como juvenis infectivos para ir a procura de novos hospedeiros. O ciclo de vida para a maioria dos esteinernematídeos e heterorabditídeos, da infecção à emergência dos juvenis infectivos, varia de 7 a 10 e de 12 a 15 dias, respectivamente, em condições de temperatura ambiente (Ehlers, 2001).

Fora do cadáver do inseto, os juvenis infectivos dos nematóides utilizam estratégias diferentes para a localização do hospedeiro: esteirernematódeos usam uma estratégia de emboscada, ou seja, ficam no aguardo da passagem de algum inseto (Campbell & Gaugler, 1993); heterorabditódeos se locomovem pelo solo, na procura de hospedeiro (Lewis *et al.*, 1992).

Atualmente, nematóides entomopatogênicos (NEPs) são considerados efetivos no controle de uma variedade de pragas existentes no solo. Desta forma, estão sendo largamente utilizados no controle integrado de pragas como biopesticida, pois possuem diversas vantagens sobre inseticidas químicos (Kaya & Gaugler, 1993). No que se refere às vantagens, pode-se dizer que a produção em massa “*in vivo*” e “*in vitro*” dos nematóides é relativamente fácil, são facilmente aplicáveis, matam rapidamente seu hospedeiro e não poluem o meio ambiente sendo, portanto, uma forma de controle segura e “ambientalmente aceitável”. Além disso são compatíveis com muitos pesticidas químicos e biológicos (Kaya & Gaugler, 1993). A faixa de hospedeiros para cada espécie de nematóide é estreita e até específica, não causando, portanto mortalidade indiscriminada. Devido a essa estreita faixa de hospedeiros é necessária e recomendada a escolha no NEP mais adequado ao controle de determinada praga (Peters, 1996). Estes nematóides são seguros para os vertebrados, plantas e outros organismos considerados não-alvos (Kaya & Glaugler, 1993). Com relação aos vertebrados, inúmeros nematóides entomopatogênicos foram testados em diversas espécies, desde peixes até macacos. Apenas girinos de sapos e rãs se mostraram suscetíveis quando nematóides foram adicionados à água onde estavam (Akhurst & Smith, 2002).

Na última década, o progresso bastante significativo para a produção “*in vitro*” de espécies de *Heterorhabditis* e espécies de *Steinernema* tem permitido companhias produzirem nematóides mais eficientes, a custos reduzidos (Georgis, 1990). Normalmente o processo de produção inicia-se com o isolamento do nematóide do solo e multiplicação em larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) conforme método descrito por Bedding & Akhust (1975).

Esses nematóides podem ser multiplicados “*in vivo*” e “*in vitro*”, sendo a primeira forma mais empregada para produção pequena visando, geralmente, à manutenção de coleções do parasito em laboratório e a realização de bioensaios. A

segunda é para produção em maior escala, objetivando desde experimentos de campo à produção comercial (Georgis, 1990).

No Brasil, Folegatti *et al.* (1988) propuseram um novo método para criação “*in vivo*” de *S. carpocapsae*, usando lagartas de *Diatraea saccharalis*, broca da cana-de-açúcar. O custo de produção foi considerado compatível ao custo sobre *Galleria mellonella* (Leite *et al.*, 1990).

De acordo com Ehlers (1996 e 2001) para um propósito de controle biológico, nematóides entomopatogênicos devem ser produzidos em escala industrial em fermentadores onde meios líquidos são incubados com a respectiva bactéria simbiote, e posteriormente introduzidos os juvenis infectivos.

Nematóides entomopatogênicos passaram a ser estudados para o controle de insetos a partir de 1930; no entanto, somente na década de 80 é que se iniciou a sua utilização comercial para o controle de insetos, devido ao aperfeiçoamento do método de produção em massa desses agentes “*in vitro*”, em sistema monoxênico, aproveitando-se da bactéria simbiote como fonte de alimento. A inserção de registro dos produtos formulados junto à “Environmental Protection Agency – EPA”, nos Estados Unidos, ou a organismos congêneres em vários outros países, tem sido um ponto positivo para o crescimento da produção comercial de produtos a base de tais nematóides/bactérias, visando o controle de insetos pragas em gramados, plantas ornamentais, na horticultura, na agricultura em geral, na silvicultura e até na saúde animal na América do Norte, Europa e Ásia durante os últimos 21 anos, sendo que em meados dos anos 90 mais de vinte produtos encontravam-se disponíveis no mercado (Ehlers, 2001).

Na América Latina, vários nematóides entomopatogênicos têm sido encontrados atacando insetos e isolados a partir de hospedeiro ou solo conforme se observa na Tabela 1. Ressalta-se o trabalho realizado por Travassos (1927) no Brasil, transferindo a espécie *Aplectana krausseii* para um novo gênero por ele denominado de *Steinernema*. *Heterorhabditis hambletoni* foi originalmente encontrado atacando a broca do algodoeiro *Eutinobothrus brasiliensis* Hambleton, 1937 (Coleoptera: Curculionidae) e descrito por Pereira (1937) como pertencente ao gênero *Rhabditis*. Esse foi o primeiro registro, no Brasil, do gênero *Rhabditis*. A espécie *S. scapterisci* Nguyen & Smart, 1990 foi primeiramente encontrada no Brasil e Uruguai atacando a paquinha *Neocurtilla hexadactyla* Perty, 1832 (Orthoptera:

Gryllotalpidae) (Fowler & Garcia, 1988), e em seguida na Argentina parasitando o mesmo hospedeiro (Stock, 1992).

Tabela 1: Nematóides steinernematídeos e heterorabditídeos encontrados e isolados na América Latina e Caribe.

Espécie	Origem	Região geográfica	Referência
<i>Heterorhabditis. argentiensis</i>	<i>Graphognathus</i>	Argentina	Stock, 1993a
<i>H. bacteriophora</i>	Solo	Argentina	Doucet <i>et al.</i> , 1996
	Solo	Argentina	Stock, 1993a
	Solo	Brasil	Poinar, 1990
	<i>Cylas formicarius</i>	Cuba	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> , 1998
<i>H. heliothidis</i>	solo	Colômbia	Caicedo & Bellotti, 1996
	---	Cuba	Arteaga & Vasquez, 1991
<i>H. indica</i>	---	Cuba	Rodriguez <i>et al.</i> , 1996
<i>H. indicus</i>	---	Venezuela	Mracek <i>et al.</i> , 1994
<i>Heterorhabditis</i> sp.	<i>Pachneus litus</i>	Cuba	Rodriguez <i>et al.</i> , 1996
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	México	Mracek <i>et al.</i> , 1994
	<i>Graphognallus leucoloma</i>	Argentina	Doucet & de Doucet, 1995
<i>S. feltiae</i>	<i>Diloboderus abderus</i>	Argentina	Stock, 1993b
	Solo	Colômbia	Saenz, 1999
<i>S. glaseri</i>	<i>Migdolus fryanus</i>	Brasil	Poinar, 1990
<i>S. puertoricensis</i>	Solo	Porto Rico	Roman & Figueroa, 1994
<i>S. rara (rarum)</i>	<i>Heliothis</i> sp.	Argentina	Doucet, 1986
<i>S. rilleri</i>	Solo	Argentina	Doucet & Doucet, 1990
<i>S. riobravis</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	México	Raulston <i>et al.</i> , 1992
<i>S. scapterisci</i>	<i>Scapteriscus vicinus</i>	Uruguai	Nguyen & Smart, 1990
	Solo	Argentina	Stock, 1992
<i>S. cubana (cubanum)</i>	solo	Cuba	Mracek <i>et al.</i> , 1994

1.3 - Família Heterorhabditidae (Poinar, 1976)

Esta família foi estabelecida por Poinar, em 1976, quando definiu o gênero e a espécie *Heterorhabditis bacteriophora*. Esta família possui o gênero *Heterorhabditis* com onze espécies das quais 75% foram descobertas na última década (Nguyen *et al.*, 2004). Os infectivos juvenis da família Heterorhabditidae são encontrados no solo localizam o hospedeiro pela detecção de produtos de excreção dos insetos, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura, iniciam a infecção penetrando o inseto pelas cavidades naturais como boca, ânus, espiráculos ou rompendo a cutícula do inseto por meio de um “dente” dorsal quitinoso localizado na extremidade anterior (Figura 1) (Poinar, 1990). Os J1s se deslocam até a hemocele onde, em contato com a hemolinfa, liberam células bacterianas do gênero *Photorhabdus* que se multiplicam, causando a morte do hospedeiro por septicemia em período de 24-48 horas (Forst & Nealon, 1996). Os nematóides alimentam-se dos tecidos do hospedeiro e de células da bactéria simbiote, desenvolvem-se em adultos hermafroditas que produzem os demais estádios que são anfimíticos (ovos, J1, J2, J3 ou Jis) (Dunphy & Webster, 1988). Nesta fase na qual se encontram os nematóides, o hospedeiro se torna visivelmente luminescente; ao término de duas a três gerações do nematóide no inseto, há a formação de juvenis infectivos que são juvenis de terceiro estágio especializados para localizar e infectar insetos hospedeiros através de estratégias de busca que variam com a espécie do nematóide. A cutícula do segundo estágio é mantida, o sistema digestivo entra em colapso e células das bactérias simbióticas são encapsuladas (Poinar, 1990). Estes juvenis infectivos são, portanto, mais resistentes às condições ambientais. Como são organismos do solo, nematóides entomopatogênicos são especialmente indicados para o controle de pragas que possuam pelo menos um estágio do ciclo nesse ambiente (Alves *et al.*, 1988).

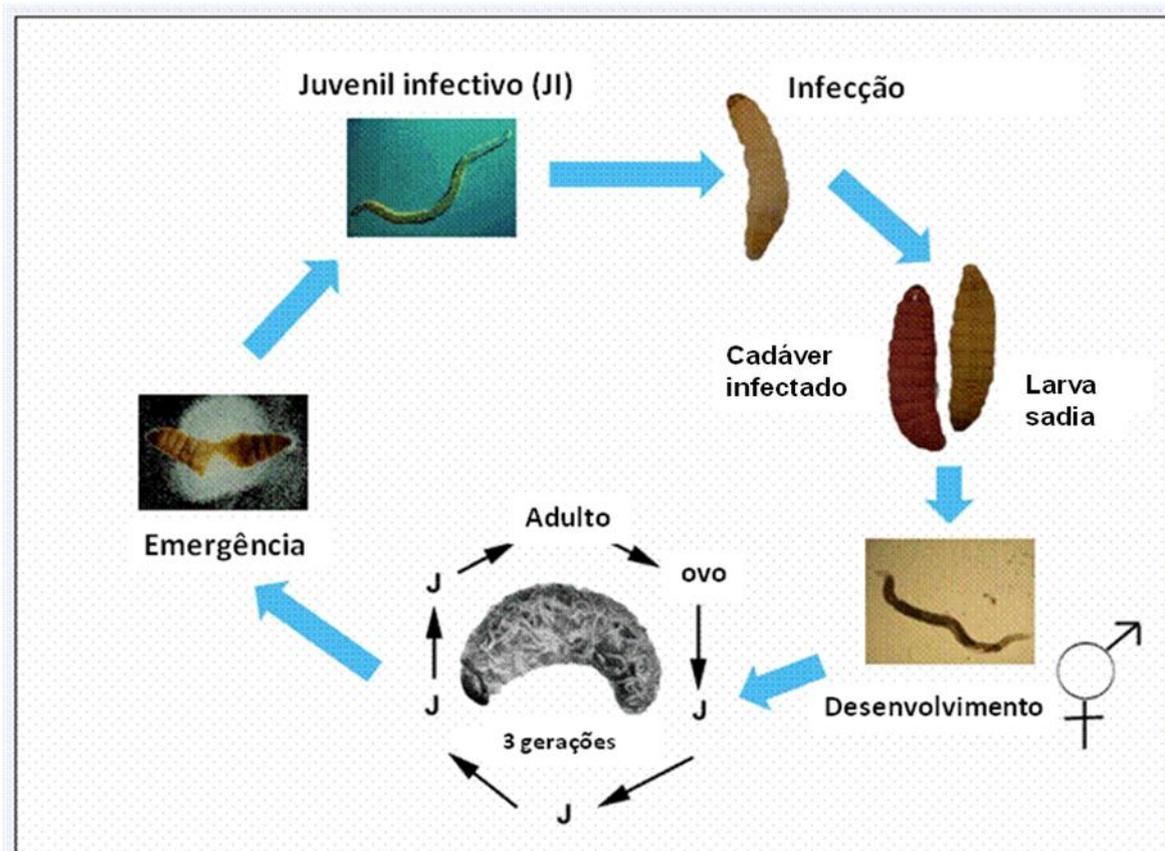


Figura 1: Ciclo de vida do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis*. J - juvenil e JI - juvenil infectivo (French-Constant *et al.*, 2003).

1.4 - O gênero *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae)

As bactérias do gênero *Photorhabdus* são células em forma de bastão, medindo 0,5-2 x 1-10 μm , móveis, Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não esporulantes, da família Enterobacteriaceae (Boemare, 2002). Neste gênero *Photorhabdus*, duas espécies são associadas a *Heterorhabditis*: *Photorhabdus luminescens* e *Photorhabdus temperata* (Fischer-le *et al.*, 1999).

A bactéria *Photorhabdus* apresenta variação fenotípica, são duas formas denominadas de forma primária (fase I) e forma secundária (fase II) (Akhurst, 1980). Tem sido sugerido que a forma primária representa a célula natural associada ao nematóide enquanto a forma secundária aparece espontaneamente quando a bactéria é cultivada *in vitro* por longo tempo (Forst & Clarke, 2002). A forma primária expressa uma variedade de fenótipos que podem ter um papel no que se refere à estabilização da infecção. Nesta fase as células absorvem o vermelho neutro e azul de bromotimol em meio agar, possuem corpos de inclusão, produzem substâncias antibióticas, lipase, fosfolipase, protease, pigmentos e bioluminescência, enquanto

que o mesmo não ocorre com a forma secundária (Akhurst,1980). Durante a fase primária as bactérias do gênero *Photorhabdus* também produzem toxinas que são responsáveis pela septicemia e morte do inseto hospedeiro (Ffrench-Constant & Bowen, 1999). A forma secundária influencia no sucesso da produção de nematóides, principalmente do gênero *Heterorhabditis* (Ehlers *et al.*, 1998).

1.5 - Como as bactérias simbiotes dos NEPs matam o inseto?

P. luminescens pode ser cultivada prontamente fora do hospedeiro, e valores de LD50 (dose na qual são mortos 50% dos insetos) foram publicados como sendo equivalente a menos de cinco bactérias por larva de inseto (Bennett & Clarke, 2005). Apesar de que esta bactéria também produz proteínas de inclusão cristalinas, semelhantes em aparência às proteínas tipo Bt toxinas, a virulência é independente destas inclusões (Bowen *et al.*, 1998). Estudos prévios sugeriram que a toxicidade, nesta e em outras espécies relacionadas, é mediada por secreção de proteases, lipases ou lipopolissacarases (Dunphy & Webster, 1988; Forst & Nealson, 1996; Bowen *et al.*, 1998). Porém, o grupo liderado pelo Dr. Ffrench-Constant tem mostrado que a toxicidade oral está associada a um complexo de proteínas de alto peso molecular que é secretado diretamente no meio de cultura pelas bactérias e é ativo contra uma grande variedade de insetos, inclusive larvas de mosquitos (Waterfield *et al.*, 2005). Importante para seu uso prático, este complexo de toxina é ativo oralmente, apesar do fato de que normalmente seria introduzido diretamente na hemocele do inseto pelas bactérias (Bowen *et al.*, 1998).

A biologia do processo de infecção da bactéria *P. luminescens* foi recentemente descrita usando-se como inseto modelo larvas da mariposa *Manduca sexta* (Silva *et al.*, 2002). Além de toxinas inseticidas, *P. luminescens* também produz uma miríade de produtos anti-bacterianos/-fúngicos/-nematicidas (Ffrench-Constant *et al.*, 2000).

P. luminescens começa a colonizar as larvas de *M. sexta* a partir da região proximal do intestino médio. As bactérias crescem entre a membrana extracelular que reveste o intestino no lado da hemolinfa e o epitélio intestinal propriamente dito. Elas não chegam a invadir as células do epitélio intestinal, mas secretam toxinas

neste micro-ambiente, entre elas toxinas que induzem as células do intestino a entrar em apoptose (Silva *et al.*, 2002; Daborn *et al.*, 2002).

O colapso do epitélio intestinal leva a uma grande perda da pressão de turgor corporal e morte do inseto, em questão de horas. Uma toxina chamada de MCF ("makes cartepillars floppy"), além de induzir apoptose no epitélio intestinal, também o faz com os hemócitos, que são células circulantes na hemolinfa do inseto e envolvidas na resposta imune celular do animal (Daborn *et al.*, 2002). O fato de que a região proximal do intestino médio é uma região absorptiva de nutrientes em larvas de lepidópteros, levanta a questão da possibilidade de que essas bactérias sejam capazes de reconhecer essas regiões para dar continuidade ao processo de infecção.

Apesar desses recentes avanços na compreensão do processo de infecção por *P. luminescens*, ainda não se sabe qual é o padrão da infecção em insetos de ordens diferentes e se este processo se repete para outras espécies de *Photorhabdus*. Nossos objetivos visam contribuir neste cenário através de uma abordagem comparativa, visando estabelecer os fenômenos envolvidos na interação entre a bactéria entomopatogênica *Photorhabdus temperata* K122 e diferentes insetos e sua ação sobre a flora intestinal.

1.6 – Características das espécies estudadas

1.6.1 - *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

A *Diatraea saccharalis* é um inseto pertencente à ordem Lepidoptera que se caracteriza por apresentar corpo mole e ter asas, corpo e apêndices cobertos por escamas pigmentadas. As asas são membranosas, sendo as posteriores um pouco menores que as anteriores. As peças bucais são modificadas numa probóscide enrolada e usadas para sugar o néctar das flores. A metamorfose da *D. saccharalis* é completa: ovo → larva → pupa ou crisálida → adulto (Figura 2). As larvas são lagartas de corpo cilíndrico, cabeça desenvolvida e distinta do corpo, pernas torácicas e falsas pernas abdominais. Esta é a fase de intenso crescimento, tanto em tamanho como em ganho de peso, alimentando-se usualmente de plantas (Gallo *et al.*, 2002).

A *D. saccharalis* na fase adulta é uma mariposa com as asas anteriores de colorido amarelo-palha. Nesta fase os insetos alimentam-se muito pouco. Após o

acasalamento, a fêmea faz a postura nas folhas da cana-de-açúcar, de preferência na face dorsal das mesmas. O número de ovos em cada postura é variável de 5 a 50, sendo esta postura imbricada, assemelhando-se a um segmento de couro de cobra ou escama de peixe (Lima Filho, 1999).

A eclosão se dá em 4 a 9 dias. As larvas recém-nascidas alimentam-se, no início, do parênquima das folhas, convergindo a seguir, para a bainha das mesmas. Após a primeira muda de pele penetram pela parte mais mole do colmo e abrem galerias perfurando-o de baixo para cima. Ao atingirem seu completo desenvolvimento, em média aos 40 dias, medem de 22 a 25 mm de comprimento, sendo de coloração amarelo-pálida e cabeça marrom. Fazem então um orifício para o exterior e, fechando-o com fios de seda e serragem, passam a crisálida, de coloração castanha. Ficam neste estado por 9 a 14 dias quando emerge o adulto que sai pelo orifício feito anteriormente pela larva. O ciclo evolutivo completo é de 53 a 60 dias e, em nosso meio, podem dar até quatro gerações anuais, em casos excepcionais até cinco, dependendo das condições climáticas. Na última geração há um alongamento de ciclo ficando a larva no interior do colmo por 5 a 6 meses (Gallo *et al.*, 2002).

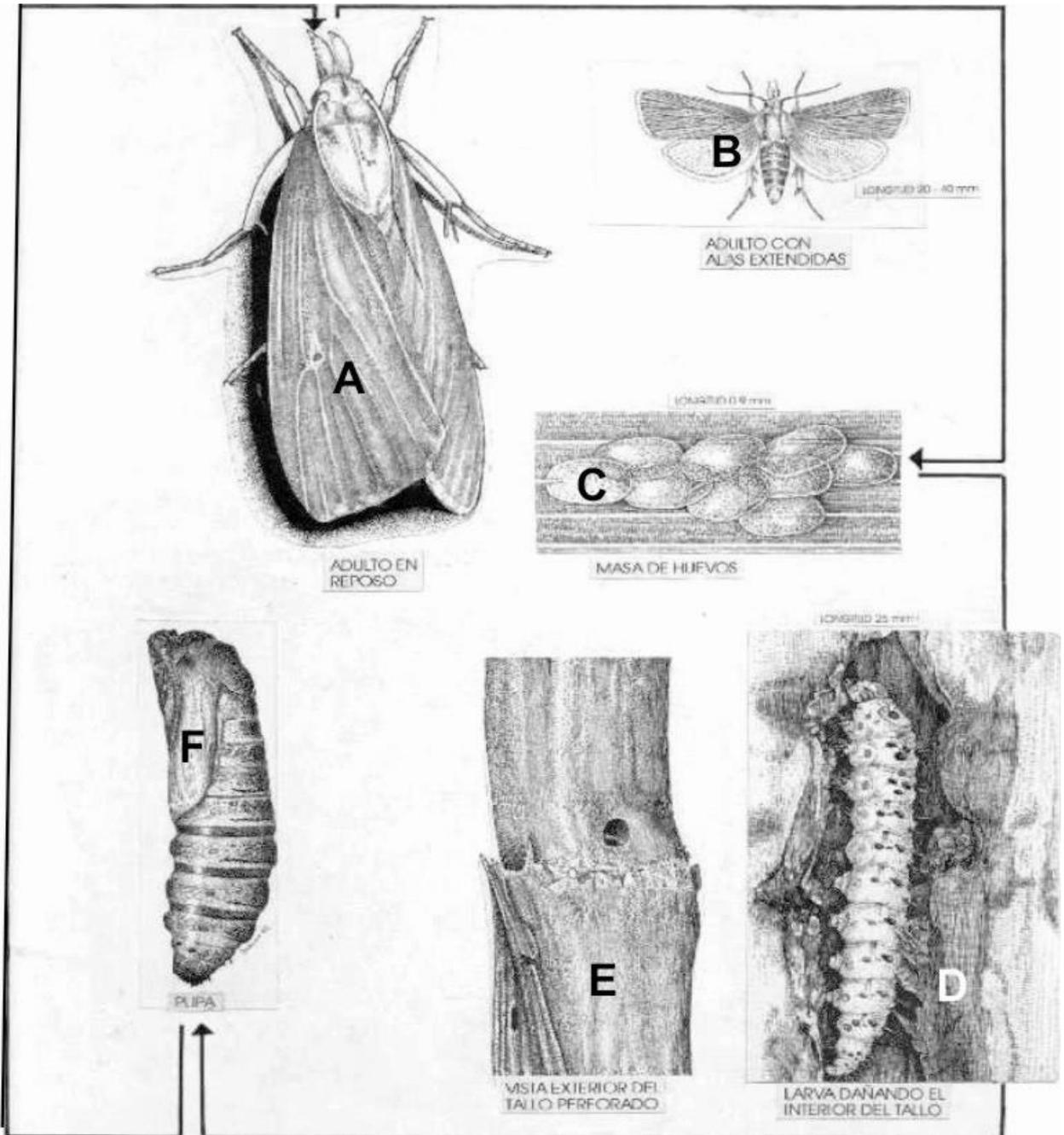


Figura 2: Ciclo de vida da *Diatraea saccharalis*. A: Inseto adulto em repouso, B: Inseto adulto com asas estendidas, C: Massa de ovos, D: Larva causando danos no interior do talo, E: Vista exterior do talo deformado e F pupa.

creatures.ifas.ufl.edu/field/sugarcane_borer.htm

As larvas da *D. saccharalis* são a principal praga da cana sendo provavelmente originárias da América Central e do Sul e são popularmente conhecidas como brocas da cana-de-açúcar. As larvas produzem prejuízo direto pela abertura de galerias ocasionando perda de peso da cana, morte das gemas, falhas na germinação e quando fazem galerias circulares (transversais), seccionando o colmo, provocam o tombamento da cana pelo vento. Nas canas novas, as larvas produzem o secamento dos ponteiros, conhecido por “coração morto” (Braga, 2001).

Os prejuízos indiretos são os mais consideráveis, uma vez que através dos orifícios e galerias penetram fungos como *Colletotrichum falcatum* que causam a podridão vermelha do colmo, podendo abranger toda a região compreendida entre as diversas galerias (Gualgliumi, 1972).

A cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância econômica e social para o Brasil. Atualmente é cultivada em grande extensão em muitos estados do país, ocupando área em torno de 4,8 milhões de hectares, cuja produção é destinada principalmente à fabricação de açúcar (40 %) e álcool (60 %) (Paiva, 1998). Hoje, o Brasil é responsável por 25% da produção mundial de cana-de-açúcar, sendo o Estado de São Paulo produtor de 60% da produção nacional (Prossiga, 2007).

Além desses produtos, a cana-de-açúcar constitui base para a produção de matérias-primas como o bagaço, melado (Stupiello, 1987). O setor sucro-alcooleiro gera cerca de um milhão e trezentos mil empregos diretos e três milhões indiretos.

Como todas as plantas cultivadas, essa gramínea está sujeita à ação de fatores bióticos e abióticos que interferem na sua produtividade. Dentre os primeiros, as brocas *D. saccharalis* e *D. flavipennella* são consideradas as principais pragas da cultura, estando distribuídas em todas as regiões canavieiras do país (PLANALSUCAR, 1977). Muitas vezes, os prejuízos decorrentes das infestações da *Diatraea* spp. em cana-de-açúcar alcançam cifras significativas. No período 1971/1975, as perdas estimadas pelo complexo broca-podridões foram da ordem de 550 milhões de dólares por ano, para a intensidade de infestação (percentagem de internódios perfurados) média de 12,5 % (Bento, 1999).

1.6.1.1 – Controle da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*)

Em 1972, o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), órgão do Ministério da Indústria e Comércio, hoje extinto, instituiu o PLANALSUCAR (Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar), o qual, por sua vez, em 1974, criou o Programa Nacional de Controle Biológico de brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea* spp., no Brasil, como resposta à preocupação do setor canavieiro com os prejuízos devidos a essa praga. Essa iniciativa permitiu o desenvolvimento de estudos sobre o comportamento da praga a nível nacional, adotando-se metodologias padronizadas para todas as regiões canavieiras, bem como o desenvolvimento de técnicas de controle de praga, com ênfase para os métodos biológicos (Lima Filho, 1999).

A queimada da cana, ao contrário do que se acreditava inicialmente, auxilia no controle da broca-da-cana, reduzindo em mais de 95% sua população, enquanto uma parcela significativa de parasitóides e, principalmente, predadores sobrevivem durante esses eventos. Entretanto, devido aos problemas ambientais, a proibição prevista na legislação deve levar à substituição da cana queimada pela colheita mecanizada de cana crua (Degaspari *et al.*, 1987)

O controle químico para broca-da-cana ocorre quando a infestação for igual ou superior a 3%, ou quando houver 3% de lagartas pequenas na região da primeira folha junto ao “palmito” da cana, antes de penetrarem no colmo (Gallo *et al.*, 2002).

Os inseticidas registrados para o controle de *D. saccharalis* na cultura da cana no Brasil são o carbofurano e o fipronil (Brasil, 2007). De acordo com Novareti *et al.* (1999), a aplicação de fipronil 800 WG é eficiente no controle da broca-da-cana.

A eficiência do controle químico é influenciada pela dificuldade de se atingir a lagarta e pelos casos de resistência aos pesticidas. Os relatos na literatura de populações de *D. saccharalis* resistentes a inseticidas são referentes aos azinfós-metil, carbofurano, endossulfan, endrim, monocrotofós e tebufenozide, em Louisiana e no Texas, nos Estados Unidos (Pesticide Resistance, 2007).

Em condições naturais, a broca-da-cana é atacada por diversos inimigos naturais:

- Patógenos: *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniatii*, *Fusarium oxysporum*, *Grandosis virus*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraca rilehi*, *Nucleopholyhedrosis virus*, *Puecilomyces fumosoroseus*, *Serratia marcescens*;

A broca-da-cana é altamente sensível ao ataque de *Metarhizium anisopliae*. No Nordeste, sua ocorrência é comum, causando até 10% de mortalidade natural da broca no campo. Os fungos *Nomuraca rilehi*, *Beauveria bassiana* e *Puecilomyces fumosoroseus* também são patogênicos a *D. saccharalis* (Coutinho, 2001).

- Parasitóides: *Aguthis sp.*, *Alabagrus stigma*, *Apanteles angaleti*, *A. diatraeae*; *Archtas marmoratus*, *Ascogaster quadridentatus*, *Bracon brevicornis*, *Cotesia chilonis*, *C. diatraea*, *C. flavipes*, *C. sesamiae*, *Trichogramma chilostracae*, *T. brasiliense*, *T. chilemis*, *T. chilostracae*, *T. dissimilis*, *T. ma distinctum*, *T. exignam*, *T. fasciatum*, *T. fuentesi*, *T. galloi*, *T. julmirezi*;

Outro inimigo natural promissor para programas de MIP (Manejo Integrado de Pragas) é o microhimenóptero *Trichogramma galloi* que ataca ovos de lepidópteros. O parasitóide vem sendo produzido em larga escala em laboratórios de vários países, inclusive no Brasil, e suas liberações têm mostrado que é um eficiente agente regulador da população da praga (Botelho *et al.*, 1995).

- Predadores: *Doru lineare*, *Estatomma quadridens*, *Labidura riparia*, *Montina confusa*, *Pheidole megacephala*, *Phorastes femoratus*, *Polybia sericea*, *Psecas zonatus*, *Solenopsis interrupta*, *Tythus mundulus* (Cab. International, 2007).

As formigas predadoras contribuem para o controle natural de ovos e lagartas pequenas de *D. saccharalis*. Um levantamento da fauna de formigas predadoras foi realizado em lavouras de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e as principais espécies encontradas foram: *Solenopsis saevissima*, *Dorymyrmex sp.*, *Pheidole sp.* *Crematogaster sp.* (Rossi & Fowler, 2004).

Atualmente o controle biológico através do parasitóide larval *Cotesia flavipes* é o método mais utilizado para o manejo da broca-da-cana em nosso país. No Brasil,

tal controle vem aumentando gradativamente, até em 1994 atingir 360.000 hectares de cana-de-açúcar. Inicialmente, o parasitismo médio dessa espécie era de 0,14% em 1979, no período entre 1997 e 2002 essa taxa situou-se entre 30 a 40% (Botelho & Macedo, 2002).

1.6.2 - *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785 (Coleoptera: Tenebrionidae)

As perdas mundiais em produtos armazenados, devido ao ataque de insetos-praga na pós-colheita, são estimadas anualmente em 15% e custos elevados são envolvidos para a proteção destes produtos contra estas infestações (Reichmuth *et al.*, 1997). No Brasil, as perdas chegam a atingir 10% de toda a produção, sendo os principais fatores associados ao ataque de insetos, fungos e ácaros nos armazéns, silos e depósitos agroindustriais durante o armazenamento (Lorini, 2001).

A ordem Coleoptera abrange a maioria das espécies pragas de produtos armazenados. Os insetos que vivem em produtos armazenados apresentam características para adaptação neste tipo de ambiente. A forma adulta destes coleópteros possui uma estrutura corpórea resistente e de pequena dimensão, o que permite o movimento pelos reduzidos espaços existentes entre os grãos. Além disso, possuem uma alta capacidade de reprodução, permitindo que poucos indivíduos, em um curto espaço de tempo, formem uma população considerável (Merck & Gomes, 1982).

A ordem Coleoptera, com cerca de 370.000 espécies descritas (Pereira & Almeida, 2001), constitui o maior grupo conhecido de insetos, o que corresponde, aproximadamente, a 40% da Classe Insecta e a 30% do Reino Animalia (Lawrence & Britton, 1991). Como foram os primeiros insetos holometábolos a evoluírem, ocuparam grande quantidade de nichos ecológicos (Evans, 1975).

Muitos são os prejuízos gerados pelos coleópteros em grãos armazenados, dentre eles: perda de peso e do poder germinativo dos grãos, poluição da massa de grãos pela presença de ovos, larvas, pupas e adultos, além de fragmentos de insetos mortos, excrementos de microrganismos que vivem associados aos insetos e disseminação de fungos na massa de grãos, sendo que todos estes fatores levam a desvalorização do produto (Puzzi, 1977).

Alguns coleópteros de grãos armazenados podem ainda ser hospedeiros de parasitas como é o caso do *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) que atua como

hospedeiro intermediário de *Hymenolepis diminuta* (Cetoda). O *T. molitor* adquire o parasita pela ingestão de ovos encontrados em fezes contaminadas de roedores. A infecção do homem ocorre pela ingestão direta dos ovos dos parasitas ou quando o inseto é ingerido acidentalmente com o alimento infestado (Phillips & Burkholder, 1984; Kettle, 1985).

Dentre os coleópteros, pragas de grãos e subprodutos armazenados podem-se citar representantes de cinco importantes famílias: Tenebrionidae, Cucujidae, Anobiidae, Curculionidae e Nitinulidae (Evans, 1987). Pertencentes à família Tenebrionidae há três espécies de maior importância econômica: *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e *T. confusum* (ICI, 1988).

O bicho-da-farinha ou tenébrio é o nome dado às larvas do *T. molitor*, um besouro do gênero *Tenebrio*, representante típico da família dos tenebrionídeos, de cor preta ou pardo-escura, que não gosta de luz, e evita locais com iluminação (Evans, 1987).

O besouro *T. molitor* é considerado praga secundária, isto é, se alimenta de grãos partidos previamente por insetos que têm a capacidade de romper o tegumento externo do grão (Puzzi, 1977). Tanto as larvas como os adultos atacam farelos, farinha, fubá, açúcar e ração bem como outros gêneros alimentícios. Ocorrem em todas as regiões do mundo e no Brasil são encontrados nos estados de São Paulo, Maranhão, Pernambuco, Bahia, Pará, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Phillips & Burkholder, 1984; Gallo *et al.*, 1988).

Como todos os insectos holometabólicos, o *T. molitor* atravessa quatro estágios na vida: ovo, larva, pupa, e adulto. As larvas medem tipicamente cerca de 2,5 cm e os adultos têm entre 1,25 e 1,8 cm de comprimento (Figura 3) (Gallo *et al.*, 1998).

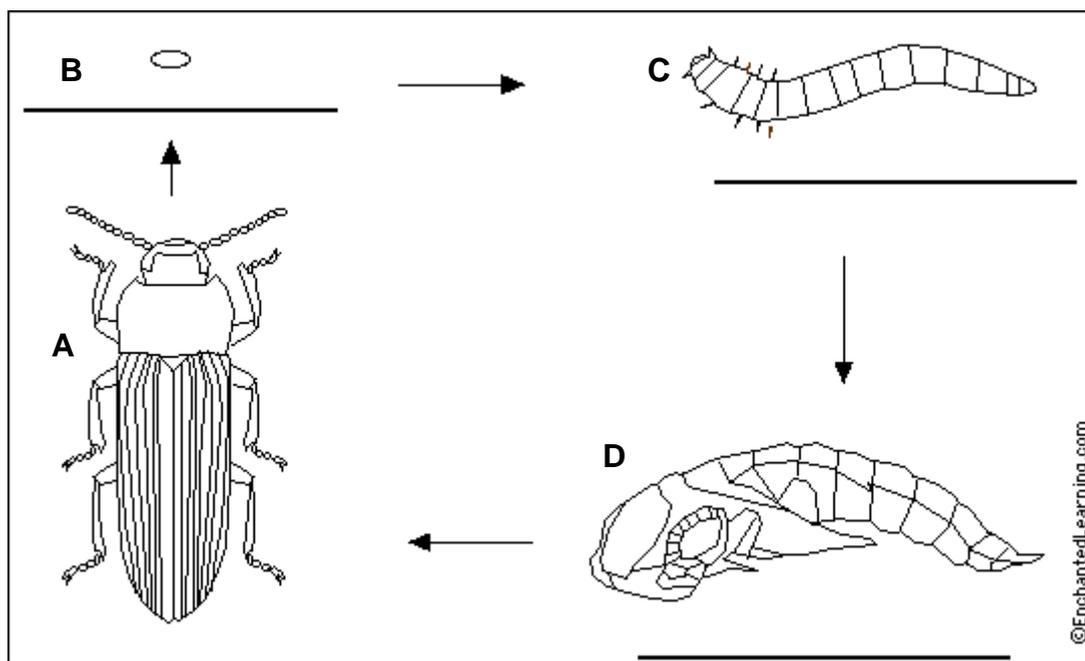


Figura 3: Ciclo de vida do *Tenebrio molitor*. A: Inseto adulto em repouso, B: Ovo, C: Larva, D: Pupa.

<http://www.enchantedlearning.com/subjects/insects/beetles/mealworm/label/>

O ciclo reprodutivo se completa em 6 meses, estando, no entanto, muito sujeito às condições de temperatura, umidade, nutrição e iluminação. São de hábitos noturnos, não suportando a luz solar. Baixas temperaturas poderão retardar ou até mesmo impedir seu desenvolvimento. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento fica entre 28 e 32°C (Gallo *et al.*, 1998).

Os besouros apresentam dimorfismo sexual evidente, estão maduros sexualmente no décimo dia e vivem por cerca de 60 dias. Uma fêmea pode efetuar a postura de cerca de 300 ovos que se aderem às partículas do substrato e eclodem após 15 dias (Gallo *et al.*, 1998).

A pele da larva, denominada exoesqueleto, é quitinosa e não acompanha o desenvolvimento da larva, sendo substituída por até quinze vezes antes que essa se torne uma pupa, em um processo chamado ecdise. A duração da fase larvar é de aproximadamente 90 dias e uma larva pode atingir 3 cm de comprimento e 1 g de peso. No final do seu desenvolvimento, sobem para a superfície do substrato e iniciam a fase de transformação, quando são chamadas de pupas ou crisálidas. As pupas não se alimentam e movimentam-se apenas por contorções dorso-ventrais

quando estimuladas pelo toque. Permanecem nesse estágio por 15 dias, quando viram besouros adultos (Gallo *et al.*, 2002).

1.6.2.1 - Controle de pragas de grãos armazenados

Em razão dos problemas causados pelos insetos nos armazéns, tem-se usado principalmente tratamento com inseticidas que protegem o produto contra as infestações por alguns meses (Puzzi, 1977). Malation e pirimifós-metil são os inseticidas de contato mais comumente usados em todo o mundo para o tratamento de grãos armazenados (Shawir *et al.*, 1988).

A busca de novos métodos de controle dos insetos de grãos armazenados tem se intensificado nos últimos anos, principalmente aqueles que oferecem segurança aos produtos tratados destinados à alimentação. Na verdade, esta busca tem sido motivada não só pela resistência desenvolvida pelas pragas a um limitado número de inseticidas internacionalmente aceitos para tratamentos de grãos e seus subprodutos, como também pela presença de resíduos de inseticidas em produtos tratados. O desenvolvimento de tal resistência seria facilitado pelo ambiente restrito em que estes insetos vivem (Parkin, 1965).

A constatação da resistência aos fosforados e às fosfinas alerta para a necessidade de um manejo adequado no controle de pragas de grãos armazenados, o que inclui a diversificação de inseticidas e a busca de métodos alternativos de controle (Pacheco, 1991).

Pós-inertes, como a terra de diatomácea (TD), são utilizados para o controle de pragas de grãos armazenados (Lorini *et al.*, 2001), sendo sua eficiência comprovada para o cascudinho, besouro *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), em testes de laboratório (Alves *et al.*, 2006).

A TD é proveniente de fósseis de algas diatomáceas, composta principalmente por dióxido de sílica amorfa. É um produto natural, inerte, não produzindo resíduos tóxicos. Seu modo de ação é baseado na adesão das partículas do pó ao corpo dos insetos e, conseqüentemente, na remoção da cera epicuticular, devido à abrasão. A morte ocorre, principalmente, por desidratação ou dessecação (Quarles, 1992; Korunic, 1998).

Os principais métodos físicos de controle são o uso de temperaturas altas e baixas, o que inclui o resfriamento de certos produtos como grãos, armazenamento hermético e irradiação por raios gama ou elétrons (Munro, 1966).

A temperatura é um fator limitante no desenvolvimento dos coleópteros pragas de grãos, assim como para qualquer outro inseto. Howe (1965) demonstrou que na temperatura inferiores a 17°C o desenvolvimento era insignificante na maioria das 3 espécies estudadas. Evans (1987), trabalhando com estágios imaturos de coleópteros pragas de grãos, verificou que quando expostos a uma temperatura de 9°C ou 13,5°C, havia uma baixa taxa de sobrevivência dos indivíduos. A grande maioria dos coleópteros que ataca os grãos armazenados e farinhas é de origem subtropical (Puzzi, 1977).

As tentativas iniciais de controle biológico das pragas de produtos armazenados foram feitas pelos chineses, que levavam ninhos de formigas do faraó, *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera: Formicida), aos depósitos de produtos agrícolas para que estas atacassem as larvas das pragas presentes nestes locais (Simmonds *et al.*, 1976).

Com relação aos predadores e parasitos, nenhuma estratégia de controle poderia eliminar a população praga em um armazém ou silo. Sob condições especiais, estes inimigos naturais podem chegar a causar uma eliminação de uma pequena população praga, mas isto normalmente não ocorre na prática por várias razões (Haines, 1984).

Poucas espécies de predadores e parasitos têm sido objeto de estudos ecológicos e comportamentais e, vários destes estudos fixam-se somente em um aspecto da biologia da espécie ou foram conduzidos em condições que não são relevantes na prática. Como exemplo de predadores temos o ácaro *Cheyletus eruditus* (Acarina, Cheyletidae) que ataca larvas jovens de coleópteros (Haines, 1984).

No caso de parasitos, pode-se citar *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae), que ataca vários coleópteros, parasitando seus estágios imaturos (Press *et al.*, 1975). Outro parasita que também ataca estágios imaturos é *Choetospila elegans* (Hymenoptera: Pteromalidae).

Vários protozoários são conhecidos por serem patogênicos a coleópteros. Entre os mais promissores para uso no controle microbiano pode-se citar *Nosema whitei* (Microsporea) para *T. castaneum* e *T. confusum* (Pacheco, 1991).

Com relação à utilização de fungos entomopatogênicos, poucas são as informações disponíveis. O uso destes patógenos como agentes microbianos de controle em grãos armazenados é altamente discutível, uma vez que a umidade relativa necessária para a sobrevivência do patógeno e conseqüente desenvolvimento da doença é extremamente alta, o que praticamente inviabiliza seu uso (Hluchy & Samsinakova, 1989).

Fungos entomopatogênicos como *Metarrhizium anisopliae* e *Spicaria farinosa* já foram observados parasitando larvas de *T. molitor* em estudos de laboratório (Zacharuck, 1981).

Os registros de viroses em coleópteros pragas de produtos armazenados são escassos. Um dos poucos existentes é o de Martignori e Iwai (1981) onde foi relatada uma virose causada por um iridovírus em *T. molitor*.

Apesar da grande diversidade de bactérias entomopatogênicas, os relatos da ocorrência de bacterioses em coleópteras pragas de produtos armazenados são raros. *Serratia marcescens* é uma das poucas espécies isoladas destes insetos (Bucher, 1963).

Em 1983, na Alemanha, Krieg e colaboradores isolaram de pupas de *T. molitor*, uma nova variedade de *Bacillus thuringiensis* denominada *tenebrionis*.

1.6.3 - *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)

As sementes são atacadas por uma ampla variedade de organismos desde microrganismos (fungos e bactérias) até invertebrados (insetos e nematóides) e vertebrados (pássaros e mamíferos). Dentre os vários inimigos das sementes, os insetos representam um amplo e variado grupo, em muitos casos sendo um fator de grande importância na produtividade de sementes e grãos de interesse econômico causando perdas consideráveis à produção de alimentos (Panizzi & Parra, 1991).

Os insetos podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com seus hábitos alimentares em relação às sementes: os mastigadores e os sugadores. Os mastigadores são representados, principalmente, pelas ordens Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Diptera (Janzen, 1971, 1977, 1978).

Os insetos sugadores de sementes são representados, principalmente pela ordem Hemiptera com diversas famílias, destacando a Pyrrhocoridae. A maioria dos hemípteros (percevejos) prefere se alimentar de sementes imaturas, que são mais macias e, portanto, mais fáceis de serem perfuradas. Entretanto, percevejos da família Pyrrhocoridae e Lygaeidae alimentam-se de sementes maduras (Janzen, 1978). Os Pyrrhocoridae incluem os *Dysdercus* sp., que são sugadores importantes de sementes de árvores das florestas decíduas na América Central (Janzen, 1971), além de importantes pragas nas lavouras comerciais de algodão (Freire & Santos, 1999).

Os percevejos sugadores de sementes sugam as porções líquidas (como proteínas solúveis) das mesmas. Durante esse processo eles injetam agentes histolíticos que liquefazem as porções sólidas e semi-sólidas das células o que permite a sua ingestão. O resultado é a inviabilidade da semente ou a redução de sua viabilidade com a produção de plântulas com vigor fraco (Panizzi & Parra, 1991). Na lavoura de algodão as perdas também se dão nas fibras desse vegetal, já que o inseto mancha as flores causando prejuízos econômicos (Freire & Santos, 1999).

O gênero *Dysdercus* possui uma ampla distribuição geográfica, existindo registros de sua ocorrência em diversas regiões das Américas (incluindo o Brasil), África, Índia e Austrália (Almeida, 1980; Almeida, 1983; Gonçalves, 2000).

O *D. peruvianus* é um inseto hemimetábolo e, assim como os demais representantes deste gênero, completam seu ciclo de vida em aproximadamente 45 dias. O período de incubação dos ovos é de seis dias, apresenta cinco estágios ninfais até atingir a fase adulta, quando apresenta asas e maturidade sexual (Figura 4). As ninfas eclodem dentro de um período de 6 a 10 dias após a postura dos ovos e em 45 dias, o ciclo de vida é completado (Gonçalves, 2000).

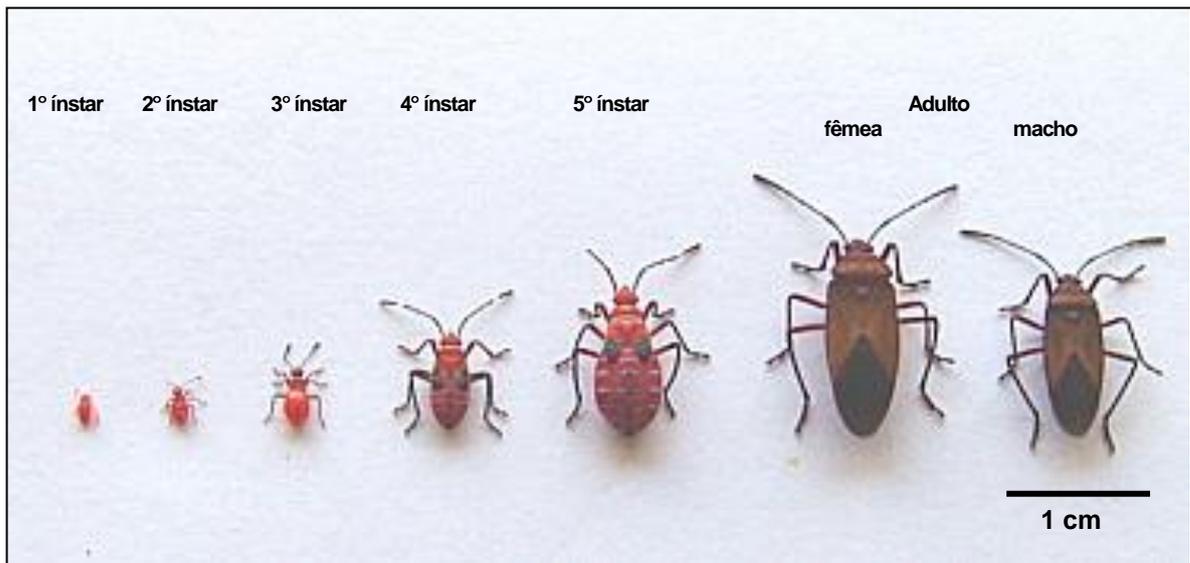


Figura 4: Estádios de vida do *Dysdercus peruvianus*. Consiste de cinco estágios de ninfa (ínstares) até chegar a forma adulta (Costa, 2006).

A espécie se reproduz durante todo o ano em plantas hospedeiras alternativas silvestres ou cultivadas (malváceas, solanáceas, etc.). As populações crescem e migram entre lavouras durante o verão e condições de alta umidade favorecem o desenvolvimento do inseto. Os prejuízos mais importantes são causados por ninfas e adultos através de dejeções que mancham as fibras de algodão, as quais tornaram-se amareladas, levando a perda de valor comercial. Além disso, a sucção do óleo das sementes afeta a qualidade das mesmas causando grandes perdas (Freire & Santos, 1999). Vários estudos já foram realizados sobre a ecologia e comportamento de diferentes espécies do gênero *Dysdercus* em diversas regiões do mundo, principalmente na África. Entretanto, existem poucos trabalhos no Brasil, onde ocorrem 14 espécies e 7 sub-espécies desse gênero de um total de 53 espécies americanas conhecidas (Gonçalves, 2000)

1.6.3.1 - Controle de percevejos sugadores de sementes

Os percevejos do algodoeiro passaram despercebidos por muito tempo, pois eram controlados simultaneamente com a aplicação de inseticidas para eliminar as principais lagartas dessa cultura (curuquerê-do-algodoeiro, bicho do algodoeiro, lagarta-da-maçã e lagarta rosada) (Gallo *et al.*, 1988)

Com a adoção de técnicas de manejo de pragas no algodoeiro, reduzindo-se a aplicação de agroquímicos, os percevejos manchador e rajado passaram a ocorrer com frequência, causando, algumas vezes, prejuízos consideráveis, especialmente pelo desconhecimento de sua bioecologia (Panizzi & Parra, 1991).

Os insetos sugadores de sementes são atacados por uma grande variedade de inimigos naturais, incluindo artrópodos parasitóides e predadores, répteis, anfíbios, pássaros, mamíferos e fungos (Slansky & Panizzi, 1987).

Entre os artrópodes que atacam os hemípteros sugadores de sementes, os parasitóides de ovos se constituem num dos principais grupos. Por exemplo, os pentatomídeos fitófagos associados às culturas de soja, são atacados, pelo menos, por 12 espécies de microhimenópteros, só na América do Sul. Destes, *Trissolcus basalís* e *Telenomus mormideae*, são as espécies principais. Dentre os parasitas de adultos, as moscas da família Tachinidae se destacam pela sua abundância e diversidade, como por exemplo, *Trichopoda pennipes*, na América do Norte. Na América do Sul, a espécie *Eutrichopodopsis nitens*, é o parasita de adulto mais importante do percevejo *Nezara viridula* (Panizzi & Slansky, 1985). As formigas canívoras parecem ser os predadores predominantes do percevejo *N. viridula* (Stam *et al.*, 1987).

O impacto dos inimigos naturais em populações dos percevejos sugadores de sementes não tem sido quantificado claramente. Entretanto, sua remoção de campos de soja, através do uso de inseticidas, causa uma forte ressurgência das pragas, sugerindo que os inimigos naturais são fundamentais na regulação das populações dos insetos sugadores neste agrossistema (Panizzi & Parra, 1991).

Os percevejos do gênero *Dysdercus* são sensíveis ao ataque de fungos entomopatogênicos *Nematospora coryli* e *N. gossypii* (Frazer, 1944), e outros do gênero *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Nigrospora* (Martin *et al.*, 1987).

1.7 - Associação entre microrganismos e insetos

Com o avanço dos conhecimentos científicos e a melhoria das técnicas microscópicas, tem-se constatado que os insetos são seres altamente infestados por microrganismos. Este fato apresenta uma grande importância e torna ainda mais complexo o trabalho dos patologistas de insetos que se dedicam ao estudo da determinação dos agentes de doenças (Alves *et al.*, 1998). A associação entre

microrganismos e insetos pode ser de natureza patogênica, comensal, simbiótica, inquilinismo ou mutualística (Dillon & Dillon, 2004).

Os microrganismos simbiontes do trato digestivo podem contribuir na produção de feromônios, aquisição de material genético, defesa e nutrição. O processo de nutrição está relacionado, neste caso, a uma maior eficiência da digestão, aproveitando os alimentos inadequados, isto é, realizando parte da digestão e a aquisição de enzimas digestivas e vitaminas para os insetos (Dillon & Dillon, 2004).

Os microrganismos podem estar presentes interna ou externamente ao corpo do inseto, mantendo ou não relações complexas com o mesmo. A maioria das relações ecológicas entre microrganismos e insetos são construtivas, resultando em benefícios aos insetos, aos microrganismos ou a ambos (Alves *et al.*, 1998). Dividem-se tais relações nas seguintes formas:

Microrganismos servindo de alimento para insetos

Relata-se, como exemplo, o fato de que larvas de pernilongo necessitam de microrganismos vivos ou mortos, os quais fornecem a elas grande parte das vitaminas e proteínas indispensáveis ao seu crescimento. Além disso, o metabolismo microbiano concorre para a diminuição da concentração de oxigênio nas poças d'água e, em conseqüência, favorece a eclosão dessas larvas (Alves *et al.*, 1998).

Microrganismos atuando sobre substratos que servirão de alimentos para insetos

Muitos microrganismos saprofíticos atuam sobre a matéria orgânica, liberando substâncias aproveitáveis pelos insetos, representadas por polipeptídeos, ácidos graxos e outros produtos voláteis, e também de forma secundária, produzindo odores dos produtos em decomposição, os quais atraem os insetos. Frutas como jaca e manga em decomposição atraem uma grande variedade de insetos (Alves *et al.*, 1998).

Microrganismos cultivados para alimentação de insetos

Os fungos são os principais microrganismos cultivados por insetos de diferentes classes. Formigas da subfamília Myrmicinae cultivam fungos para a sua sobrevivência. Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, de ocorrência comum no Brasil, são

excelentes cultivadores de fungos e desenvolveram uma técnica sofisticada de preparação do substrato e colheita do material fúngico (Alves *et al.*, 1998).

Alguns cupins cultivam fungos para sua alimentação dentro do termiteiro. Esses microrganismos são cultivados pelos térmitas que vivem na madeira em decomposição, serrapilheira e húmus. Tais cupins superiores (Termitidae) normalmente não estão associados a protozoários simbiotes e, assim, necessitam de celulasas produzidas pelos fungos para realizar a digestão dos alimentos (Alves *et al.*, 1998).

As vespas da família Siricidae são pragas que atacam árvores decadentes ou derrubadas. Entre os insetos e o fungo fitopatogênico *Amylostereum areolarum* há uma verdadeira relação simbiótica, pois é clara a interdependência entre ambos. A fêmea da vespa carrega o fungo em uma bolsa intersegmentar na base do ovopositor, formada pela invaginação do tegumento, sendo conectada à extremidade do ovopositor por meio de ductos. Na ovoposição, os esporos (artrósporos) são injetados na seiva da árvore e envolvidos por um muco polissacarídico, a aproximadamente 1 cm de profundidade no tronco. Quando germinam, formam um micélio que invade a madeira, próximo ao orifício feito pela fêmea ou junto às galerias construídas pelas larvas (Alves *et al.*, 1998).

Como o crescimento inicial do fungo diminui os vasos, a formação de resina é prejudicada tornando a região mais seca. Isso favorece a eclosão e o desenvolvimento das larvas (Alves *et al.*, 1998).

Microrganismos presentes no interior do corpo dos insetos

Os microrganismos são mais numerosos no interior dos insetos. É dentro deles que encontram abrigo e alimentos mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Os microrganismos podem estar localizados nos aparelhos reprodutores, olhos, espiráculos, traquéias, cecos gástricos, hemocele, no interior de células, etc. (Alves *et al.*, 1998).

As bactérias e leveduras podem ser encontradas ao longo do trato digestivo dos insetos. *Streptococcus faecalis* pode estar presente no tubo digestivo de lagartas de *Galleria* e *Agrotis*. Ao mesmo tempo que esses microrganismos se restringem a flora do intestino e conferem defesa natural ao inseto, eles podem se tornar patógenos a esses artrópodes, auxiliados pelos estresses ligados à falta

d'água, temperatura, umidade e danos mecânicos, comum em condições de laboratório (Alves *et al.*, 1998).

Estruturas como cecos gástricos, epitélio do mesêntero e paredes quitinosas do intestino posterior são locais onde pode ser encontrada uma série de bactérias Gram-negativas, bacilos, espirilos, etc., que são saprófitas ou anaeróbias e de difícil crescimento em meios de cultura. Elas mantêm uma relação mutualística com os seus hospedeiros, fornecendo-lhes nutrientes, ajudando a digestão, produzindo enzimas, vitaminas, feromônios (bactérias do trato digestivo de *Locusta migratória* produzem o feromônio de agregação Locustol), fixando nitrogênio (*Citrobacter* fixa o nitrogênio no intestino de *Coptotermes*) e prevenindo contaminações do intestino médio. Os insetos, por sua vez, lhes asseguram abrigo e disseminação através de ovos (interna e externamente) ou pelos seus hábitos (Alves *et al.*, 1998).

Uma considerável população de microrganismos tem sido descrita no lúmen do intestino médio de alguns grupos de insetos. Os cupins *Cubitermes* possuem actinomicetos no espaço ectoperitrófico (Bignell *et al.*, 1980). Os percevejos da subfamília Triatominae têm uma diversidade de bactérias Gram-positivas encontradas, em sua maioria, no segmento proximal do intestino (Cavanagh & Marsden, 1969; Nyirady, 1973). O pirrocorídeo *Pyrrhocoris apterus* possui uma bactéria *Bifidobacterium* Gram-positiva anaeróbia obrigatória no terceiro ou quarto segmento intestinal (Haas & König, 1987).

Microrganismos também foram encontrados nos cecos gástricos de larvas de 4 famílias de Coleoptera: anobiídeos, cerambicídeos, curculionídeos e crisomelídeos. Quando o intestino larval é destruído pela metamorfose, os simbiontes são liberados. No entanto, muitos microrganismos sobrevivem nos insetos fêmeas e são incorporados em estruturas da região final do ovopositor em anobiídeos e crisomelídeos. As associações são ausentes em adultos machos (Douglas & Beard, 1996).

Em particular, a bactéria associada à mosca de oliveira *Dacus oleae* foi reportada como sendo *Pseudomonas savastanoi*, o agente da infecção da oliveira; mas a bactéria isolada, por Luthy *et al.* (1983), de bulbos cefálicos de *D. oleae* não pertence a esta espécie. Num estudo extensivo sobre a microbiota existente em sete espécies de *Rhagoletis* foram isoladas 12 espécies de bactérias dos bulbos cefálicos dos adultos, incluindo *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*

e *E. cloacae*, (Howard, 1989). No entanto, apenas *K. oxytoca* foi isolada do intestino das larvas, resultado que sugere que a associação é mais específica em larvas do que em adultos (Howard & Bush, 1989). Na mosca *Dacus oleae*, a bactéria mutualística pode ser encontrada no trato anal da fêmea adulta. Quando esta faz a postura, a bactéria sai e entra pela micrópila do ovo, contaminando a larva e persistindo em um bulbo na pupa. No inseto adulto, ela vai para o trato anal e é disseminada novamente (Alves *et al.*, 1998).

Os fungos também podem ser encontrados dentro de insetos. São poucos os grupos, se comparados aos que ocorrem sobre os insetos e aqueles que são patogênicos. As leveduras são importantes na produção de aminoácidos para *Chrysopa*, cujos adultos se alimentam de secreções açucaradas de plantas. Os Actinomicetos são encontrados nos espaços existentes entre as células da parte anterior do tubo digestivo de alguns percevejos (Alves *et al.*, 1998).

Diferentes classes de protozoários estão presentes nos insetos, sendo freqüentes na parte posterior (protodéu) do tubo digestivo. São conhecidos pela associação mutualística com os cupins que atacam a madeira, além de serem agentes entomopatogênicos (microsporídeos). Centenas de espécies de protozoários estão associadas a quase todas as famílias de cupins, sendo freqüentes em Rimotermitidae e Kalotermitidae. Nestes cupins eles produzem enzimas para a digestão da celulose e podem manter uma relação mutualística complexa com bactérias, as quais podem se localizar fora (epibióticas) ou dentro (endobióticas) dos protozoários. Essas bactérias atuam na manutenção de condições favoráveis a esses protozoários. De modo geral, espiroquetas e protozoários atuam na manutenção de condições anaeróbicas e na regulação da flora bacteriana do tubo digestivo dos cupins (Alves *et al.*, 1998).

Os vírus também podem ser encontrados no interior dos insetos. Os patogênicos estão presentes nas suas diferentes fases de desenvolvimento, podendo-se encontrar também os bacteriófagos patógenos de plantas e de animais. Os vírus do tipo propagativo podem promover danos nos insetos vetores (Alves *et al.*, 1998).

Os nematóides *Deladenus siricidicola* só conseguem sobreviver dentro da vespa da madeira *Sirex noctilio* ou em árvores infectadas pelo fungo *Amylostereum*

areolatum. Este nematóide também infecta as larvas e, persistindo na pupa, atinge os ovários dos adultos, causando a sua esterilidade (Alves *et al.*, 1998).

Há que se considerar também que a simbiose entre microrganismos e insetos pode ser extra e intracelular. Na simbiose extracelular os microrganismos vivem no aparelho digestivo, principalmente cecos gástricos e nos divertículos. Os protozoários existentes no tubo digestivo dos cupins e das baratas e as bactérias do tubo digestivo das moscas-das-frutas são importantes para os seus respectivos hospedeiros. Simbiontes intracelulares localizam-se em uma grande variedade de células dos insetos. Dá-se o nome de micetoma a uma estrutura multicelular capaz de abrigar esses microrganismos. As baratas e os afídeos possuem simbiontes intracelulares, sendo que nos primeiros, os microrganismos ocorrem principalmente nos tecidos gordurosos. De um modo geral, os insetos regulam os simbiontes através dos fagócitos, lisoenzimas, hormônios e antiproteínas, sendo que esses simbiontes são muito difíceis de serem isolados em meio de cultura (Alves *et al.*, 1998).

Os microrganismos em Coleoptera podem também estar alojados em células especializadas do epitélio intestinal, denominadas micetócitos. A distribuição dos micetócitos varia entre as espécies, podendo estar igualmente distribuídos ao longo do intestino ou concentrados em determinadas regiões (Douglas & Beard, 1996). No anobiídeo *Stegobium paniceum* os micetócitos são encontrados entre 79 a 90% do total de células do epitélio intestinal (Kiefer, 1932) Porém, em alguns outros anobiídeos, os micetócitos são restritos à porção final dos cecos gástricos, ligados ao lúmen intestinal por um estreito canal envolto por células epiteliais (Koch, 1960).

Os micetócitos das larvas de *S. paniceum* abrigam leveduras do gênero *Torulopsis* (Bismanis, 1976). Jurzitza (1979) realizou um estudo ultra-estrutural sobre as associações simbióticas em larvas do anobiídeo *Lasioderma serricorne*, incluindo a descrição de diferenças espaciais nas associações com cada micetócito.

Em larvas de tefritídeos, foram isoladas bactérias dos cecos gástricos não associadas a micetócitos. Esta associação é perdida com a metamorfose e os insetos adultos possuem estas bactérias nas invaginações do intestino posterior, conhecidas como bulbo cefálico (Douglas & Beard, 1996).

II – OBJETIVOS

2.1 - Objetivos gerais

Nesta dissertação pretendemos comparar o que foi descoberto em larvas de *Manduca sexta* (Carlos *et al.*, 2002) com insetos pragas encontrados no Brasil, como *Dysdercus peruvianus* (praga de algodão), *Diatraea saccharalis* (praga de cana-de-açúcar), *Tenebrio molitor* (praga de grãos armazenados). Queremos saber se o padrão inicial de colonização por *Photorhabdus temperata* K122 é diferente quando insetos de diferentes ordens são infectados. Um dos primeiros aspectos que daremos atenção é para o fato de que a região proximal do intestino médio em lepidópteros, como *Manduca sexta*, é uma região absorptiva de nutrientes do intestino para a hemolinfa. Uma das nossas hipóteses de trabalho é que a bactéria reconhece sítios absorptivos no trato intestinal para iniciar a colonização. Sendo assim, testaremos essa hipótese usando insetos de diferentes ordens, que possuem sítios de absorção em diferentes regiões do intestino médio. Também poderemos avaliar a capacidade da bactéria em matar insetos com fisiologias bem diferentes.

Uma vez que as bactérias entomopatogênicas precisam eliminar todo competidor em potencial no cadáver do inseto, estamos interessados na resposta da flora microbiana no trato intestinal à infecção com *Photorhabdus*. Nossa intenção é avaliar o efeito da infecção com a *P. temperata* K122 sobre a flora microbiana da *D. saccharalis*, do *D. peruvianus* e do *T. molitor*.

2.2 - Objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade da bactéria entomopatogênica *Photorhabdus temperata* K122 em matar insetos modelo das ordens Coleoptera (*Tenebrio molitor*), Hemiptera (*Dysdercus peruvianus*) e Lepidoptera (*Diatraea saccharalis*).
- Avaliar o efeito da infecção por *P. temperata* sobre as atividades das sacarose hidrolases, α -glicosidases, α -galactosidases, α -amilases e proteases de larvas de *D. saccharalis* e *T. molitor* quando estão infectadas com *P. temperata* K122.
- Avaliar o efeito da infecção por *P. temperata* K122 sobre a atividade de aminopeptidases, α -galactosidases e α -glicosidases de *D. peruvianus*.
- Descrever a biologia da infecção da bactéria *P. temperata* K122 em insetos modelo das ordens Coleoptera, Hemiptera e Lepidoptera, inclusive verificando a correlação

entre a localização de sítios de absorção de nutrientes no intestino médio dos insetos modelos e o início da colonização pela bactéria *P. temperata* K122.

- Descrever a flora microbiana cultivável do conteúdo luminal da *D. saccharalis*, *D. peruvianus* e *T. molitor*.
- Avaliar a resposta da flora microbiana residente no trato intestinal da *D. saccharalis*, *D. peruvianus* e *T. molitor* à infecção com *P. temperata* K122.
- Testar de virulência da *Photorhabdus* contra as bactérias isoladas do conteúdo luminal dos insetos.
- Testar de efeito antimicrobiano da hemolinfa, do epitélio intestinal e do conteúdo luminal dos insetos infectados contra as bactérias residentes no lúmen dos insetos.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Obtenção dos insetos

- Larvas de *Diatraea saccharalis*

As larvas de *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) são cedidas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Leonel Miranda), onde são criadas em dieta artificial, segundo Hensley & Hammond (1968) (composição descrita no Anexo I). A temperatura de crescimento foi de 28°C e 60% de umidade relativa, com fotoperíodo natural.

- Larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) são mantidas no nosso laboratório há pelo menos 7 anos. Os animais são criados em viveiros de plástico transparente cobertos com retalhos de tela presos por elásticos, sob condições de fotoperíodo natural, umidade relativa de 60-70% e temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os insetos são alimentados com farinha de germe de trigo, obtida no comércio local.

- Adultos de *Dysdercus peruvianus*

Uma colônia do sugador de sementes de algodão *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) é mantida no nosso laboratório desde 1995. Os animais são criados em viveiros de vidro transparente cobertos com retalhos de pano de algodão presos por elásticos, sob condições de fotoperíodo natural, umidade relativa de 60-70% e temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os insetos da colônia tiveram amplo acesso a água e a sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*).

3.2 - Determinação da curva de crescimento da *Photorhabdus temperata* K122

A bactéria utilizada neste estudo foi *P. temperata* K122, fornecida pelo Prof. Richard French-Constant (Universidade de Bath, UK).

Com a finalidade de determinar-se o melhor tempo para obtenção máxima de células de *P. temperata* K122 em fase logaritma em meio caldo Luria Bertani (LB – Anexo II) foi determinada a curva de crescimento num gráfico (absorbância X tempo).

Colônias de culturas puras desta bactéria, crescidas em agar Mackonkey, 36°C a 28°C, foram submetidas ao método de suspensão direta da colônia em 2 mL de caldo LB, sob agitação a 150 rpm a 28°C.

O crescimento foi monitorado lendo-se a absorbância da cultura a 600 nm em intervalos de 6 h. As leituras foram anotadas em um gráfico (absorbância X tempo).

As culturas de *P. temperata* são fáceis de identificar pois esta bactéria produz um pigmento que confere a sua colônia e aos meios, seja líquido ou solidificado, a coloração vermelha. Além disso, estas bactérias emitem luz bioluminescente.

3.3 - Preparo do inóculo

A cultura *Photorhabdus temperata* K122 utilizada para os ensaios de infecção era mantida em 2 mL de caldo Luria Bertani (LB) e em agitador giratório horizontal (150 rpm) por 24 horas a 28°C.

Decorridas as 24 horas de crescimento em caldo LB, as culturas de *Photorhabdus temperata* K122 eram utilizadas para preparo de culturas em placas ou para ensaios de infecção dos insetos.

Para o preparo de cultura em placa, uma gota da suspensão bacteriana foi coletada com alça de nichrome, sob condições estéreis, e inoculada pela técnica do esgotamento do inóculo em agar Mackonkey. As placas eram submetidas a 28°C por 36 horas. Assim as colônias estariam novamente em condições apropriadas para preparo de novas culturas em meio caldo LB.

Para a inoculação dos insetos, a cultura da *P. temperata* crescida em caldo LB, com 24h de crescimento, foi lavada três vezes em tampão PBS (fosfato de sódio 100 mM, contendo NaCl 250 mM, pH 7,0), depois de centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos, a temperatura ambiente e depois ressuspendida no mesmo tampão. O número de bactérias foi determinado em hemocitômetro de Neubauer e a densidade bacteriana era ajustada utilizando-se tampão PBS.

3.4 - Desinfecção dos insetos

Os insetos foram lavados em solução salina 215 mM estéril e em seguida, esterilizados externamente com o uso de solução de etanol 70 % por 5 segundos. As dissecações foram realizadas em ambiente estéril, como no interior de um fluxo laminar ou sob chama de bico de Bunsen. Este procedimento foi adotado para as

etapas de infecção dos animais, contagem de *P. temperata* nos diferentes compartimentos do inseto, isolamento e contagem de microrganismos no conteúdo luminal e remoção de intestino para microscopia.

3.5 - A infecção dos animais

Somente os insetos que se alimentavam ativamente foram selecionados para a inoculação das bactérias.

A infecção dos insetos, previamente desinfectados, com as suspensões de *P. temperata* foi feita através da injeção na hemocele dos animais imobilizados em gelo usando uma seringa tipo Hamilton. Para a realização dos experimentos a suspensão bacteriana previamente lavada e na concentração desejada foi injetada dorsalmente entre o terceiro e o quarto segmento abdominal dos insetos, com 10 μ L da suspensão do respectivo microrganismo. Os insetos controle para os ensaios de infecção foram inoculados com 10 μ L de tampão PBS ou com 10 μ L de suspensão de *Escherichia coli* previamente lavada e em concentrações idênticas às usadas para *P. temperata*.

A concentração de bactérias injetadas foi confirmada pelo plaqueamento de volume conhecido da suspensão injetada em agar para contagem de microrganismos por 36 horas, 28°C.

Outra forma de inoculação utilizada foi via oral usando uma seringa tipo Hamilton. O volume correspondente a 10 μ L da suspensão bacteriana era injetado diretamente pela boca das larvas de *D. saccharalis* e *T. molitor*. Este procedimento foi monitorado através de uma lupa, para garantir que as larvas não regurgitavam o conteúdo inoculado.

Depois da inoculação, os insetos foram mantidos em dieta artificial, e os sintomas e patogenicidade foram observados durante este período.

3.6 - Gráficos de dose-resposta e taxa de mortalidade

Gráficos de dose-resposta foram determinados para *D. saccharalis*, *T. molitor* e *D. peruvianus*. Os insetos foram previamente desinfectados com álcool 70%. Logo após, foram inoculados com *P. temperata* e *E. coli*, e mantidos sob observação para avaliação de mudança de comportamento, coloração e para contagem da mortalidade.

Para a determinação dos gráficos de dose-resposta foram preparados 5 lotes contendo 10 insetos em cada um. Os insetos previamente desinfectados foram infectados com concentrações diferentes de bactérias por cada 10 μL , as quais foram equivalentes a 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 (células/10 μL). Os insetos foram contados após 48 horas da inoculação.

Para determinação da taxa de mortalidade, quando era utilizada uma concentração de 50 células/10 μL , os insetos previamente desinfectados foram inoculados com esta concentração bacteriana (*P. temperata*) e num intervalo de 6 em 6 horas eram contados. Para este experimento foram preparados 5 lotes contendo 10 insetos.

Os insetos mortos por ação de bactérias do gênero *Photorhabdus* apresentam coloração vermelha e bioluminescência quando visualizados em câmara escura. Além destas características, o conteúdo interno dos insetos era removido e plaqueado em agar Mackonkey (Anexo II) para a visualização das colônias vermelhas típicas de *P. temperata* K122.

3.7 - Colonização dos diferentes tecidos dos insetos pela *P. temperata* K122

Para a contagem do número de bactérias nos diferentes compartimentos dos insetos controle e infectados, procedeu-se da seguinte forma: os insetos foram desinfectados externamente em álcool 70% e as dissecações se procederam em ambiente estéril. A coleta da hemolinfa foi realizada cortando-se as patas anteriores deste inseto e efetuando uma leve pressão sobre o abdome do inseto; a hemolinfa foi coletada a partir de um microcapilar estéril. Para a separação dos demais compartimentos utilizados nos experimentos, os insetos foram dissecados. Após remoção do trato digestivo e separação do intestino-médio, o epitélio foi separado e lavado em salina NaCl 215 mM estéril, enquanto que o conteúdo luminal, disperso em PBS, foi coletado com auxílio de um capilar e disperso em volume conhecido. O intestino e a carcaça (corpo gorduroso e a cutícula) foram homogeneizados em solução tampão PBS em microtubos com auxílio de um pistilo. Os volumes das amostras referentes aos compartimentos foram ajustados para 200 μL .

3.8 - Contagem da *Photorhabdus temperata* K122 nos diferentes compartimentos dos insetos

A contagem de microrganismos por compartimento intestinal foi feita através da técnica “Pour Plate”. Diluições sucessivas em solução tampão PBS estéril foram feitas das amostras de cada compartimento. Um volume de 10 μ L foi transferido para o meio de cultivo agar para contagem de microrganismos e para agar Mackonkey, e o espalhamento da amostra foi realizado com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28°C, por 36 horas e as unidades formadoras de colônias contadas em contador de colônias digital. O agar Mackonkey, por ser um meio seletivo tornava mais fácil a visualização das colônias da *P. temperata* por impedir o crescimento de bactérias Gram-positivas.

3.9 - Preparo das amostras para os ensaios de atividade enzimática

Larvas de 4^o instar de *D. saccharalis* e *T. molitor* foram imobilizadas em gelo, dissecadas e seus intestinos foram removidos para solução salina fria, 215 mM. Os intestinos foram então lavados e os túbulos de Malpighi removidos. As amostras de epitélios intestinais foram congeladas por 24 horas a – 20°C. Após descongelado, o material foi homogeneizado em solução salina fria, homogeneizado e centrifugados a 15.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o volume final ajustado para 1 mL.

Insetos adultos de *D. peruvianus* foram imobilizados em gelo, dissecados e o intestino dividido em V1, V2 e V3 juntamente com V4. As diferentes partes do epitélio intestinal do *D. peruvianus* foram removidas para solução salina fria. Os diferentes compartimentos foram homogeneizados separadamente em salina. O material foi submetido a centrifugação a 15.000 x g por 30 minutos a 4^o C. Cada um dos sobrenadantes foi coletado (V1 solúvel, V2 solúvel e V3 / V4 solúvel), os sedimentos correspondentes a cada fração intestinal foram homogeneizados em solução salina 215 mM (V1 sedimento, V2 sedimento e V3 / V4 sedimento). O volume foi ajustado para 1 mL.

3.10 - Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas totais das amostras são feitas de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina de ovo como padrão.

3.11 - Ensaio de atividade por eletroforese em gel de poliacrilamida

Um dos parâmetros que foram acompanhados durante o processo de infecção foi a atividade de enzimas digestivas que serviram de marcadores para as condições de funcionamento do aparelho digestivo.

Para a determinação da atividade enzimática em gel de poliacrilamida, as eletroforeses foram realizadas em SDS-PAGE. As amostras contendo concentrações apropriadas de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol 10% (m/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v), SDS 10 %) para eletroforese livre de β -mercaptoetanol e, sem fervura. A eletroforese foi efetuada usando-se um sistema de mini-géis BioRad MiniProtean II a uma voltagem constante de 150 V (Laemmli, 1970). As corridas foram realizadas a 4°C usando tampão de corrida (1,5 M de Tris pH 8,8, 0,4% de SDS) previamente resfriado. Após eletroforese, os géis foram lavados duas vezes com Triton X-100 2,5 % (m/v) por 15 minutos, a temperatura ambiente para renaturação.

As sacarose hidrolases foram localizadas no gel, ensaiando as atividades os substratos sacarose (Glc α 1 \rightarrow β 2 Fru) e rafinose (Gal α 1 \rightarrow 6 Glc α 1 \rightarrow β 2 Fru), na concentração de 0,5 M em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, por 15 min a 30 °C. Após a incubação, os géis foram transferidos para solução de NaOH 0,5 M contendo 0,05 % (m/v) de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC), e revelados por aquecimento a 100 °C, por cerca de 3 min (Gabriel, 1971).

Paras os ensaios de α -glicosidase e α -galactosidase, os substratos fluorogênicos 4-metilumbeliferil- α -D-glucosídeo (MU α Glu) e 4 metil-umbeliferil- α -galactosídeo (MU α Gal), 2 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,0 foram testados, incubando os géis renaturados por 15 minutos a 30 °C. Bandas fluorescentes foram visualizadas usando luz UV.

As α -amilases das preparações dos intestinos dos insetos *D. saccharalis* e *T. molitor* foram detectadas por eletroforese em gel SDS-PAGE como descrito por Campos *et al.* (1989). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de

poliacrilamida a 12% em condições semi-desnaturantes, sem serem fervidas. Após o término da corrida os géis foram transferidos para solução substrato/tampão [1% (m/v) amido da batata gelatinizada em tampão acetato 100 mM pH 6,0, NaCl 0,2mM, CaCl₂ 100 mM] e incubadas a 30 °C por 30 minutos. Após a lavagem do gel em água, a atividade amilolítica foi interrompida transferindo o gel para uma solução corante [1,3% (m/v) I₂, 3% (m/v) KI]. Após a coloração, as regiões claras que aparecem quando o gel é colocado de encontro ao fundo escuro indicam a presença de α -amilase ativa.

As atividades de proteases foram detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, copomerizado com gelatina bovina 0,1%, de acordo com o método de Laemmli (1970) sob condições semi-desnaturantes (SDS-PAGE). Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes com solução de Triton X-100 2,5% por 30 minutos, para remoção do SDS e incubado em 100 mL de tampão de atividade proteolítica (glicina/NaOH 100 mM pH 8,6) durante 16 horas sob temperatura de 37°C. Após este período o gel foi corado com azul de coomassie R 250 0,1% em solução de metanol/ácido acético/água destilada (4:1:5) por mais 1 hora. Os géis corados foram armazenados em solução de ácido acético 2%. As áreas de proteólise aparecem no gel como zonas claras em contraste com o plano de fundo azulado.

3.12 - Condições dos ensaios enzimáticos

Em cada determinação de atividade enzimática, a mistura dos reagentes foi incubada a 30 °C por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (branco de substrato) ou sem substrato (branco de enzima) foram feitos e tratados do mesmo modo que os experimentais. A atividade calculada foi expressa, na maioria das vezes, em nmols de ligações clivadas por minuto (mili Unidades, mU).

A atividade das sacarose hidrolases foi determinada pela medida da produção da glicose pelo método da Tris-glicose oxidase (Dahlqvist, 1968) para sacarose na concentração 100 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 para as enzimas extraídas de epitélio intestinal.

A atividade sobre os substratos rafinose e amido, foram determinadas usando-se o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), preparado de acordo com Noelting & Bernfeld (1948). Um aumento no poder redutor, medido pelo reagente

DNS, permitiu acompanhar a clivagem do açúcar. No caso da β -frutosidase da *D. saccharalis*, 50 μ L da enzima foram incubados com 50 μ L de solução substrato/tampão pH 7,0 (100 mM de rafinose em tampão fosfato de sódio 100 mM) e para α -amilase, 50 μ L da enzima foram incubados com 50 μ L de solução substrato/tampão pH 6,0 (0,5% de amido em citrato/fosfato 50mM). As enzimas foram extraídas de epitélio intestinal. O ensaio foi interrompido com a adição de 400 μ L de DNS. A solução foi aquecida em água em ebulição por 5 min, resfriada e, depois da adição de 400 μ L de água destilada, a absorbância foi determinada a 550 nm.

As atividades de α -glucosidase e de α -galactosidase foram determinadas pela medida de produção de p-nitrofenolato (Terra *et al.*, 1979). Os substratos utilizados foram o p-nitrofenil- α -D-glucosídeo (NP α Glu) e o p-nitrofenil- α -D-galactosídeo (NP α Gal), que ao serem hidrolisados pela α -glucosidase e pela α -galactosidase, respectivamente, liberam p-nitrofenol. Em meio alcalino, o p-nitrofenol sofre desprotonação, e sob a forma de p-nitrofenolato possui coloração amarela. A condição de ensaio está de acordo com Terra *et al.* (1979), onde o NP α Glu foi utilizado na concentração final de 5 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0. A absorbância foi determinada a 420 nm. Em cada determinação, a mistura dos reagentes foi incubada a 30°C por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo e as velocidades iniciais calculadas. Controles sem enzima ou sem substrato foram preparados do mesmo modo que os experimentais.

Os ensaios rotineiros de atividade de aminopeptidase foram realizados nas condições segundo Erlanger *et al.* (1961). Nestes ensaios foi utilizado o substrato cromogênico LpNA (L-leucina p-nitroanilida) na concentração final de 1 mM em tampão Tris-HCl 100mM, pH 8,0 (o substrato foi previamente dissolvido em DMSO e adicionado ao tampão). As reações contendo 100 μ L de amostra mais 300 μ L de substrato foram incubadas em banho-maria a 30°C por quatro diferentes períodos de tempo (30, 60, 90 e 120 minutos) e interrompidas com 200 μ L de ácido acético 30%. A hidrólise do LpNA foi determinada pela liberação do grupo p-nitroalanina. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 410nm. As atividades calculadas foram expressas em mili Unidades, μ m (nmoles de ligações clivadas por minutos).

3.13 - Técnicas de microscopia usadas para descrever a infecção dos insetos com *Photorhabdus temperata* K122

Para o estudo da biologia da infecção de *Photorhabdus* ao longo do intestino médio dos insetos utilizados como modelo, os insetos foram dissecados, seus intestinos removidos e separados em segmentos. Os intestinos nas larvas de *D. saccharalis* e *T. molitor* foram divididos em três segmentos (anterior, médio e posterior), já o *D. peruvianus* tem seu intestino dividido em V1, V2 e V3 juntamente com V4 (Figura 5).

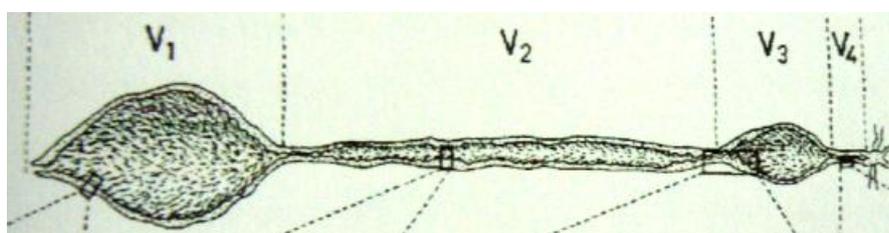


Figura 5: Representação esquemática do intestino médio de *Dysdercus peruvianus* mostrando as principais divisões ventriculares. V1, V2, V3 e V4, são o primeiro, segundo, terceiro e quarto segmentos ventriculares (Silva *et al.*, 1995).

Para observação ao microscópio eletrônico de varredura e transmissão, os tecidos foram fixados por 2 h a 4°C em tampão Karnovsky (4% de glutaraldeído, 4% de formaldeído, em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,0). Após duas lavagens de 30 minutos em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, as porções do tubo digestivo foram pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1 % no mesmo tampão (se for utilizada para observação em varredura) e em ferricianeto de potássio na proporção 1:1 (para a observação em transmissão). Posteriormente, as preparações foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4 por duas vezes no intervalo de 30 min .

As amostras para uso em microscopia de transmissão foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona 30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100% super seca, a temperatura ambiente com a incubação a cada etapa de 30 minutos.

As amostras são embebidas em resina de Epon, por infiltração em solução Epon/acetona nas proporções 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, e Epon puro em intervalos de 6 horas. Mais uma troca de Epon puro foi feita para a inclusão final do material em estufa a 60°C por 48 horas. Cortes semi-finos de 0,6 micrômetros foram colocados em lâminas, deixados secar e corados com azul de toluidina 0,1% por 5 minutos, montados entre lâmina e lamínula com Entellan (Merck) e observados em

microscópio de luz convencional. Os cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo, coletados em telas de cobre de 400 mesh, contrastados e examinados em um microscópio eletrônico de transmissão, marca Zeiss.

Para microscopia de varredura, a desidratação foi feita com concentrações crescentes de etanol nos mesmos intervalos de tempo utilizados para transmissão, e em seguida, as amostras foram levadas para aparelho de ponto crítico, montadas com fita de carbono em "stubs", metalizadas com ouro em evaporador Balzers por 120 segundos e observadas em microscópio eletrônico de varredura, marca Zeiss.

3.14 - Isolamento dos microrganismos do conteúdo luminal dos insetos

Os insetos foram desinfectados e, em seguida, lavados em solução salina NaCl 215 mM e dissecados longitudinalmente com tesouras estéreis, para a exposição do intestino. Após remoção do trato digestivo e separação do intestino-médio, o conteúdo luminal foi coletado com auxílio de uma pipeta, transferido para microtubos, seu volume completado para 200 μ L com solução salina 215 mM e em seguida homogeneizado. Todos os ensaios realizados com microrganismos foram conduzidos sob condição estéril.

Para o cultivo, 50 μ L da suspensão do conteúdo luminal são inseridos em meio de cultura BHI (caldo infusão de cérebro de coração – Anexo II) e incubados a 28°C em condições aeróbicas e anaeróbicas.

Após crescimento por 24 h, a 28°C, são feitas inoculações pela técnica do esgotamento do inóculo, para meios solidificados: agar EMB (eosina azul de metileno - Anexo II), agar manitol (Anexo II), agar APC (para contagem de microrganismos – Anexo II). Estes meios foram incubados a 28°C por 24 h em condições aeróbicas e anaeróbicas.

As colônias foram analisadas em microscópio estereoscópico, de forma a detectar diferenças morfológicas. Após esta análise, as colônias foram transferidas novamente para caldo BHI e incubadas sob agitação, a 28°C por 24 h. Uma alíquota da cultura foi transferida para agar para contagem de microrganismos e confirmação da pureza da cultura. De todos os meios foram feitas placas controle.

A diferenciação das espécies foi realizada baseada na morfologia das colônias, forma, arranjos e coloração de Gram (1884).

Uma vez obtida a cultura pura, uma suspensão de cada microrganismo com 24h de crescimento em caldo BHI foi congelada em nitrogênio líquido e depois submetida à liofilização.

Para a contagem do número total de microrganismos cultiváveis utilizou-se a técnica “Pour Plate” associada a diluições décuplas sucessivas. A placa escolhida para a contagem era a que tinha entre 30 e 300 colônias.

As culturas puras das bactérias foram utilizadas para teste de atividade antimicrobiana.

3.15 - Observação em microscópio de luz dos microrganismos isolados do conteúdo luminal dos insetos

O esfregaço de colônia crescida em agar para contagem de microrganismo com 24 h de cultivo foi fixado pelo calor, corado pelo método de Gram (1884) com solução fenicada de cristal violeta, lavado com água destilada de baixa pressão e fixado com lugol (iodo, 1 g; iodeto de potássio, 2 g; água destilada, 300 mL). Em seguida o esfregaço foi lavado com água, depois com álcool acetonado, lavado novamente com água e por fim a coloração de fundo foi realizada com fucsina de Ziehl, diluída 1:10, durante 30 segundos e lavado com água destilada. A observação foi feita em campo claro em microscópio de luz Axioplan, Zeiss, com ampliação de 1000 X.

3.16 - Teste de virulência da *Photorhabdus temperata* K122 contra as bactérias isoladas do conteúdo luminal dos insetos

Utilizando a mesma metodologia de isolamento e contagem de *Photorhabdus* nos diferentes compartimentos dos insetos (itens 3.7 e 3.8), insetos foram infectados com *Photorhabdus*, e em tempos de 12 em 12 horas o conteúdo luminal foi removido e a flora microbiana observada em placa de agar para contagem de microrganismos para avaliar se a *Photorhabdus* estava influenciando na sobrevivência de alguma espécie. Para isto a contagem do número total de microrganismos no conteúdo foi importante.

O meio agar para contagem de microrganismos (APC) foi utilizado para contagem das bactérias do conteúdo luminal, devido ao fato deste meio permitir o crescimento de um grande variedade de microrganismos.

Insetos controle e infectados com *Photorhabdus* tiveram seus intestinos removidos em intervalos de tempo de 12 horas e liofilizados.

Estas amostras podem futuramente ser utilizadas para que possa ser avaliado o desaparecimento de outras bactérias não cultiváveis ao longo da infecção dos insetos utilizando técnicas de biologia molecular.

3.17 - Detecção da atividade antimicrobiana nos compartimentos dos insetos infectados por *Photorhabdus temperata* K122

Determinado o tempo em que bactérias desaparecem do conteúdo luminal dos insetos infectados, sua hemolinfa, epitélio intestinal e conteúdo luminal foram recolhidos e testados em placa de Petri. Para isto, foram removidos 500 µL das culturas das bactérias isoladas do conteúdo luminal de larvas controle em caldo BHI e foram adicionados a agar Mueller Hinton (Anexo II), espalhados com alça de Drigalsky e ao meio foi inserido, com pinça estéril, discos umedecidos com hemolinfa e conteúdo luminal; o epitélio intestinal foi adicionado diretamente sobre o agar. As placas de agar Mueller Hinton (Anexo II) foram incubadas a 28° C por 24 horas e em seguida, foram observadas para verificar se houve formação de halo de inibição.

3.18 - Teste de efeito antimicrobiano da cultura de *Photorhabdus temperata* em caldo LB

Culturas de *P. temperata* crescida em caldo LB foram avaliadas quanto à capacidade de possuir substâncias que interfiram nas culturas das bactérias isoladas a partir dos insetos sadios. Para isto, placas de agar Mueller Hinton estéreis foram inoculadas com 500 mL da suspensão da flora microbiana, sendo a amostra espalhada com auxílio da alça de Drigalsky. Com o auxílio de pipetas Pasteur estéreis foram removidos cilindros do meio de cultivo, deixando o agar com pequenos orifícios sem meio de cultivo. Para este local foi transferido o volume de 100 µL da cultura de *P. temperata* crescida em caldo LB por 24 horas. As placas de agar Mueller Hinton foram incubadas a 28° C por 24 horas. Após 24 horas, as placas foram observadas para verificar a formação de halos de inibição.

3.19 – Teste do efeito da infecção por *Phortorhabdus temperata* K122 sobre o número total de hemócitos dos insetos *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*

Para contagem de hemócitos, as hemolinhas coletadas dos insetos foram diluídas em solução anticoagulante (0,01M de ácido etilenodiamino tretacético, 0,1M de glicose, 0,026M de ácido cítrico, pH 4,6) (1 parte de hemolinfa: 9 partes de anticoagulante) e a contagem foi feita em hemocitômetro sob microscópio óptico de contraste de fase. As contagens foram realizadas com três repetições.

IV - RESULTADOS

4.1 - Determinação da curva de crescimento da *Photorhabdus temperata* K122 em caldo Luria Bertani

Através da determinação da curva de crescimento da *P. temperata* K122 em caldo LB, foi verificado que com 24 horas de crescimento, a 150 rpm e a 28° C, a densidade óptica no meio atingia um valor médio de 1.1 (Figura 6). Nesta densidade óptica o número de bactérias viáveis era 10⁸. Este dado foi necessário para a certeza de que os insetos estavam sendo inoculados com bactérias vivas.

A partir de 36 horas de infecção o meio caldo LB começou a apresentar uma leve coloração vermelho-alaranjada devido à produção de pigmento pela *P. temperata*; com 48 horas de crescimento o meio apresenta uma coloração vermelha mais intensa (Figura 7D). Estas características foram importantes para auxiliar na confirmação de que as bactérias inoculadas eram realmente *P. temperata* K122, além da observação da bioluminescência da cultura em câmara escura.

4.2 - Características culturais da *Photorhabdus temperata* K122

Os meios solidificados utilizados para cultivo e contagem de *P. temperata* foram respectivamente agar MacKonkey e agar para contagem de microrganismos. Foi possível distinguir as colônias de *P. temperata* pela produção de pigmento de coloração vermelha (Figura 7A, 7B e 7C). As colônias de *P. temperata* foram circulares, opacas, elevadas, de superfície lisa e possuem diâmetro médio de 3mm. Com 36 horas de crescimento em meio solidificado a coloração foi vermelho-alaranjada (Figura 7A); com 48 horas a coloração foi vermelho-marrom. Ao serem removidas com auxílio da alça de nichrome apresentaram aparência de filamento. Outra questão importante foi que a produção do pigmento não foi restrita a área da colônia, houve uma difusão do pigmento pelo meio de cultivo (Figura 7A e 7C).

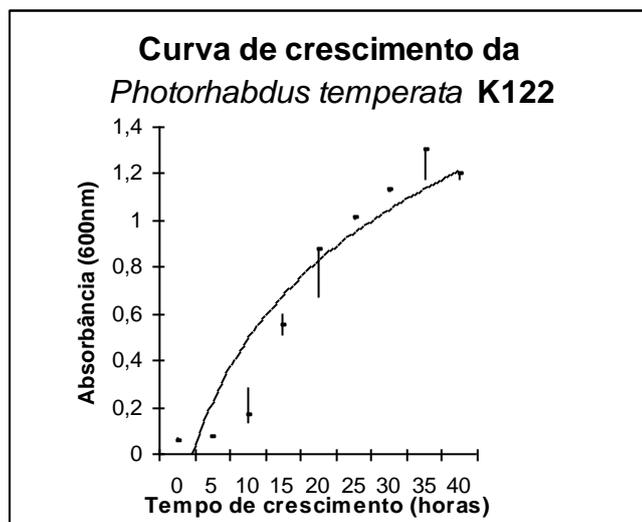


Figura 6: Curva de crescimento de *Photorhabdus temperata* K122 em caldo Luria Bertani. A cultura foi mantida sob agitação a 150 rpm por 24 a 28°C. O crescimento foi monitorado lendo-se a absorbância da cultura a 600 nm em intervalos de 6 h. Os valores utilizados foram médias de três experimentos.

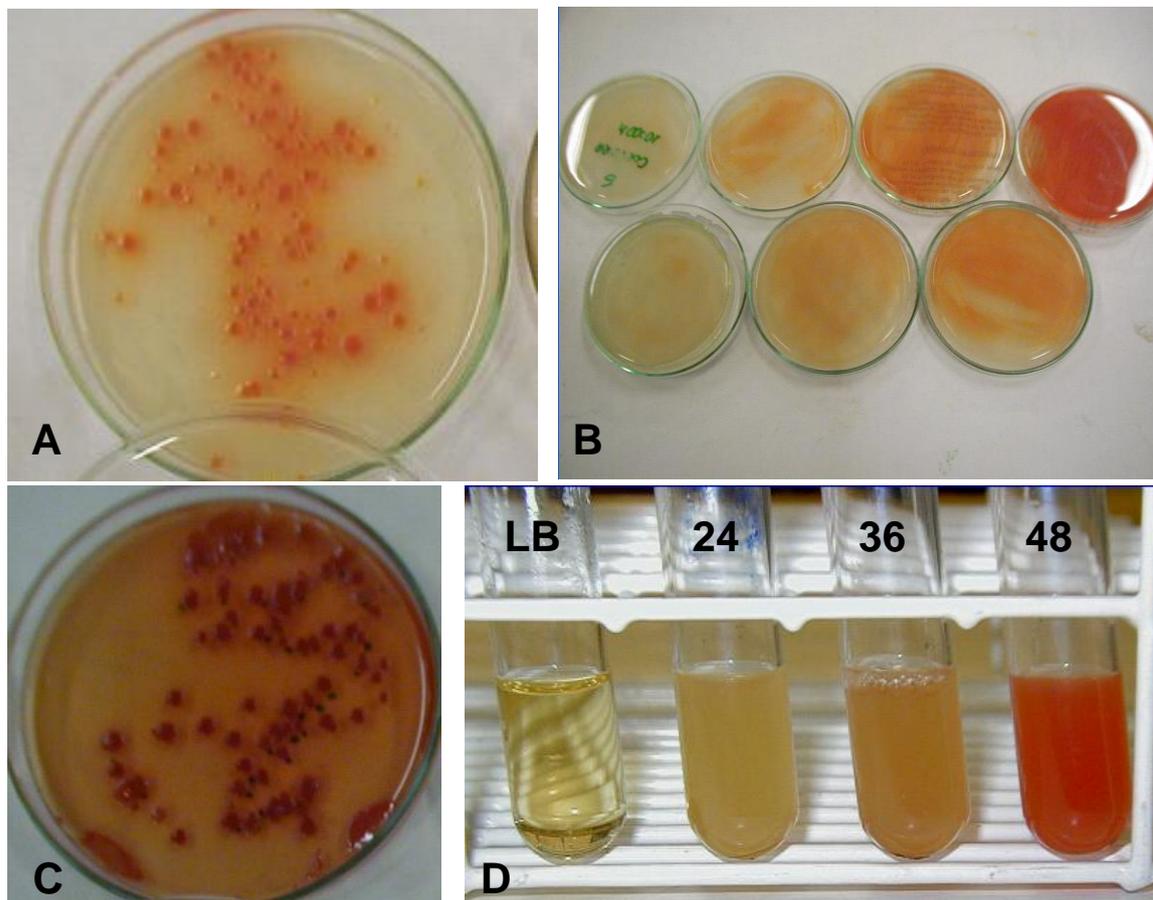


Figura 7: Crescimento de *Photorhabdus temperata* K122 em meios de cultivo. A: Colônias de coloração avermelhada típicas de *P. temperata* em agar para contagem de microrganismos, 36 horas, 28°C. B: Método de contagem de *P. temperata* através da contagem de colônias em placa e técnica de diluições sucessivas, utilizando agar para contagem de microrganismos, 36 horas, 28°C. C: Colônias de *P. temperata* crescidas em agar para contagem de microrganismos, 48 horas, 28°C. D: Crescimento de *P. temperata* em caldo Luria Bertani (LB). LB= caldo estéril, 24, 36 e 48, foram os tempos em horas de crescimento da bactéria no meio, 150 rpm, 28°C.

4.3 - Gráficos de dose-resposta e taxa de mortalidade

P. temperata K122 foi altamente virulenta quando testada contra larvas do quarto instar de *D. saccharalis* com uma dose letal para 50% da população de insetos (DL₅₀) de 16,2 células bacterianas (limite de confiança 10,1 – 22,5), calculado por análise Probit, no período de 48 horas pós-infecção. O inóculo utilizado na concentração de 50 células por 10 µL matou, em média, 90% das larvas testadas. Valores de concentrações de inóculo superiores a estes mataram todas as larvas ensaiadas no período de 48 horas (Figura 8).

A concentração bacteriana escolhida para as subseqüentes infecções foi de 50 células bacterianas/10µL para ensaios com larvas de *D. saccharalis*. As larvas infectadas começaram a morrer num período em torno de 30 horas pós-infecção com um tempo letal para 50% da população de insetos (TL₅₀) no valor de 33,8h (limite de confiança 32.2 – 35.6) e tempo letal para 90% da população de insetos (TL₉₀) no valor de 44,8h (limite de confiança 40,8 – 51,4). A maioria das larvas morreu com 48-54 horas pós-infecção e neste período as larvas tornaram-se vermelha-marrons, cor típica dos insetos infectados com *P. temperata* (Figura 9).

Nos ensaios de *P. temperata* K122 infectando adultos de *D. peruvianus*, também foi possível verificar uma alta virulência. Valores de DL₅₀ foram 5,3 células bacterianas (limite de confiança 4,2 - 6,1), calculado por análise Probit, no período de 48 horas pós-infecção. Concentrações de 10 bactérias por 10 µL mataram 90% dos insetos ensaiados (Figura 8) e valores maiores que este mataram todos os insetos no período de 48 horas. A concentração bacteriana escolhida foi de 50 células/10µL para adultos de *D. peruvianus*. Os insetos infectados com esta concentração de bactérias começaram a morrer num período em torno de 36 horas (30%) e com 48 horas uma porcentagem de 95% dos insetos estavam mortos (Figura 9). Os valores de TL₅₀ e TL₉₀ foram respectivamente 33,9h (limite de confiança 32,9 – 34,9) e 38,3h (limite de confiança 36,8 – 40,9).

Para os testes de virulência em larvas de *T. molitor* infectados por *P. temperata* K122, foi possível verificar que este, entre os insetos testados, é o mais sensível à infecção por *P. temperata*. Concentrações de 5 bactérias por 10 µL mataram 40% dos insetos infectados e com 50 bactérias por 10 µL todos os insetos testados foram mortos (Figura 8). A concentração bacteriana utilizada para os experimentos posteriores de infecção foi de 50 células bacterianas por 10 µL. Os

insetos infectados com esta concentração começam a morrer com 30 horas de infecção (50%) e com 48 horas todos estavam mortos (Figura 9). Os valores de TL₅₀ e TL₉₀ foram respectivamente 30,3h (limite de confiança 27,6 – 32,1) e 40,4 h (limite de confiança 37,7 – 42,1).

Escherichia coli, usada como um controle negativo, não mostrou patogenicidade na concentração de 10⁸ células sobre os insetos testados.

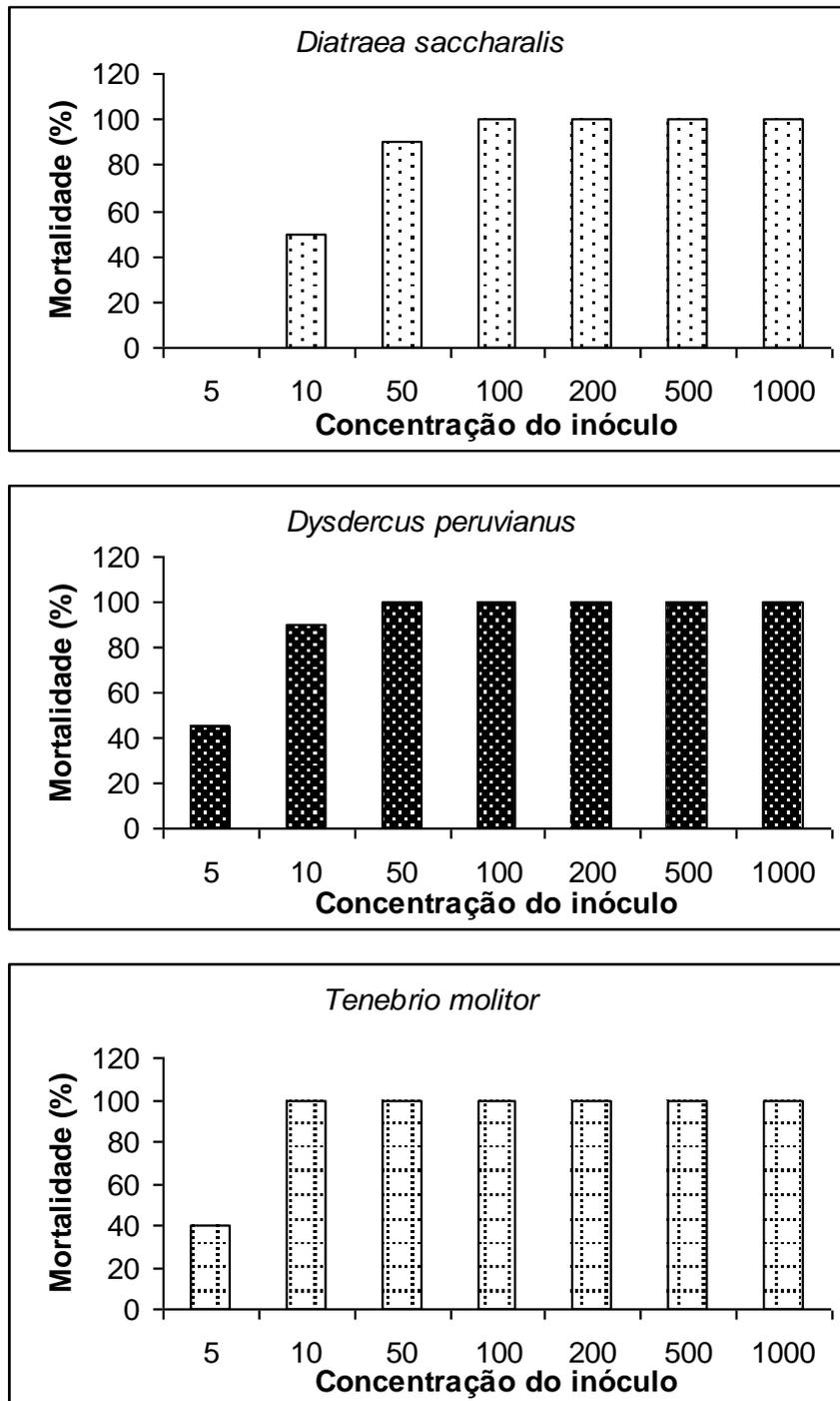


Figura 8: Efeito da concentração do inóculo bacteriano sobre a mortalidade dos insetos num período de 48 horas. Estes resultados são representativos de cinco lotes contendo, cada um, 10 insetos de cada espécie, infectados com a *Photorhabdus temperata* K122. A contagem dos insetos mortos foi realizada em 48 horas de infecção.

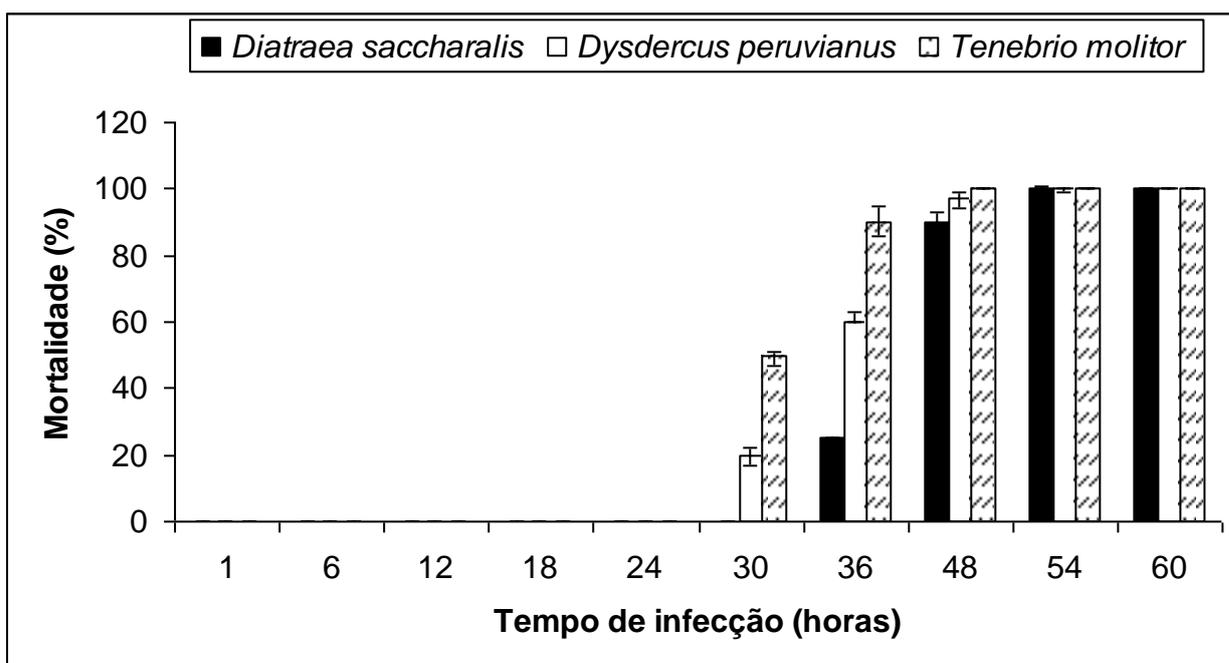


Figura 9: Determinação da mortalidade de *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor* quando infectados com *Photorhabdus temperata* K122. Estes resultados são representativos de cinco lotes, cada um contendo 10 insetos infectados com a *P. temperata* K122. Cada infecção dos insetos foi feita com inóculo de 50 células bacterianas/10 μ l. A contagem dos insetos mortos foi realizada em intervalos de 6 horas.

4.4 - Sintomatologia externa da infecção dos insetos por *Photorhabdus temperata* K122

As larvas sadias de *D. saccharalis* estavam em constante movimento, sempre se alimentando, e respondiam ao toque com uma pinça metálica movimentando-se para longe ou se escondendo na própria dieta. As larvas inoculadas com *P. temperata*, após 18 horas de infecção passaram a se movimentar um pouco mais devagar, porém continuavam se alimentando; com 24 horas de infecção o inseto não se locomovia mais naturalmente, só com estímulo do toque com a pinça. Mesmo assim os movimentos eram muito lentos; neste período de infecção as larvas quase não buscavam mais a dieta. Com 36 horas de infecção as larvas não respondem mais ao toque, e estavam mais magras, pois pararam de se alimentar (Figura 11). Após 48 horas de infecção, as larvas estavam mortas em sua grande maioria, apresentando a coloração vermelha típica da sintomatologia externa causada por *Photorhabdus* em insetos e ao tentar suspendê-las com uma pinça estavam sem turgor, parecendo estar murchas (Figura 10B). As larvas quando visualizadas em câmara escura, apresentavam bioluminescência, outra característica da infecção por *P. temperata*. Extratos de partes internas das larvas mortas, quando plaqueadas em agar Mackonkey apresentavam colônias típicas da *P. temperata*.

As larvas sadias de *T. molitor* também estavam em constante movimento, alimentando-se, respondendo ao toque, girando o seu corpo em círculos quando suspensas por uma pinça e se escondendo na presença de luz. Com 18 horas de infecção, as larvas apresentaram características semelhantes às sadias. As alterações comportamentais surgiram a partir de 24 horas de infecção; as larvas estavam paralisadas, só mexiam quando eram tocadas com as pinças e não respondiam ao estímulo da luz. A busca pelo alimento também diminuiu. Com 36 horas de infecção muitas larvas já apresentavam coloração levemente avermelhada e não respondiam mais a estímulos. No período de 48 horas de infecção as larvas estavam todas mortas apresentando a coloração vermelho-tijolo (Figura 10D) e bioluminescência quando observadas em câmara escura. Amostras do corpo dos insetos foram removidas para a observação de colônias de *P. temperata* e confirmação da infecção por este microrganismo.

Os insetos adultos de ambos os sexos de *D. peruvianus* sadios, estavam em movimentos nos viveiros, bebendo água, sugando as sementes de algodão e

acasalando. Quando estimulados ou ameaçados, locomoviam-se no sentido das sementes de algodão escondendo-se por trás delas. Nas primeiras 24 horas de infecção dos percevejos mantinham características dos insetos sadios, movimentavam-se, alimentavam-se, acasalavam e quando estimulados respondiam com movimentos rápidos. A única diferença observada é que estes insetos bebiam mais água do que os sadios. Com 36 horas, os insetos diminuíram consideravelmente seus movimentos, restringindo-se à parte inferior do viveiro, pararam de se acasalar e a busca por água também diminuiu; quando estimulados, locomoviam-se pelas sementes de algodão, sem, no entanto, subirem até o topo do viveiro, movimentavam suas pernas, mas praticamente não saíam do lugar e os que conseguiam, andavam trêmulos. No período de 48 horas de infecção os insetos estavam mortos. A coloração vermelha característica da infecção por *Photorhabdus* não foi possível de ser distinguida porque a cutícula do *D. peruvianus* era vermelha também. A confirmação da morte devido a infecção da *P. temperata* se deu por visualização dos insetos bioluminescentes em câmara escura e pelo plaqueamento de amostras do inseto em agar Mackonkey onde foi possível visualizar as colônias típicas de *P. temperata* K122.

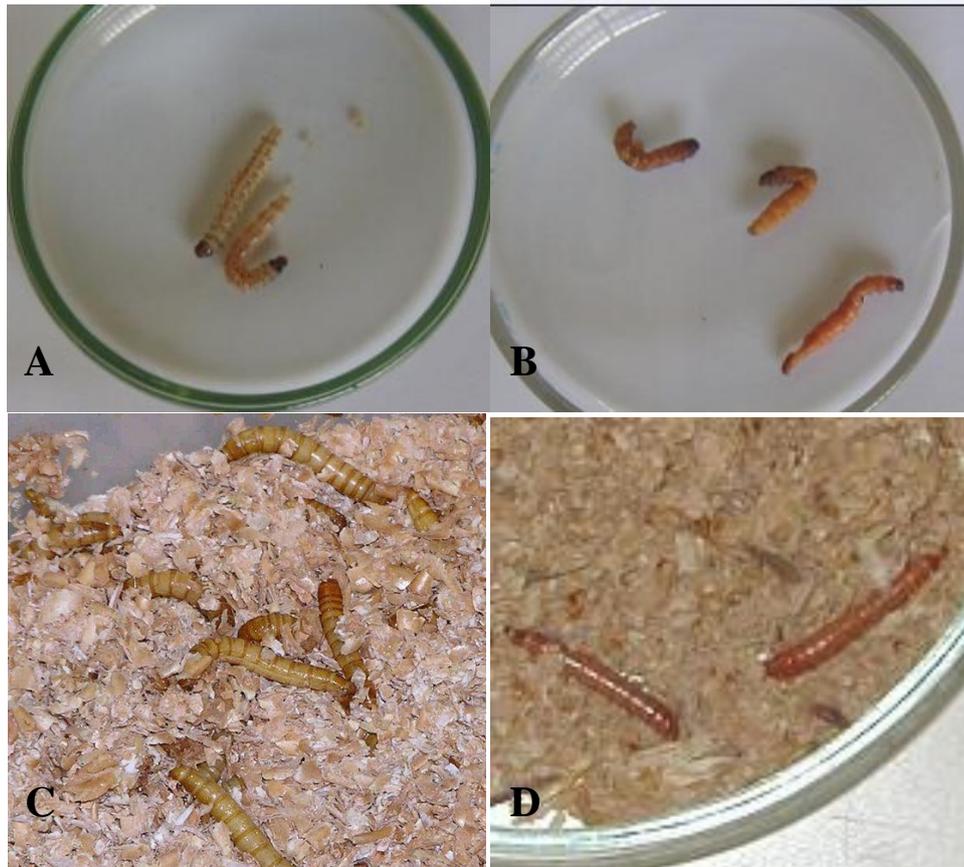


Figura 10: Larvas de *Diatraea saccharalis* (A e B) e de *Tenebrio molitor* (C e D). A e C: Larvas não infectadas. B e D: Larvas infectadas com *Photorhabdus temperata* K122, por período de 48 horas, estas apresentam coloração vermelha típica da infecção por *Photorhabdus temperata* K122.



Figura 11: Larvas de 4^o instar de *Diatraea saccharalis*. C: larva controle não infectada. Os valores 18, 36 e 48, correspondem ao tempo em horas de infecção por *Photorhabdus temperata* K122.

4.5 - Colonização dos diferentes tecidos dos insetos pela *Photorhabdus temperata* K122

A colonização de diferentes tecidos dos insetos pela *P. temperata* K122 foi avaliada pela técnica de contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por inseto infectado. O número de bactérias inoculado foi de 50 bactérias por 10 μ L.

Com 18 horas de infecção das larvas de *D. saccharalis* com *P. temperata* K122, a média dos valores de UFC/animal na hemolinfa foi de 354.000 UFC/animal e 24 horas pós-infecção teve em média 693.000 UFC/animal. A maior alteração nos valores determinados de UFC/animal na hemolinfa ocorreu no tempo de 36 horas onde o número de UFC foi de 4.300.000 UFC/animal. Com 48 horas de infecção o valor médio obtido foi 4.007.900 UFC/animal (Figura 12A). Na carcaça a alteração mais evidente no número de UFC presente nesta região ocorreu no horário de 48 horas. Com 18 horas de infecção o valor médio foi 37.500.000 UFC/animal, com 36 horas o valor foi 435.000.000, e com 48 horas de infecção o valor obtido foi 9.000.000.000 UFC/animal (Figura 12B).

Na região do epitélio intestinal de *D. saccharalis* com 18 horas de infecção o valor médio foi 195.000 UFC/animal; em 24 horas o valor médio foi 85.000.000 UFC/animal e a maior alteração no valor de UFC acontece com 36 horas pós-infecção, totalizando 861.000.000 UFC/animal. Após 48h de infecção, as bactérias atingem um valor máximo de 1.147.500.000 UFC/animal (Figura 12C).

Através destes resultados pode-se verificar que as bactérias se encontram nos três compartimentos testados, e que a partir de 36 horas os valores de bactérias na hemolinfa e epitélio aumentam significativamente; nesta fase o inseto está moribundo. Já a carcaça tem a maior alteração a partir de 48 horas, quando os insetos já estão mortos. Em 48 horas pós-infecção, o número de UFC atinge na hemolinfa valores da ordem de 10^6 , na carcaça, 10^9 e no epitélio, 10^{10} .

Quanto ao efeito da infecção sobre a microbiota residente no intestino das larvas de *D. saccharalis*, observou-se que ao longo da infecção o número de UFC/animal da microbiota diminuiu. As larvas sadias, denominadas controle, apresentavam em média 64.000.000 UFC/animal. Com 18 horas de infecção o valor médio foi de 49.500.000 UFC/animal. Uma diminuição no número de UFC/animal ocorreu com 48 horas, quando o valor obtido foi 4.053.000; com 54 horas de

infecção foram encontradas colônias das bactérias da microbiota do intestino na ordem de 10^3 (Figura 12D).

A contagem do número de UFC de *P. temperata* nos compartimentos dos adultos de *D. peruvianus* foi investigada. Na hemolinfa, no período de 18 horas pós-infecção obteve-se o valor médio de 34.500 UFC/animal (Figura 13A). Nos tempos seguintes, o número de UFC/animal diminuiu. Vale aqui ressaltar que nos períodos posteriores a 18 horas de infecção, o volume de hemolinfa recolhida foi diminuindo cada vez mais, fato este que levou a valores menores de UFC neste compartimento. Na carcaça, com 18 horas de infecção, foram detectadas 1.400.000; com 24 horas, o valor foi de 3.760.000, e com 42 horas o valor obtido foi de 18.000.000 UFC/animal. No período de 48 horas o número de UFC/animal foi de 47.000.000 (Figura 13B). O epitélio do *Dysdercus* foi dividido em três regiões, V1, V2 e V3 / V4. Observou-se que o número de UFC/animal foi maior para V1. Esta região apresentou 1.275 UFC/animal com 18 horas de infecção, 58.000 UFC/animal para o período de 24 horas e 185.000 UFC/animal para 48 horas de infecção. Na contagem em V2 obteve-se 475 UFC/animal em 18 horas, 5.550 em 24 horas e 60.000 em 48 horas pós-infecção. A região correspondente a V3 / V4 teve os valores médios de 150, 3250 e 50.000 UFC/animal para os tempos de infecção 18, 24 e 48 horas respectivamente (Figura 13C). No horário de 48 horas, a hemolinfa apresentou valores da ordem de 10^4 UFC/animal, a carcaça, 10^7 e o epitélio intestinal 10^5 UFC/animal.

O efeito da infecção por *P. temperata* K122 sobre a microbiota intestinal dos adultos de *D. peruvianus* foi investigada nas diferentes regiões do epitélio intestinal deste inseto. Nos insetos controle foi possível verificar que o maior número de UFC/animal foi encontrado em V3 / V4 atingindo o valor de 62.500.000. Nas regiões V1 e V2 o número de UFC/animal foram respectivamente 37.675.000 e 23.337.500. Durante as primeiras 24 horas de infecção o número de UFC/animal nestas três regiões praticamente não foi alterado; uma diminuição mais evidente ocorreu com 42 horas de infecção, quando as regiões V1, V2 e V3 / V4 apresentaram, respectivamente, os seguintes valores de UFC/animal, 2.500.000, 2.875.000 e 5.375.000 (Figura 13D). Com 48 horas de infecção o valor de UFC/animal foi da ordem de 10^4 e em 54 horas 10^2 .

No *T. molitor*, a contagem de UFC/animal de *P. temperata* K122 na hemolinfa mostrou que em 18 horas de infecção, o aumento das bactérias na hemolinfa foi significativo quando comparado ao valor obtido para 5 horas. Com 5 horas de infecção contaram-se 1.750 UFC/animal e para 18 horas, o valor obtido foi de 145.000 UFC/animal. Nos demais horários, 24 e 36 horas, os valores foram, respectivamente, 80.000 e 37.500 UFC/animal (Figura 14A). Assim como foi visto em *D. peruvianus*, o volume coletado de hemolinfa do *T. molitor* foi ficando cada vez menor, a partir de 24 horas de infecção. Na carcaça, o maior número de UFC/animal foi obtido no horário de 48 horas de infecção. Com 18 horas de infecção o número de UFC/animal foi 2.500.000. Nos horários de 24 e 36 horas os valores foram, respectivamente, 27.000.000 e 50.000.000 UFC/animal (Figura 14B). No epitélio intestinal os valores para os horários de 18, 24 e 36 horas de infecção foram, respectivamente, 500.000, 2.912.500 e 6.000.000 UFC/animal (Figura 14C).

A flora microbiana intestinal nas larvas controle de *T. molitor*, em UFC/animal, foi estimada em 11.250.000. Após a infecção observou-se uma diminuição na quantidade de UFC/animal encontrada no lúmen das larvas. Com 18 horas de infecção o valor médio de UFC/animal encontrado foi de 7.110.000; para 24 horas foi de 6.335.000 UFC/animal e em 36 horas pós-infecção o valor obtido foi de 833.500 UFC/animal (Figura 14D). No horário de 48 horas de infecção a quantidade de UFC/animal está na ordem de 10^2 .

Durante a infecção, morte e subsequente ruptura do epitélio intestinal degenerado, as bactérias da microbiota intestinal não invadem a hemocele. Apenas colônias de *P. temperata* foram observadas depois do plaqueamento da hemolinfa e outros órgãos internos das larvas infectadas.

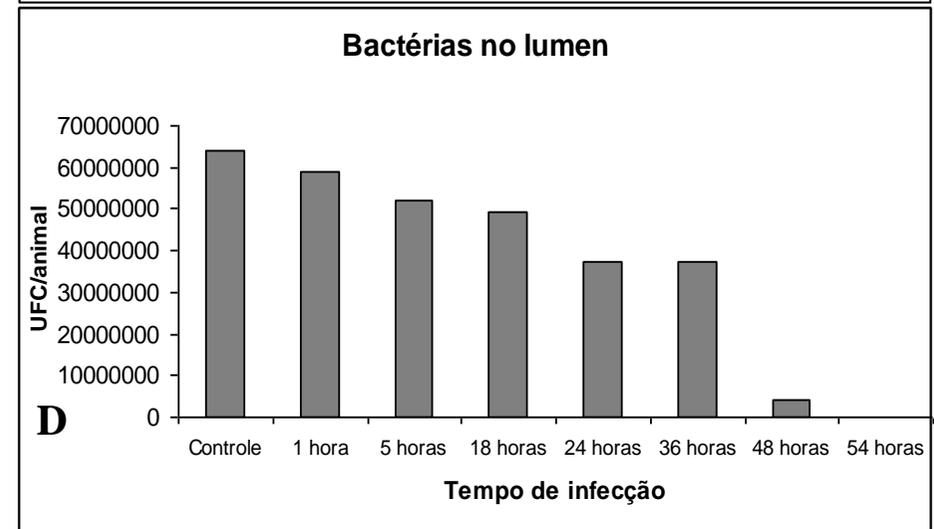
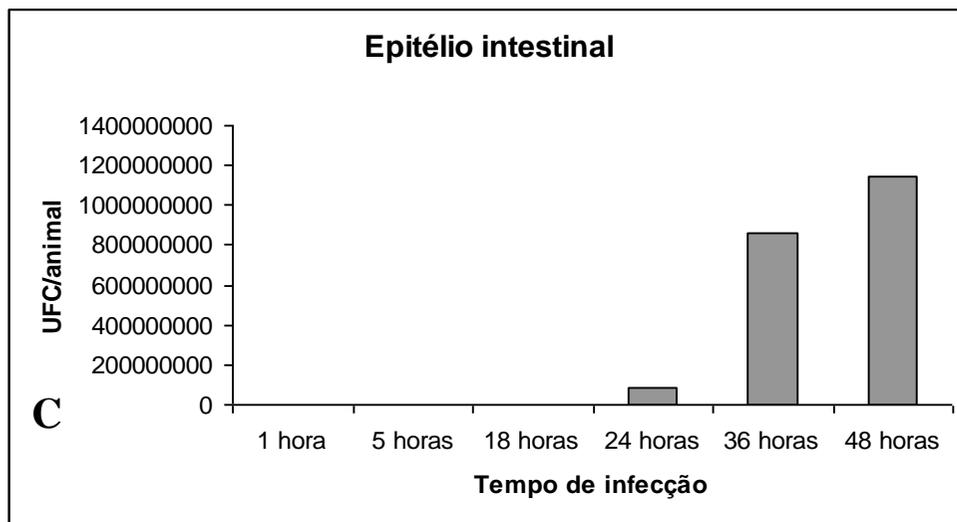
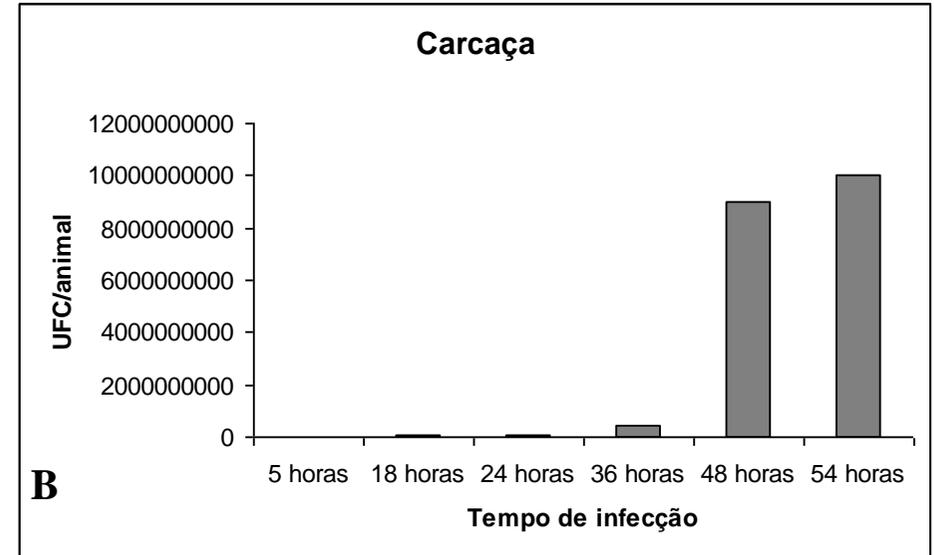
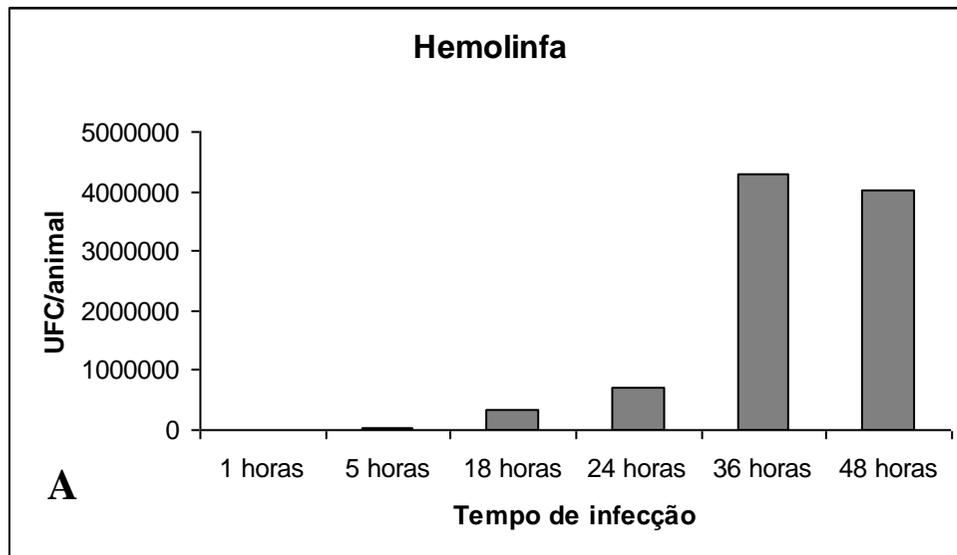


Figura 12: Determinação das concentrações de *Photorhabdus temperata* K122 em diferentes compartimentos e o seu efeito sobre a flora intestinal das larvas de *D. saccharalis* ao longo da infecção, estas foram determinadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por larva infectada em Agar APC. A, B e C: contagem do número de *P. temperata* K122 na hemolinfa, carcaça e epitélio intestinal, respectivamente. D: Contagem do número total de bactérias da flora intestinal residente no intestino das larvas de *Diatraea saccharalis*. Estes resultados foram representativos de três lotes contendo 10 insetos cada.

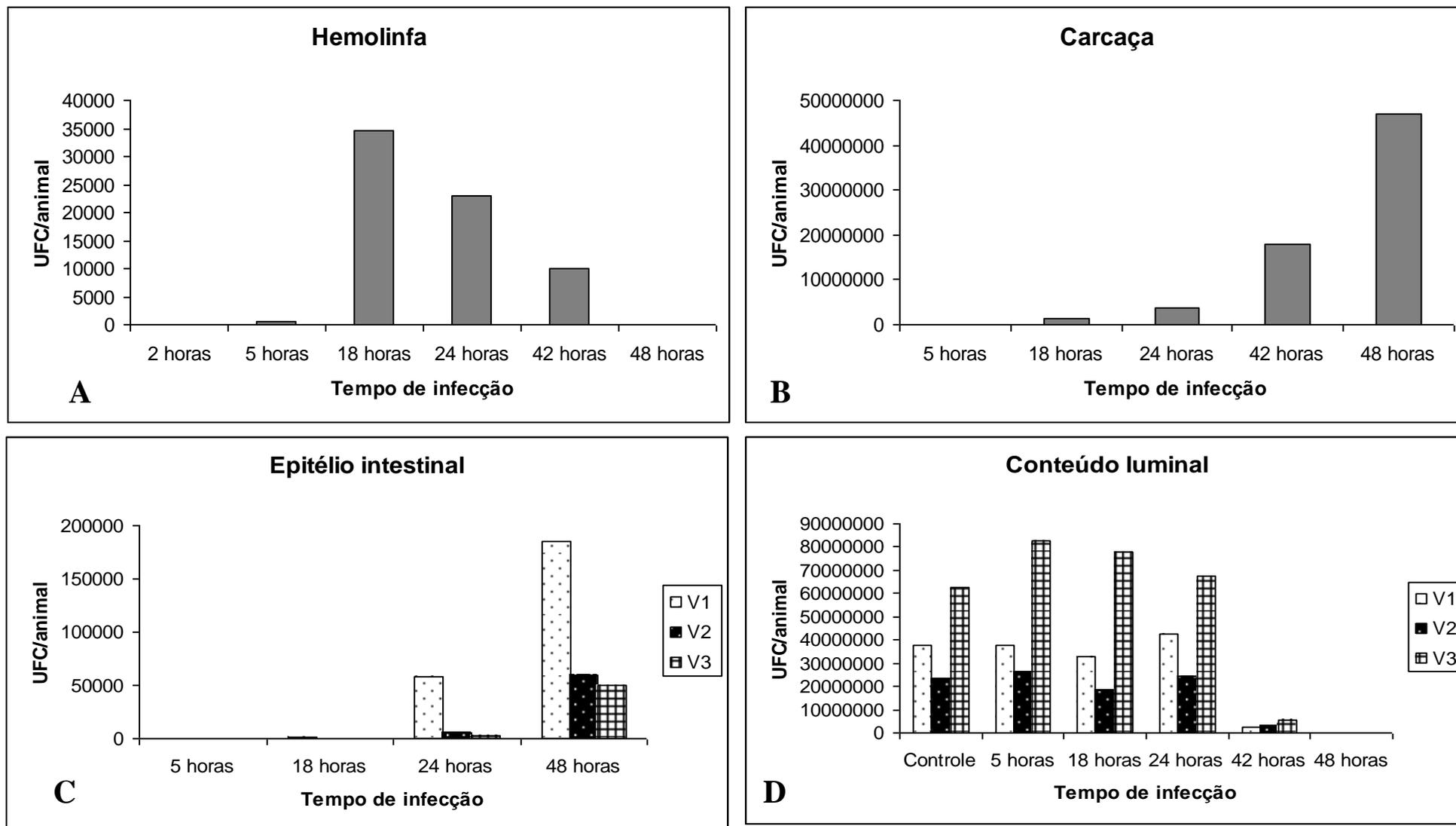


Figura 13: Determinação das concentrações de *Photorhabdus temperata* K122 em diferentes compartimentos e o seu efeito sobre a flora intestinal de *D. peruvianus* ao longo da infecção. A, B e C: contagem do número de *P. temperata* K122 na hemolinfa, carcaça e epitélio intestinal, respectivamente. D: Contagem do número total de bactérias da flora intestinal residente no intestino das larvas de *Dysdercus peruvianus*. Estes resultados foram representativos de três lotes contendo 10 insetos cada.

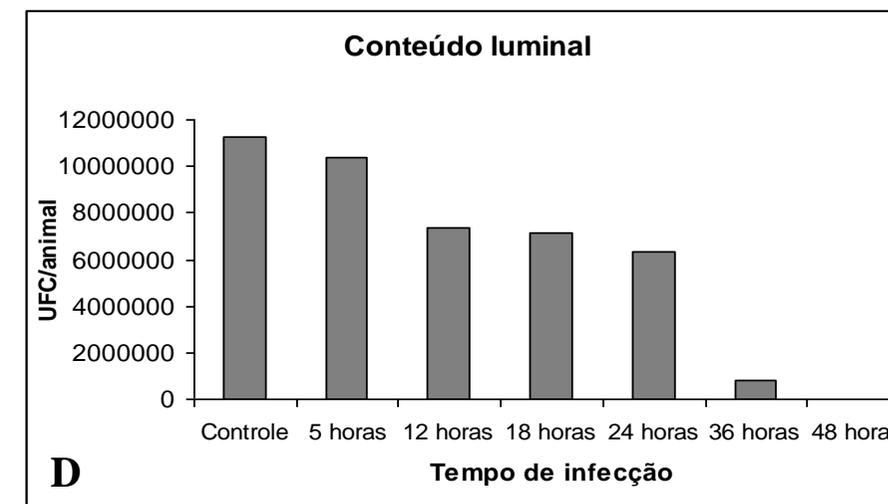
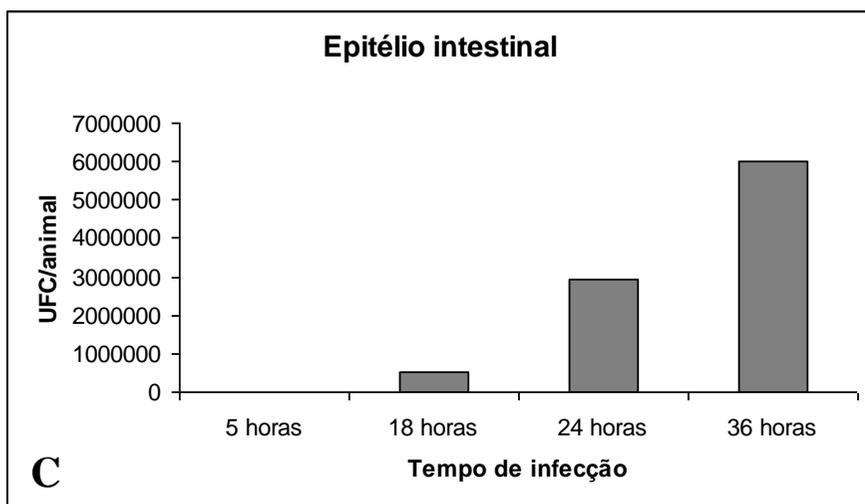
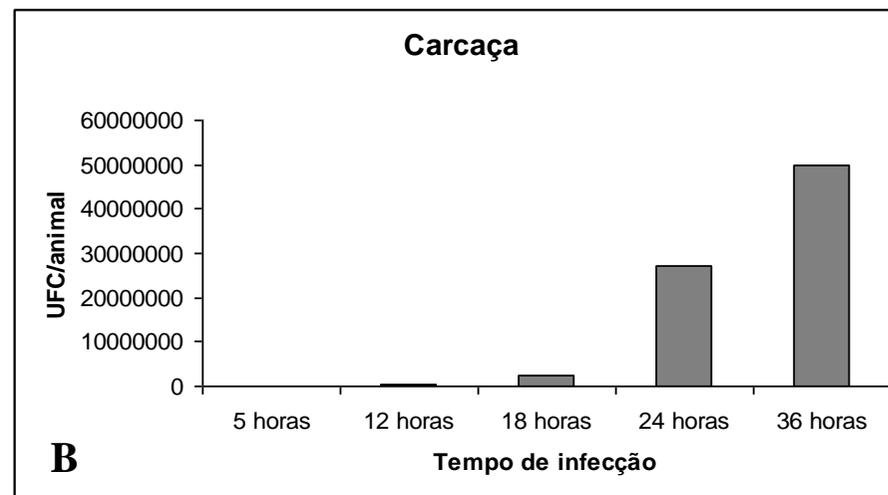
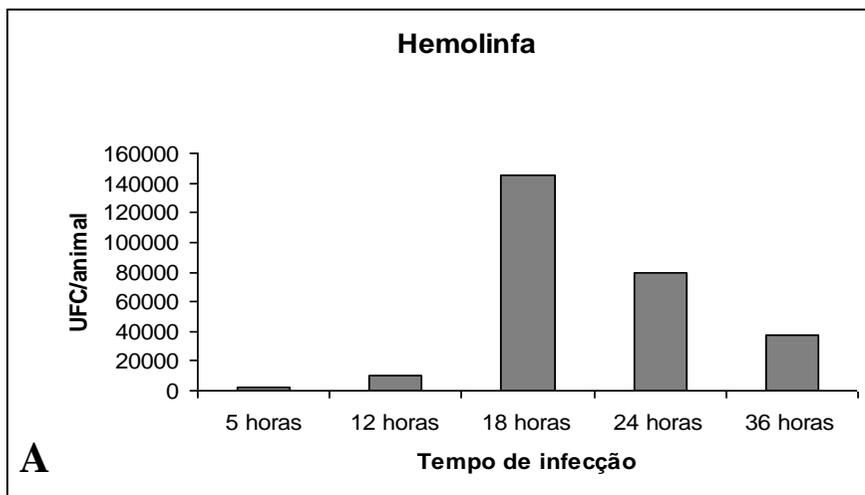


Figura 14: Determinação da concentração de *Photorhabdus temperata* K122 em diferentes compartimentos e o seu efeito sobre a flora intestinal das larvas de *Tenebrio molitor* ao longo da infecção. A, B e C: contagem do número de *P. temperata* K122 na hemolinfa, carcaça e epitélio intestinal, respectivamente. D: Contagem do número total de bactérias da flora intestinal residente no intestino das larvas de *T. molitor*. Estes resultados foram representativos de três lotes contendo 10 insetos cada.

4.6 - Efeito da infecção por *Photorhabdus temperata* K122 no número total de hemócitos na hemolinfa dos insetos *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*

O número total de hemócitos na hemolinfa dos insetos também foi investigado com o objetivo de verificar o efeito da infecção nestas células do sistema imune dos insetos.

O número de hemócitos por larvas controle de *D. saccharalis* foi em média 70.500. Com uma hora de infecção o número de hemócitos aumentou significativamente atingindo o valor de 470.000. O número de hemócitos nas larvas com 5 horas de infecção foi de 142.500. Nos tempos de 18 horas e 24 horas foram respectivamente 28.500 e 12.000. A partir de 36 horas já não foram detectados hemócitos na hemolinfa coletada (Figura 15A).

Nos insetos adultos de *D. peruvianus*, os não infectados apresentaram 1.300 hemócitos por inseto. Nas primeiras 2 horas de infecção o número de hemócitos aumentou para 8.875. De 5 horas de infecção até 48 horas, os valores diminuíram progressivamente. Em 5 horas foram encontrados 6.000 hemócitos/animal, em 18 horas, 4.500, em 24 horas, 2.250 e em 42 horas, 250. A partir de 48 horas não foram detectados hemócitos na hemolinfa (Figura 15B).

Em *T. molitor* também foi verificado um aumento do número de hemócitos nas primeiras 5 horas de infecção por *P. temperata* quando comparados com o controle. O controle apresentou 950 hemócitos/animal e em 5 horas pós-infecção, 4.000. Com 18 horas de infecção o número de hemócitos diminuiu consideravelmente para 800 e em 24 horas foram 20 hemócitos/animal. A partir de 36 horas não foram mais detectados hemócitos na hemolinfa do inseto (Figura 15C).

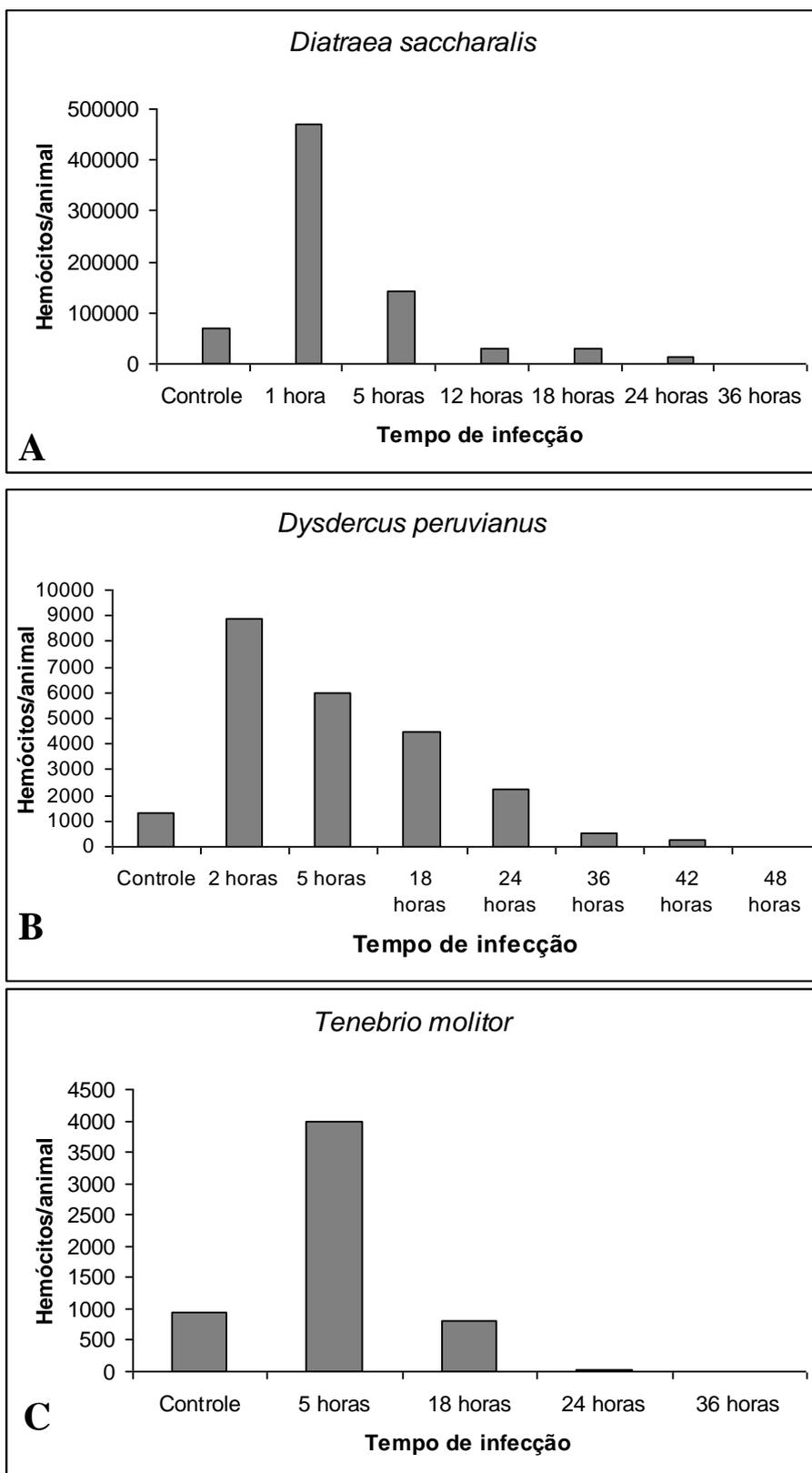


Figura 15: Contagem de hemócitos da hemolinfa dos insetos infectados com *Photorhabdus temperata* K122. A: *Diatraea saccharalis*, B: *Dysdercus peruvianus* e C: *Tenebrio molitor*. Estes resultados foram representativos de três lotes contendo 10 insetos cada.

4.7 - Efeito da infecção por *Photorhabdus temperata* K122 nas atividades enzimáticas dos insetos *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*

Larvas não infectadas de *D. saccharalis* apresentam três sacarose hidrolases (SH), as quais foram denominadas respectivamente SH1, SH2, SH3, conforme sua migração no gel. Uma α -glicosidase (SH2), são elas uma β -frutosidase (SH1) e uma sacarose hidrolase atípica (SH3) (Carneiro *et al.*, 2004).

Ensaio de atividade sobre sacarose realizado em gel de eletroforese semi-desnaturante mostraram que as atividades decrescem ao longo do período de infecção. As enzimas SH1 e SH3 no tempo de 24 horas de infecção praticamente não têm mais sua atividade detectada em gel (Figura 16A). Com base nos valores das atividades encontradas no extrato bruto do homogeneizado do epitélio intestinal das larvas de *D. saccharalis* foi detectado que a atividade sobre este substrato foi diminuindo ao longo da infecção. Os insetos controle apresentaram atividade absoluta de 711 mU/epitélio, os de 12 horas apresentaram atividade absoluta de 700 mU/epitélio (Tabela 2). Nestas primeiras 12 horas a atividade praticamente não se altera. A partir das 18 horas foi possível se observar uma diminuição mais evidente da atividade enzimática, estimada em valor absoluto de 522 mU/epitélio. Com 24 horas de infecção a atividade absoluta foi de 389 mU/epitélio. A partir dos dados da Tabela 2 é possível verificar que nas primeiras 12 horas há um decréscimo de 2%, em 18 horas a atividade diminui 27%, em 24 horas, 45%, em 36 horas, 70% e em 48 horas, 92,2%.

No horário de 24 horas as larvas de *Diatraea saccharalis* param de ingerir alimento, em 36 horas o inseto está moribundo e nas 48 horas o inseto está morto.

O efeito da infecção sobre a β -frutosidase, especificamente, foi observado em gel e por ensaios de cinética enzimática. Foi possível observar a partir da atividade revelada em gel de eletroforese que a enzima perde sua atividade ao longo da infecção, não tendo sua atividade revelada no gel quando os insetos estão infectados com *P. temperata* a partir de 36 horas (Figura 16B). Resultados semelhantes foram verificados a partir de ensaios enzimáticos, onde a atividade absoluta sobre rafinose detectada nas larvas controle de *D. saccharalis* foi 244 mU/epitélio (Tabela 2). Logo nas primeiras 12 horas de infecção foi possível observar uma redução de 52% da atividade total sobre rafinose apresentando um

valor absoluto de 116 mU/epitélio. Os valores de atividade absoluta para os tempos de 18, 24, 36 e 48 horas de infecção foram especificamente, 83 mU/epitélio, 67 mU/epitélio, 39 mU/epitélio, 22 mU/epitélio. Com 24 horas de infecção a atividade absoluta foi reduzida a 16 % e com 48 horas, a 5,4%, da atividade de larvas controle.

As atividades de α -glicosidases ensaiadas em gel de eletroforese também diminuíram ao longo da infecção. Porém, nos ensaios com amostras expostas a 48 horas de infecção ainda foi encontrada atividade considerável no gel, principalmente da enzima de maior migração eletroforética (Figura 16C). As larvas controle tiveram atividade absoluta de 33 mU/epitélio (Tabela 2). Após 12 horas de infecção, as larvas apresentam atividade ainda elevada quando comparadas com a atividade das larvas controle, 29,5 mU/epitélio, resultado semelhante àquelas infectadas por 18 horas com a *Photorhabdus temperata*, cujo valor foi 29 mU/epitélio. Nestes dois tempos de infecção a redução da atividade foi em torno de 20% do valor total. Com 24 horas de infecção foi possível verificar uma diminuição da atividade em 65% do seu valor total, sendo a atividade absoluta neste horário de 11,5 mU/epitélio. Nos tempos de 36 e 48 horas os valores de atividade foram respectivamente 8 mU/epitélio e 5 mU/epitélio, neste período a redução da atividade enzimática foi em torno de 75% do valor total (Tabela 2).

As atividades de α -galactosidases observadas em gel de eletroforese semi-desnaturante foram decrescendo ao longo da infecção, sendo que com 48 horas de infecção a atividade em gel ainda é perceptível (Figura 16D). As larvas controle tiveram atividade absoluta de 46,5 mU/epitélio, resultado semelhante ao daquelas infectadas por 12 horas com a *Photorhabdus temperata*, cujo valor foi 45,5 mU/epitélio. Com 18 horas de infecção foi possível verificar uma diminuição da atividade em 67% do seu valor total; a atividade absoluta neste horário foi 17,5 mU/epitélio. Nos tempos de 24 e 36 horas os valores de atividade foram respectivamente 12 mU/epitélio e 10 mU/epitélio, correspondentes a redução da atividade enzimática em torno de 75% do valor total. A atividade enzimática relativa a α -glicosidase nas larvas com 48 horas de infecção foi de 4 mU/epitélio, tendo uma redução de 91,4% (Tabela 2).

A atividade das α -amilases também foi investigada em gel de eletroforese e em ensaios enzimáticos em tubo. Observando o gel de atividade foi possível verificar

que a atividade permaneceu similar entre o controle e os tempos de 12 e 18 horas pós-infecção; com 24 horas de infecção houve uma diminuição significativa da atividade desta enzima e após 48 horas não houve detecção de atividade (Figura 17A). Tal resultado confere com a atividade enzimática em tubo de ensaio que mostrou que com 24 horas de infecção, a atividade de α -amilase teve uma redução de 60% em relação ao valor da atividade encontrada nos insetos controle. A atividade absoluta foi 313 mU/epitélio nos insetos controle e 126,6 mU/epitélio nos insetos com 24 horas de infecção. Com 48 horas de infecção a atividade enzimática teve uma redução de 80% do seu valor total: 65,5 mU/epitélio (Tabela 2).

Ensaio da atividade de proteases foram realizados em gel de eletroforese. Foi possível verificar que após 24 horas de infecção houve redução da atividade desta enzima (Figura 17B), porém a atividade ainda estava presente no período de 48 horas embora bem menor quando comparada com larvas controle e infectadas por 12 horas.

As enzimas α -glicosidase e α -galactosidase apresentaram redução de suas atividades ao longo da infecção dos adultos de *D. peruvianus* com *P. temperata* K122. Ensaio enzimático mostraram que estas enzimas apresentam uma redução de aproximadamente 50% da atividade total, comparada com os insetos controle, no período de 24 horas, e permanecem com atividade residual no período de 48 horas de infecção, na faixa de 2 a 8% em V1 e V2. Em V3 / V4, estas enzimas apresentaram uma redução semelhante de aproximadamente 50% de sua atividade total nas primeiras 24 horas, mas mantiveram 15% de sua atividade no período de 48 horas de infecção (Tabela 3).

A atividade determinada para α -glicosidase em V1 nos insetos controle foi de 12 mU/epitélio. Com a infecção a atividade de α -glicosidase nesta região do intestino, apresentou atividade de 10 mU/epitélio nas primeiras 12 horas, 9 mU/epitélio no período de 18 horas de infecção, 7,7 mU/epitélio em 24 horas, 3,5 mU/epitélio nas 36 horas e com 48 horas pós-infecção a atividade residual foi de 0,83 mU/epitélio (Tabela 3).

A atividade de α -glicosidase em V2 nos insetos controle foi de 15 mU/epitélio, reduzindo levemente nas primeiras 18 horas para 12 mU/epitélio, e posteriormente decaídas para 8,2 mU/epitélio em 24 horas de infecção, para 6,4 mU/epitélio em 36 horas e para 1,0 mU/epitélio nas 48 horas de infecção (Tabela 3).

Em V3 / V4 a atividade encontrada nos insetos controle para α -glicosidase foi menor do que nas demais regiões do epitélio intestinal do *D. peruvianus*. Os insetos controle apresentaram atividade de 0,6 mU/epitélio. Com 18 horas de infecção a atividade é reduzida praticamente pela metade da atividade encontrada no inseto controle, caindo para 0,33 mU/epitélio. Com 24 horas reduziu-se para 0,2 mU/epitélio, com 36 horas de infecção, para 0,16 mU/epitélio e com 48 horas, a atividade residual foi de 0,09 mU/epitélio (Tabela 3).

A atividade de α -galactosidase determinada para os adultos controle de *D. peruvianus* foi, em V1, 2,5 mU/epitélio, em V2, 1,8 mU/epitélio e em V3, 1,2 mU/epitélio. Em V1, no período de 18 horas de infecção, a atividade encontrada foi de 1,7 mU/epitélio, com 24 horas foi de 1,4 mU/epitélio, em 36 horas foi de 1,2 mU/epitélio e em 48 horas, 0,2 mU/epitélio. Para V2 o valor obtido de atividade absoluta para 18 horas foi de 0,86 mU/epitélio, em 24 horas, 0,76 mU/epitélio, em 36 horas, 0,13 mU/epitélio e em 48 horas foi de 0,045 mU/epitélio. Em V3 os valores de atividade encontrados para 18 horas foi 0,6 mU/epitélio, para 24 horas foi 0,51 mU/epitélio, para 36 horas, 0,44 mU/epitélio e para 48 horas, 0,18 mU/epitélio (Tabela 3).

A atividade de aminopeptidase nos insetos adultos de *D. peruvianus* sofreu redução de 50% em 24 horas de infecção, apresentando em 48 horas 3,6 % da atividade total em V1, quando comparadas com o controle. Em V2 a redução de 50% foi no período de 36 horas, permanecendo 13 % da atividade no tempo de 48 horas. Em V3, após 36 horas, não foi mais possível detectar atividade aminopeptidásica (Tabela 3).

Os valores de atividade encontrados para aminopeptidase em V1 do epitélio intestinal de *D. peruvianus* foram: controle → 2,5 mU/epitélio, 12 horas → 1,6 mU/epitélio, 18 horas → 1,5 mU/epitélio, 24 horas → 1,1 mU/epitélio, 36 horas → 0,56 mU/epitélio, 48 horas → 0,09 mU/epitélio. Em V2 os valores das atividades foram: controle → 0,54 mU/epitélio, 12 horas → 0,52 mU/epitélio, 18 horas → 0,38 mU/epitélio, 24 horas → 0,36 mU/epitélio, 36 horas → 0,3 mU/epitélio e 48 horas → 0,07 mU/epitélio. Em V3 os valores obtidos foram: controle → 0,16 mU/epitélio, 12 horas → 0,15 mU/epitélio, 18 horas → 0,12 mU/epitélio, 24 horas → 0,1 mU/epitélio, 36 horas → 0,06 mU/epitélio e 48 horas → < 0,03 (Tabela 3).

Ao estudar o efeito da infecção sobre as atividades enzimáticas de α -glicosidase, α -galactosidase, sacarose hidrolases e proteases no *T. molitor* através de ensaios em gel de eletroforese semi-desnaturante, foi possível verificar que estas enzimas perdem suas atividades ao longo da infecção (Figura 18).

A partir da Figura 18A, foi possível verificar que as bandas de atividade sobre sacarose no controle e no horário de 12 horas foram bem parecidas. A partir de 18 horas houve uma redução da atividade, resultado semelhante ao encontrado em 24 horas e então, após 36 horas, a atividade não foi mais detectada em gel. Através de ensaios enzimáticos pode-se verificar que em 12 horas de infecção ainda foram detectadas 95% da atividade inicial encontrada no controle. Com 18 e 24 horas de infecção as porcentagens de atividades foram 90 e 86%. Os horários de 36 e 48 horas apresentaram atividades percentuais nos valores de 5,2% e 4,2% (Tabela 4).

Os valores de atividades da sacarose hidrolase encontrados para as larvas de *T. molitor* foram: controle → 210 mU/epitélio, 12 horas → 200 mU/epitélio, 18 horas → 190 mU/epitélio, 24 horas → 180 mU/epitélio, 36 horas → 11 mU/epitélio e 48 horas → 8,9 mU/epitélio (Tabela 4).

Os ensaios em gel para atividade de α -glicosidases de larvas de *T. molitor* mostraram 3 bandas de atividades sobre $\text{Mu}\alpha\text{Glu}$. As três enzimas tiveram suas atividades diminuídas ao longo da infecção, sendo que a enzima de menor migração eletroforética, $\text{Glu}3_{\text{T}}$, apresentou pouca atividade, dificultando sua avaliação. No entanto, pode-se perceber que com 48 horas de infecção não aparece sinal de atividade desta enzima. A enzima $\text{Glu}2_{\text{T}}$ sofreu uma redução de atividade logo nas primeiras 12 horas de infecção e passou a não ser mais detectada em gel a partir de 36 horas de infecção. A enzima $\text{Glu}1_{\text{T}}$ também sofreu redução significativa de sua atividade nas primeira 12 horas de infecção e no horário de 36 horas voltou a ter sua atividade reduzida. Esta enzima continuou apresentando atividade no período de 48 horas de infecção (Figura 18B).

Os valores obtidos a partir de ensaios enzimáticos em tubo mostraram em termos de porcentagem que nas primeiras 12 horas permanecem 92% da atividade total (34 mU/epitélio), com 18 horas foi 76% (28 mU/epitélio), com 24 horas foi 70% (26 mU/epitélio), com 36 horas foi 18% (6,7 mU/epitélio) e com 48 horas foi 11% (4,2 mU/epitélio) (Tabela 4).

O ensaio em gel para proteases de larvas de *T. molitor* controle e infectadas mostraram que a redução mais significativa das atividades ocorreu após 36 horas de infecção (Figura 18C).

A atividade sobre $\text{Mu}\alpha\text{Gal}$ foi ensaiada em gel, para detecção de α -galactosidasas. A partir das quatro bandas obtidas em gel de eletroforese pode-se verificar que a atividade destas enzimas permaneceu até o período de 24 horas de infecção; após este horário as atividades não são mais detectadas (Figura 18D). A partir dos ensaios enzimáticos em tubo pode-se verificar que com 12 horas de infecção havia 76% (19 mU/epitélio) da atividade total comparada ao controle (25 mU/epitélio), com 18 horas foi 68% (17 mU/epitélio), com 24 horas foi 56% (14 mU/epitélio), com 36 horas foi 19% (4,7 mU/epitélio), com 48 horas foi 5,2% (1,3 mU/epitélio) (Tabela 4).

As α -galactosidasas, α -glicosidasas e a sacarose hidrolase apresentaram uma redução de sua atividade enzimática em torno de 80% no período de 36 horas de infecção (Tabela 4).

O ensaio enzimático em tubo para atividade de α -amilases mostrou que esta enzima sofreu a redução mais significativa no horário de 36 horas pós-infecção, com atividade absoluta de 180 mU/epitélio correspondendo a 44 % da atividade total quando comparada com a atividade absoluta das larvas controle (410 mU/epitélio). No período de 48 horas de infecção apresentou 37% da atividade total, com uma atividade absoluta de 150 mU/epitélio (Tabela 4).

As atividades contra os substratos naturais mostraram resultados similares aos resultados obtidos com os substratos sintéticos. O interessante é que, no período em que os insetos começam a morrer (48 horas pós-infecção), todas as enzimas testadas continuam sendo detectadas no intestino (aproximadamente 5% da atividade total).

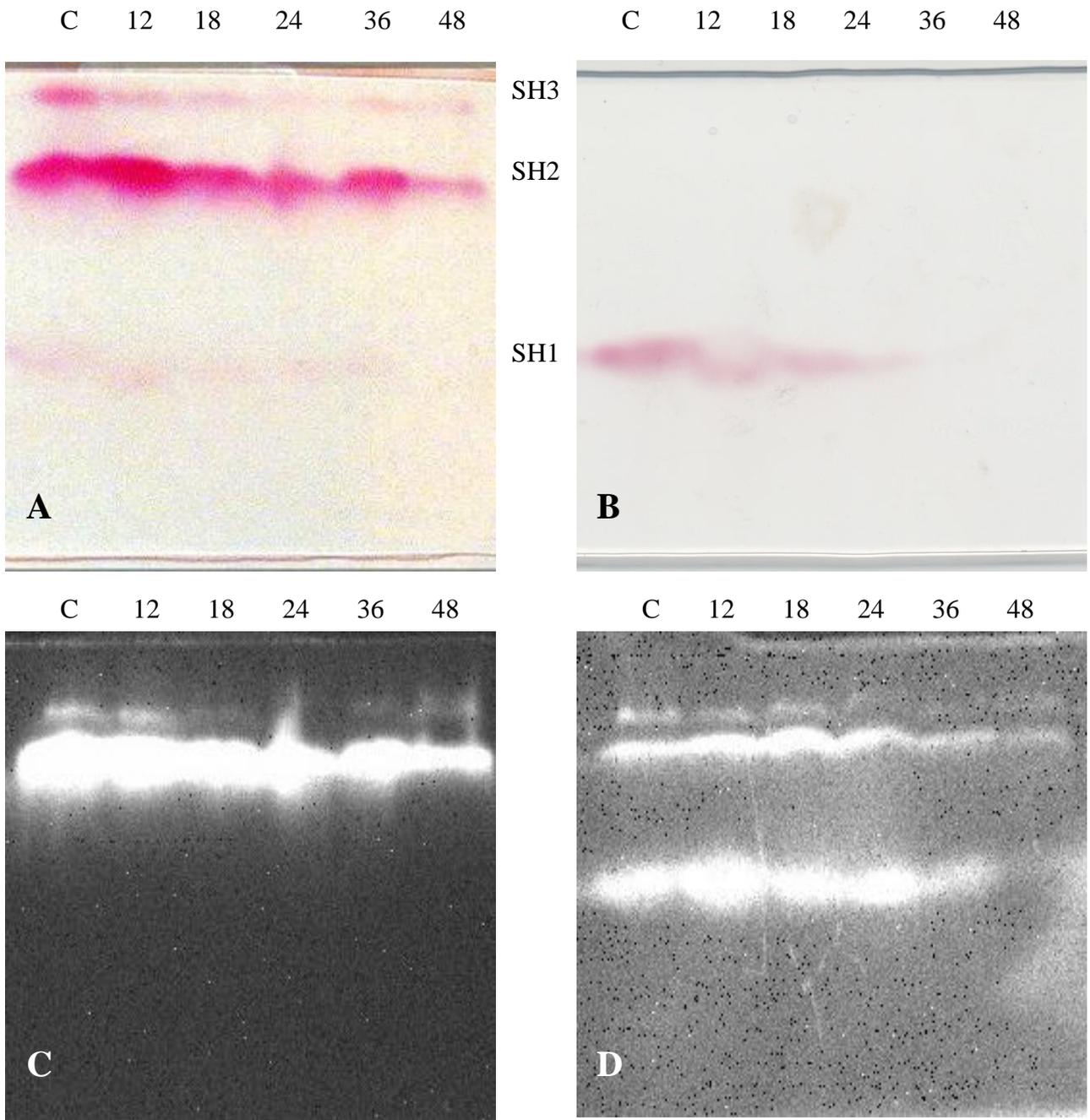


Figura 16: Efeito da infecção por *Photorhabdus temperata* K122 sobre as atividades das carboidrases de larvas do 4º instar da *Diatraea saccharalis*. As amostras foram sobrenadantes do homogeneizado do epitélio intestinal congelado de larvas controle (C) e infectadas por 12, 18, 24, 36 e 48 horas. A: O gel foi incubado com sacarose 0,5 M pH 7,0. B: Incubado com rafinose 0,5 M pH 7,0. As atividades de A e B foram reveladas com cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio 0,05 % a 100°C por 3 minutos. C: Incubado com MU α Glu 2 mM em pH 6,0. D: Incubado com MU α Gal 2 mM em pH 6,0. C e D foram fotografados através de luz UV. Todos os ensaios foram realizados a 30°C por 15 minutos.

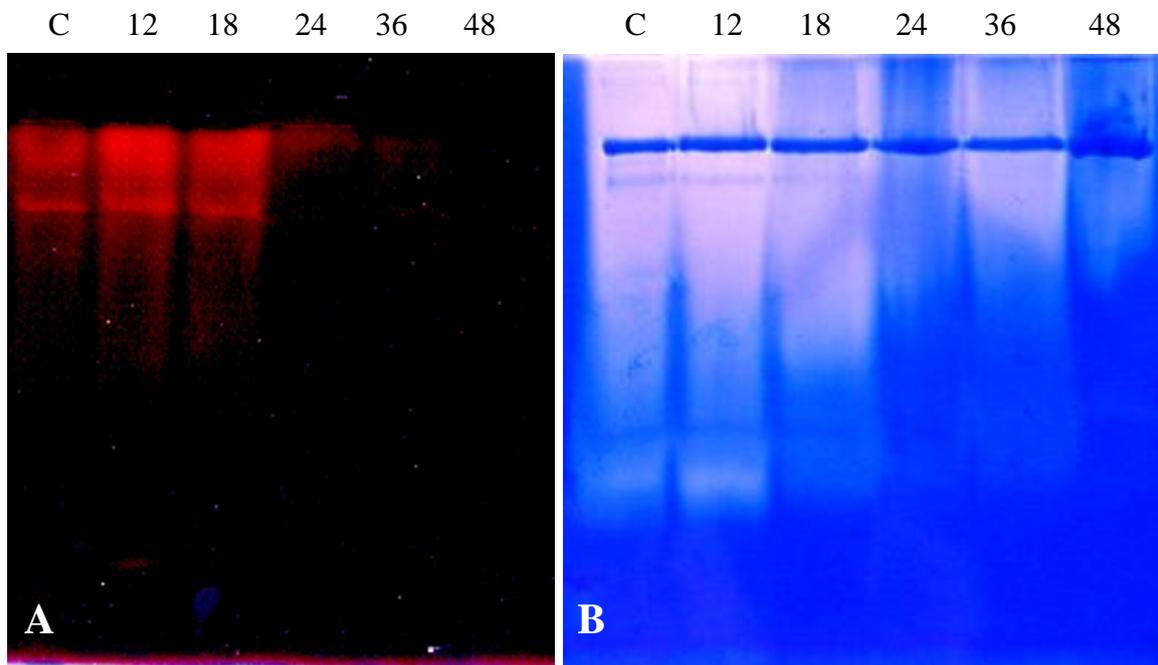


Figura 17: Efeito da infecção por *Photorhabdus temperata* K122 sobre as atividades das α -amilases e proteases de larvas do 4^o instar da *Diatraea saccharalis*. As amostras foram sobrenadantes do homogeneizado do epitélio intestinal congelado de larvas controle (C) e infectadas por 12, 18, 24, 36 e 48 horas. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em condições semi-desnaturantes, sem serem fervidas. A: O gel foi incubado em substrato/tampão [1% (m/v) amido de batata gelatinizada em tampão acetato 100 mM pH 6,0, NaCl 0,2mM, CaCl₂ 100 mM] e incubadas a 30°C por 30 minutos. A atividade amilolítica foi interrompida com uma solução corante [1,3% (m/v) I₂, 3% (m/v) KI]. As regiões claras indicam a presença de α -amilase ativa. B: As atividades de proteases foram detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina bovina 0,1%. O gel foi incubado em 100 mL de tampão de atividade proteolítica (glicina/NaOH 100 mM pH 8,6) durante 16 horas sob temperatura de 37°C. Foi corado com azul de Coomassie R 250 0,1% em solução de metanol/ácido acético/água destilada (4:1:5) por 1 hora e depois descorado. As áreas de proteólise aparecem no gel como zonas claras em contraste com o plano de fundo azulado.

Tabela 2: Atividades enzimáticas no intestino de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas com *Photorhabdus temperata* K122.

Substrato	Horas de infecção					
	Controle	12	18	24	36	48
MU α Glu	33 (256)	29,5 (209)	29 (124)	11,5 (85)	8 (55)	5 (27,5)
MU α Gal	46,5 (357)	45,5 (323)	17,5 (113)	12 (89)	10 (74)	4 (22,5)
Sacarose	711 (5470)	700 (4968)	522 (3383)	389 (2898)	211 (1520)	55,5 (289)
Rafinose	244 (1880)	116 (828)	83 (539)	67 (496)	39 (280)	22 (116)
Amido	313 (2558)	317,7 (2269)	305,5 (1984)	126,6 (945)	104,4 (756)	65,5 (371)

Os valores representam as atividades absolutas expressas como mU/epitélio e específicas (entre parênteses) expressas como mU/mg de proteína. Os valores médios foram calculados a partir de quatro ensaios de cada uma das cinco preparações contendo 10 animais. Os desvios padrões ficaram entre 5-20%.

Tabela 3: Atividades enzimáticas no intestino de larvas de *Dysdercus peruvianus* infectadas com *Photorhabdus temperata* K122.

Substrato	Horas de infecção					
	Controle	12	18	24	36	48
MUαGlu						
V1	12 (800)	10 (670)	9 (600)	7,7 (510)	3,5 (23)	0,83 (5,5)
V2	15 (1300)	13 (1100)	12 (1000)	8,2 (680)	6,4 (530)	1,0 (830)
V3 / V4	0,6 (7,1)	0,45 (5,4)	0,33 (4,0)	0,2 (2,4)	0,16 ((1,8)	0,09 (1,1)
MUαGal						
V1	2,5 (32)	2,2 (28)	1,7 (22)	1,4 (18)	1,2 (15)	0,2 (2,5)
V2	1,8 (30)	1,1 (16)	0,86 (14)	0,76 (11)	0,13 (1,3)	0,045 (0,7)
V3 / V4	1,2 (71)	0,7 (35)	0,6 (32)	0,51 (26)	0,44 (24)	0,18 (11)
LpNA						
V1	2,5 (32)	1,6 (20)	1,5 (19)	1,1 (14)	0,56 (7,2)	0,09 (1,2)
V2	0,54 (420)	0,52 (400)	0,38 (270)	0,36 (260)	0,3 (200)	0,07 (54)
V3 / V4	0,16 (76)	0,15 (71)	0,12 (55)	0,1 (36)	0,06 (20)	<0,03

Os valores representam as atividades absolutas expressas como mU/epitélio e específicas (entre parênteses) expressas como mU/mg de proteína. Os valores médios foram calculados a partir de quatro ensaios de cada uma das cinco preparações contendo 20 animais. Os desvios padrões ficaram entre 5-20%.

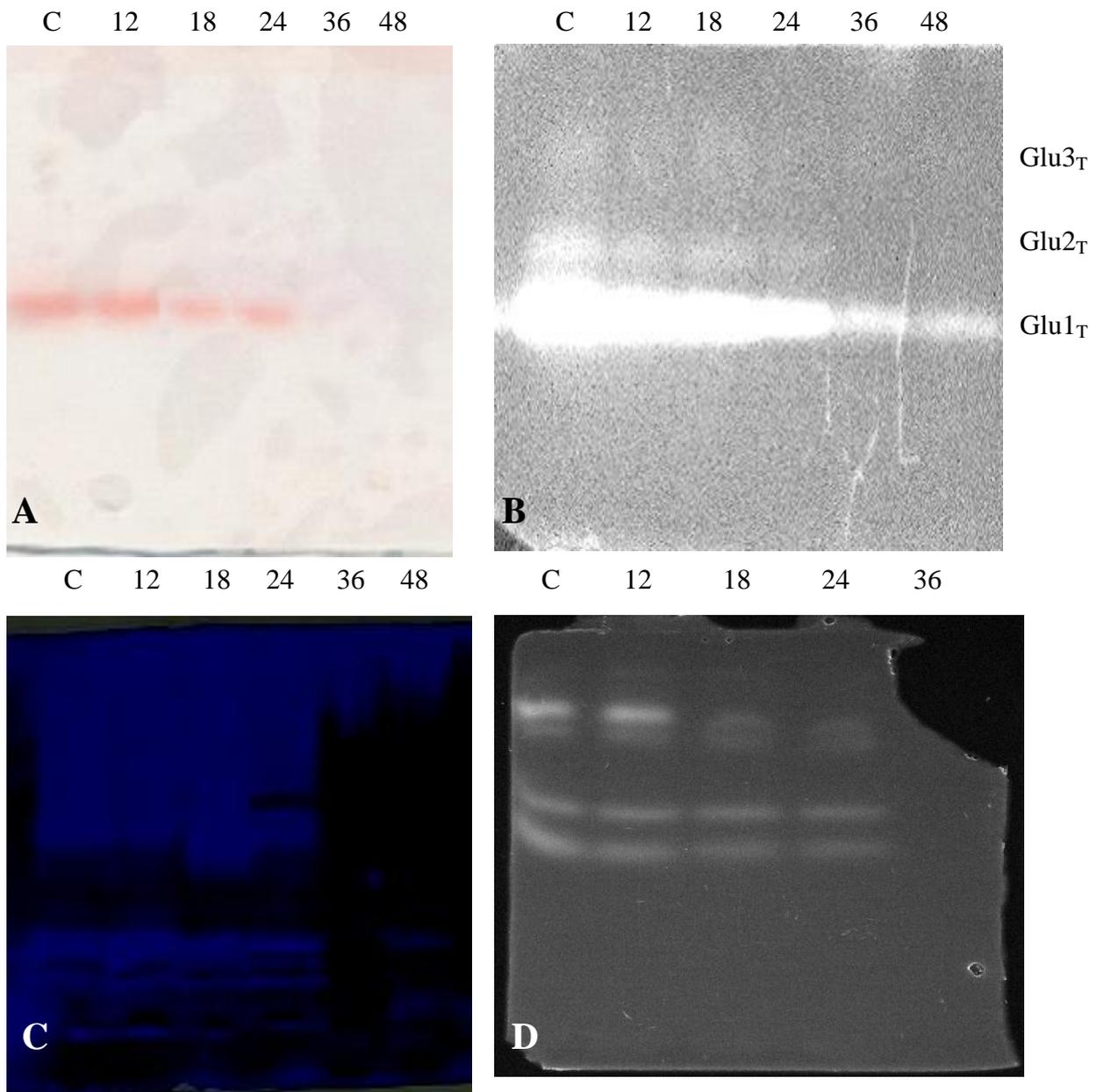


Figura 18: Efeito da infecção por *Photorhabdus temperata* K122 sobre as atividades das carboidrases e proteinases de larvas do 4^o instar da *Tenebrio molitor*. As amostras foram sobrenadantes do homogeneizado do epitélio intestinal congelado de larvas controle (C) e infectadas por 12, 18, 24, 36 e 48 horas. Os géis foram de poliácridamida 12% semi-desnaturantes. A: Gel foi incubado com sacarose 0,5 M pH 7,0. B: Incubado com MU α Glu 2 mM em pH 6,0. C: As atividades de proteases em gel copolimerizado com gelatina bovina 0,1%, incubado com tampão de atividade proteolítica (glicina/NaOH 100 mM pH= 8,6). D: Incubado com MU α Gal 2 mM em pH 6,0. Os ensaios com sacarose, MU α Glu e MU α Gal foram realizados a 30°C por 15 minutos.

Tabela 4: Atividades enzimáticas no intestino de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Photorhabdus temperata* K122.

Substrato	Horas de infecção					
	Controle	12	18	24	36	48
MU α Glu	37 (730)	34 (710)	28 (580)	26 (540)	6,7 (14)	4,2 (8,8)
MU α Gal	25 (490)	19 (400)	17 (350)	14 (290)	4,7 (9,8)	1,3 (2,7)
Sacarose	210 (410)	200 (410)	190 (400)	180 (380)	11 (23)	8,9 (19)
Amido	410 (800)	370 (770)	350 (730)	340 (710)	180 (380)	150 (310)

Os valores representam as atividades absolutas expressas como mU/epitélio e específicas (entre parênteses) expressas como mU/mg de proteína. Os valores médios foram calculados a partir de quatro ensaios de cada uma das cinco preparações contendo 10 animais. Os desvios padrões ficaram entre 5-20%.

4.8 - Descrição da biologia da infecção dos insetos com *Photorhabdus temperata* K122 através de microscopia

Em larvas de *D. saccharalis* infectadas por 18 horas com *P. temperata* K122, foi possível verificar que haviam muitos hemócitos aderidos à lâmina basal que recobria o epitélio intestinal (Figuras 19A e 19B). Fotografias tiradas no microscópio eletrônico de varredura mostraram que em alguns locais a lâmina basal apresentava uma protuberância (Figura 19C) que sugeriam ser colônias de bactérias localizadas logo abaixo da lâmina basal (Figura 19D). Havia bactérias aderidas à superfície da lâmina basal (Figuras 19D e 19E). Nota-se na Figura 19D que as bactérias que estão aderidas à superfície da lâmina basal são mais alongadas e mais estreitas quando comparadas com o formato das bactérias que estão abaixo da lâmina basal. As colônias de bactérias foram visualizadas próximas aos músculos longitudinais (Figura 19C).

Com 24 horas pós-infecção foi possível observar, por microscopia eletrônica de varredura, um aumento da população bacteriana presente nas colônias localizadas abaixo da lâmina basal (Figuras 20A, 20B, 20C e 20D). Novamente apareceram bactérias aderidas à superfície da lâmina basal, e estas eram mais alongadas e estreitas do que o formato que aparentavam as que estavam abaixo da lâmina basal (Figura 20E). Por microscopia luminosa pode-se observar que as bactérias estão localizadas entre a membrana basal e a lâmina basal do epitélio intestinal e que as bactérias não invadiram as células do epitélio, apesar de estarem de alguma maneira associadas a elas (Figura 20F).

Após 36 horas de infecção pode-se observar por microscopia eletrônica de varredura que o epitélio intestinal estava completamente revestido pelas colônias que se localizam abaixo da lâmina basal (Figura 21). A superfície do intestino neste horário estava toda irregular (Figura 21A), tendo uma aparência bem diferente da característica observada no horário de 18 horas (Figura 19C). A distinção dos músculos longitudinais agora é mais difícil devido ao crescimento das bactérias logo abaixo da lâmina basal (Figuras 21B e 21D). É possível visualizar na lâmina basal que reveste os músculos que abaixo dela existem colônias bacterianas (Figuras 21B e 21D). As bactérias estavam mais visíveis, como se a lâmina basal estivesse mais fina, permitindo a melhor visualização da bactéria (Figura 21C).

Ao observar o intestino de larvas de *D. saccharalis* infectadas por 48 horas com a bactéria *P. temperata* por microscopia eletrônica de varredura, foi possível detectar que a população bacteriana aumentou, envolvendo todo o intestino por um biofilme bem compacto (Figura 22). Esta população bacteriana estava aparente, sem estar revestida pela lâmina basal (Figura 22C) e as bactérias começam a organizar um biofilme bem compacto em torno do intestino mergulhado em uma massa semelhante a uma teia de aparência clara (Figura 22B). Nota-se que este biofilme recobria o intestino e que aparentemente a lâmina basal ainda estava intacta contendo colônias de bactéria abaixo dela (Figuras 22B). Todo o intestino estava revestido por este biofilme, sendo que na região anterior (Figura 22A) o biofilme estava mais espesso do que na região posterior (Figura 22D).

O intestino de adultos de *D. peruvianus* infectadas por *P. temperata* K122 por 18 horas apresentou resultados semelhantes aos que foram visualizados com as larvas de *D. saccharalis*. Através de microscopia eletrônica de varredura e por microscopia luminosa pode-se observar que as bactérias estão localizadas abaixo da lâmina basal (Figuras 23A e 23 B), mais exatamente entre a lâmina basal e a membrana basal do epitélio; as bactérias não invadiram as células epiteliais (Figuras 23C e 23D) e as bactérias estão em regiões próximas às traquéias (Figuras 23A, 23B, 23C e 23D). Com 24 horas de infecção foi observado por microscopia eletrônica de varredura que a superfície do epitélio intestinal apresentava uma série de elevações tal qual as vistas com *D. saccharalis* (Figura 24A) e que nestas regiões encontravam-se colônias e bactérias abaixo da lâmina basal (Figura 24B). Estas bactérias que se encontravam entre a lâmina basal e a membrana basal não invadiam as células epiteliais (Figuras 24C e 24D). Pelas Figuras 24A e 24C pode-se observar que as colônias estavam próximas às traquéias e entre os músculos longitudinais (Figura 24A). Com 36 horas de infecção o intestino apresenta a lâmina basal com mais elevações (Figura 25A) do que no horário de 24 horas (Figura 24A). Isto ocorreu devido ao aumento do número de bactérias nas colônias localizadas abaixo da lâmina basal (Figura 25B). As bactérias que se encontravam nestas colônias tinham sua forma mais visível através da lâmina basal neste período de infecção (Figuras 25C e 25D). Na Figura 25D foi possível visualizar uma colônia próxima a região onde a traquéia penetra no epitélio intestinal.

Em larvas de *T. molitor* infectadas por 18 horas com *P. temperata* K122, pode-se verificar por microscopia eletrônica de varredura que na região anterior do epitélio intestinal haviam bactérias localizadas abaixo da lâmina basal e também aderidas à superfície desta lâmina (Figuras 26A, 26D e 26E). Algumas colônias foram observadas próximas às traquéias (Figuras 26B, 26C, 26D e 26E). Por microscopia luminosa e eletrônica de transmissão pode-se perceber que elas não estavam causando danos à membrana basal e aos músculos do epitélio intestinal neste período de infecção (Figura 26C) e que as colônias se localizavam entre a lâmina basal e a membrana basal (Figuras 26C e 26F). Com 24 horas de infecção observou-se que as bactérias estavam recobrando a superfície do intestino por um biofilme mergulhado numa teia, semelhante à observada em *D. saccharalis* (Figuras 27A, 27B, 27C e 27D). Na região anterior o biofilme recobria praticamente todo o epitélio, na região posterior o biofilme estava se formando. Podia-se ainda observar a lâmina basal em alguns trechos (Figura 27A e 27B). Através de microscopia eletrônica de transmissão pode-se perceber que as bactérias apresentavam vacúolos no seu interior, correspondendo à região circular clara (Figuras 27C e 27D).

Após 36 horas de infecção foi possível verificar por microscopia eletrônica de varredura e microscopia luminosa que o biofilme estava muito mais espesso (Figura 28A) recobrando todo o epitélio intestinal mergulhado numa “teia”, a mesma visualizada com 24 horas, só que agora mais compacta (Figuras 28B e 28D). Na Figura 28C observou-se o biofilme formado na superfície do epitélio e as células do intestino, aparentemente, intactas, sem haver desprendimento delas e sem alterações no tecido muscular do epitélio. A região posterior também estava tomada pelo biofilme bacteriano, só que nesta região, o biofilme estava menos compacto, mais estreito, sendo possível visualizar em algumas regiões o epitélio intestinal logo abaixo do biofilme (Figuras 29A e 29B). Com 36 horas de infecção não é possível mais observar o epitélio intestinal tamanha era a espessura do biofilme bacteriano, que agora estava recobrando todo o intestino, anterior e posterior (Figuras 30A, 30B e 30C). No período de 48 horas pós-infecção o intestino está todo recoberto por um espesso e compacto biofilme bacteriano (Figura 30A). As bactérias estão organizadas nesta região compacta, mergulhadas numa teia e não se vêem mais bactérias isoladas, como se observou no começo da infecção (Figuras 30B e 30C).

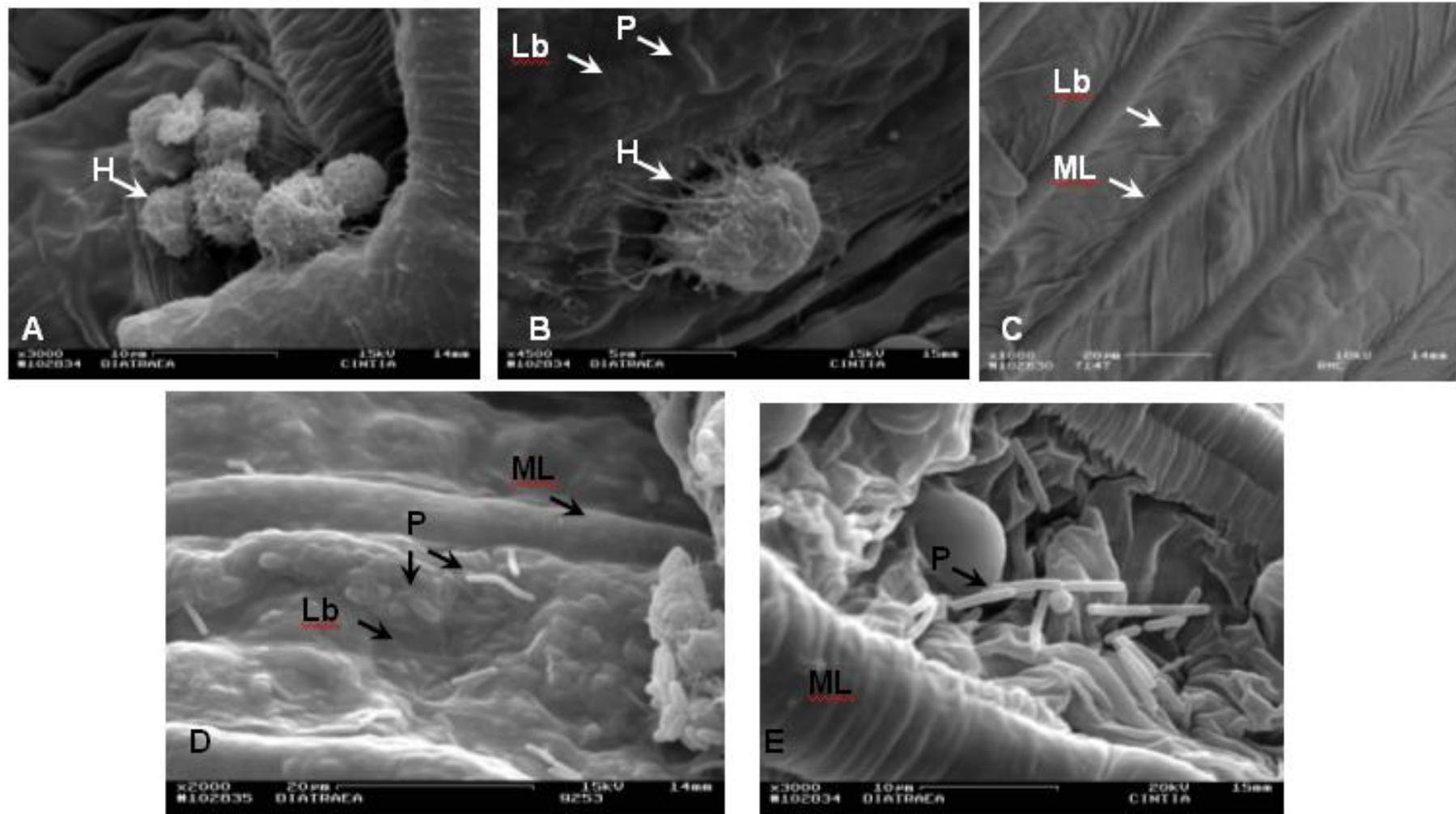


Figura 19: Foto de microscopia eletrônica de varredura de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas por *Photorhabdus temperata* K122, 18 horas de infecção. A, B: Hemócitos aderidos à lâmina basal do epitélio intestinal. C e D: Bactérias localizadas abaixo da lâmina basal do epitélio e por fora dela, e E: Bactérias aderidas na superfície da lâmina basal do intestino. *Photorhabdus* (P), lâmina basal (Lb), músculo longitudinal (ML), hemócitos (H).

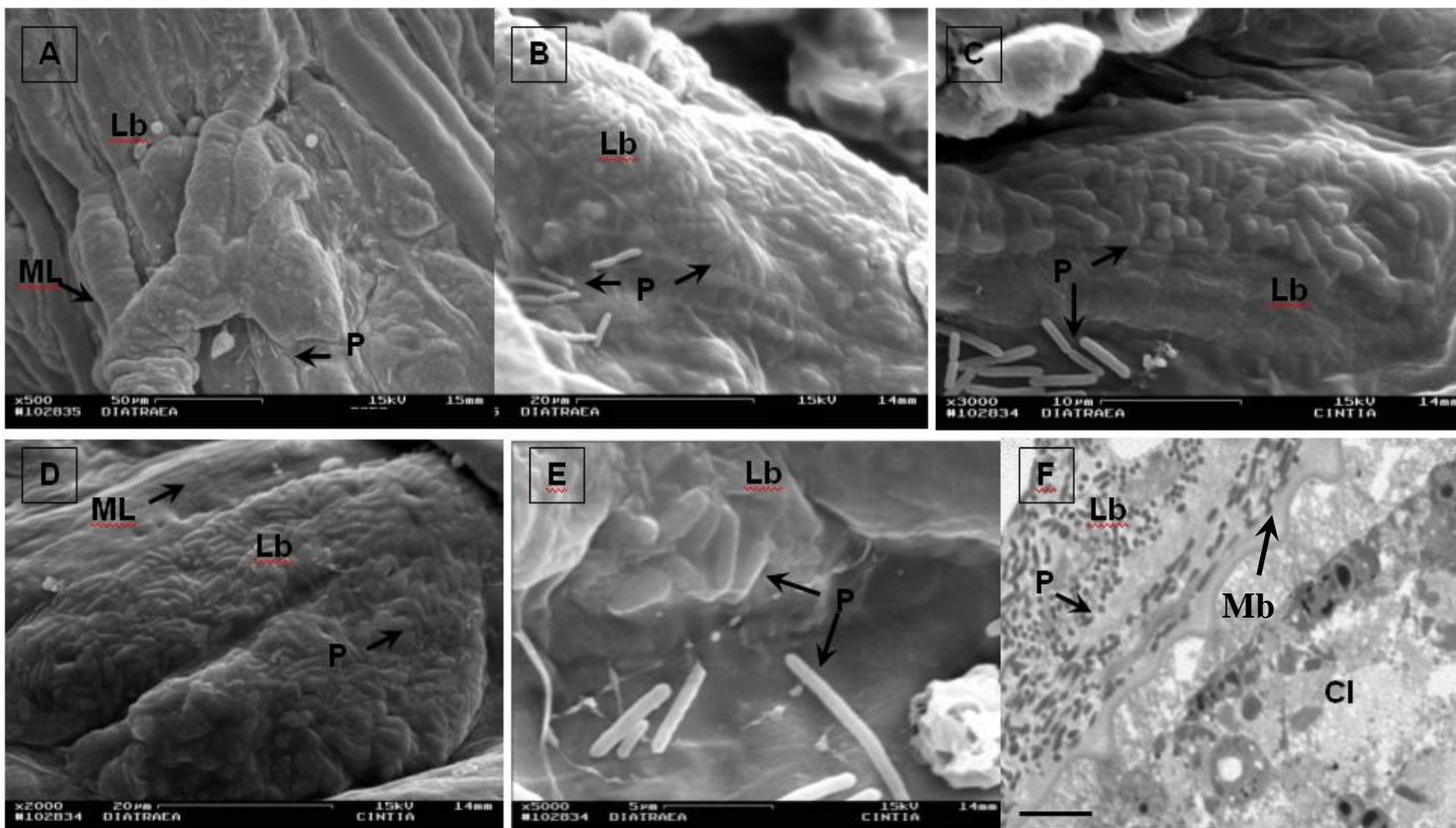


Figura 20: Foto de microscopia do intestino de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas por *Photorhabdus temperata* K122, 24 horas de infecção. A, B, C, D e E: Bactérias localizadas abaixo da lâmina basal do epitélio intestinal através de microscopia eletrônica de varredura e B, C, E: Bactérias também aparecem acima da lâmina basal. F: Bactérias localizadas entre a lâmina basal e a membrana basal do intestino vistas através cortes transversais semi-finos em microscopia luminosa; barra 10 μm . *Photorhabdus* (P), lâmina basal (Lb), músculo longitudinal (ML), células intestinais (CI), membrana basal (Mb).

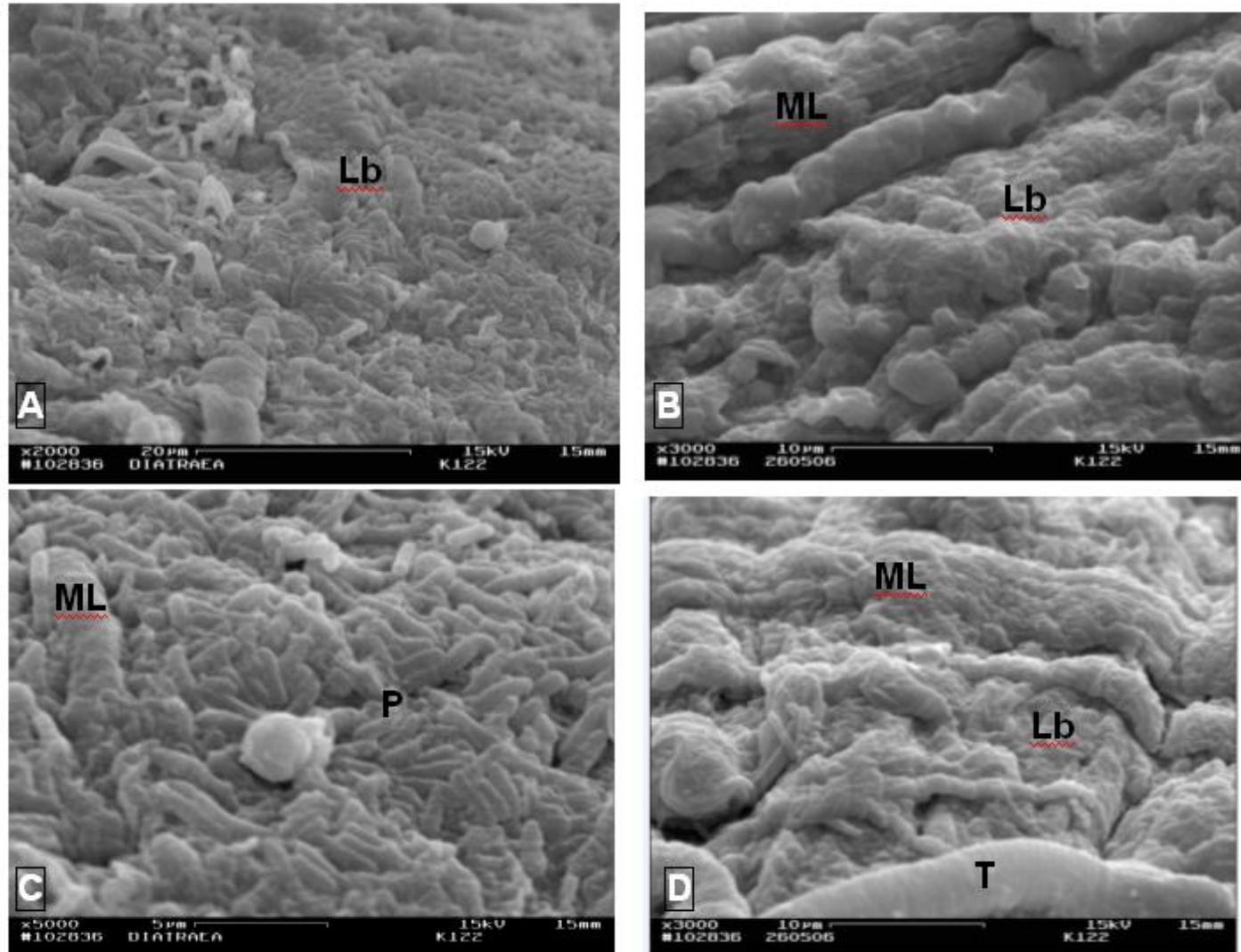


Figura 21: Foto de microscopia eletrônica de varredura do intestino de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas por *Photorhabdus temperata* K122, 36 horas de infecção. A, B, C e D: Bactérias localizadas abaixo da lâmina basal do epitélio. Lâmina basal (Lb), traquéia (T), bactéria (P), músculo longitudinal (ML).

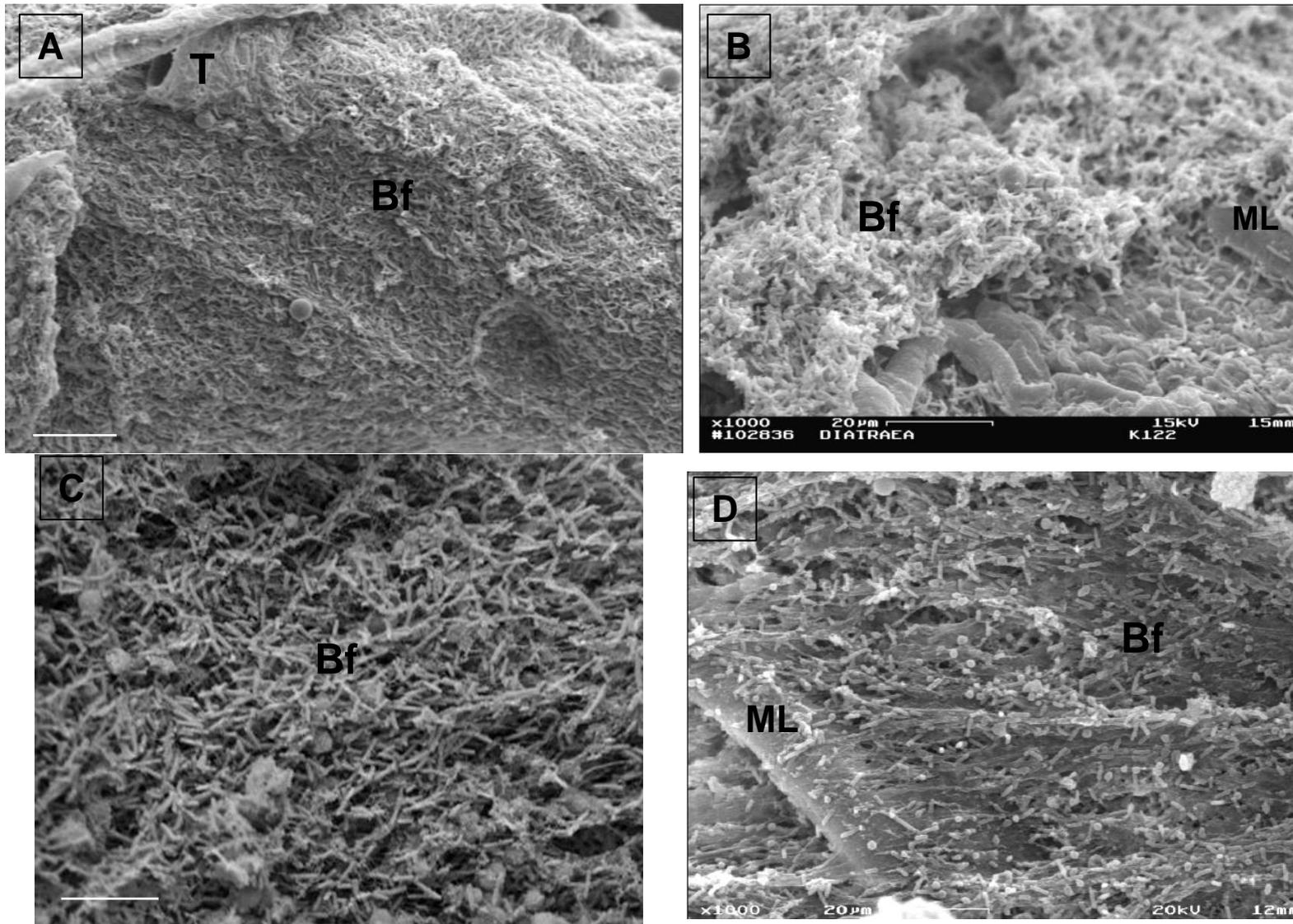


Figura 22: Foto de microscopia eletrônica de varredura do intestino de larvas de *Diatraea saccharalis* infectadas por *Photorhabdus temperata* K122, 48 horas de infecção. A, B e C: Biofilme bacteriano presente na superfície do epitélio intestinal. região anterior. D: Biofilme bacteriano na região posterior do intestino. A: barra = 10 μ m e C: 5 μ m. Biofilme de bactérias (Bf), traquéia (T), músculo longitudinal (ML).

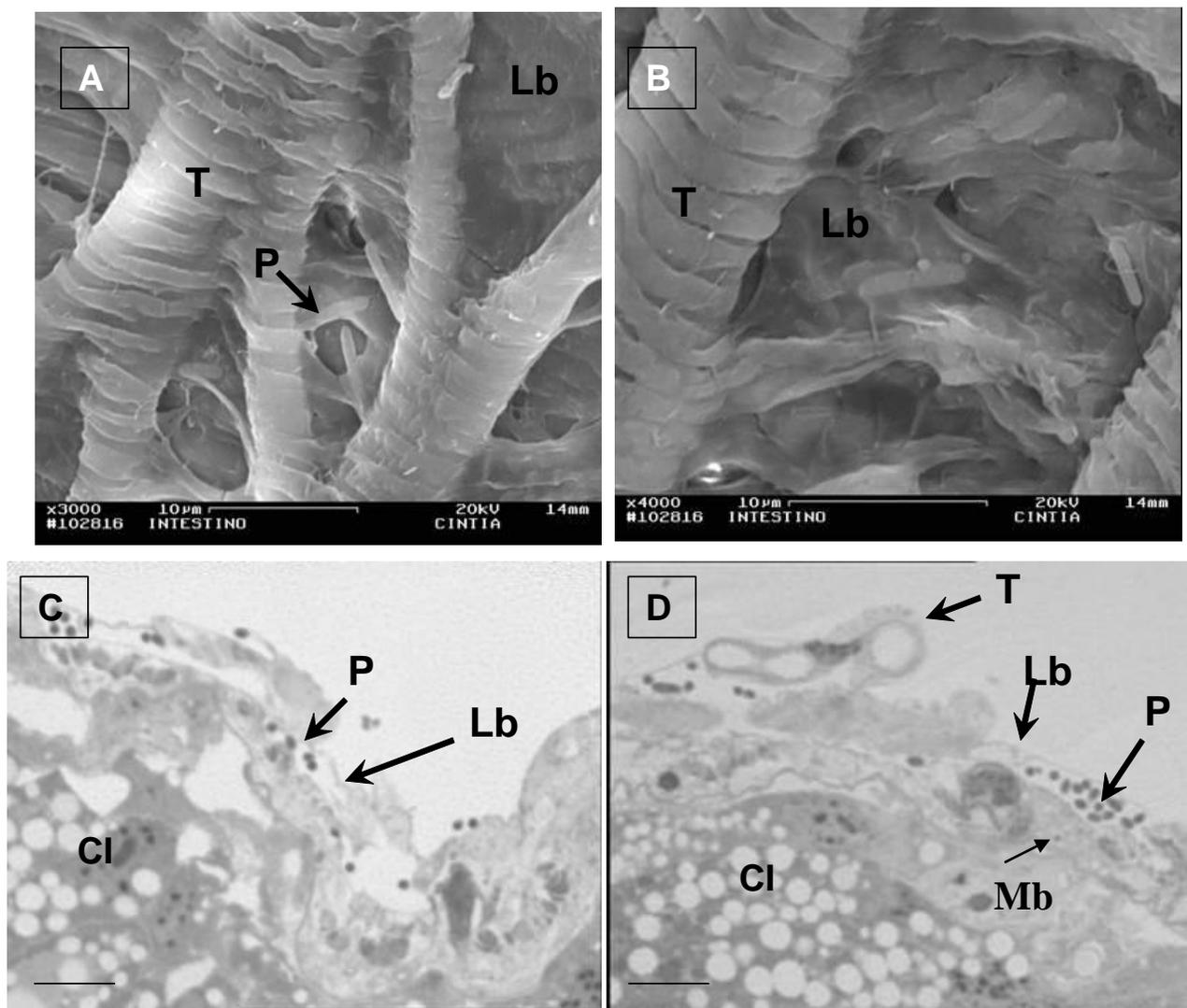


Figura 23: Fotografias do intestino de *Dysdercus peruvianus* infectados por 18 horas por *Photorhabdus temperata* K122. A e B: Microscopia eletrônica de varredura; bactérias aparecem logo abaixo da lâmina basal. C e D: Cortes transversais semi-finos em microscopia de luz. Barra 10 μm. Bactérias estão entre a membrana externa do epitélio e membrana basal. Lâmina basal (Lb), *Photorhabdus* (P), células do intestino (CI), traquéia (T), membrana basal (Mb).

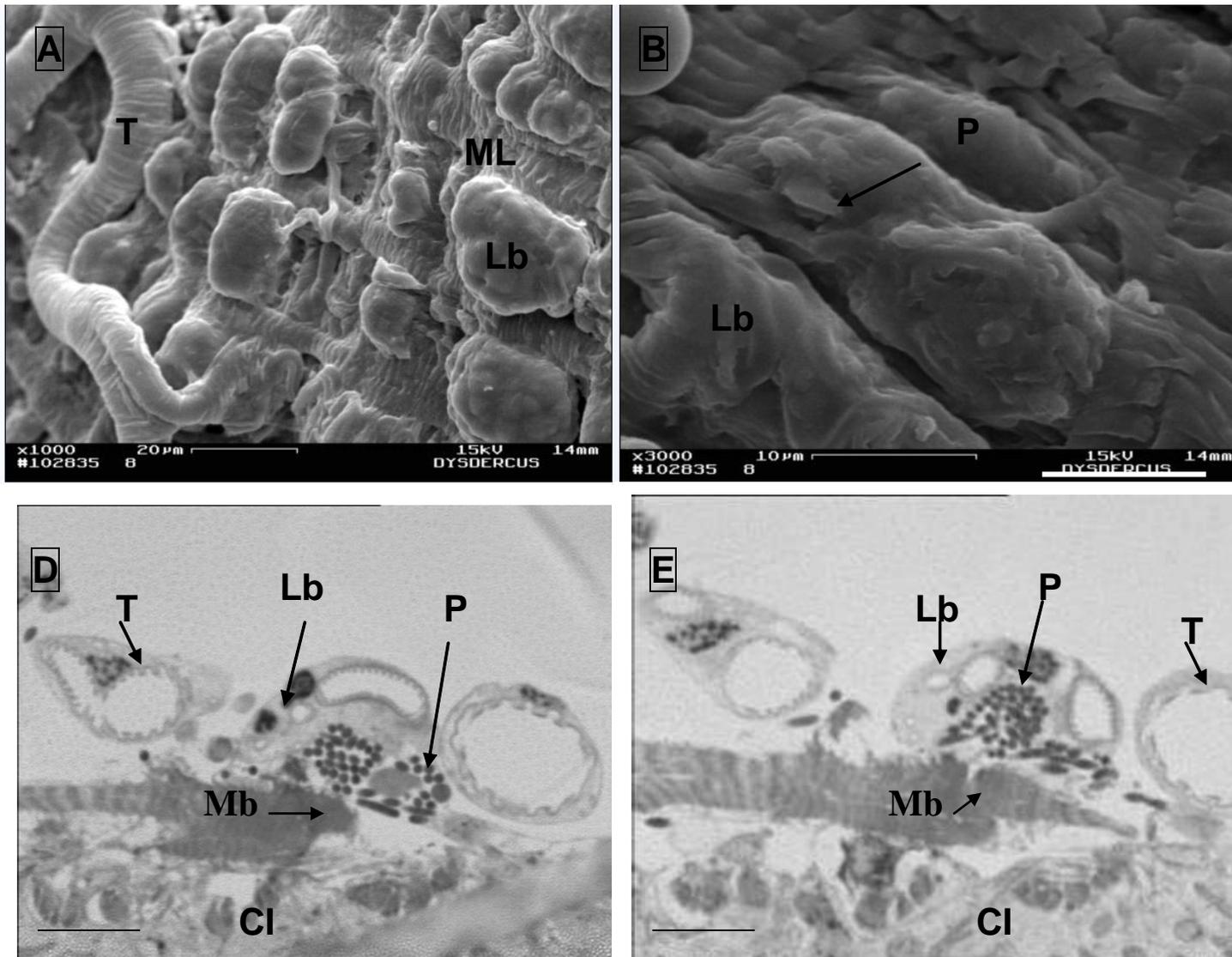


Figura 24: Fotografias do intestino de *Dysdercus peruvianus* infectado com *Photorhabdus temperata* K122 por 24 horas. A, B e C: bactérias estão entre a lâmina basal e a membrana basal; microscopia eletrônica de varredura. D e E: cortes semi-finos transversais do intestino visualizadas em microscópio luminoso. Barra 5 μm. Traquéia (T), lâmina basal (Lb), *Photorhabdus* (P), células do intestino (CI), membrana basal (Mb).

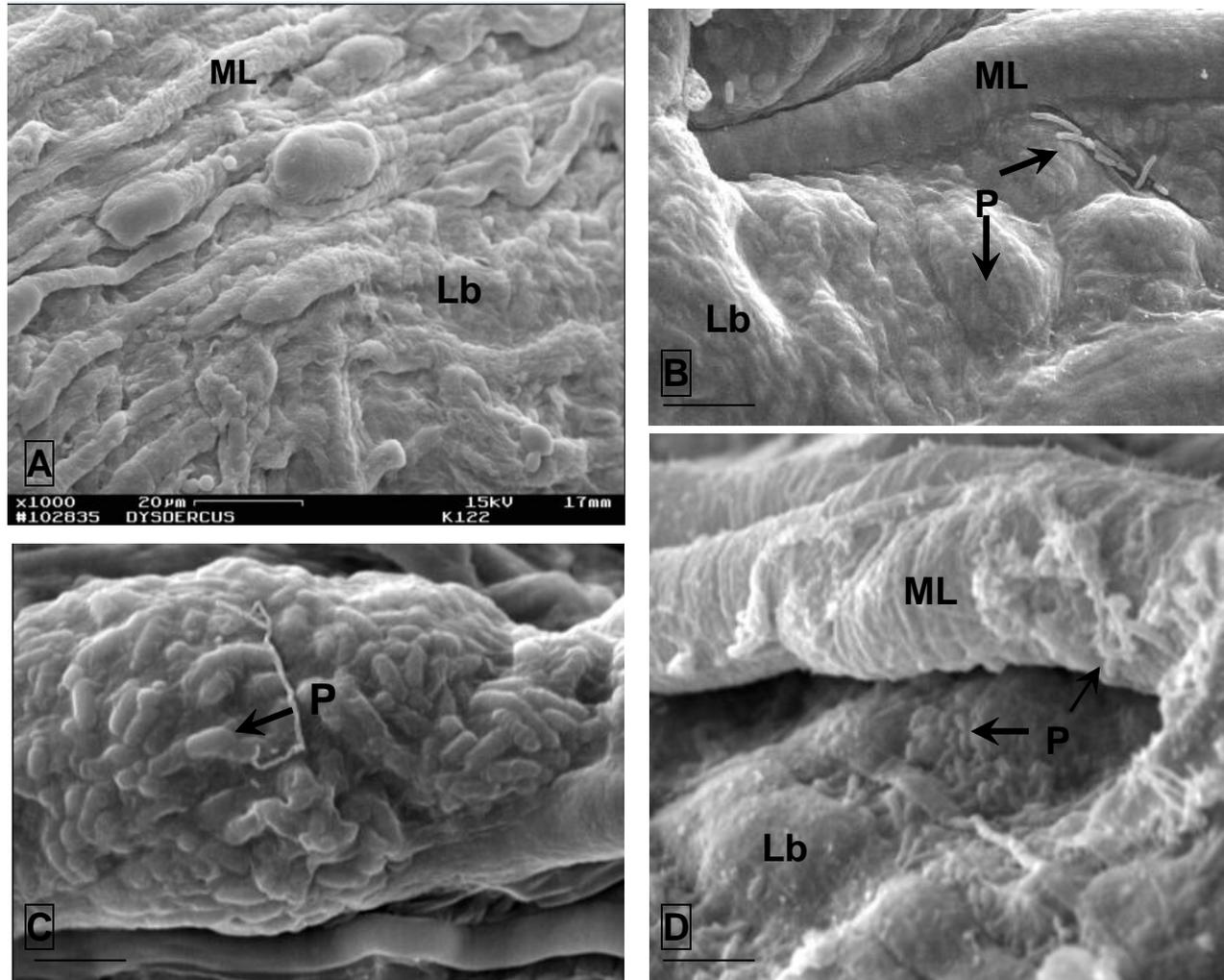


Figura 25: Fotografia de microscopia eletrônica de varredura do intestino de adultos de *Dysdercus peruvianus* infectados com *Photorhabdus temperata* K122 por 36 horas. A: Visão geral da superfície do intestino. B: Bactérias na superfície e abaixo da lâmina basal. C: Colônia de bactérias abaixo da lâmina basal. D: Colônia de bactérias próximas a um músculo longitudinal. B e D: Barra 5 μm, C: Barra 2 μm. *Photorhabdus* (P), músculo longitudinal (ML), lâmina basal (Lb).

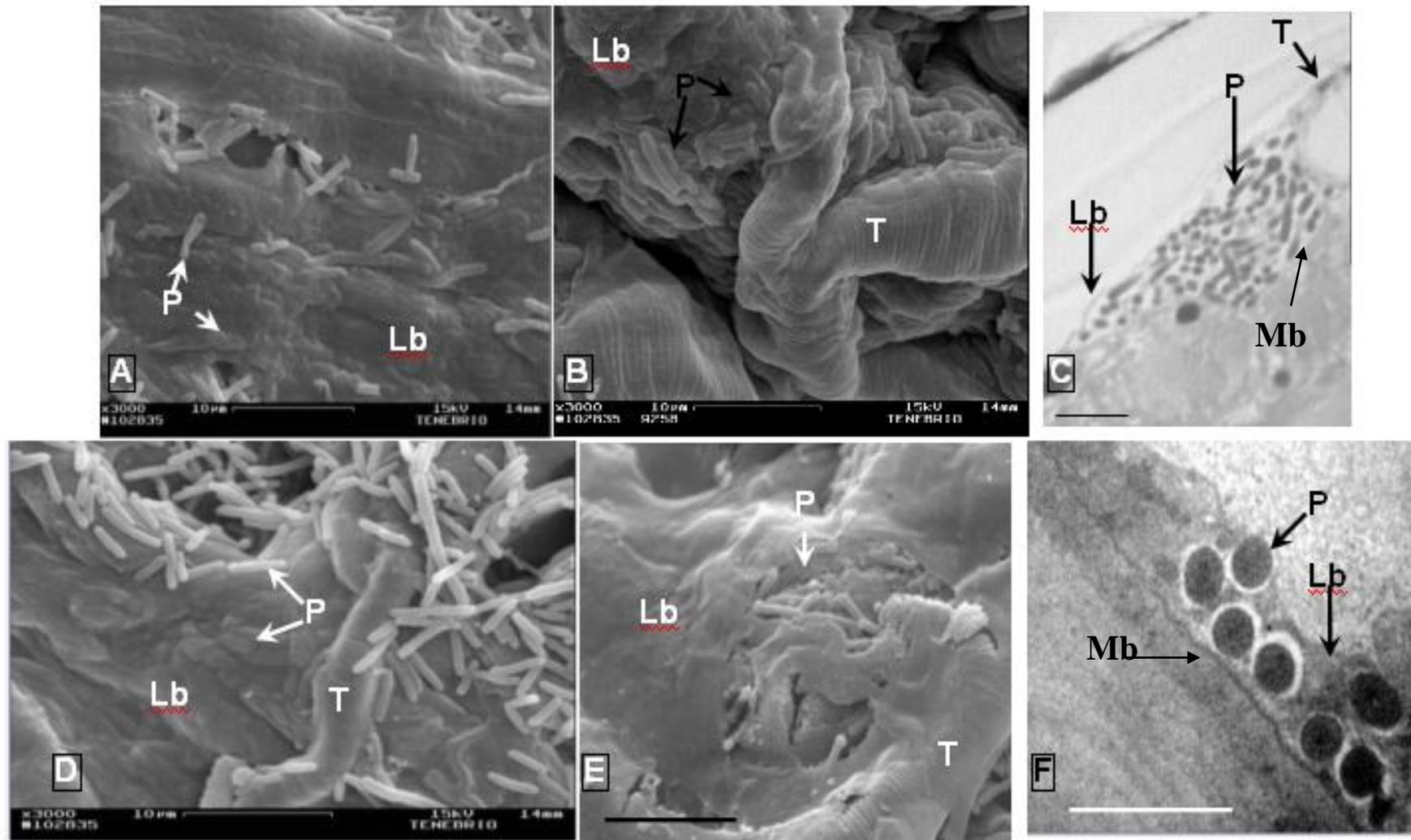


Figura 26 : Fotografias de microscopia do intestino de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por *Photorhabdus temperata* K122, 18 horas de infecção. A, B, D e E: Bactérias sobre a superfície do epitélio intestinal, região anterior, e abaixo da lâmina basal. C: Bactérias localizadas entre a lâmina basal e a membrana basal. F: Bactérias sobre a superfície externa do intestino, visualizadas a partir de cortes transversais em microscópio eletrônico de transmissão. C e F: 5 μ m. Lâmina basal (Lb), *Photorhabdus* (P), traquéia (T), membrana basal (Mb).

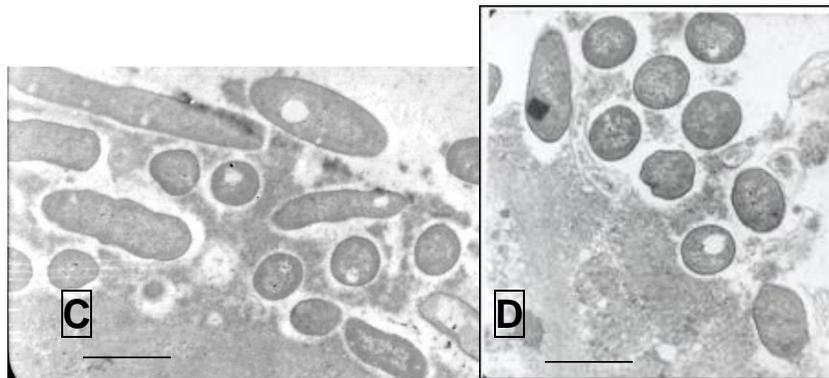
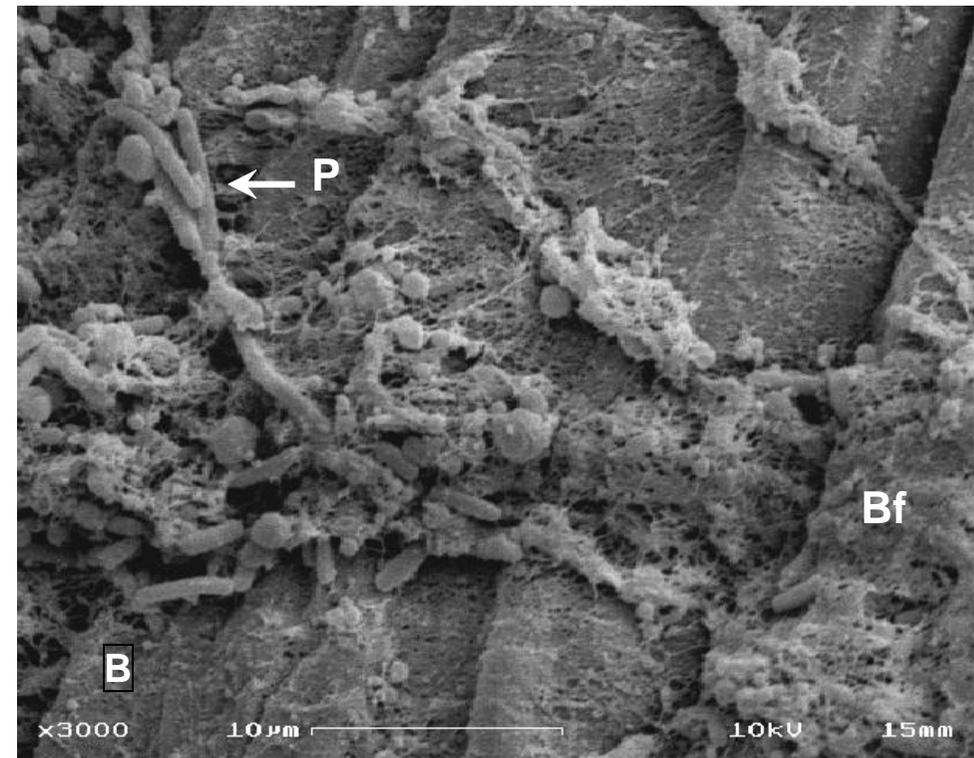
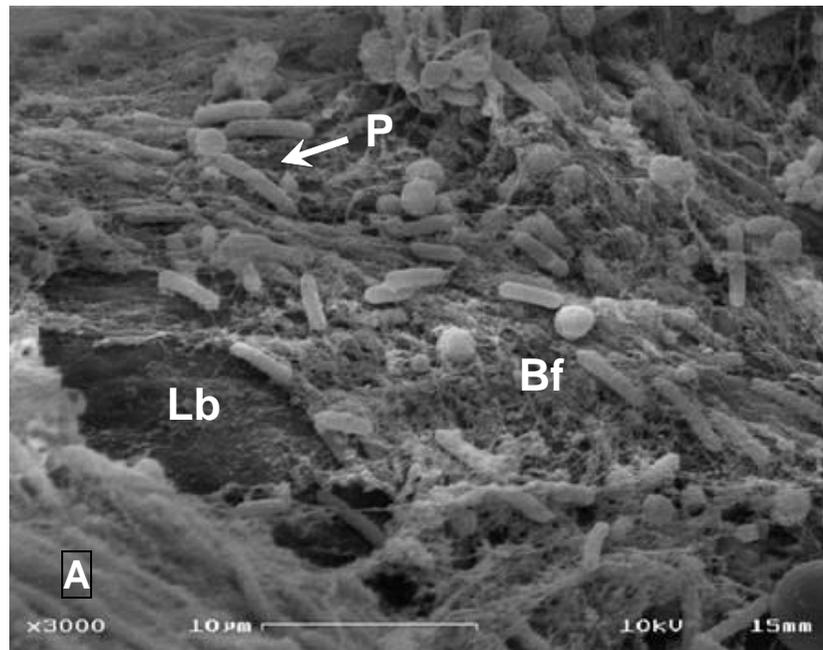


Figura 27: Fotografias de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Photorhabdus temperata* K122, 24 horas de infecção. A e B: Fotos de microscopia eletrônica de varredura do intestino. A: Região anterior do intestino. B: Região posterior do intestino. C e D: Foto de microscopia eletrônica de transmissão de cortes transversais ultra-finos do intestino. Barra 2 μm . Biofilme bacteriano (Bf), lâmina basal (Lb), *Photorhabdus* (P).

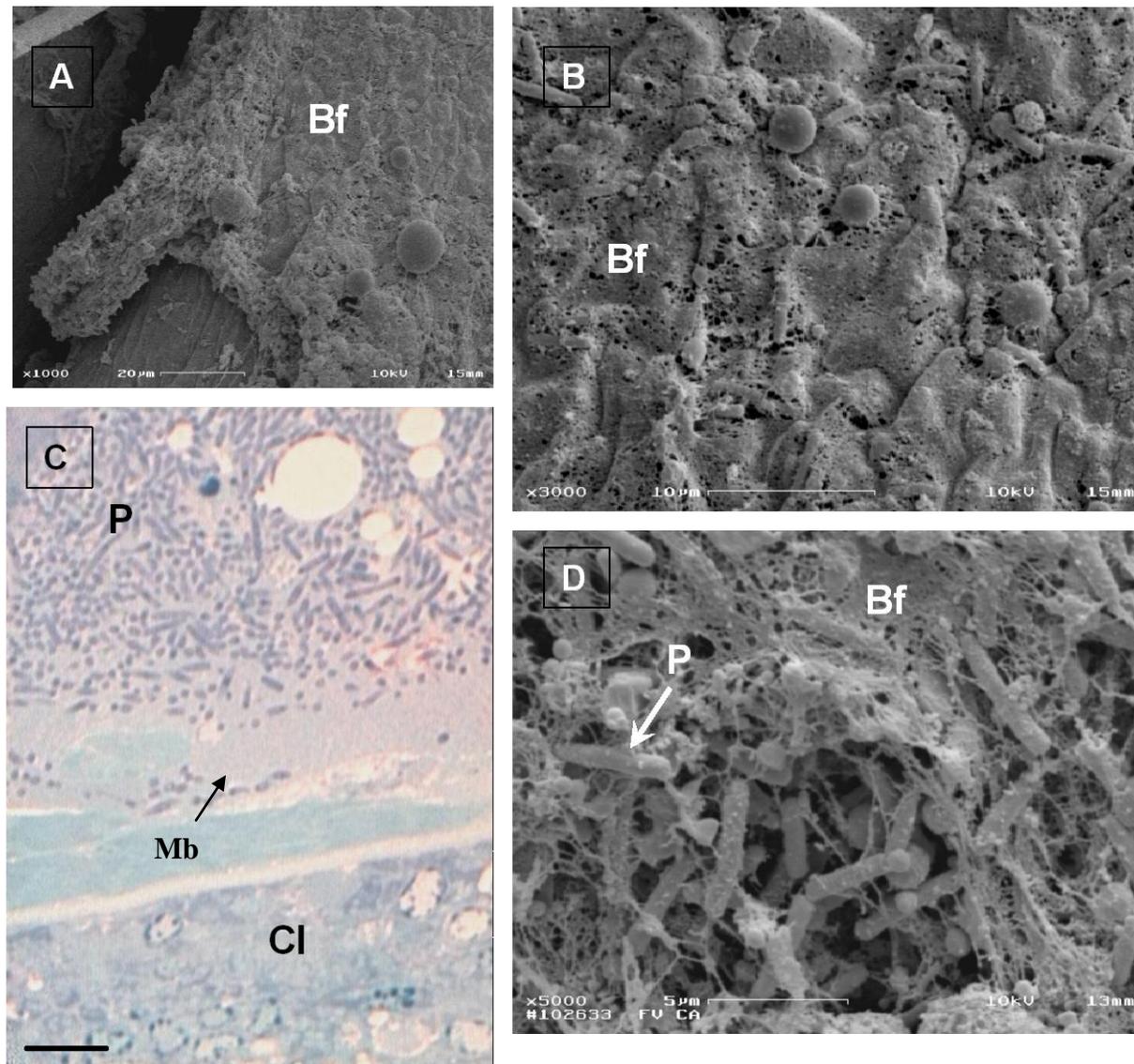


Figura 28: Fotografia da região anterior do intestino de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por 36 horas por *Photorhabdus temperata* K122. A, B e D: fotografias de microscopia eletrônica de varredura mostrando um biofilme de bactérias envolvendo o epitélio intestinal. C: Foto de cortes transversais semi-finos em microscopia de luz. Barra 20 μ m. *Photorhabdus* (P), biofilme (Bf) e células intestinais (CI), membrana basal (Mb).

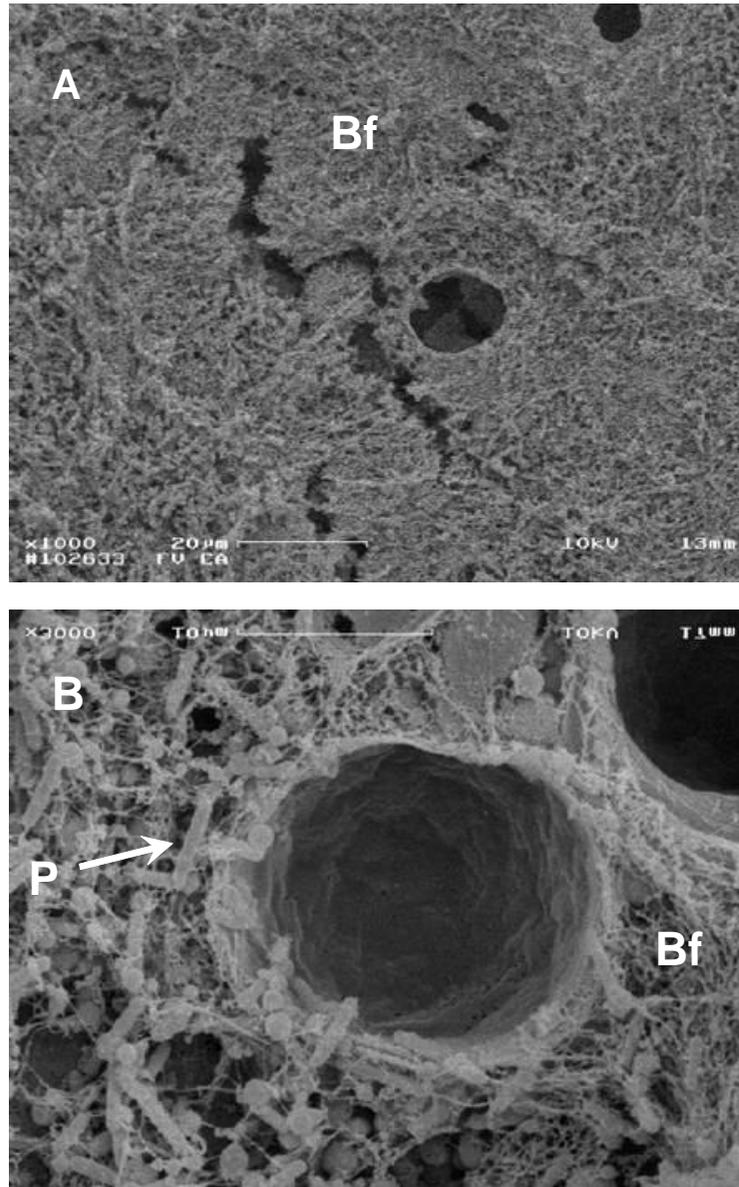


Figura 29: Foto de microscopia eletrônica de varredura da região posterior do intestino de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Photorhabdus temperata* K122 por 36 horas. A, B: Biofilme de bactérias envolvendo o epitélio intestinal. Biofilme (Bf), *Photorhabdus* (P).

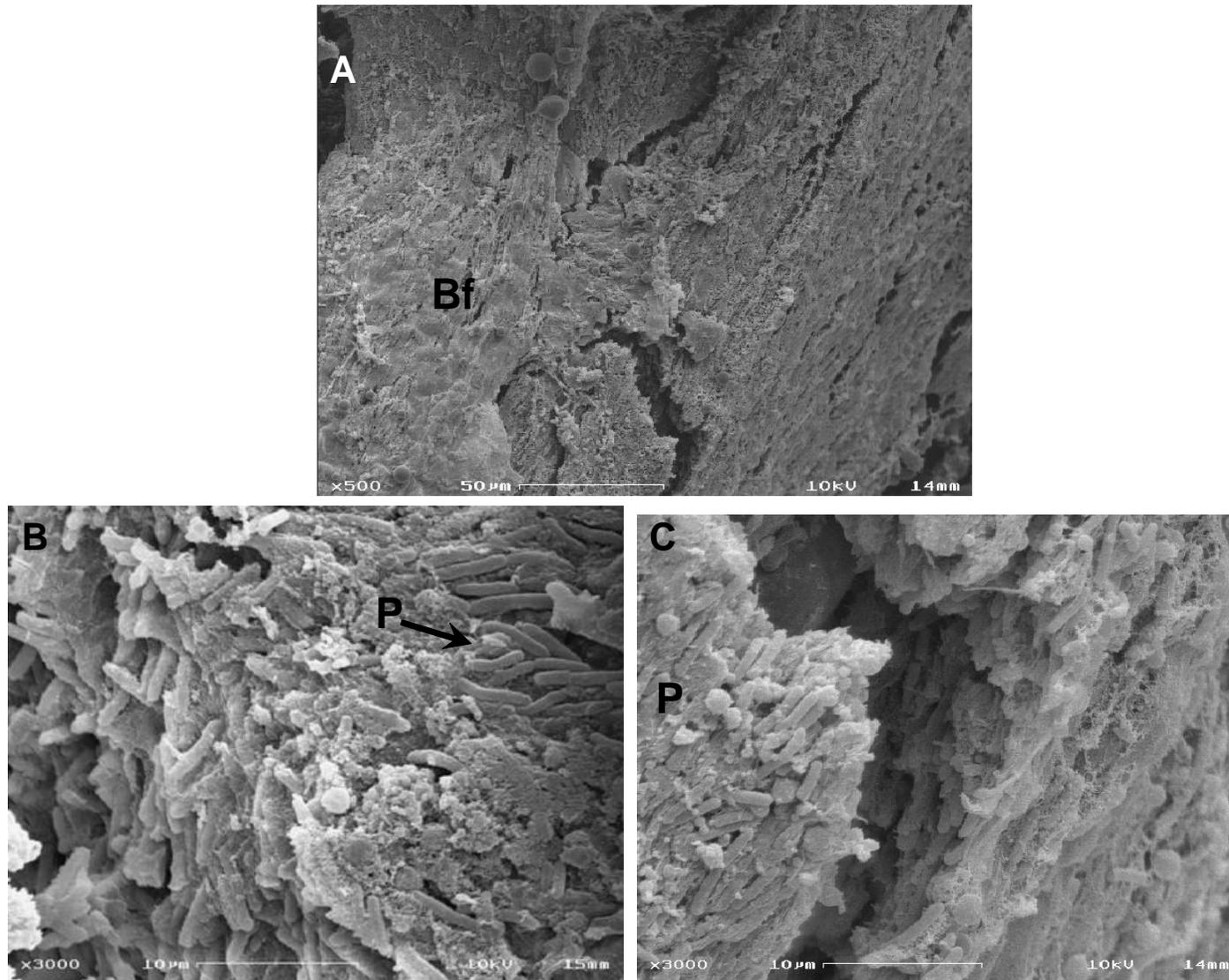


Figura 30: Foto de microscopia eletrônica de varredura do intestino de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Photorhabdus temperata* K122 por 48 horas. A, B e C: Biofilme espesso de bactérias na superfície do intestino. *Photorhabdus* (P), biofilme (Bf).

4.9 - Microrganismos isolados do conteúdo luminal dos insetos

O conteúdo luminal coletado das larvas de *D. saccharalis*, dos adultos de *D. peruvianus* e das larvas de *T. molitor* foi inoculado em meio de cultura caldo BHI para o crescimento dos microrganismos residentes nesta região do intestino. A diferenciação das espécies foi realizada segundo métodos padrões de diagnóstico microbiano (Garcia *et al.*, 1998): diferenças morfológicas nas colônias em agar APC coloração de Gram (Figura 31), motilidade e exigência atmosférica.

Uma espécie de levedura e sete de bactérias foram isoladas do conteúdo luminal das larvas de *D. saccharalis* (Figura 31). Suas características estão descritas a seguir:

- As colônias de levedura apresentaram 1,5 mm de diâmetro em agar APC, coloração levemente amarelada, elevadas, brilhosas, circulares. A levedura mostra reprodução por brotamento e formato oval em microscópio de luz (Figura 31A).

- Estafilococos, Gram-negativos (Figura 31B), imóveis, aeróbicos, crescem bem em agar APC apresentando colônias elevadas com diâmetro 1 mm, coloração bege, brilhosas, circulares, coloração do centro levemente mais acentuada do que as extremidades. Também houve crescimento em agar manitol, mas não desenvolveram em agar EMB.

- Bactéria na forma de cocos, arranjo tetrade, Gram-positivos (Figura 31C), imóveis, aeróbicas, crescem em agar APC apresentando colônias circulares com diâmetro 1 mm, levemente elevadas, coloração bege, brilhosas, centro apresenta coloração mais acentuada do que as extremidades. Cresceram em agar manitol e não se desenvolvem em agar EMB.

- Bacilos, formadores de esporos, arranjo tipo paliçada, Gram-positivos (Figura 31D), móveis, aeróbicos, crescem em agar APC com colônias levemente elevadas de diâmetro 4 mm, coloração bege, opacas, formatos irregulares, coloração no centro mais acentuada do que nas extremidades, aspecto superficial rugoso. Não cresceu em agar manitol e nem em agar EMB.

- Bacilos capazes de esporular, isolados, Gram-positivos, móveis, aeróbicos, crescem em agar APC com diâmetro de 6 mm, levemente elevadas, coloração bege, opacas, formatos irregulares, centro apresentando ondulações, aspecto superficial rugoso. Não crescem nem em agar manitol e nem em EMB (Figura 31E).

- Bacilos capazes de esporular isolados, Gram-positivos, móveis, aeróbicos, crescem em agar APC com colônias de diâmetro em torno de 6 mm, elevadas, umbilicadas, coloração bege, opacas, formatos irregulares. Não crescem nem em agar manitol e nem em EMB (Figura 31F).

- Bacilos capazes de esporular, paliçada, Gram-positivos, móveis, aeróbicos, crescem em agar APC com colônias de diâmetro de 4 mm, plana, coloração bege, opacas, formatos irregulares, aspecto granuloso na superfície. Não crescem em agar manitol e nem em EMB (Figura 31G)

- Bastões, isolados, Gram-negativos, móveis, anaeróbicos facultativos, crescem em agar APC com colônias de diâmetro menor que 1 mm, elevadas, coloração bege, brilhosas, formatos circulares. Não cresceram em agar manitol mas cresceram em agar EMB (Figura 31H).

Foram isoladas 6 espécies de bactérias do conteúdo luminal de adultos de *D. peruvianus* são eles:

- Estafilococos, Gram-negativos, aeróbicos, móveis, crescem em agar APC com colônias de cor bege, elevadas, brilhosas, superfície lisas, tamanho 2 mm, formato circulares. Crescem em agar manitol mas não crescem em agar EMB (Figura 32A).

- Bacilos, Gram-positivos, imóveis, anaeróbicos facultativos, crescem em agar APC, colônias de cor bege, opacas, planas, superfície aneladas, tamanho 4 mm, formato irregular. Não crescem em agar manitol e nem em agar EMB (Figura 32B).

- Estafilococos, Gram-positivos, aeróbicos, móveis, crescem em agar APC com colônias de cor rosa, elevadas, brilhosas, superfície lisa, tamanho 5 mm, formato circular. Crescem em agar manitol mas não crescem em agar EMB (Figura 32C).

- Estafilococos, Gram-positivos, aeróbicos, móveis, crescem em agar APC com colônias de cor branca, levemente elevadas, opacas, superfície rugosa, tamanho 1mm, formato irregular. Crescem em agar manitol mas não crescem em agar EMB (Figura 32D).

- Cocos Gram-positivos isolados, anaeróbicos facultativos, imóveis, crescem em agar APC com colônias amarelas, elevadas, brilhosas, superfície lisa e tamanho 2 mm. Crescem em agar manitol mas não crescem em agar EMB (Figura 32E).

- Bacilos, Gram-positivos, formadores de esporo, aeróbicos, imóveis, crescem em agar APC com colônias amarelas, umbelicadas, opacas, superfície rugosa, tamanho 4 mm. Não crescem nem em agar manitol e nem em agar EMB (Figura 32F).

Em larvas de *T. molitor* foram isolados do conteúdo luminal 8 microrganismos são eles:

- Bastões, Gram-negativos, paliçada, anaeróbicos facultativos, móveis, crescem em agar APC com colônias bege nas bordas e centro branco, irregulares, superfície lisa, brilhosas, tamanho 2 mm. Não crescem em agar manitol e crescem em agar EMB (Figura 33A).

- Estafilococos Gram-positivos, aeróbicos, móveis, crescem em agar APC com colônias bege, elevadas, circulares, brilhosas, superfície lisa, tamanho 4 mm. Não crescem em agar EMB e crescem em agar manitol (Figura 33B).

- Bastões Gram-negativos, isolados, anaeróbicos facultativos, móveis, crescem em agar APC com colônias bege, brilhosas, planas, irregulares, superfície lisa, 7 mm. Não crescem em agar manitol e crescem em EMB (Figura 33C).

- Bastões, Gram-negativos, isolados, anaeróbicos facultativos, móveis, crescem em agar APC com colônias brancas, brilhosas, umbelicadas, superfície lisa, irregular 3 mm. Não crescem em agar manitol e crescem em EMB (Figura 33D).

- Bastões, Gram-negativos, paliçada, anaeróbicos facultativos, móveis, crescem em agar APC com colônias brancas, brilhosas, elevadas, superfície lisa, circular, 1mm. Crescem em EMB e não crescem em manitol (Figura 33E).

- Bastões, Gram-negativos, paliçada, anaeróbicos facultativos, móveis, crescem em agar APC com colônias brancas, brilhosas, planas, superfície anelada, irregulares e diâmetro de 4 mm. Crescem em EMB e não crescem em agar manitol (Figura 33F).

- Leveduras, ovais, anaeróbicas facultativas, crescem em agar APC com colônias brancas, opacas, elevadas, superfície irregular, irregulares e diâmetro de 3 mm. Não crescem nem em agar manitol nem em EMB (Figura 33G).

- Bacilos, Gram-positivos, isolados, formadores de esporos deformantes terminais, aeróbicos, imóveis, crescem em agar APC com formação de colônias amarelas, opacas, planas, superfície lisa, irregulares e diâmetro de 2mm. Não crescem nem em agar manitol e nem em EMB (Figura 33H).

Os microrganismos isolados em placas de agar APC foram submetidos ao crescimento em caldo BHI e posteriormente foram utilizados para ensaios de substâncias anti-microbianas produzidas pela *P. temperata* e liofilizados para posterior identificação.

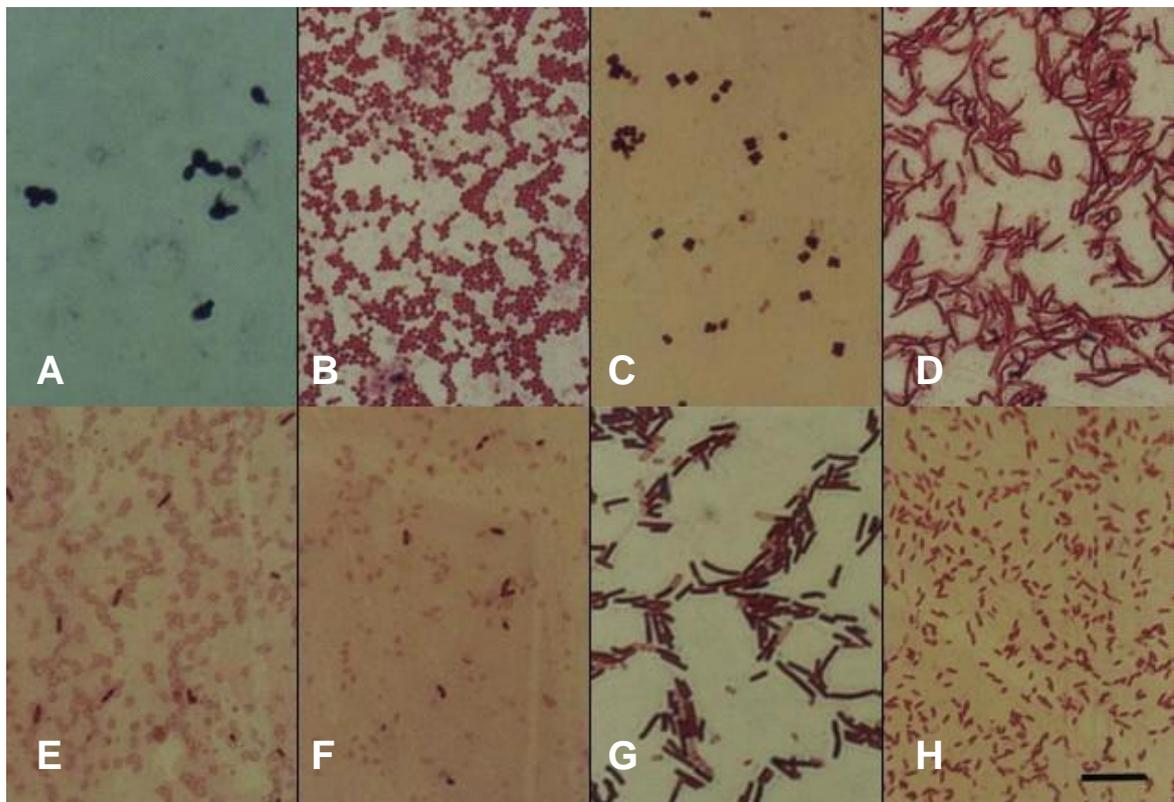


Figura 31: Caracterização morfológica dos microrganismos isolados do intestino de larvas de *Diatraea saccharalis*. Imagem fotografada em microscópio de luz dos microrganismos corados pelo método de Gram. Esfregaços preparados a partir de cultura de 24 horas de incubação em agar A.P.C. Barra 10 μ m. A: levedura, B: Estafilococo, C: Cocos, D, E, F, G, H: Bacilos.

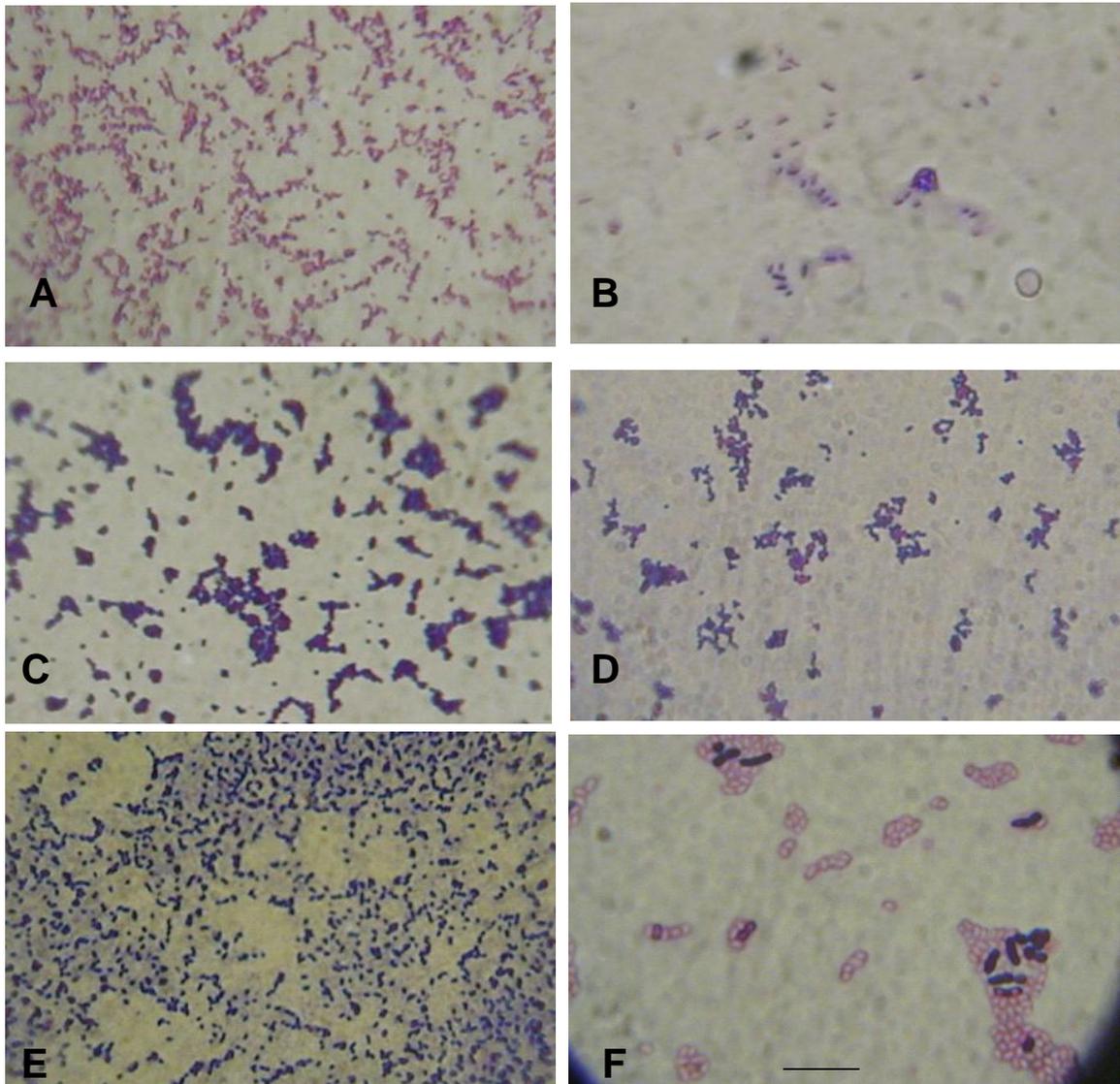


Figura 32: Caracterização morfológica dos microrganismos isolados do intestino de larvas de *Dysdercus peruvianus*. Imagem fotografada em microscópio de luz dos microrganismos corados pelo método de Gram. Esfregaços preparados a partir de cultura de 24 horas de incubação em agar APC. A, C e D: Estafilococos. B e F: Bacilos. E: Cocos isolados. Barra 5 μm .

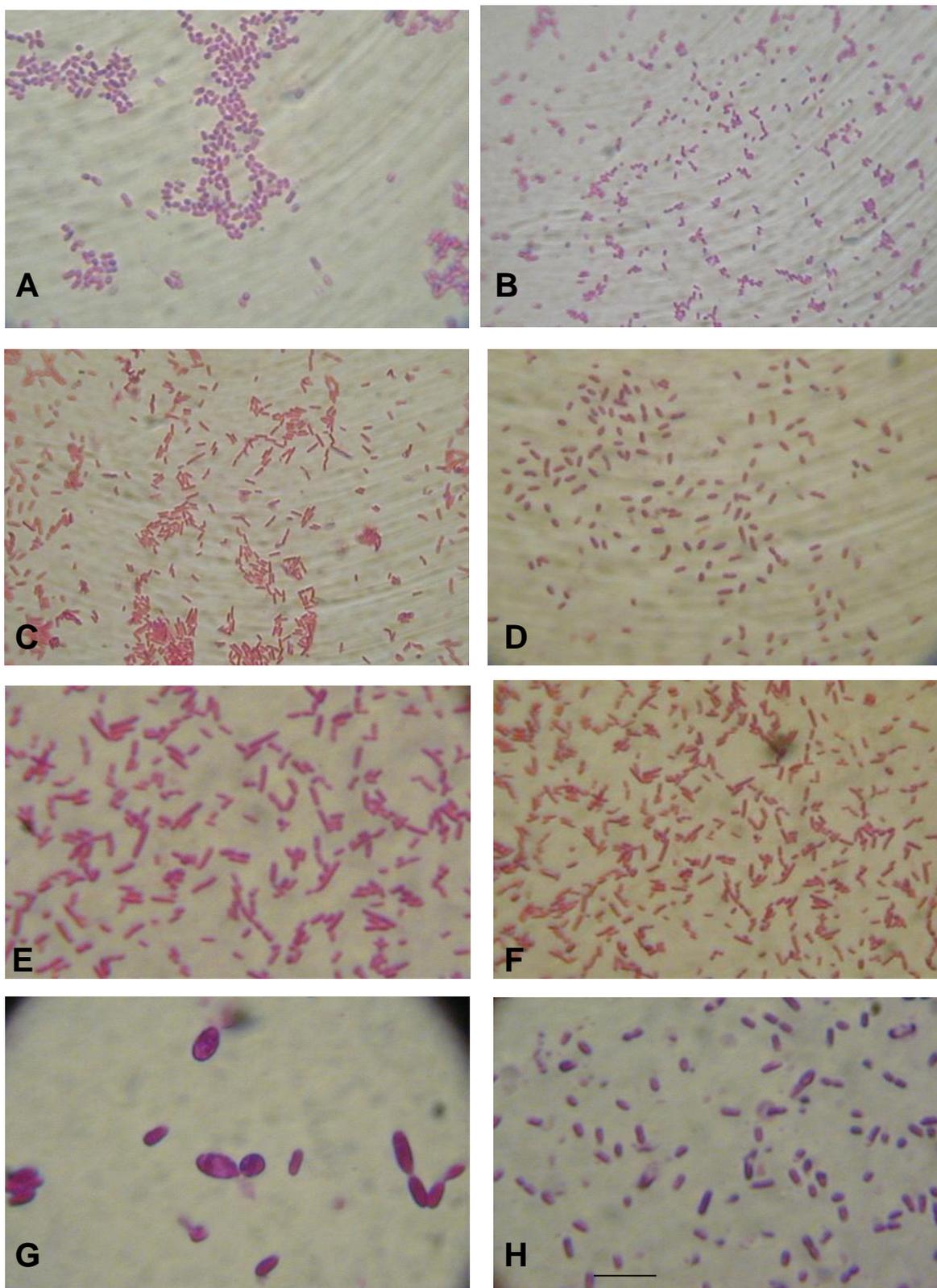


Figura 33: Caracterização morfológica dos microrganismos isolados do intestino de larvas de *Tenebrio molitor*. Imagem fotografada em microscópio de luz dos microrganismos corados pelo método de Gram. Esfregaços preparados a partir de cultura de 24 horas de incubação em agar APC. A, C, D, E, F e H são bastonetes, B: Estafilococo e G: Levedura. Barra 5 μm .

4.10 - Teste de efeito antimicrobiano da hemolinfa, do epitélio intestinal e do conteúdo luminal dos insetos infectados com *Photorhabdus temperata* sobre bactérias da flora intestinal.

Determinado o horário em que bactérias desaparecem do conteúdo luminal dos insetos infectados, sua hemolinfa, epitélio intestinal e conteúdo luminal foram recolhidos e testados em placa de Petri para avaliar a capacidade da *P. temperata* em produzir substâncias antimicrobianas. O tempo de infecção escolhido foi o de 36 horas de infecção para a *D. saccharalis* e o *D. peruvianus* e de 30 horas para o *T. molitor*.

O método utilizado foi o de difusão em placa. Não houve formação de halo de inibição para as hemolinfas e nem para os conteúdos luminiais dos insetos. Os epitélios intestinais dos três insetos, no entanto, apresentaram inibição do crescimento das bactérias isoladas do conteúdo luminal. As figuras 34A, 34B e 34C mostram o efeito antimicrobiano dos epitélios intestinal de *D. saccharalis*, *D. peruvianus* e *T. molitor*, respectivamente, sobre estafilococos isolados do conteúdo luminal destes insetos.

4.11 - Teste de efeito antimicrobiano da cultura em meio líquido da *Photorhabdus temperata* K122 sobre bactérias da flora intestinal

Culturas de *P. temperata* crescida em caldo LB por 24 horas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir substâncias que interfiram nas culturas das bactérias isoladas a partir dos insetos sadios. Para isto, placas de agar Mueller Hinton estéreis foram inoculadas com 500 µL da suspensão bacteriana. O método utilizado foi de perfuração do meio e inserção da cultura da *P. temperata* neste local. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas. Houve formação de halos de inibição nas placas gerados a partir das *P. temperata* adicionadas sobre bactérias da microbiota intestinal dos insetos. Foi possível observar através da figura 34D a formação do halo de inibição sobre cultura de estafilococo isolada do lúmen de larvas de *D. saccharalis* sadias.

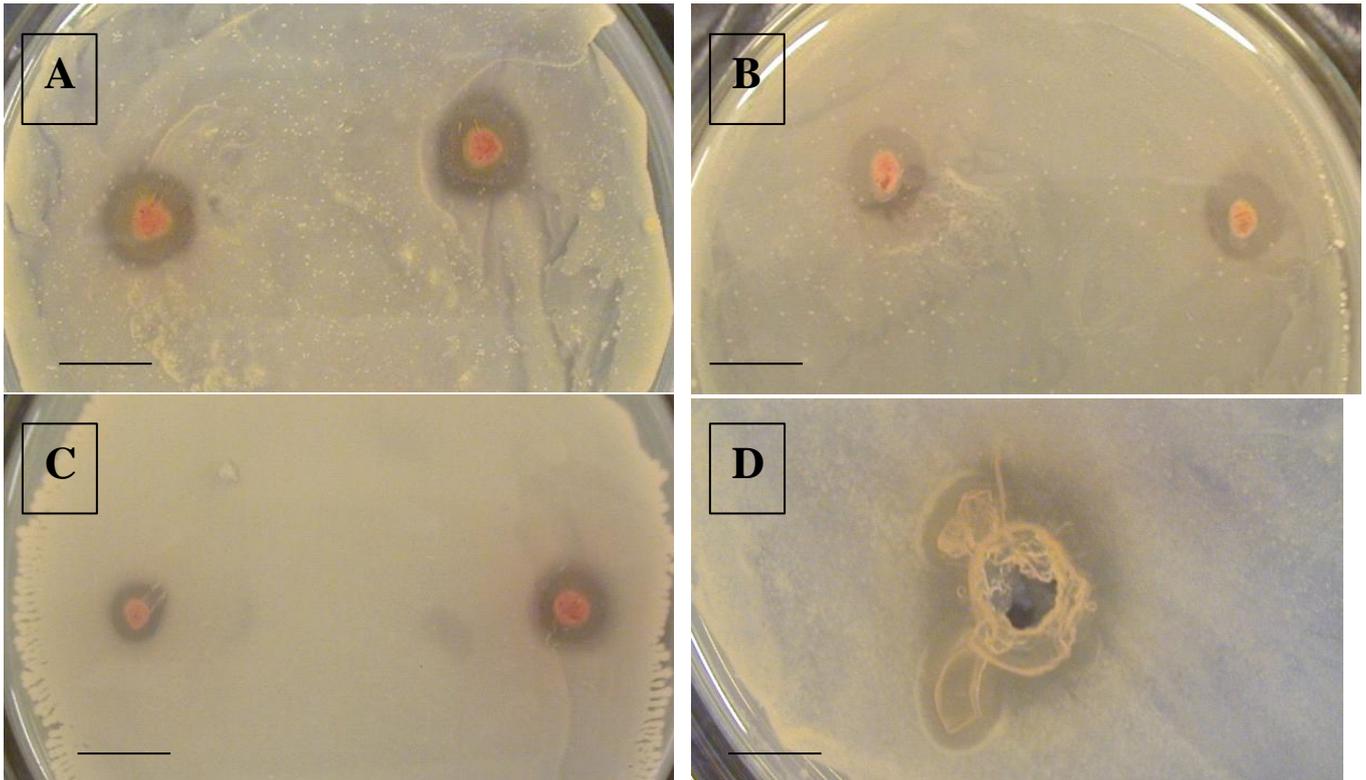


Figura 34: Efeito de compostos antimicrobianos produzidos por *Photorhabdus temperata* K122 sobre cultura de estafilococo isolada do conteúdo luminal de *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*. A: Halo de inibição produzido pelas *P. temperata* presente no epitélio intestinal de *D. saccharalis*. B: Halo de inibição produzido pela *P. temperata* presente no epitélio intestinal de *T. molitor*. C: Halo de inibição produzido pela *P. temperata* presente no epitélio intestinal de *D. peruvianus*. D: Halo de inibição produzido por cultura de 24 horas da *P. temperata* adicionada na região perfurada do agar Mueller Hinton. Barra 10 mm.

V - DISCUSSÃO

Photorhabdus são bactérias bioluminescentes que vivem em associação simbiótica com nematóides de solo da família Heterorhabditidae. Na natureza, o complexo formado por bactéria-nematóide é patogênico aos insetos. Nas infecções dos insetos, os nematóides após atingirem a hemocele do hospedeiro, liberam suas bactérias simbiotas, que são transportadas nos seus intestinos. Uma vez na hemocele, o número inicial de bactérias é relativamente pequeno; as bactérias então, se reproduzem e colonizam o hospedeiro, produzindo toxinas e enzimas que resultam em septicemia e bioconversão do cadáver do inseto (Thomas & Poinar, 1979; Silva *et al.*, 2002). Os nematóides reproduzem no corpo do hospedeiro em 2-3 gerações, alimentando-se das bactérias, até o desenvolvimento dos juvenis infectivos (IJs). Os IJs são a única forma que consegue sobreviver fora do hospedeiro. Antes de saírem do cadáver do inseto hospedeiro, os IJs readquirem a bactéria que é mantida em seus intestinos. Os IJs de vida livre procuram por um novo hospedeiro no solo e recomeçam um novo ciclo de infecção (French-Constant *et al.*, 2003). A bactéria simbiótica é necessária para matar o inseto e para digerir os tecidos do hospedeiro, assim, promovendo assim a produção de nutrientes para o desenvolvimento do nematóide e sua multiplicação. Nematóides axênicos não conseguem sobreviver, mas a bactéria pode ser mantida indefinidamente em meios de cultivo. As bactérias mantidas em meios de cultivo podem ser artificialmente injetadas no inseto hospedeiro e a infecção pode ser acompanhada sem a participação do nematóide (Silva *et al.*, 2002).

Este estudo caracterizou a *P. temperata* K122 durante a infecção de larvas de *Diatraea saccharalis*, broca da cana-de-açúcar, adultos de *Dysdercus peruvianus*, percevejo do algodão e larvas de *Tenebrio molitor*, praga de grãos armazenados. *P. temperata* K122 foi altamente virulenta quando testada contra estes insetos.

Valores de DL₅₀ foram determinados para larvas de quarto instar de *D. saccharalis* e adultos de *D. peruvianus*. Foram estas respectivamente, 16,2 e 5,3. Quanto às larvas de *T. molitor*, concentrações de 5 bactérias por 10 µL mataram 40% dos insetos infectados. Algumas espécies de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são altamente virulentas, a injeção de menos de 10 células da bactéria na hemolinfa dos insetos pode ser o suficiente para matar o inseto susceptível como larvas de *Galleria*

mellonella e larvas de *Manduca sexta* (Poinar & Thomas, 1967; Forst *et al.*, 1997, French-Constant & Bowen, 1999). Ensaios realizados com *Photorhabdus luminescens* apresentaram valores de DL₅₀ de 5 bactérias por larva de *Galleria mellonella* (Bennett & Clarke, 2005). Larvas de *Spodoptera exigua* foram infectadas com *Xenorhabdus nematophila* e a DL₅₀ estimada em 33 bactérias por larva (Youngjin & Yonggyun, 2000).

A concentração da bactéria utilizada para os testes de patogenicidade, do efeito sobre as enzimas digestivas, e de colonização dos diferentes compartimentos do corpo dos insetos-modelo foi de 50 bactérias/10 µL. Utilizando esta concentração, os valores de TL₅₀ e TL₉₀ foram, respectivamente, 33,8 e 44,8h para as larvas de *D. saccharalis*, 33,9 e 38,3h para adultos de *D. peruvianus* e 30,3 e 40,4h para *T. molitor*.

Rosa *et al.* (2002) realizaram testes de patogenicidade das bactérias *Photorhabdus luminescens* Az29 e Az32 sobre larvas de *Pseudaletia unipuncta*. Foram inoculadas 200 células bacterianas em cada larva, obtiveram para *P. luminescens* Az29 os valores de TL₅₀, 40,6h e de TL₉₀, 56,6; para *P. luminescens* Az32 os valores obtidos para TL₅₀ e de TL₉₀ foram, respectivamente 49h e 61,8h.

A sintomatologia destes insetos foi bem parecida, consistindo na diminuição de movimentos, diminuição pela procura de alimento em horários próximos a 24 horas de infecção, paralisia de movimentos e de alimentação por volta de 36 horas, morte com cor característica vermelha e bioluminescência em torno de 48 horas de infecção.

O tegumento dos insetos infectados apresentou uma coloração marrom escura no local da aplicação das bactérias. Isto se deu devido ao processo de esclerotização do tegumento, esta reação faz parte do arsenal de defesas, as quais o inseto usa na tentativa de prevenir a penetração de patógenos. Com a deposição de material esclerotizado, o organismo do inseto pode bloquear a entrada do patógeno ou aprisionar o organismo invasor (Travland, 1979).

Em geral, problemas digestivos são os primeiros sintomas apresentados pelos insetos infectados por patógenos. A colonização do intestino por patógenos traz como consequência imediata a interrupção nas funções de digestão, produção de enzimas, absorção de nutrientes, e conseqüente desnutrição do inseto. Sintomas

como perda de apetite são comuns nos primeiros estágios de doenças de insetos que são colonizados via sistema digestivo (Alves & Pereira, 1998).

Devido ao controle exercido pelo sistema nervoso sobre as demais funções do corpo do inseto, o ataque de patógenos a esse sistema provoca, muitas vezes, distúrbios em outras partes do hospedeiro. Geralmente traz como conseqüência a falta ou dificuldade de locomoção ou de outra atividade motora afetada por crescimento de um patógeno ou ação de toxina sobre células nervosas. A ação de patógenos sobre o sistema nervoso quase sempre se deve à ação de toxinas produzidas pelo crescimento do patógeno na hemocele do inseto. Em alguns casos, a ação das toxinas pode ser aguda, eliminando por completo e rapidamente o controle nervoso sobre as funções do corpo do inseto, como acontece com as toxinas de *Beauveria bassiana* sobre saúvas (*Atta* sp.) e moscas domésticas, causando a diminuição de seus movimentos (Alves & Pereira, 1998).

Nas primeiras 5 horas de infecção dos insetos testados neste trabalho por *Photorhabdus temperata* K122, observa-se um aumento no número total de hemócitos. Os primeiros distúrbios detectados na hemolinfa são causados indiretamente pelos patógenos invasores e são devidos à reação de defesa dos insetos à presença deles, na tentativa de eliminar o agente invasor ou limitar o seu desenvolvimento. A produção de proteínas com ação antibiótica pode ser induzida pela presença de células vivas ou mortas, assim como por componentes de células de microrganismos patogênicos ou não (Göts & Boman, 1985).

Outro tipo de reação normal na hemolinfa é a variação no número e proporção dos diversos tipos de hemócitos, devido à presença de estruturas dos patógenos. Essa variação nos hemócitos se dá em função de dois fatores:

- a) a produção de hemócitos de certos tipos para o combate aos organismos invasores;
- b) a imobilização de hemócitos em nódulos e cápsulas ao redor de células e tecidos invasores.

Enquanto que o primeiro fator tende a elevar o número de hemócitos responsáveis pela ação contra os invasores, o segundo tende a diminuir o número de hemócitos envolvidos no processo de encapsulação (Alves & Pereira, 1998).

Durante as fases iniciais da infecção, primeiras 18 horas de infecção, as células de *Photorhabdus temperata* K122 se multiplicam na hemolinfa destruindo os

hemócitos das larvas de *D. saccharalis*, adultos de *D. peruvianus* e larvas de *T. molitor*.

Assim que é regurgitada na hemolinfa pelos nematóides infectivos juvenis, a primeira resposta do sistema imune do inseto é fagocitar e encapsular (nodulação) a bactéria invasora. Numa revisão recente, a maioria dos relatos documenta a resposta do sistema imune de *Galleria mellonella* contra bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*. A infecção, em particular, neste Lepidoptera sugere que as bactérias regurgitadas são encapsuladas pelos hemócitos em nódulos e então re-emergem na hemolinfa para continuar a replicação e matar o hospedeiro. A bactéria simbiote de *Heterorhabditis megidis* tem sido encontrada suprimindo a fagocitose dos hemócitos em gafanhotos nas primeiras 12 horas de infecção depois da infecção (van Sambeek & Wiesner, 1999).

O número de bactérias aumenta significativamente na hemolinfa nas primeiras horas de infecção, mostrando que os hemócitos não têm capacidade para suprimir o crescimento da *Photorhabdus luminescens* (Daborn *et al.*, 2001). Silva *et al.* (2002) mostraram que *Photorhabdus luminescens* W14 inibem a fagocitose dos hemócitos nas larvas de *Manduca sexta*. Neste compartimento dos insetos, as *Photorhabdus* estão destruindo tanto o sistema de defesa humoral quanto o sistema imune celular (Au *et al.*, 2004; Daborn *et al.*, 2002; Eleftherianos *et al.*, 2007).

Distúrbios fisiológicos na hemolinfa e no sistema circulatório dos insetos que são causados diretamente pela presença de patógenos podem ser de vários tipos. Inicialmente, as funções normais da hemolinfa podem ser prejudicadas, devido ao ataque dos hemócitos pelos patógenos ou pela imobilização das células da hemolinfa pela reação de defesa. Em estágios adiantados de desenvolvimento de certos patógenos na hemolinfa de insetos, problemas mecânicos podem resultar da presença excessiva de células do patógeno em circulação. Esses problemas incluem a redução do volume de hemolinfa (Alves & Pereira, 1998). Resultados semelhantes ocorreram principalmente com as larvas de *T. molitor* e adultos de *D. peruvianus* que tiveram seus volumes de hemolinfa reduzidos após 18 horas de infecção por *P. temperata*.

As bactérias podem escapar do sistema imune colonizando os tecidos, onde os hemócitos são menos eficientes para realizar a fagocitose (Dowds & Peters, 2002).

Ao mesmo tempo que bactérias *P. temperata* K122 multiplicam na hemolinfa, uma sub-população desta bactéria começa a colonizar o intestino dos insetos a partir da região proximal do intestino médio. A partir das 18 horas de infecção já é possível observar por microscopia eletrônica de transmissão e varredura e por microscopia óptica, colônias das bactérias localizadas entre a lâmina basal e a membrana basal do intestino de *D. saccharalis*, *D. peruvianus* e *T. molitor*. O sítio de colonização ocorre inicialmente próximo a traquéias e músculos longitudinais. Após 36 horas de infecção observa-se que as bactérias passam a colonizar a região posterior do intestino. Através de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que em larvas de *D. saccharalis* o biofilme era muito mais compacto na região anterior do que no posterior, no período de 48 horas e em *T. molitor* que o início da formação do biofilme era mais compacto na região anterior que na posterior no período de 36 horas de infecção. Através de método de contagem em “Pour Plate” de unidades formadoras de colônias de *P. temperata*, foi possível verificar que o número de UFC em V1 foi maior do que nas demais regiões do intestino deste inseto.

O termo biofilme é empregado para designar comunidades de microrganismos mobilizados sobre uma superfície, que abriga, estabiliza e otimiza a vida do organismo. O biofilme facilita muito a vida das bactérias, uma vez que garante a vida da colônia em ambientes não estáveis e com fluxo constante de líquidos. Pode-se atribuir ao biofilme uma série de vantagens para a colônia, como a melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas (O’Toole *et al.*, 2000).

Testes foram realizados com *Photobacterium luminescens* W14 expressando proteína verde fluorescente (GFP) para monitorar a colonização do intestino de larvas de *Manduca sexta*. Inicialmente a W14 coloniza a região anterior do intestino e subseqüentemente ocupa a região posterior. Os estudos com W14 usando *Manduca sexta* como modelo forneceram indicações que a infecção bacteriana no inseto corresponde a vários estágios específicos. *P. luminescens* começa a colonizar as larvas de *M. sexta* a partir da região proximal do intestino médio. As bactérias crescem entre a lâmina basal que reveste o intestino no lado da hemolinfa e o epitélio intestinal propriamente dito. Elas não chegam a invadir as células do epitélio intestinal, mas secretam toxinas neste micro-ambiente, entre elas toxinas que

induzem as células do intestino a entrar em apoptose (Silva *et al.*, 2002, Daborn *et al.*, 2002).

O colapso do epitélio intestinal leva a uma grande perda da pressão de turgor corporal e morte do inseto em questão de horas. Uma toxina chamada MCF (“makes caterpillars floppy”) (Daborn *et al.*, 2002), além de induzir apoptose no epitélio intestinal, também o faz com os hemócitos, que são células circulantes na hemolinfa do inseto e envolvidas na resposta imune celular do animal. O fato de que a região proximal do intestino médio é uma região absorptiva de nutrientes em larvas de lepidópteros e coleópteros, levanta a questão da possibilidade de que essas bactérias sejam capazes de reconhecer essas regiões para darem continuidade ao processo de infecção.

Os primeiros sinais da toxicidade sobre a fisiologia intestinal iniciam com 12 horas pós-infecção, horário em que as atividades enzimáticas começam a diminuir. Nas larvas de *D. saccharalis* a média das atividades enzimáticas neste horário foi de 83%, *D. peruvianus* foi de 78% e larvas de *T. molitor* foi de 88%. Quanto ao efeito da infecção por 48 horas sobre a atividade de algumas enzimas digestivas dos insetos, pode-se verificar que houve uma diminuição das atividades da maioria das enzimas digestivas, permanecendo um resíduo de atividade final entre 5-15% em média. As α -amilases das larvas de *D. saccharalis* mantiveram uma atividade residual de 37% e as α -amilases de larvas de *T. molitor*, 21%, no período de 48 horas pós-infecção.

A colonização da carcaça dos insetos por *P. temperata* K122 inicia-se também nas primeiras horas de infecção, mas o aumento mais significativo se dá a partir das 36 horas de infecção.

O processo de colonização dos demais tecidos do hospedeiro não está ainda bem conhecido, mas quando o ciclo da infecção está bem evoluído, quando os recursos nutricionais no cadáver estão esgotados, os nematóides desenvolvem uma nova geração de IJs que recrutam as células bacterianas e emergem do cadáver do inseto a procura de um novo hospedeiro. Um ponto crítico nos estágios iniciais da infecção por *Photorhabdus* é a destruição do sistema imune do inseto e a inibição de competidores, quando o número de bactérias patogênicas ainda está muito baixo. É necessário dominar rapidamente o hospedeiro. Proteínas tóxicas produzidas pelas bactérias entomopatogênicas ajudavam a diminuir a competição por microrganismos

oportunistas no cadáver do inseto (Hu & Webster, 2000; Eleftherianos *et al.*, 2007) e uma mistura de antibióticos são liberados pelas bactérias invasoras (Daborn *et al.*, 2002).

Foram isolados microrganismos do conteúdo luminal dos insetos *D. saccharalis*, *T. molitor* e *D. peruvianus*. Foram encontradas no conteúdo luminal de larvas de *D. saccharalis*: uma espécie de levedura, estafilococo Gram-positivo, cocos (tétrade) Gram-positivo, 4 bastões Gram-positivos formadores de esporos, bastão Gram-negativo. Em adultos de *D. peruvianus* foram encontradas: 2 espécies de estafilococos Gram-positivos, estafilococo Gram-negativo, 2 bacilos Gram-positivos formadores de esporos e coco Gram-positivo. Em larvas de *T. molitor* foram encontradas: levedura, estafilococo Gram-positivo, 5 bastões Gram-negativos, bastão Gram-positivo.

Resultados semelhantes foram descritos em *Schistocerca gregária*, onde foram isoladas bactérias em forma de bastão, Gram-negativas da família Enterobacteriaceae como *Escherichia coli*, *Enterobacter liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloaceae*, assim como também foram isoladas da *S. gregária* algumas espécies de *Staphylococcus* Gram-positivos (Dillon & Charnley, 2002). Foram encontradas espécies bacterianas capazes de formar endósporos *Bacillus lichenniformis* em *Pandemis pyrusana* (McKillip *et al.* 1997).

Oliveira *et al.* (2000) analisando a composição da microbiota do trato alimentar de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, do grupo dos flebotomíneos, capturadas na natureza verificaram uma predominância de bacilos Gram-negativos como *Acinetobacter iwoffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Flavimonas orizihabitans*, *Enterobacter cloaceae* e *Klebsiella ozaenae*. Menos freqüentemente foram isoladas espécies de bactérias Gram-positivas como *Bacillus thuringiensis* e *Staphylococcus* spp.

A espécie *Bacillus thuringiensis* (Gram positiva) foi detectada em 18% das fêmeas dissecadas de *Lutzomyia longipalpis*. Esta espécie também foi isolada do trato digestivo e tubos de Malpighi de machos de *Lutzomyia longipalpis* e em *Aedes triseriatus* (Demaio *et al.*, 1996).

Espécies não identificadas de *Staphylococcus* (Gram-positivos) foram encontradas também em *Psorophora tobbi* (Schlein & Muller, 1995) e em mosca do

gênero *Cochliomyia* (Caballero *et al.*, 1996). Cocos Gram-positivos foram descritos no trato digestivo de *P. papatasi* em condições naturais (Dillon *et al.*, 1996).

Leveduras têm sido isoladas de insetos das famílias Bostrichidae, Cerambycidae e Buprestidae (Phaff & Starmer 1987) e é conhecido, também, que coleópteros das famílias Scolytidae, Lymexylidae e Platypodidae possuem associações mutualísticas com leveduras (Kinuura, 1995).

A população microbiana nativa começa a desaparecer 5 horas após a infecção por *Photorhabdus temperata* K122 nas larvas de *D. saccharalis* e em larvas de *T. molitor*. Com 24 horas, 40% da microbiota intestinal cultivável de *D. saccharalis* e *T. molitor* morreu. No *D. peruvianus* o efeito sobre a população microbiana só foi detectado em horário após 24 horas de infecção. No período de 36 horas de infecção a população microbiana do *T. molitor* estava reduzida a 7%. Depois de 48 horas, somente 10% da população da *D. saccharalis* e *D. peruvianus* persistiram e no *T. molitor* a flora microbiana apareceu em valores menores que 0,01%.

A microbiota intestinal cultivável dos insetos não foi afetada por amostras coletadas do conteúdo luminal do intestino dos insetos infectados, mas as bactérias e leveduras foram mortas por tecidos epiteliais de insetos infectados, onde a subpopulação de *Photorhabdus* foi encontrada. Estes resultados apóiam a hipótese de que o nicho lâmina basal-epitélio intestinal é colonizado pela bactéria para criar uma barreira entre o lúmen intestinal e a hemocele. Como o inseto pára de se alimentar no horário entre 24 e 36 horas de infecção e a microbiota intestinal poder estar necessitando de nutrientes, há necessidade da *P. temperata* manter a flora microbiana afastada.

As toxinas liberadas pela *P. temperata* K122 não atravessam o epitélio intestinal para atuar diretamente na microbiota intestinal dos insetos testados. Os resultados também sugerem que as condições no lúmen intestinal continuam relativamente inalteradas durante as primeiras horas depois do início da infecção por *P. temperata*, quando a população de bactérias na carcaça aumenta e a larva se torna moribunda.

As bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* produzem tanto moléculas de antibióticos com baixo peso e de alto peso molecular. As moléculas de antibióticos de baixo peso molecular inibem o crescimento de um grande espectro de bactérias e fungos, muitos deles de interesse farmacêutico e de importância agrícola, como

Escherichia, *Staphylococcus*, *Aspergillus* e *Botrytis*. Em contraste, macromoléculas, como as bacteriocinas produzidas pelas bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* inibem o crescimento de espécies relacionadas a estas bactérias (Boemare *et al.*, 1992).

Akhurst (1982) demonstrou atividade antibiótica de culturas de *Xenorhabdus* spp. sobre uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas como *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus*, bactérias Gram-negativas como *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, e leveduras como *Candida* e *Saccharomyces*.

Chen *et al.* (1994) observaram uma alta atividade antimicótica em cultura das bactérias simbióticas de nematóides sobre um grande espectro de fungos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor piriformis*, *Pythium coloratum*, *Pythium ultimum*, *Penicillium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma pseudokingii* e *Verticillium dahliae*.

Foram identificados hidroxiestilbenos e indóis como antibióticos em culturas de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente por Paul *et al.* (1981), outros antibióticos foram reportados, como as xenorrabdininas (McInerney *et al.*, 1991a), xenocumacinas (McInerney *et al.*, 1991b), xenorxidios (Li *et al.*, 1998), e nematofinas (Li *et al.*, 1997).

Xenocumacinas pertencem à mesma classe de compostos de atividade farmacológica como as amicumacinas que foram isoladas inicialmente de *Bacillus pumilus* (Itoh *et al.*, 1982). Xenocumacinas são altamente ativas sobre bactérias Gram-positivas, incluindo espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e algumas espécies de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* (McInerney *et al.*, 1991b).

A produção de antibióticos pelas bactérias simbióticas de nematóides entomopatogênicos difere qualitativamente e quantitativamente dependendo da espécie da bactéria e das condições de cultura. Nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada, através de ensaios de difusão, dos metabólitos produzidos em meio de cultura (1% de peptona em água) por *Xenorhabdus* spp. (Chen *et al.*, 1996). No entanto, outros meios têm sido utilizados com sucesso para a produção de antibióticos, incluindo caldo extrato de levedura modificado (Akhurst, 1982; McInerney *et al.*, 1991a; Sztaricskai *et al.*, 1992; Sundar & Chang, 1993), caldo

Luria–Bertani (Sundar & Chang, 1993). Recentemente, foi demonstrado que a *P. luminescens* produz 13 diferentes compostos orgânicos em meios de cultura. Muitos destes compostos foram purificados e têm atividade contra bactéria, fungo e nematóides (Derzelle *et al.*, 2002).

A produção de antibióticos pelas bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* também difere qualitativamente e quantitativamente sob condições *in vitro* e *in vivo*. O composto 3,5-dihidroxi-4-etilstilbeno 3 não foi detectado em meios de cultura de *P. luminescens* C9 mas foi identificado em larvas de *Galleria mellonella* infectadas pelo complexo *Heterorhabditis megidis* 90-P. *luminescens* C9 (Hu & Webster, 2000). Este composto é produzido durante a fase pós-exponencial de crescimento da bactéria e foi sugerido pelos autores que a finalidade da produção deste composto é de suprimir a flora nativa do epitélio das larvas. *Photorhabdus* também produz compostos que repelem insetos que possam vir a se aproximar do cadáver (Baur *et al.*, 1998).

A infecção em laboratório de larvas de *G. mellonella* com nematóide entomopatogênico *Steinernema feltiae* A21 resultou no crescimento de duas espécies de bactérias, incluindo a respectiva bactéria simbiote *Xenorhabdus* spp., colonizando o cadáver do inseto. Uma população de *Enterococcus* que originou do intestino do inseto hospedeiro, foi detectada nas primeiras 30 horas de infecção. A espécie *Enterococcus* foi eliminada no horário de 48 horas pós-infecção. Isto provavelmente ocorreu devido à produção de metabólitos secundários com propriedades antibacterianas produzidos pela *Xenorhabdus* (Walsh. & Webster, 2003).

Dutky (1959) propôs que a presença dos antibióticos ajudaria a minimizar a competição de bactérias não simbiotes aos nematóides, especialmente nos primeiros estágios da infecção, e subseqüentemente prevenir a putrefação do cadáver do inseto. Outra hipótese proposta por Jarosz (1996) depois de estudar a produção de antibióticos em *G. mellonella* infectada por *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, é que a não putrefação dos insetos infectados é devido ao rápido crescimento da bactéria simbiote que assim evita ou minimiza a competição dos invasores secundários no cadáver do inseto.

As bactérias entomopatogênicas do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são recursos promissores de fatores que podem ser utilizados como agentes de controle

biológico contra insetos-praga, especialmente como possíveis fontes de moléculas de antibióticos, que podem ser utilizados diretamente contra a microbiota do intestino do inseto. Durante a infecção, estes antibióticos foram detectados no lúmen intestinal, mas permanecem no nicho ocupado pela sub-população da bactéria patogênica. Estudos devem ser feitos com frações de amostras coletadas desta região a procura de novos antibióticos.

VI – CONCLUSÃO:

- Durante a infecção a bactéria entomopatogênica *Photorhabdus temperata* K122 se distribui entre hemolinfa, carcaça e epitélio intestinal dos insetos, *Diatraea saccharalis*, *Dysdercus peruvianus* e *Tenebrio molitor*.

- Uma sub-população da bactéria ocupou o espaço entre a lâmina basal e as células do intestino;

- Nos estágios iniciais da infecção, principalmente no horário de 18 horas pós-infecção, só foi possível encontrar as colônias localizadas entre a lâmina basal e a membrana basal na região anterior do intestino dos insetos investigados;

- Toxinas liberadas nesta região não foram encontradas no conteúdo luminal;

- Houve uma diminuição das atividades da maioria das enzimas digestivas dos insetos, permanecendo um resíduo de atividade final entre 5-15% em média;

- Uma espécie de levedura, uma espécie de estafilococo, uma espécie de coco e cinco espécies de bactérias em forma de bastão, foram isoladas do conteúdo luminal das larvas de *D. saccharalis*;

- Três espécies de estafilococos, dois bacilos e uma espécie de coco isolado, foram isolados do conteúdo luminal de *D. peruvianus*;

- Seis espécies de bactérias em forma de bastão, uma espécie de estafilococo e uma espécie de levedura foram isolados do conteúdo luminal de *T. molitor*;

- Depois de 48 horas, somente 10% da população de microrganismos da *D. saccharalis* e *D. peruvianus* persiste e no *T. molitor* a flora microbiana aparece em valores menores que 0,01%;

- A microbiota intestinal cultivável dos insetos não foi afetada por amostras coletadas do conteúdo luminal do intestino dos insetos infectados, mas as bactérias foram mortas por tecidos epiteliais de insetos infectados, onde a sub-população de *Photorhabdus temperata* foi encontrada.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhurst, R.J., 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303-309.
- Akhurst, R.J., 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. J. Gen. Microbiol.: 128: 3061-3065.
- Akhurst, R.J. & Boemare, N.E., 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. J. Gen. Microbiol. 134: 1853-1845.
- Aldrovandus, U., 1623. De animalibus insectis libri septum. fol. Franeofurti.
- Almeida, A.A., 1980. Influence of the glandless and glanted cottonseeds on development, fecundity and fertility of *Dysdercus fasciatus* Signoret (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Revta. Bras. Biol.. 40: 475-483.
- Almeida, J.R., 1983. Considerações sobre a distribuição geográfica d *Dysdercus* Guérin menéville, 1831 (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Revta. Ceres 30: 173-177.
- Alves, L.F.A., Buzarello, G.D., Oliveira, D.G.P., Alves, S.B., 2006. Ação da terra de diatomácea contra adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Arq. Inst. Biol. 73: 115-118.
- Alves, S.B. & Pereira, R.M., 1998. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos. In: Controle Microbiano de Insetos, Piracicaba, Alves, S.B., Editora FEALQ. 39-54.
- Alves, S.B., Moino, J.R., Almeida, J.E.M., 1998. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: Controle Microbiano de Insetos, Piracicaba, Alves, S.B., Editora FEALQ 1143-1163.
- Arteaga, E. & Vasquez, O., 1991. General characteristics of Cuban strain of *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). Rencontres Caraibes em Lutte Biologique. Colloques. Guadeloupe: INRA 107-111.
- Au, C., Dean, P., Reynolds, S.E., French-Constant, R.H. 2004. Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. Cel. Microbiol. 6: 89-95.

- Baur, M.E., Kaya, H.K., Strong, D.R., 1998. Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects. *Biol. Control*. 12: 231-236.
- Bedding, R.A. & Akhurst, R.J., 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Bennett, H.P.J. & Clarke, D.J., 2005. The *pbgPE* operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *J. Bacteriol.* January; 187: 77-84.
- Bento, J.M.S., 1999. Perdas por insetos na agricultura. *Ação Amb.*2: 19-21.
- Bignell, D.E., Oskarsson, H., Anderson, J.M., 1980. Colonisations of the epithelial face of the peritrophic membrane and the ectoperitrophic space by actinomycetes in a soil-feeding termite. *J. Invert. Pathol.* 36: 426-428.
- Bismanis, J.E., 1976. Endosymbionts of *Sitodrepa panicea*. *Can. J. Microbiol.* 22: 1415-1424.
- Boemare, N., 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gauler R. ed. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing. Wallingford, UK. 35-56.
- Boemare, N.E., Boyer-Giglio, M., Thaler, J., Akhurst, R.J., Brehelin, M., 1992. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3032-3037.
- Botelho, P.S.M. & Macedo, N., 2002. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Côrrea-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. (Ed.). *Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. São Paulo: Manole 409-425.
- Botelho, P.S.M., Parra, J.R.P. Magrini, E.A., Haddad, M.L., Resende, L.C.L., 1995. Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794). *Sci. Agríc. Piracicaba* 52: 65-69.
- Bowen, D., Rochelaeau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., French-Constant, R.H., 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*. 280: 2129-2132.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.

- Braga, D.P.V., 2001. Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína cry/A(B) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Piracicaba. 71p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit: sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 24 dez. 2007.
- Bucher, G.E., 1963. Nonsporulating bacterial pathogens. In: Insect Pathology – An Advanced Treatise – vol 2. Steinhaus. E.A. ed., Academic Press. New York, 689p.
- Burman, M., 1982. *Neoplectana carpocapsae*. Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica* 28: 62-70.
- Burnell, A.N.N. & Stock, S.P., 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. *Nematology* 2:31-42.
- Cab International. Crop protection compendium. *Diatraea saccharalis* Fabricius. Disponível em <http://www.cabi.org/>, Acesso em 22 dez 2007.
- Caballero, M., Hernandez, G. Poudevigne, F., Ruiz-Martinez, I., 1996. Isolation and identification of bactéria associated with the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*, Coquerel and its Myiasis. *Ann. N. W. Acad. Sci.* 23: 248-254.
- Cabanillas, H. E., Poinar, G. O., Raulston, J. R., 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fund. App. Nematol.* 17:123-131.
- Caicedo, V.A.M. & Bellotti, A.C., 1996. Survey of native *Steinernema* and their bacterial symbionts – lethal pathogens of insects. *Nematology*. 2: 31-42.
- Campbell, J.F. & R. Gaugler. 1993. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour*. 126: 3-14.
- Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B., 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amilases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 51-57.

- Carneiro, C.N.B., Isejima, E.M., Samuels, R.I., Silva, C.P., 2004. Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*. J. Insect Physiol. 50: 1093-1101.
- Cavanagh, P. & Marsden, P.D., 1969. Bacteria isolated from the gut of some reduviid bugs. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63: 415-416.
- Chen, G., Dunphy, G.B., Webster, J.M., 1994. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. Biolog. Control. 4: 157-162.
- Chen, G., Maxwell, P., Dunphy, G.B., Webster, J.M., 1996. Culture conditions for *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts of entomopathogenic nematodes. Nematologica. 42: 124-127.
- Costa, I. A., 2006. Purificação e Caracterização de uma Aminopeptidase do Epitélio Intestinal de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Dissertação de mestrado. UENF – RJ.
- Coutinho, H.L.C., Oliveira, V.M., Manflo, G.P., 2001. Diversidade microbiana em amostras ambientais. In: Garay, I. & Dias, B. (Eds.) Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Editora Vozes. Petrópolis 215-232.
- Daborn, P.J., Waterfield, N.R., Blight, M.A., French-Constant, R.H., 2001. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. J. Bacteriol. 183: 5834-5839.
- Daborn, P.J., Waterfield, N.R., Silva, C.P., Au, C.P.Y., Sharma, S., French-Constant, R.H., 2002. A single *Photorhabdus* gene, *makes caterpillars floppy* (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. Proc. of the Nat. Acad. Sci. USA 99: 10742-10747.
- Dahlqvist, A., 1968. Assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 22: 99-107.
- Degaspari, N., Macedo, N., Botelho, P.S.M., Araújo, J.R., Almeida, L.C., 1987. Predação e parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. Pesq. Agropec. Brasil. 22: 785-792.
- Demayo, J., Pumpuni, C.B., Kent, M., Beier, J.C., 1996. The bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* and *Psorophora columbiae* mosquitos. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 54: 219-223.

- Derzelle, S., Duchaud, E., Kunst, F., Danchin, A., Bertin, P., 2002. Identification, characterization, and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3780-3789.
- Dillon, R.J. & Charnely, K., 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. Res. Microbiol. 13: 503-509.
- Dillon, R.J. & Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. Ann. Rev. Entomol. 49: 71-92.
- Dillon, R.J., El Kordy, E., Lane, R.P., 1996. The prevalence of microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 90: 669-673.
- Doucet, M. M. A. & Doucet, M. E., 1990. *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. Nematologica 36, 257-265.
- Doucet, M. M. A., 1986. A new species of Neaplectana Steiner (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba. Argentina. Rev. Nematol. 9, 317-323.
- Doucet, M.M.A. & De Doucet, M.M.A., 1995. Characterization of a population of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) isolated in Córdoba, Argentina. Nematol. Medit. 23: 181-189.
- Doucet, M.M.A., Bertolotti, M.A., De Doucet, M.M.A., 1996. A new population of *Heterhabditis bacteriophora* Poinar 1975 (Heterorhabditidae) from Rio Negro, Argentina: Characterization and effects on host. Nematol. Medit. 24: 169-174.
- Douglas, A.E. & Beard, C.B., 1996. Microbial symbioses in the midgut of insects. In: Biology of the Insect Midgut. Edited by M.J. Lehane and P.F. Billingsley. Chapman & Hall, London. p 419-429.
- Dowds, B.C.A & PETERS, A., 2002. Virulence Mechanisms. In: Entomopathogenic Nematology, R. Glauber. Ed., CABI Publishing, New York, NY. p.79-98.
- Dunphy, G.B. & Webster, J.M., 1988. Lipopolysaccharides of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) and their haemocyte toxicity in non-immune *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larvae. J. Gen. Microbiol. 134: 1017-1028.
- Dutky, S.R., 1959. Insect microbiology. Advances in Applied Microbiology. 1: 175-200.

- Ehlers, R.U., 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 303-316.
- Ehlers, R.U., 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 623-633.
- Ehlers, R.U., Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K., Osterfeld, K.H., 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhabditis megidis-Photorhabdus luminescens*. *BioControl.* 1: 77-86.
- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Aslam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T.J., Clarke, D.J., French-Constant, R.H., Reynolds, S.E., 2007. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104: 2419-2424.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Bioch. Bioph.* 95: 271-278.
- Evans, D.E., 1987. The survival of immature grain beetles at low temperatures. *J. Stored Prod. Res* 23: 79-83.
- Evans, G., 1975. *The life of beetles*. London, George Allen & Unwin. 105p.
- Fabricius, J. C., 1794. *Entomologia systematica emendata et aucta. Secundum classes, ordines, genera, species adjectis synonymis, locis, observationibus, descriptionibus.* Tom. III. Pars II. - pp. 1-349.
- Ferraz, L.C.C.B., 1998. Nematóides entomopatogênicos. In: *Controle Microbiano de Insetos* (Alves, S.B., coord.), pp. 541- 569. Piracicaba. FAPESP & FEALQ, 1163p.
- French-Constant, R.H. & Bowen, D., 1999. *Photorhabdus* toxins: Novel biological insecticides. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 284-288.
- French-Constant, R.H., Waterfield, N.R., Burland, V., Perna, N.T., Daborn, P.J., Bowen, D., Blattner, F.R., 2000. A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potencial implications for virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3310-3329.
- French-Constant, R.H., Waterfield, N.R., Daborn, P., Joyce, S., Bennett, H., Au, C., Dowling, A., Boundy, S., Reynolds, S.E., Clarke, D., 2003. *Photorhabdus*:

towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. FEMS Microbiol. Rev. 26: 433-456.

- Filipev, I. N., 1934. Eine neue art der gattung *Neoplectana* Steiner nebst Bemerkungen uber die systematische sellung der letzteren. Magasin de parasitologie de l'Institut zoologique des Sciences de l' USSR. IV. 1934:229-240.
- Fisher-Le Saux, M., Mauleon, H., Constant, P., Brunel, B., Boemare, N., 1998. PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts. App. Environ. Microbiol. 64: 4246-4254.
- Fisher-Le Saux, M., Viillard, V., Brunel, B., Normand, P., Boemare, N.E., 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1645-1656.
- Folegatti, M.E.G., Alves, S.B., Kawai, P.R.C., Botelho, P.S.M., 1988. Nova metodologia para a produção *in vivo* de *Neoplectana carpocapsae* Weiser. Nematol. Bras. 12: 76-83.
- Forst, S. & Clarke, D., 2002. Bacteria-nematode symbiosis. In: Gaugler R. ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. Wallingford, UK 57-77.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., Stackebrandt, E., 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Ann. Rev. Microbiol. 51: 47-72.
- Forst, S. & Nealson, K., 1996. Molecular biology of the symbiont-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. Microbiol. Rev. 60:21-43.
- Fowler, H.G. & Garcia, C.R., 1988. Nematodes (Rhabditida: *Steinernema feltiae*) as natural control agents of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae): field and laboratory studies. Rev. Bras. Biol. 48: 789-795.
- Frazer, H.L., 1944. Observation on the method of transmission of internal boll disease of cotton by the cotton stayner-bug. Ann. App. Biol. 31: 271-290.
- Freire, E.C. & Santos, W.J., 1999. Cultura do algodoeiro. Piracicaba: POTAFÓS, 133-179.
- Gabriel, O., 1971. Locating enzymes on gels. In W. B. Jacoby, eds. Meth. Enzymol. 22: 578-604.

- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Baptista, G.C., Filho, E.B., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., 2002. Entomologia Agrícola. Piracicaba. FEALQ 920p.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira S., Carvalho, R.T.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R., Alves, S.B., Vendramim, J.D., 1988. Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 649 p.
- Garcia L.S., Procop G.W., Roberts G.D., Thomson jr. B.B. 1998. Overview of conventional methods for bacterial identification. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiol. 167-181.
- Georgis, R. & Manweiler, S.A., 1994. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. Agric. Zool. Review. 6: 63-94.
- Georgis, R., 1990. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Gaugler,R.; Kaya, H.K. Editora CRC Press: Boca Ration, Florida 173-191.
- Gonçalves, L., 2000. Biologia e comportamento de *Dysdercus ruficollis* (Linnaeus, 1764) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) em condições de laboratório. Flor. Amb. 7:68-79.
- Göts, P. & Boman, H.S., 1985. Insect Immunity. In Kerkut, C.A. & Gilbert L.I. eds. Comprehensive Insect Pathology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, Pergamon Press. 3: 453-485.
- Götz, P., Boman, A., Boman, H.G., 1981. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. Proc. Roy. Soc. Lond. B212: 334- 350.
- Gram, C. 1884. Ueber die isolirte färbung der Schizomyceten in schitt-and trockenpreparaten. Fortschritte der Medicin, 2: 185-189.
- Gualgliumi, P., 1972. Pragas da cana-de-açúcar (Nordeste do Brasil). Rio de Janeiro. IAA 622p.
- Haas, F. & König, H., 1987. Characterisation of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). FEMS Microbiol. Ecol. 45: 99-106.
- Haines, C.P., 1984. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. III. The use of predators and parasites. Trop. Stored. Prod. Inf. 48: 17-25.

- Hambleton, E.J., 1937. A existência da *Platyedra gossypiella* (Saunders) na floração, dos algodoeiros em São Paulo durante 1936-1937. Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo. 8: 249-254.
- Hensley, S.D. & Hammond, A.H., 1968. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61: 1742-1743.
- Hluchy, M. & Samsinakova, A., 1989. Comparative study on the susceptibility of adult *Sitophilus granaries* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) to the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. J. Stored. Prod. Res., 25: 61-64.
- Howard, D.J. & Bush, G.L., 1989. The influence of bacteria on larval survival and development in *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 82: 633-640.
- Howard, D.J., 1989. The symbionts of *Rhagoletis*. In: Robinson A.S. and Hooper G. (eds.), Fruitflies, Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier, Amsterdam 121-129
- Howe, R.W., 1965. A summary of estimates of optimal and minimal conditions for population increase of some stored products insects. J. Stored Prod. Res. 1: 177-184.
- Hu, J. & Webster, J.M., 2000. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus*-Heterorhabditis infected *Galleria mellonella* larvae. FEMS Microbiol. Letters. 189: 219-223.
- I.C.I. 1988. Proteção dos grãos armazenados. Manual Técnico. 17p.
- Itoh, J., Shomura, T., Omoto, S., Miyado, S., Yuda, Y., Shibata, U., Inouye, S., 1982. Isolation, physiochemical properties and biological activities of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus*. Agric. Biol. Chem. 46: 1255-1259.
- Janzen, D.H., 1971. Seed predation by animals. Ann. Rev. Ecol. Syst. 2: 465-492.
- Janzen, D.H., 1977. The interaction of seed predators and seed chemistry. In: Laberyrie, V. Ed. Colloques Internationaux du C.N.R.S., Paris, 415-428.
- Janzen, D.H., 1978. The ecology and evolutionary biology of seed chemistry as relates to seed predation. In: Harbone, J.B. ed. Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution. Acad. Press, New York 163-205.

- Jarosz, J., 1996. Ecology of antimicrobials produced by bacterial associates of *Steinernema carpocapsae* and *eterorhabditis bacteriophora*. Parasitology. 112: 545-552.
- Jurzitza, G., 1979. The fungi symbiotic with anobiid beetles, In Insect Fungal Symbiosis (edited L.R. Batra), Wiley, New York.
- Kaya H.K. & Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38: 181-206.
- Kettle, D.S., 1985. Medical and Veterinary Entomology. John Wiley & Sons Publ., New York, 658 p.
- Kiefer, H., 1932. Der einfluss von kalte und hunger aud die symbionten der anobiiden –und cerambycidenlarven. Zentralhl Bakteriol. 86.
- Kinuura, H., 1995. Symbiotic fungi associated with Ambrosia beetles. Jarq. 29: 57-63.
- Koch, A. ,1960. Intracellular symbiosis in insects. Annu. Rev. Microbiol. 14: 121-140.
- Koppenhöfer, A.M. & Fuzy, E.M., 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*, a scarab-adapted entomopathogenic nematode from New Jersey. J. Inv. Pathol. 83:139-148.
- Korunic, Z., 1998. Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. J. Stored Prod. Res. 4: 87-97.
- Krieg, A., Hugger, A.M., Langenbruch, G.A., Schnetter, W., 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von Coleopteren wirksamer pathotyp. J. Appl. Entomol. 96: 500-508.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. Nature. 227: 680-685.
- Lawrence, J.F. & E.B. Britton., 1991. Coleoptera. Cornell University Press, New York, 543-683.
- Leite, L.G., Batista Filho, A., Prada, W.L.A., 1990. Produção de *Neoplectana glaseri* Steiner em lagartas vivas e mortas de *Galleria mellonella* L. Rev. Agric. 65: 225-231.
- Leite, L.G., Machado, L.A., Ginarte, C.M.A., 2004. Nematóides contra os insetos. Rev. Cultivar Grandes Culturas. Ano 6, 64: 12-15.
- Lewis, E.E., Gaugler, R., Harrison, R., 1992. Entomopathogenic nematode host finding: response to contact cues by cruise and ambush foragers. Parasitology 105: 309-315.

- Li, J., Chen, G., Webster, J.M., 1997. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteraceae). *Can. J. Microbiol.* 43: 770-773.
- Li, J., Hu, K., Webster, J.M., 1998. Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Chem. Heteroc. Comp.* 34: 1561-1570.
- Lima Filho, M., 1999. Aperfeiçoamento dos sistemas de produção e liberação inundativa de *Trichogramma galloi* zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense, 111p.
- Linnaeus, C. von., 1758. *Systema naturae regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus differentibus, synonymis, locis.* Editio decima reformat. 1.
- Lorini, I., 2001. Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados, Embrapa Trigo.
- Lorini, I., Ferreira Filho, A.; Barbieri, I., Demaman, N.A., Martins, R.R., Dalbello, O., 2001. Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. *Agroecol. Desenv. Rur. Sust.* 2: 32-36.
- Luthy, P.D., Studer, D., Jaquet F., Yamvrias, C., 1983. Morphology and *in vitro* cultivation of the bacterial symbiont of *Dacus oleae*. *Schweiz Entomol. Geschalt.* 56: 67-72.
- Martignori, M.E. & Iwai, P.J., 1981. A catalogue of viral diseases of insects. Mites and Ticks. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980.* Burges. H.D. ed., Acad. Press, 949p.
- Martin, W.R., Grisham, M.P., Kenrley, C.M., Sterling, W.L. & Morgan, P.W., 1987. Microorganisms associated with cotton fleahopper *Pseodotomoscelis seriatus* (Heteroptera: Miridae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 80: 251-255.
- Mckillip, J.L., Small, C.L., Brown, J.L., Brunner, J.F., Spence, K.D., 1997. Sporogenous midgut bacteria of the leafroller, *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ. Entomol.* 26:1475-1481.
- McInerney, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R.J., Engelhardt, L.M., White, A.H., 1991a. Biologically active

- metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. J. Nat. Prod. 54: 774-784.
- McInerney, B.V., Taylor, W.C., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Gregson, R.P., 1991b. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. J. Nat. Prod. 54: 785-795.
- Melo, I.S. & Azevedo, J.L., 1998. Controle Biológico. São Paulo: Editora Embrapa, Vol. 1., 264p.
- Merck, R. F. & Gomes, N. K., 1982. Beneficiamento e armazenamento de grãos. In: Controle de Pragas em Grãos Armazenados. Cia. Estadual de Silos e Armazéns, 104p.
- Mracek, Z., Hernandez, E.A., Boemare, N.E., 1994. *Steinernema cubana* sp. N. (Nematoda: Steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium. J. Inv. Pathol. 64: 123-129.
- Munro, J.W., 1966. Pests of Stored Products. Hutchinson & Co. (Publishers) Ltda., 234p.
- Nguyen, K. B. & Smart, G. C., 1994. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen. n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). 1994. Journal of Nematology. 26:162-174.
- Nguyen, K.B. & Smart, G.C., 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. Steinernematidae: Nematoda). J. Nematol. 22: 187-199.
- Nguyen, K.B., Shapiro-Ilan, D., Stuart R.J., MCCoy, C.W., James, R.R., Adams, B.J., 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Tamaulipas, Mexico with morphological studies of bursa of *Heterorhabditis* spp. Nematology, 6: 231-244.
- Noelting, G. & Bernfeld, P., 1948. Sur les enzymes amylolytiques III – La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. Helvetica Chem. Acta 31: 286-290.
- Novaretti, W.R.T., Pereira, I.J., Santos, A.F. do, Silva, L.A. da., 1999. Controle químico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, por meio da aplicação aérea do inseticida fipronil 800 WG. STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, vol 18, 2: 41-44.

- Nyirady, S.A., 1973. The germfree culture of three species of Triatominae: *Triatoma protracta* (Uhler), *Triatoma rubida* (Uhler), and *Rhodnius prolixus*. Stal. J. Med. Entomol. 10: 417-448.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79.
- Oliveira, S.M.P., de Moraes, B.A., Gonçalves, C.A., Giordano-Dias, C.M., d'Almeida, J.M., Asensi, M.D., Mello, R.P., Brazil, R.P., 2000. Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes do campo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 33: 319-322.
- Pacheco, I.A., 1991. Resistência de pragas de grãos armazenados a pesticidas. 5º Encontro. Atualização sobre os métodos de controle. ESALQ/USP, resumos 100-109.
- Paiva, M.R., 1998. O setor gera empregos. Jornalcana, 5 (57): 10-16.
- Panizzi A.R. & Parra J.R.P. 1991. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Ed: Manole. São Paulo.
- Panizzi, A.R. & Slansky, F.Jr., 1985. *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae): an unusual host of the tachinid *Trichopoda pennipes*. Fl. Entomol. 68: 485-486.
- Parkin, E.A., 1965. The onset of insecticide resistance among field populations of stored-products insects. J. Stored. Prod. Res., 1: 3-8.
- Paul, V.J., Frautschy, S., Fenical, W., Neilson, K.H., 1981. Antibiotics in microbial ecology, isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. J. Chem. Ecol. 7: 589-597.
- Pereira, C., 1937. *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da "broca do algodoeiro" (*Gasterocercodes brasiliensis*). Arch. Inst. Biol. 8: 215-230.
- Pereira, P. R. V. S. & Almeida, L. M., 2001. Chaves para identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. Revta Bras Zool. 18: 271-283.
- Perty, J. A. M., 1832. Delectus animalium articulorum quae in itinere per Brasilian annis MDCCCXVII-MDCCCXX jussu at auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae

regis augustissime peracto collegerunt Dr. J.B. de Spix et Dr. C.F. Ph. de Martius. Monachii, 61-124, p13-24.

- Pesticide Resistance. Database of Arthropds Resistant to Pesticides. Resistant Species Profile: *Diatraea saccharalis*. Disponível em http://www.pesticides.gov.uk/rags_home.asp Acesso em: 09 dez 2007.
- Peters, A., 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 389-402.
- Phaff, H. J. & Starmer, W.T., 1987. Yeasts associated with plants, insects and soil. In A. H. Rose & J. S. Harrison (eds.), *The yeasts*. London, Academic Press, p. 123-180.
- Phillips, J.K. & Burkholder, W.E., 1984. Health Hazards of Insects and Mites in Food. In *Insect Management for Food Storage and Processing*. (Bauer F.J., ed.) pp 280-293. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- PLANALSUCAR 1977. Relatório Anual, Rio de Janeiro, IAA, 100p.
- Poinar, G.O., 1975. *Entomopatogenous nematodes, a manual and host list of insect-nematode associations*. Leiden, E.J.Brill, 254p.
- Poinar, G.O., 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n.gen. (Rhabditida: Heterorhabditidae n.fam.). *Nematologica*. 21: 463-470.
- Poinar, G.O., 1979. *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press: Boca Ration, Florida, USA 277p.
- Poinar, G.O., 1990. Taxonomy and biology of Sternernematidae and Heterorhabditidae. In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (Gaugler R. and Kaya H.K.), CRC. 23-60.
- Poinar, G.O., Jackson, T., Klein, M., 1987. *Heterorhabditis megidis* sp. N. (Heterorhabditidae: Rhabditidae) parasitic in the Japonesse beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera) in Ohio. *Proc. Helminthol. Soc. Washington*. 54: 54-59.
- Poinar, G.O. & Thomas, G.M. (1967). The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*. 9: 510-514.
- Press, J.W., Flaherty, B.R., Arbogast, R.T., 1975. Control of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, in a warehouse by a predaceous bug. *Xylocoris flavipes*. *J. Georgia. Entomol. Soc.*, 10: 76-78.
- Prossiga, <http://www5.prossiga.br/basesdedados/> (20 dez. 2007).

- Puzzi, D., 1977. Os insetos que atacam grãos armazenados. Em: Manual de Armazenamento de Grãos – Armazéns e Silos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 405p.
- Quarles, W., 1992. Diatomaceous earth for pest control. IPM Practitioner 14: 1-11.
- Raulston, J. R., Pair, S. D., Lorea, J., Cabanillas, H. E., 1992. Prepupal and pupal parasitism of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera rugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) by *Steinernema* sp. in cornfields in the Lower Rio Grande Valley. J. Econ. Entomol. 85: 1666-1670.
- Reichmuth, C., Schöller, M. & Ulrichs, C., 1997. Gelsenkirchen 119.
- Rodríguez, M.Z., Rodríguez, L., Sanchez, L., Iglesia, A., 1996. Identification and morphological characterization of three strains of entomopathogenic nematodes of Cuba. Revta. Protec. Vegetal 3: 159-163.
- Roman, J. & Figueroa, W., 1994. *Steinernema puertoricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. J. Agric. Univ., Puerto Rico, 78: 167-175.
- Rosa, J.S., Cabral, C., Simões, N., 2002. Differences between the pathogenic processes induced by *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditida) in *Pseudaletia unipuncta* (Insecta: Lepidoptera). J. Invert. Pathol., 80: 46-54.
- Rossi, M.N. & Fowler, H.G., 2004. Predaceous ant fauna in new sugarcane fields in the state of São Paulo, Brazil. Braz. Arch. Biol. Technol. Curitiba. 47: 805-811.
- Saenz, A., 1999. Process evaluation for isolation and storage of a native entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). Rev. Colomb. Entom. 25: 209-215.
- Schlein, Y. & Muller, G., 1995. Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitos (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 32: 882-888.
- Shawir, M., Le Patourel, G.N.J., Moustafa, F.I., 1988. Amorphous silica as an additive to dust formulations of insecticides for stores grain pest control. J. Stored. Prod. Res., 24: 123-130.
- Silva, C.P., Waterfield, N.R., Daborn, P.J., Dean, P., Chilver, T., Au, C.P.Y., Sharma, S., Potter, U., Reynolds, S.E., French-Constant, R.H., 2002. Bacterial infection of a model insect: *Photobacterium luminescens* and *Manduca sexta*. Cell. Microbiol. 4: 329-339.

- Simmonds, F.J., Franz, J.M., Sailer, R.I., 1976. History of biological control. In: Theory and Practice of Biological Control. Huffaker, C.B. & Messenger, P.S. Eds. Academic Press, New York 788p.
- Slansky Jr, F. & Panizzi, A.R., 1987. Nutritional ecology of sedd-sucking insects. p283-320 In: Slanky, Jr.F. & Rodriguez, J.G., eds., Nutritional Ecology of nsects, mites spiders, and related invertebrates, New York, J. Wiley & Sons. 1016p.
- Stam, P.A., Newsom, L.D., Lambremont, E.N., 1987. Predation and food as factors affecting survival of *Nesara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) in a soy bean ecosystem. Environ. Entomol. 16: 1211-1216.
- Stock, S., 1992. Presence of *Steinernema scapterisci* Nguyen et Smart parasitizing the mole cricket *Scapteriscus borellii* in Argentina. Nematol. Medit. 20: 163-165.
- Stock, S.P., 1993a. A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar 1976 (Nematoda: Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. Larvae (Coleoptera: Curculionidae) from Argentina. Res. Rev. Parasitol., 53: 103-107.
- Stock, S.P., 1993b. Description of an Argentinian strain of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Nematoda: Steinernematidae). Nematol. Mediterranea 2: 279-283.
- Stupiello, J.P., 1987. A cana-de-açúcar como matéria prima. In: Paranhos, S.B. (Coord.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas. Fundação Cargil. 2: 187-259.
- Sundar, L. & Chang, F.N., 1993. Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. J. Gen. Microbiol. 139: 3139-3148.
- Sztaricskai, F., Dinya, Z., Batta, G., Szallas, E., Szentirmai, A., Fodor, A., 1992. Anthraquinones produced by enterobacters and nematodes. Acta Chimica Hungarica – Models in Chem. 129: 697-707.
- Terra, W.R., Ferreira, C., De Bianchi, A.G., 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. J. Insect Physiol. 25: 487-494.
- Thomas, G.M. & Poinar, G.O., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov. a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 29: 352-360.

- Travassos, L. 1927. Sobre o genera *Oxysomatium*. Boletim Biologico 5:20-21.
- Weiser, J. 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata, Steinernematidae) nový cizopasník housenek obalece jablecneho, *Carpocapsa pomonella* L. Vestn. Cesk. Zool. Spol. 19: 44-52.
- Travland, L.B., 1979. Initiation of infection of mosquito larvae (*Culiseta inornata*) by *Coelomomyces psorophorae*. J. Invertebr. Pathol. 33: 95-105.
- Van Driesche, R.G. & Bellows Jr, T.S., 1996. Biological Control. New York, Chapman & Hall, (eds), 539p.
- Van Sambeek, J. & Wiesner, A., 1999. Successful parasitism of locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with inhibition of insect phagocytes. J. Invertebr. Pathol. 73: 154-161.
- Walsh, K.T. & Webster, J.M., 2003. Interaction of microbial populations in *Steinernema* (Steinernematidae, Nematoda) infected *Galleria mellonella* larvae. J. Invertebr. Pathol. 83, 118–126.
- Waterfield, N., Kamita, S.G., Hammock, B.D., French-Constant, R.H., 2005. The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. FEMS Microbiol. Lett. 245: 47-52.
- Weiser, J., 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata: Steinernematidae) a new nematode parasite of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L). Acta. Soc. Zool. Bohemoslovaca. 19: 44-52.
- Youngjin, P. & Yonggyun, K., 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46: 1469-1476.
- Zacharuk, R.Y., 1981. Fungal diseases of terrestrial insects. In: Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Davidson, E.W. ed., Allanheld, Osmun Publ., 562p.

ANEXO I

DIETA ARTIFICIAL

Água destilada	1.558,0 mL
Aureomicina	0,50 g
Sais de Wesson	18,0 g
Caseína	54,0 g
Sacarose	90,0 g
Germe de trigo	54,0 g
Cloreto de colina	1,8 g
Solução vitamínica	18,0 mL
Ácido ascórbico	7,2 g
Formaldeído (37,2 %)	0,9 mL
Metil-p-hidroxibenzoato	2,7 g
Bacto-agar	36 g

A solução vitamínica consta das seguintes vitaminas, dissolvidas em 1.000 ml de água destilada.

Niacinamida	1g
Pantotenato de cálcio	1 g
Riboflavina	0,5 g
Tiamina	0,25 g
Piridoxina	0,25 g
Ácido fólico	0,1 g
Biotina	0,02 g
Vitamina B12 (1000 mg/cc)	2 mL

ANEXO II

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

1. Agar Eozina Azul de Metileno (EMB)

Composição	gramas por litro
Peptona de carne	10,0
Lactose	5,0
Sacarose	5,0
Hidrogenofosfato de potássio	2,0
Eosina y amarela	0,4
Azul de metileno	0,065
Agar	15,0

pH 7,0 ± 0,2

2. Agar MacKonkey

Composição	gramas por litro
Peptona	17,0
Polipeptona	3,0
Lactose	10,0
Sais biliares	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5
Água	1000 mL

pH 6,9 ± 0,2

3. Agar Manitol

Composição	gramas por litro
Peptona de carne	10,0
Extrato de carne	1,0
D-manitol	10,0
Vermelho de fenol	0,025
Agar	15,0

pH 7,4 ± 0,2

4. Agar Mueller Hinton

Composição	gramas por litro
Infusão de carne	300,0
Caseína	17,5
Amido	1,5
Agar	17,0
Água	1000 mL

pH 7,4 ± 0,2

5. Agar Padrão para Contagem (APC)

Composição	gramas por litro
Triptona	5,0
Extrato de levedura	2,5
Dextrose	1,0
Agar	15,0

pH 7,0 ± 0,2

6. Caldo infusão de cérebro e coração (BHI)

Composição	gramas por litro
Infusão de cérebro de carneiro	12,0
Infusão de coração de boi	5,0
Peptona	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dissódico	2,5
Glicose	2,0
Água	1000 mL

pH 6,9 ± 0,2

7. Caldo Luria Bertani (LB)

Composição	gramas por litro
Triptona	10,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5
Água	1000 mL

pH 7,0 ± 0,2

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)