



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO**

**PROGRAMA MULTINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**



**Potencial biológico de bactérias cultiváveis de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) da biota
Amazônica, ativas contra este vetor**

Juan Campos de Oliveira

JUAN CAMPOS DE OLIVEIRA

Potencial biológico de bactérias cultiváveis de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) da biota Amazônica, ativas contra este vetor

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC- UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

Co-Orientadora: Dra. Rosemary Aparecida Roque

Co-orientador: Dr. Ricardo de Melo Katak

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48p Oliveira, Juan Campos de
Potencial biológico de bactérias cultiváveis de *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762) da biota Amazônica, ativas contra este vetor /
Juan Campos de Oliveira . 2024
73 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi-Filho
Coorientadora: Rosemary Aparecida Roque
Coorientador: Ricardo de Melo Katak
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Microbiota bacteriana. 2. Metabolismo. 3. *Aedes aegypti*. 4.
Vetor. 5. Controle biológico. I. Astolfi-Filho, Spartaco. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que ao longo de toda minha jornada sempre esteve comigo guiando meus caminhos e me concedendo forças em todos os obstáculos, permitindo a realização deste objetivo. A caminhada foi árdua, mas uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia PPGBIOTEC, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, pela oportunidade da realização deste objetivo acadêmico.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue.

Ao meu orientador Dr. Spartaco Astolfi-Filho, e coorientadores Rosemary Aparecida Roque e Ricardo de Melo Katak, , pela oportunidade, dedicação e disponibilidade em contribuir com seus conhecimentos para a realização deste trabalho.

Meus eternos agradecimentos ao saudoso Dr Wanderli Pedro Tadei, por todo o apoio inicial neste trabalho

Aos meus avós João e Maria, meu Pai Valmir Oliveira, por tudo que representam, pelo amor, carinho, dedicação e todas as lições de vida que sempre me proporcionaram. São exemplos de amor incondicional, de caráter que tenho na vida. Amo Vocês!

Aos meus familiares Tia Adma, Tia Jacira, Tia Juliana, Tia Jorlene pelo incentivo e carinho. A minha tia Jocely Campos pelo acolhimento durante o período de minha estadia na cidade de Manaus. Sem dúvida serei grato por toda minha vida. Muito obrigado.

A minha irmã, Lindalva Sâmela Oliveira, pela consideração e companheirismo não apenas no decorrer da pós-graduação, mas em toda a minha vida me proporcionando carinho e incentivo para tudo dar certo. Ao meu irmão Antônio Lucas, por todo seu amor e carinho.

Aos meus amigos; Elerson Matos, Deidre Machado, Laura Viana, Izanne, Jackeline Veranilce Muniz, Anny Caroline, pelo companheirismo em todos os momentos da pós graduação, nos procedimentos laboratoriais, com elogios, críticas e acima de tudo com a sua grande amizade.

Aos amigos do Laboratório da Malária e Dengue do INPA; Augusto, Adriano, William, Eunice, Aylanne pelo acolhimento e descontração nos momentos vividos nos intervalos de trabalho. A todos, que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

A microbiota bacteriana associada aos mosquitos apresenta uma diversidade significativa e pode interagir de forma simbiótica ou antagônica com seus hospedeiros, surgindo como alternativa na busca de novos agentes entomopatogênicos. Este estudo analisou bactérias cultiváveis isoladas de todas as etapas do ciclo de vida de *Ae. aegypti*, considerando os seguintes aspectos: i) a atividade larvicida de metabólitos e determinação de CL₅₀ e CL₉₀ contra o *Ae. aegypti*; ii) a identificação taxonômica das bactérias, por meio de análises morfológicas e moleculares; e iii) atividade larvicida dos componentes celulares (Pellet) e sobrenadantes obtidos de *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp. e *Stenotrophomonas* spp. contra o *Ae. aegypti*. No que diz respeito ao primeiro aspecto, foram isoladas 424 bactérias das amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas de *Ae. aegypti*, utilizando os meios de cultivo (NA, LB e ISP2). Todas as bactérias foram testadas quanto ao potencial entomopatogênico contra larvas deste vetor. Nove linhagens dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Stenotrophomonas* apresentaram 100% de atividade larvicida, semelhante à linhagem padrão Bti AM65-52. Em relação ao tópico ii, entre 415 isolados analisados quanto à diversidade bacteriana, 300 são gram-negativas e 115 gram-positivas. Todas as linhagens apresentaram-se como catalase positivas e foram agrupadas em dez morfotipos: coco negativo, bacilo positivo, bacilo negativo, cocobacilo negativo, microbacilo positivo, microbacilo negativo, cocos positivo, micrococcus negativo, diplococo negativo e cocobacilo positivo.. Por meio do sequenciamento do gene *16S rRNA*, foram sequenciadas 68 linhagens bacterianas cujas sequências foram comparadas com as do GenBank. Os gêneros identificados foram: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* e *Sphingobacterium*, os quais foram representantes de três filos. O filo Proteobacteria (60,30%) foi o mais abundante, seguido de Bacillota (36,76%) e Bacteroidetes (2,94%). No terceiro aspecto, nove linhagens que apresentaram atividade larvicida foram utilizadas para o teste das frações do sobrenadante secretado e dos componentes celulares (pellets), quanto à atividade larvicida. Os resultados mostraram que a fração dos pellets das bactérias P18NA-*Enterobacter* sp. e L65NA-*Bacillus* sp. causaram 100% de mortalidade das larvas nas primeiras 24h, respectivamente. Em relação à toxicidade da fração do sobrenadante secretado, a bactéria P18NA- *Enterobacter* sp. ocasionou 100% de mortalidade em 24h, enquanto que a linhagem L65NA-*Bacillus* sp. 98% em até 72h. As frações do pellet e sobrenadante das linhagens apresentaram perfis de toxicidade semelhantes ao da linhagem Bti AM65-52. Portanto, este estudo evidencia que algumas bactérias isoladas de *Aedes aegypti* podem ter um potencial antagônico para o próprio vetor. Os dados são promissores para o desenvolvimento de novos bioinseticidas destinados ao controle desses mosquitos de importância médica. Além disso, este estudo fornece novas informações sobre a estrutura e abundância da microbiota em diferentes estágios do *Ae. aegypti* e uma compreensão das interações entre mosquitos e microrganismos.

Palavras-chaves: Microbiota bacteriana, *Aedes aegypti*, controle biológico, Metabolismo bacteriano

ABSTRACT

The bacterial microbiota associated with mosquitoes is diverse and can interact symbiotically or antagonistically with their hosts, providing an alternative in the search for new entomopathogenic agents. In this study, cultivable bacteria isolated from all life stages of *Ae. aegypti* were analyzed for: i) their larvicidal activity of crude metabolites and determination of LC50 and LC90 against *Ae. aegypti*; ii) taxonomic identification of the bacteria, involving morphological and molecular analyses; and iii) larvicidal activity of cellular components (pellet) and supernatants obtained from *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., and *Stenotrophomonas* spp. against *Ae. aegypti*. For topic i, 424 bacteria were isolated from egg, larva, pupa, and adult female samples of *Ae. aegypti* using culture media (NA, LB, and ISP2). All bacteria were tested for entomopathogenic potential against larvae of this vector. Nine strains of the genera *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Stenotrophomonas* showed 100% larvicidal activity, similar to the standard strain *Bti* AM65-52. Regarding topic ii, among 415 isolates analyzed for bacterial diversity, 300 are Gram-negative and 115 Gram-positive. All strains were catalase positive and presented ten morphotypes: negative coccus, positive bacillus, negative bacillus, negative coccobacillus, positive microbacillus, negative microbacillus, positive cocci, negative micrococcus, negative diplococcus, and positive coccobacillus. The strains were grouped according to morphological characteristics, where a representative of each group was identified by molecular characters. Through 16S rRNA gene sequencing, 68 bacterial strains were sequenced, and their sequences were compared with those in GenBank. The identified genera were: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, and *Sphingobacterium*, representing three phyla. The phylum *Proteobacteria* (60.30%) was the most abundant, followed by *Bacillota* (36.76%) and *Bacteroidetes* (2.94%). Regarding topic iii, nine strains that exhibited larvicidal activity were used to test the fractions of secreted supernatant and cellular components (pellets) for larvicidal activity. The results demonstrated that the pellet fraction of bacteria *P18NA-Enterobacter* sp. and *L65NA-Bacillus* sp. caused 100% larval mortality within the first 24 hours, respectively. Regarding the toxicity of the secreted supernatant fraction, the bacterium *P18NA-Enterobacter* sp. caused 100% mortality in 24 hours, while the strain *L65NA-Bacillus* sp. achieved 98% within 72 hours. The pellet and supernatant fractions of the strains presented toxicity profiles similar to the *Bti* AM65-52 strain. Therefore, this study demonstrates that some bacteria isolated from *Ae. aegypti* may exhibit antagonistic potential towards the vector itself. The data are promising for the development of new bioinsecticides for the control of these medically important mosquitoes. Additionally, this study provides new information on the structure and abundance of microbiota at different stages of *Ae. aegypti* and an understanding of the interactions between mosquitoes and microorganisms.

Keywords: Bacterial microbiota, *Aedes aegypti*, biological control, bacterial metabolism

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Total de linhagens bacterianas obtidas em cada amostra do mosquito (ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas) nos três meios de cultivo (NA, LB e ISP2). 32

Tabela 2: Caracterização morfológica e molecular de bactérias isoladas do ciclo biológico de..... 34

CAPÍTULO II

Table 3: Characterization of isolated bacteria with pathogenicity against Ae. Aegypti larvae. 51

Table 4: : LC50 and LC90 values of bacterial cultures against Ae. aegypti larvae. 51

Table 5: LC50 and LC90 values of bacterial metabolites against Ae. aegypti larvae:..... 52

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Perfil dos morfotipos bacterianos das bactérias isoladas das amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas de <i>Ae. aegypti</i>	32
Figura 2: : Coloração de gram e características morfológicas das colônias bacterianas	33
Figura 3: Abundância de bacterianas identificadas pertencentes ao seu respectivo filo isoladas de ovo, larva, pupa e fêmea adulta de <i>Ae. Aegypti</i>	35
Figura 4: Abundância de espécies bacterianas identificadas pertencentes à sua respectiva família, isoladas de ovo, larva, pupa e fêmeas adultas de <i>Ae. Aegypti</i>	35
Figura 5: Ocorrência de gêneros bacterianos identificados nas amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas de <i>Ae. Aegypti</i>	36

CAPÍTULO II

Figure 6: . Graphical abstract	46
Figure 7: Mortality of third instar <i>Ae. aegypti</i> larvae exposed to isolated bacterial strains.	50

CAPÍTULO III

Figure 8: Atividade larvicida de frações de culturas microbianas. PEL= Pellet e SUP= Sobrenadante. (A) PEL = 0,5 mg/ml de pellet liofilizado (B) SUP = Aliquotas de 1000, 500, 250 e 125 ml do sobrenadante. A mortalidade das larvas foi avaliada em 24, 48 e 72 horas. CN – controle negativo com água no lugar de frações de cultura microbiana.	64
Figura 9: Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas a fração do pellet (PEL) da linhagem P18NA- <i>Enterobacter</i> sp.* CN=Controle negativo. CB= Contaminação bacteriana. As setas vermelhas indicam possíveis colonizações de bactérias nas superfícies das estruturas das larvas.	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762), (Diptera: Culicidae).....	12
2.2 Capacidade e competência vetorial de <i>Aedes aegypti</i> a arbovírus.....	13
2.3 Estratégias de controle populacional do <i>Aedes aegypti</i>	14
2.4 Microbiota bacteriana associada ao <i>Aedes aegypti</i>	15
2.5 Mecanismos de aquisição e modulação de bactérias	17
2.6 Microbiota bacteriana e ciclo de vida do mosquito	18
2.7 Influência da microbiota bacteriana na competência vetorial	19
2.8 Identificação de bactérias pelo gene 16S rRNA	20
2.9 Bioprospecção de metabólitos de bactérias com potencial entomopatogênico.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Geral	23
3.2 Específicos.....	23
CAPÍTULO I	24
Resumo	24
Abstract	25
Introdução.....	26
Material e métodos	27
Resultados	31
Discussão.....	36
Conclusão	40
Referências	40
CAPÍTULO II	44
Abstract	45
Introduction	46
Materials and methods.....	47
Results	50
Discussion	52
Conclusion.....	54
References	55
CAPÍTULO III.....	59
Resumo	59
Abstract	60
Introdução.....	61
Material e métodos	62
Resultados	63
Discussão.....	65
Conclusão	67
Referências Bibliográficas.....	67

CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO

Mosquitos da família Culicidae estão distribuídos nas cinco regiões biogeográficas do globo terrestre, sendo encontrados em ambientes de florestas tropicais, que abrigam a maior diversidade de espécies (HARBACH 2022; WRBU 2022). No Brasil, o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é o principal vetor de patógenos que causam doenças como a dengue, chikungunya, zika, entre outras, que ainda infectam milhares de pessoas em todo o mundo (VEGA-RÚA et al., 2014; CAMPBELL et al., 2015; LIMA-CAMARA, 2016; LETA et al., 2018; KRAEMER et al., 2019).

A diminuição da transmissão desses arbovírus pode ser ocasionada com a diminuição da população do vetor, sendo os inseticidas como Clotianidina, Deltametrina, Imidacloprido e Praletrina alguns dos mais utilizados para tal finalidade (MS, 2022). No entanto, o uso contínuo e prolongado pode ocasionar a seleção de mosquitos resistentes, contaminação ambiental e de alimentos, efeitos nocivos em outros organismos e alto custo econômico (AMELIA-YAP et al., 2020).

Diante disso, é necessário implementar novas medidas de controle para o vetor que sejam ecologicamente corretas e seguras para o meio ambiente, como os bioinseticidas provenientes de microrganismos entomopatogênicos e moléculas produzidas pelo metabolismo de bactérias e fungos (ALVES, 1998; SALDANHA et al., 2017; FALQUETO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021). A utilização deste método alternativo é promissora, pois apresenta vantagens como o baixo custo, e alguns metabólitos podem apresentar mecanismo de ação direcionada ao organismo alvo e menor impacto no meio ambiente e na saúde humana (KATAK et al., 2023).

As bactérias são capazes de produzir uma diversidade de metabólitos, alguns dos quais são responsáveis pelo processo de adaptação e sobrevivência das mesmas. Além disso, podem ser utilizadas em diversos processos biotecnológicos, industriais, farmacêuticos e no controle de vetores de doenças e pragas agrícolas (SEYEDSAYAMDOST, 2019). Espécies bacterianas como *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Brevibacillus halotolerans* e *Serratia marcescens* demonstraram evidências de patogenicidade para o controle de populações de *Ae. aegypti*, *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus* (BRAVO et al., 2007; DONOVAN et al., 2015; SOARES-SILVA et al., 2017; BARBIERE et al., 2021; KATAK et al., 2021). A descoberta de novas bactérias, genes ou vias metabólicas podem ser exploradas de microrganismos por meio de diversas abordagens envolvendo técnicas como a genômica, proteômica e metabolômica (PERNICE et al., 2014; BARBOSA et al., 2015; PEREIRA et al., 2017). Com isso, essa interação de diversas áreas pode auxiliar na descoberta de novos agentes entomopatogênicos e novas moléculas bioinseticidas.

Os microrganismos, como componentes dos ecossistemas, são amplamente encontrados na natureza em diversos ambientes, como solos, plantas, águas e insetos (QIU et al., 2023). A

microbiota bacteriana associada ao *Aedes aegypti* molda-se mutuamente e coloniza os seus diferentes órgãos, influenciando significativamente o ciclo biológico e a competência vetorial por meio de interações simbióticas ou microparasitárias (GENDRIN & CHRISTOPHIDES, 2013). Conhecer as principais interações e a variabilidade genética das espécies constituintes da microbiota bacteriana associada ao *Ae. aegypti* é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle vetorial. A caracterização das bactérias associadas ao *Ae. aegypti* e a identificação de bactérias com potencial larvicida podem contribuir para o controle do mosquito vetor e reduzir a transmissão de arbovírus.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), (Diptera: Culicidae)

O mosquito *Aedes aegypti* possui ciclo biológico holometábolo (ovo, larva, pupa e adulto). Esse ciclo inicia em criadouros contendo água, onde os mosquitos põem os ovos que eclodem em larvas, passam pela fase de pupa e eventualmente se transformam em adultos. Os ovos são de formato alongado e fusiforme e, após a embriogênese, quando armazenados em condições desfavoráveis para a eclosão das larvas, podem entrar em diapausa embrionária e manter a viabilidade embrionária por cerca de um ano (SILVA & SILVA, 1999; POWELL & TABACHNICK, 2013). A resistência embrionária é um dos principais obstáculos ao controle do vetor, pois possibilita a dispersão da espécie para diferentes locais, aderidos em recipientes como pneus, vasos de plantas e materiais descartáveis (FORATTINI, 2002; SIMMONS et al., 2012).

O estágio larval é constituído por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4), morfologicamente idênticos, mas diferentes em tamanho. As larvas se alimentam da matéria orgânica e dos microrganismos presentes nos criadouros. Após o quarto estágio, entram no estágio de pupa, que não se alimenta, mas permanece no ambiente aquático onde ocorre a metamorfose para a fase adulta e reprodutiva (FORATTINI, 2002; KRAEMER et al., 2015). Fatores bióticos e abióticos do ambiente larval, como a temperatura, matéria orgânica, densidade populacional de larvas e a microbiota, têm influência na biologia dos imaturos e na fisiologia dos adultos.

Os mosquitos adultos apresentam, morfologicamente, escamas na cor escura, faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto. Os machos geralmente são menores, possuem antenas plumosas e palpos alongados, enquanto as fêmeas são maiores, possuem antenas pilosas e palpos curtos. Ambos os sexos se alimentam de néctar obtido dos vegetais, seiva e outras fontes de carboidratos (FORATTINI, 2002; POWELL & TABACHNICK, 2013; YIMER et al., 2016). As fêmeas adultas são também hematófagas e se alimentam do sangue de vertebrados, preferencialmente dos humanos, os quais são fontes de

proteínas essenciais ao metabolismo do ciclo gonadotrófico (ANOOPKUMAR & ANEESH, 2021).

A hematofagia aumenta a probabilidade de adquirir e transmitir patógenos, e as condições ambientais e fisiológicas influenciam na longevidade. Este comportamento dos mosquitos tem implicações significativas em suas interações com microrganismos, como, por exemplo, podem ingerir várias bactérias durante a alimentação sanguínea, e estes microrganismos podem colonizá-los. Além disso, a seleção dos hospedeiros e a localização geográfica são alguns dos fatores que também moldam a formação de sua microbiota (GAO et al., 2020).

O *Ae. aegypti* é uma espécie de origem africana e foi descrita no ano de 1762 por Linnaeus no Egito, sendo originalmente encontrada em habitats silvestres de florestas tropicais, cujos criadouros eram os buracos em árvores, bromélias, folhas e a fonte de alimentação sanguínea os animais silvestres (CHRISTOPHERS, 1960). A interação humana com o habitat do *Ae. aegypti* interferiu em seus hábitos silvestres, levando à adaptação ao ambiente urbano e à preferência por criadouros e fontes de alimentação, como o sangue humano, que se tornou alimento comum para as fêmeas (POWELL & TABACHNICK, 2013; SHARAGAI et al., 2017).

Nas últimas décadas, mudanças climáticas, demográficas e sociais criaram nichos ecológicos favoráveis ao aumento populacional do *Ae. aegypti* em todo o mundo (SHARAGAI et al., 2017). Devido a esses fatores, a distribuição geográfica desse mosquito compreende as zonas urbanas e periurbanas das regiões tropicais e subtropicais do planeta (KRAEMER et al., 2015; KAMAL et al., 2018).

No Brasil, foi registrada a presença do *Ae. aegypti* durante o século XVIII, na época em que ocorria o comércio de escravos (FORATTINI, 2002; MONTEIRO et al., 2014). Desde então, ele se prolifera em diversas regiões do país. Embora tenham sido implementadas medidas de intervenção para o controle vetorial, há alta densidade populacional deste mosquito em áreas urbanas de todos os estados brasileiros (MAITRA et al., 2019).

2.2 Capacidade e competência vetorial de *Aedes aegypti* a arbovírus

Devido ao aumento populacional do *Aedes aegypti* e à interação entre o vetor e seres humanos, houve também maior transmissão de arbovírus como o da Dengue, Zika e Chikungunya, que infectam milhares de pessoas em todo o mundo (PINCEBOURDE et al., 2016; WONG et al., 2022). Múltiplos fatores estão associados à proliferação dessas doenças, incluindo a capacidade e competência vetorial, que enfatizam a probabilidade do *Ae. aegypti* em obter e transmitir arbovírus aos hospedeiros suscetíveis (VALDERRAMA et al., 2017).

O mosquito adquire os vírus durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, os quais são abrigados no lúmen do intestino médio. Posteriormente, os vírus infectam e se replicam

nas células epiteliais, e após isso se proliferam nas glândulas salivares, pelas quais são transmitidos a outro hospedeiro, por meio de um novo repasto sanguíneo (POWELL & TABACHNICK, 2013). Conhecer como ocorre o ciclo de replicação dos arbovírus nos órgãos dos mosquitos, bem como a cadeia de transmissão, é importante para o desenvolvimento de medidas de prevenção e monitoramento dessas doenças (DA COSTA et al., 2017; AMOA- BOSOMEM et al., 2021).

A obtenção e disseminação desses vírus pode ser influenciada pelo sistema imune do hospedeiro, nutrição, composição da microbiota, sorotipo viral, bem como as condições ambientais, como temperatura, exposição a inseticidas químicos e origem geográfica do vetor (VILLEGAS et al., 2018; AUBRY et al., 2020; GODOY et al., 2021; CHAVES et al., 2022).

Na natureza, os mosquitos estão expostos a distintas pressões de seleção que podem ocasionar mudanças genéticas e no seu ciclo de vida. Estudos demonstram diferenças genéticas e na suscetibilidade para a infecção de vírus como da Dengue em diferentes populações de *Ae. aegypti*, e isso pode estar relacionado a diferentes expressões de genes envolvidos em vias imunológicas (SIM et al., 2013; CHAVES et al., 2022). Esses fatores em conjunto influenciam na suscetibilidade à invasão arboviral e na disseminação dos vírus para as glândulas salivares, e posterior transmissão a hospedeiros suscetíveis, para continuação do ciclo viral (CHEN & VASILAKIS, 2011; POWELL, 2019).

2.3 Estratégias de controle populacional do *Aedes aegypti*

A utilização de inseticidas químicos, como organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretróides, e reguladores de crescimento de insetos (IGRs), é um dos principais métodos de controle populacional de *Ae. aegypti* (GUBLER, 2011; YOOYANGKET et al., 2018). No entanto, a aplicação contínua e a longo prazo tem ocasionado o desenvolvimento da resistência natural do mosquito a estes inseticidas (YOOYANGKET et al., 2018). Isto tem sido um obstáculo preocupante para o uso dessa medida de controle vetorial (RIBEIRO et al., 2021). A elucidação dos mecanismos de resistência ainda não é bem esclarecida, porém, há algumas evidências como: a desintoxicação metabólica de inseticidas, mutações genéticas, diminuição da sensibilidade das proteínas-alvo ou genes e espessamento da epiderme, que reduz a penetração do inseticida (DE ALMEIDA ROCHA et al., 2021; AMELIA-YAP et al., 2018; 2022).

A desintoxicação metabólica de inseticidas é uma via para o desenvolvimento de resistência em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*, pois possuem mecanismos que envolvem a regulação de genes das enzimas citocromo P450 monooxigenase, glutathione S-transferase e carboxilesterase (VONTAS et al., 2020). Além disso, bactérias associadas à microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, como *Burkholderia mallei*, *Stenotrophomonas maltophilia* e

Citrobacter amalonaticus, podem influenciar na sua via metabólica relacionada à expressão de genes de desintoxicação de inseticidas, como os piretróides (SCATES et al., 2019; WHANG et al., 2021; GÓMEZ-GOVEA et al., 2022). Devido à resistência dos mosquitos, é importante a implementação de novas estratégias para o controle vetorial. Desta forma, a utilização de microrganismos como as bactérias e suas moléculas sintetizadas pode ser uma alternativa promissora (RAJAGOPAL et al., 2020).

A Organização Mundial da Saúde recomenda a utilização de biolarvicidas comerciais compostos de bactérias *Saccharopolyspora spinosa*, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus*. Estes biolarvicidas são seguros ao meio ambiente, pois são específicos para as larvas de mosquitos, além de serem biodegradáveis. No entanto, há poucas opções disponíveis desses biolarvicidas.

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) é uma bactéria entomopatogênica Gram-positiva cujo produto comercial pode ser aplicado na água para matar larvas de mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*. O mecanismo de ação é por meio da ingestão, sendo que posteriormente os microrganismos se multiplicam no intestino médio e liberam δ -endotoxinas (toxinas Cry) que formam poros nas membranas celulares dos enterócitos e outros órgãos, ocasionando a perda da função de barreira intestinal, seguido de paralisia e a morte da larva (HUANG et al., 2017). A probabilidade de desenvolvimento de resistência é menor em comparação com os inseticidas químicos, mas o uso a longo prazo pode resultar no desenvolvimento de resistência às toxinas Cry nesses mosquitos (KAJLA, 2019).

As bactérias interagem com os mosquitos em geral, e especificamente com o *Ae. aegypti*, podendo alterar a longevidade, competência vetorial, e outros mecanismos desconhecidos. Conhecer essas interações e a composição dessas comunidades bacterianas pode ser uma possibilidade de encontrar novas bactérias simbióticas ou antagônicas que possam ser implementadas como novas estratégias para controlar a população do mosquito, bem como reduzir a cadeia de transmissão das arboviroses.

2.4 Microbiota bacteriana associada ao *Aedes aegypti*

Durante a evolução biológica, organismos procariontes e eucariontes mantiveram estreita relação e numerosas interações, tanto harmônicas quanto desarmônicas. Comensalismo, mutualismo e parasitismo são exemplos de interações que ocorrem entre membros da diversidade biológica em ecossistemas naturais ou antrópicos (BUNNEFELD et al., 2018; CARTHEY et al., 2019). Os mosquitos possuem complexas interações com diferentes espécies de microrganismos que habitam seus órgãos, incluindo o trato digestivo, respiratório e outros. A quantidade de microrganismos que compõem as comunidades microbianas pode ser muito maior que o número

de células do hospedeiro (FELDHAAR, 2011; DELAUX & SCHORNACK, 2021). A complexidade dos mecanismos envolvidos nessas interações é essencial para a manutenção do equilíbrio ecológico nos ecossistemas.

A microbiota associada ao *Aedes aegypti* é constituída por uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, que apresentam elevada variabilidade genética (SCOLARI, 2019). Os gêneros bacterianos constituintes do microbioma associados ao *Ae. aegypti* são principalmente do filo Proteobacteria, Pseudomonadota, Actinomycetota e Bacillota, entretanto, a sua composição exata é altamente variável. As condições ambientais dos nichos ecológicos, características fisiológicas e bioquímicas do sistema digestivo, fontes de alimentos e o ciclo biológico, são alguns dos fatores responsáveis pela diversidade bacteriana (MINARD et al., 2012; GIMONNEAU et al., 2014; JUMA et al., 2021).

Bactérias simbiotes de grande importância para o desenvolvimento dos mosquitos, como *Asaia* e *Wolbachia*, podem colonizar em maior abundância o *Ae. aegypti* com maior tempo de longevidade (WANG et al., 2018). Neste contexto, mudanças na regulação imunológica durante o envelhecimento do mosquito estão relacionadas à idade e podem estar associadas à composição da microbiota bacteriana (SCOLARI et al., 2019). Embora as características intrínsecas sejam parcialmente determinantes das comunidades bacterianas, acredita-se que as variações entre as populações de mosquitos sejam mais dependentes de fatores extrínsecos associados ao ambiente.

Mosquitos da mesma espécie, coletados em locais geográficos diferentes, podem frequentemente ser constituídos por diferentes espécies de bactérias. Populações de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller, criadas e mantidas em diferentes condições, abrigavam microbiota bacteriana diversificada, e mosquitos da mesma espécie coletados em diferentes localidades apresentaram comunidades bacterianas diferentes, tanto na fase imatura quanto na adulta. Isso enfatiza que o ambiente pode ser determinante para a diversificação da composição de sua microbiota (DICKSON et al., 2017; LIN et al., 2021).

Os mosquitos coletados no campo abrigavam maior diversidade bacteriana do que aquela população de mosquitos criados em laboratório, provavelmente devido à maior diversidade de bactérias presentes nos diferentes criadouros (AKORLI et al., 2019). Essa complexa associação entre as bactérias e *Ae. aegypti* pode ocorrer com diversos gêneros, como *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteobacteria* e *Stenotrophomonas*, que já foram detectados nesses mosquitos (MINARD et al., 2015; WANG et al., 2018; SCOLARI et al., 2021).

Portanto, a composição dos microrganismos no *Ae. aegypti* é influenciada tanto por fatores externos quanto internos, como ambientais, genética, idade e sexo. Dessa forma, conhecer os mecanismos fundamentais para que ocorram essas interações pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle populacional desse mosquito vetor.

2.5 Mecanismos de aquisição e modulação de bactérias

Os mosquitos adquirem a maioria das bactérias durante o estágio larval, quando se alimentam da matéria orgânica e microrganismos presentes na água dos criadouros, enquanto na fase adulta, as bactérias são obtidas a partir das fontes de alimentos (WANG et al., 2018; KIM et al., 2015; AKORLI et al., 2019). A maior abundância de bactérias, em muitos insetos, é encontrada no intestino médio, entretanto, as bactérias colonizam todos os órgãos, com destaque para *Wolbachia*, que é uma das bactérias mais estudadas e detectada em diversos tecidos somáticos do *Ae. aegypti* (PIETRI et al., 2016; DA SILVA GONÇALVES et al., 2019).

O tubo digestivo dos mosquitos é um reservatório de bactérias que pode conter táxons bacterianos pertencentes a diversos grupos filogenéticos, como Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Bacillota (MUTURI et al., 2017). O tubo digestivo é dividido em três partes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo que o primeiro e o último são de origem ectodérmica, com revestimento de cutícula, que é eliminado a cada ecdise (FORATTINI, 2002). Bactérias associadas a essas regiões podem ser eliminadas durante a metamorfose das fases imaturas, evidenciando que a microbiota bacteriana é transitória.

A modulação das bactérias no tubo digestivo também é influenciada pela membrana peritrófica (MP), uma estrutura anatômica de dois tipos (I e II) composta por quitinas, proteínas e glicoproteínas localizadas entre o lúmen e o epitélio intestinal (TERRA, 1990; DINGLASAN et al., 2009; WEISS et al., 2014; RODGERS et al., 2017). Na fase larval, a MP do tipo II é sintetizada pelas células localizadas no início do intestino médio e envolve o bolo alimentar. Nas fêmeas adultas, a membrana do tipo I é produzida pelas células do intestino médio durante a alimentação sanguínea, e a sua estrutura envolve o bolo sanguíneo (RODGERS et al., 2017).

Além disso, a MP divide o intestino dos insetos em dois espaços: endoperitrófico e ectoperitrófico. Essa divisão possibilita o controle da passagem de moléculas entre os compartimentos da membrana, permitindo apenas a entrada de enzimas digestivas, nutrientes e moléculas do sistema imunológico. Este mecanismo permite que a maior parte da microbiota permaneça restrita ao espaço endoperitrófico e não ocorra o contato direto da microbiota total com o epitélio intestinal, o que pode impedir uma infecção bacteriana sistêmica (ENGEL & MORAN, 2013; RODGERS et al., 2017). Todavia, a MP pode ser perfurada pelas bactérias que secretam enzimas quitinolíticas, as quais clivam as cadeias de quitina constituintes da MP (KATO et al., 2008).

Na fase de pupa, ocorre a degeneração do canal alimentar e desenvolvimento do mecônio, o qual é envolto por uma membrana que contém os resíduos do epitélio intestinal, e provavelmente uma parte dos microrganismos permanece nestes resíduos. Deste modo, após a emergência da fase adulta, o intestino pode estar estéril ou com pouca diversidade microbiana (MOLL et al., 2001).

Os mosquitos adquirem novamente os microrganismos absorvendo a água do ambiente larval ou após a alimentação com néctar, sangue de vertebrados ou outras fontes de alimentos (WANG et al., 2011). Além disso, durante o ciclo biológico, ocorrem alterações fisiológicas nas células dos túbulos de Malpighi que possibilitam a transmissão transestadial de microrganismos. Este fato foi evidenciado nos estudos de CHAVSHIN et al., (2015) e ROCHA et al., (2021), nos quais foi observado que as bactérias presentes nos estágios de larvas de *Ae. aegypti* e *An. darlingi* permaneceram até a fase adulta.

O sistema imunológico é um dos principais moduladores da microbiota bacteriana intestinal, pois é controlado pelas vias de sinalização humoral: Toll, Immune Deficiency (IMD) e Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT). A presença de bactérias, vírus, fungos e parasitas no epitélio intestinal ativa mecanismos imunológicos como a resposta imune expressa por peptídeos antimicrobianos e a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela enzima dual oxidase (DUOX) (ENGEL & MORAN, 2013; VIEIRA et al., 2014; GABRIELI et al., 2021; CARAGATA & SHORT, 2022).

Apesar dos conhecimentos existentes, ainda é necessário ampliar as pesquisas sobre possíveis fatores que influenciam na aquisição e modulação das bactérias pelo *Ae. aegypti*. Entretanto, o ambiente larval é a principal fonte da microbiota do mosquito, algumas das quais são adquiridas pelos adultos. Alterações subsequentes na microbiota podem ocorrer através da metamorfose, alimentação com sangue e néctar.

2.6 Microbiota bacteriana e ciclo de vida do mosquito

As comunidades bacterianas associadas ao *Ae. aegypti* incluem microrganismos simbióticos benéficos e alguns patogênicos que podem potencialmente afetar o comportamento dos mosquitos. As bactérias colonizam diferentes órgãos e tecidos deste mosquito e interferem significativamente em seu ciclo biológico, em diversos aspectos fisiológicos, como desenvolvimento, reprodução, nutrição, metabolismo, imunidade, entre outros (COON et al., 2016; YADAV et al., 2016; LIN et al., 2021).

Mosquitos axênicos durante o desenvolvimento apresentaram tamanho adulto e longevidade reduzida, enquanto que os mosquitos colonizados por bactérias ao longo do desenvolvimento larval apresentaram características desejáveis ao ciclo biológico (CORREA et al., 2018; ROMOLI et al., 2021). Como exemplo, a riboflavina é essencial ao desenvolvimento do mosquito, e as bactérias podem auxiliar na suplementação desta vitamina (COON et al., 2014; WANG et al., 2021).

Análises do desenvolvimento de larvas de *Ae. aegypti* criadas em condições axênicas demonstraram que a maioria das larvas não se desenvolveu completamente e morreu. Entretanto,

as larvas criadas em associação com as bactérias desenvolveram-se saudáveis em todo o ciclo biológico (THONGSRIPONG et al., 2018). A análise transcriptômica de larvas de mosquitos gnotobióticas destaca que a suplementação de folato, a digestão lipídica e de proteínas pela microbiota também podem ser importantes para o desenvolvimento das larvas (ROMOLI et al., 2021).

Em relação ao repasto sanguíneo, *Ae. aegypti* submetidos a tratamentos com antibióticos antes da alimentação sanguínea demonstraram redução da hemólise, digestão de proteínas e fecundidade (GAIO et al., 2011). Além disso, as bactérias também podem alterar o comportamento de alimentação sanguínea dos mosquitos, como o exemplo da *Serratia*, que pode interferir na capacidade de *Ae. aegypti* se alimentar de sangue, quando comparados com mosquitos não infectados e tratados com antibióticos (KOZLOVA et al., 2021).

A microbiota bacteriana intestinal do mosquito também pode inibir a colonização de outras bactérias. Por exemplo, a colonização de bactérias do gênero *Cedecea* em mosquitos foi reduzida após a colonização subsequente por bactérias do gênero *Serratia* (KOZLOVA et al., 2021). No geral, algumas interações da microbiota com o mosquito já foram descritas e incluem o desenvolvimento, digestão, longevidade, proteção contra patógenos, mudanças na propensão à alimentação sanguínea e resistência a inseticidas. Entretanto, ainda há lacunas de conhecimento em relação às interações que podem existir entre o vetor e sua microbiota associada.

2.7 Influência da microbiota bacteriana na competência vetorial

Os membros da microbiota bacteriana podem alterar a competência vetorial dos mosquitos para transmitir arbovírus e parasitas. Este efeito é específico da espécie e pode ser positivo ou negativo (COON et al., 2016; YADAV et al., 2016; LIN et al., 2021). A diversidade bacteriana associada ao *Ae. aegypti* interage ativamente com os patógenos por meio de sinergismo ou antagonismo (SCOLARI et al., 2019). A colonização de gêneros bacterianos como *Chromobacterium*, *Paenibacillus* e *Proteus*, por exemplo, no intestino médio de *Ae. aegypti*, demonstrou a redução da carga viral de DENV-2 (RAMIREZ et al., 2012, 2014). Apesar de não ter sido esclarecido o mecanismo responsável pela redução da carga viral, isso pode estar associado à indução da expressão gênica de vias imunológicas do mosquito, na presença das bactérias (RAMIREZ et al., 2012, 2014).

Bactérias e patógenos compartilham o ambiente intestinal do vetor; deste modo, as bactérias podem interagir com o patógeno por meio do bloqueio físico de receptores no epitélio intestinal e pela síntese de biofilme, ocasionando efeitos antagônicos e auxiliando o sistema imunológico dos mosquitos no combate à proliferação (WANG & JACOBS-LORENA, 2013; BENELLI et al., 2016; TALYULI et al., 2021). Essas interações têm influência na suscetibilidade

em modular a infecção e a veiculação de patógenos como o Zika vírus e o *Plasmodium falciparum* (DUTRA et al., 2016; WANG et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018).

Mosquitos com maior longevidade têm alta probabilidade de disseminar vírus como o da dengue, visto que, ao infectá-lo, o vírus permanece em um período de incubação para o ciclo replicativo e posterior transmissão a outro hospedeiro. Dessa forma, a redução do tempo de vida do mosquito tem influência na cadeia de transmissão dos vírus (MCMENIMAN et al., 2009; WANG & JI, 2020). A diminuição em até 50% do tempo de vida de *Drosophila melanogaster* adulta e o bloqueio de infecções por vírus de RNA, ocasionados pela proliferação da bactéria *Wolbachia*, estimulou o uso desta bactéria em pesquisas com o *Ae. aegypti* (MIN & BENZER, 1997; MCMENIMAN et al., 2009).

As cepas *wMelPop* e *wMel* de *Wolbachia*, isoladas de *D. melanogaster*, ocasionaram a diminuição de infecções pelos vírus DENV, CHIKV e ZIK V (WALKER et al., 2011; PASSOS, 2011; DUTRA et al., 2016). Os mecanismos ainda não são bem descritos; entretanto, foi proposto que a estimulação imunológica ou a competição por recursos desempenham essa função (DENNISON et al., 2014). Embora alguns microrganismos interfiram negativamente na competência vetorial dos mosquitos, outros podem auxiliar na proliferação. A presença de *Serratia odorífera* na alimentação sanguínea de *Ae. aegypti* demonstrou aumento na prevalência do vírus DENV (APTE-DESHPANDE, 2012).

Sendo assim, a modulação da competência vetorial de *Ae. aegypti* ocasionada pela sua microbiota bacteriana é variável e depende da composição da microbiota e do vírus em questão. Os mecanismos dessas interações entre as bactérias e mosquitos são complexos e permanecem pouco compreendidos, necessitando de mais estudos para serem elucidados. A compreensão destes mecanismos pode potencialmente levar ao desenvolvimento de novas ferramentas, que possam reduzir a competência vetorial e limitar a transmissão de doenças. Com o desafio global da transmissão de doenças, compreender o papel dos microrganismos na relação entre os mosquitos e os arbovírus é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle mais eficazes (YANG et al., 2023).

2.8 Identificação de bactérias pelo gene 16S rRNA

Interações biológicas entre insetos e bactérias podem ser elucidadas por meio da descrição das bactérias associadas ao hospedeiro. Conhecer os principais microrganismos é fundamental para entender os seus efeitos no comportamento dos mosquitos (CHEN et al., 2022). As bactérias compreendem um dos principais grupos de microrganismos e dentro das bactérias, existem três tipos principais de RNAs ribossômicos (rRNA), 5S, 16S e 23S (TSUKUDA et al., 2017). Entre estes, o *16S rRNA* é uma pequena subunidade do RNA ribossômico bacteriano e o gene

codificador para esta subunidade é o DNA ribossômico 16S (rDNA), muito utilizado na identificação taxonômica de gêneros bacterianos, cuja confiabilidade é cientificamente comprovada (AGUILAR-MARCELINO et al., 2020).

O gene 16S rRNA funciona como um marcador genético entre as bactérias, pois as sequências nucleotídicas são conservadas ao longo das gerações dos procariotos. Este gene é composto de 1500 pb e dividido em nove regiões variáveis (V1 a V9), tendo como modelo universal o 16S rRNA da bactéria *Escherichia coli* (COENYE et al., 2005; KLINDWORTH et al., 2013; YANG et al., 2016, SONG et al., 2018).

Além disso, as nove regiões conservadas do gene possibilitam a síntese de primers universais ou específicos a gêneros de bactérias, que guiam a enzima DNA polimerase no processo de amplificação gênica (Reação em cadeia de Polimerase - PCR). O tamanho de 1500 pb do gene facilita as análises por bioinformática (BADOR et al., 2020). Desde a década de 1980, já foram identificadas muitas espécies bacterianas, cujas sequências encontram-se depositadas em bancos de dados (GenBank do National Center for Biotechnology Information-NCBI) (PATEL, 2001; JANDA & ABBOTT, 2007).

As análises das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA consistem em um processamento analítico, cuja função envolve a exclusão de fragmentos ou bases nitrogenadas duvidosas detectadas nos eletroferogramas, obtidos das plataformas de sequenciamento de DNA e alinhamentos das duas fitas, oriundas dos primers Forward (F) e Reverse (R), utilizados na PCR, para gerar uma fita consenso. Essa fita deverá ser comparada com as dos bancos de dados (GenBank do NCBI) bacterianos disponíveis utilizando a ferramenta BLAST (KLINDWORTH et al., 2013).

2.9 Bioprospecção de metabólitos de bactérias com potencial entomopatogênico

O uso de inseticidas no controle vetorial tem sido cada vez mais associado a maior resistência, toxicidade fora do alvo e persistência duradoura na natureza. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos podem ser promissores como alternativas aos inseticidas, sob essas condições (FENIBO et al., 2021). A diversidade bacteriana presente em habitats como água, plantas, solos e insetos é uma fonte rica de biomoléculas, incluindo metabólitos biologicamente ativos. Algumas bactérias podem liberar compostos metabólicos tóxicos de suas células, com atividade larvicida (SHAH et al., 2021).

Estudos com bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são significativos na descoberta de metabólitos secundários com atividades biológicas antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias, antitumorais e inseticidas (KIM et al., 2017). A síntese e secreção de δ -endotoxinas bacterianas são cruciais para a atividade entomopatogênica,

uma vez que o mecanismo de ação larvícida em *Ae. aegypti* pode ser causado pelo processo de replicação celular e produção de toxinas na hemocele, causando lesão histológica e septicemia.

Os metabólitos secundários são substâncias sintetizadas pelos microrganismos em resposta a situações adversas, como defesa celular, e podem ser agrupados em derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossômicos, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos policetído-peptídeos (ANSARI et al., 2004; ZOTCHEV, 2019). Toxinas e metabólitos microbianos podem ser usados para controlar mosquitos como *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*.

Os lipopeptídeos são um grupo estruturalmente diversificado de moléculas com uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, desde o deslocamento de óleo até antibióticos. Além disso, essas moléculas apresentam propriedades térmicas, resistência ao pH e radiação ultravioleta (UV) (GOND et al., 2015; ZHANG et al., 2017; CHEN et al., 2017). Bactérias como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. tequilensis* produzem moléculas com atividade larvícida e inseticida, como, por exemplo, os lipopeptídicos com características desejáveis, como baixas doses letais, encurtamento dos períodos de oviposição e diminuição da longevidade da idade adulta em insetos vetores de doenças (BEN KHEDHER et al., 2015; PARTHIPAN et al., 2018).

A identificação do composto presente no metabólito secundário pode abrir caminho para o desenvolvimento de novos inseticidas eficazes no controle de mosquitos. A detecção e quantificação de metabólitos secundários são complexas, mas podem ser realizadas por meio de abordagens espectroscópicas e metabolômicas. Diversas técnicas podem ser utilizadas, incluindo cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) ou eletroforese capilar (EC) acopladas à espectrometria de massa (EM).

O surgimento da metabolômica de alto rendimento usando CL-EM ajuda a gerar um conjunto de dados em larga escala que pode ser usado para a identificação de marcadores de toxicidade de vários larvicidas de mosquitos. As abordagens metabólicas permitem conhecer os componentes dos princípios ativos dos metabólitos secundários sintetizados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Avaliar o potencial de bactérias cultiváveis de *Aedes aegypti*, visando a identificação de novas bactérias entomopatogênicas e a produção de novas moléculas bioinseticidas para o controle deste vetor.

3.2 Específicos

- ✓ Isolar bactérias cultiváveis do ciclo biológico (ovos, larvas, pupas e adultos) de *Ae. aegypti*;
- ✓ Selecionar as linhagens bacterianas com potencial larvicida por meio de bioensaios seletivos e de dose;
- ✓ Caracterizar bactérias por meio de caracteres fenotípicos e moleculares;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida das frações do sobrenadante e dos componentes celulares das linhagens ativas;

CAPÍTULO I

Identificação de bactérias em diferentes fases do ciclo biológico de *Aedes aegypti*

Juan Campos de Oliveira, Cíndel de Souza Cavalcante, Elerson Matos Rocha, Veranilce Alves Muniz, Gilvan da Silva Ferreira, Rosemary Aparecida Roque, Spartaco Astolfi Filho, Ricardo de Melo Katak

RESUMO

A composição bacteriana associada ao ciclo biológico do *Aedes aegypti* é bastante diversificada, pois é modulada por diversas interações, dependendo da sua biologia e ecologia do mosquito. Bactérias desempenham importantes funções no seu desenvolvimento, fecundidade, imunidade e competência vetorial. A maioria dos estudos sobre a diversidade bacteriana de *Ae. aegypti* enfatiza bactérias presentes no intestino de fêmeas adultas, enquanto que as bactérias em outros órgãos e nos estágios de ovo, larva, pupa e adultos permanecem pouco estudadas. Neste estudo, foram analisadas 415 bactérias das amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas de *Ae. aegypti*. As características morfológicas da parede celular determinaram que 300 são Gram-negativas e 115 Gram-positivas, sendo todas positivas para o teste de catalase. Foram observados 10 morfotipos: coco negativo, bacilo positivo, bacilo negativo, cocobacilo negativo, microbacilo positivo, microbacilo negativo, cocos positivo, micrococcus negativo, diplococo negativo e cocobacilo positivo. Considerando o perfil morfológico e características estruturais semelhantes, foram selecionadas 68 linhagens, que foram identificadas pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*. As sequências de rDNA obtidas foram comparadas com as do GenBank e os gêneros bacterianos identificados foram: *Acinetobacter*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Sphingobacterium*, representantes de três filos. O filo *Proteobacteria* (60,30%) foi o mais abundante, seguido de *Bacillota* (36,76%) e *Bacteroidetes* (2,94%). As bactérias obtidas das amostras de larvas foram significativamente mais diversificadas do que as de ovos, pupas e adultos. Este estudo fornece conhecimentos fundamentais sobre a estrutura e abundância da microbiota em diferentes estágios do *Ae. aegypti*, uma vez que existem poucos estudos sobre a composição de bactérias associadas no ciclo biológico desse vetor. Além disso, essas informações podem fornecer uma melhor compreensão das interações entre mosquitos e microrganismos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Microbiota bacteriana, Diversidade.

ABSTRACT

The bacterial composition associated with the biological cycle of *Aedes aegypti* is quite diverse, as it is modulated by several interactions, depending on the biology and ecology of the mosquito. Bacteria play important roles in its development, fecundity, immunity and vectorial competence. Most studies on the bacterial diversity of *Ae. aegypti* emphasize bacteria present in the intestine of adult females, while bacteria in other organs and in the egg, larval, pupal and adult stages remain poorly studied. In this study, 415 bacteria from samples of eggs, larvae, pupal and adult females of *Ae. aegypti* were analyzed. The morphological characteristics of the cell wall determined that 300 are Gram-negative and 115 Gram-positive, all of which were positive for the catalase test. Ten morphotypes were observed: coccus negative, bacillus positive, bacillus negative, coccobacillus negative, microbacillus positive, microbacillus negative, cocci positive, micrococcus negative, diplococcus negative and coccobacillus positive. Considering the similar morphological profile and structural characteristics, 68 strains were selected, which were identified by sequencing the 16S rRNA gene. The rDNA sequences obtained were compared with those of GenBank and the bacterial genera identified were: *Acinetobacter*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* and *Sphingobacterium*, representatives of three phyla. The phylum Proteobacteria (60.30%) was the most abundant, followed by Bacillota (36.76%) and Bacteroidetes (2.94%). The bacteria obtained from larval samples were significantly more diverse than those from eggs, pupae and adults. This study provides fundamental knowledge about the structure and abundance of the microbiota at different stages of *Ae. aegypti*, since there are few studies on the composition of associated bacteria in the biological cycle of this vector. In addition, this information may provide a better understanding of the interactions between mosquitoes and microorganisms.

Keywords: *Aedes aegypti*, Bacterial microbiota, Diversity.

Introdução

O mosquito *Ae. aegypti* interage com bactérias de diversos gêneros, como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, entre outros, de maneira complexa e diversificada, influenciando em funções biológicas como metabolismo, fisiologia e homeostase (GAIO et al., 2011; CARAGATA et al., 2019). Embora diversos fatores ambientais contribuam para a aquisição e modulação do microbioma, a fonte nutricional, os habitats e os estágios do ciclo biológico são determinantes para os padrões e a dinâmica da diversidade bacteriana em insetos holometábolos, como o *Ae. aegypti* (SAAB et al., 2020).

A maioria dos microrganismos coloniza o trato intestinal dos mosquitos *Ae. aegypti*; entretanto, todos os seus órgãos constituintes podem ser colonizados por bactérias (GUSMÃO et al., 2007; SARAIVA et al., 2016). Conhecer essas bactérias e suas funções no hospedeiro pode ser relevante para o estudo da veiculação de agentes patogênicos. Neste contexto, pesquisas que visam conhecer bactérias cultiváveis associadas a mosquitos são importantes, pois permitem investigar propriedades como resistência a antibióticos, inibição do crescimento interespecíes ou dinâmica populacional ao longo do ciclo de vida dos mosquitos (SCOLARI et al., 2019; LI et al., 2023).

Portanto, a disponibilidade de isolados cultiváveis permite análises detalhadas de processos bioquímicos, metabólicos e funcionais (VALIENTE et al., 2013). Além disso, permite o sequenciamento do genoma bacteriano e o conhecimento de sua funcionalidade e identificação da espécie. A triagem de bactérias cultiváveis usando técnicas microbiológicas tradicionais é um método importante para investigar a microbiota associada a mosquitos (FRANCIS et al., 2024).

O *Ae. aegypti* é uma das principais espécies responsáveis pela transmissão de arbovírus de doenças como a dengue, Zika e chikungunya pelo mundo todo (HARBACH, 2007; WHO, 2017; SOUZA-NETO et al., 2019; LAPORTA et al., 2023). Sendo assim, é essencial conhecer a diversidade de bactérias associadas a esse vetor para avaliar sua influência na biologia e competência vetorial.

Considerando os processos de aquisição e modulação de bactérias, ainda há uma lacuna de conhecimento sobre se há alguma espécie bacteriana que seja crucial para o ciclo biológico de *Ae. aegypti*, pois apenas *Wolbachia* foi proposta como um sistema condutor de genes nesses mosquitos. Portanto, nesta pesquisa, investigamos bactérias cultiváveis em populações naturais de *Ae. aegypti*, visando avaliar a diversidade bacteriana em cada fase do ciclo holometábolo desse mosquito.

Material e métodos

Coleta de *Aedes aegypti* no campo

Todos os materiais utilizados na coleta foram previamente esterilizados. As bandejas e pipetas de plástico foram esterilizadas com álcool 70% e expostas à luz ultravioleta por 15 minutos. Os demais materiais foram esterilizados em autoclave a temperatura de 127 °C por 20 min.

A população de *Ae. aegypti* foi obtida a partir de larvas e pupas coletadas em um único ponto (-3.0726016,-59.9284962) na região leste de Manaus. A zona administrativa apresenta alta densidade vetorial, de acordo com os resultados do Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Ae. aegypti* (LIRAA) realizado pela Secretaria Municipal de Saúde do Amazonas (SEMSA/Prefeitura de Manaus 2020). As coletas foram realizadas na estação seca, com autorização do SISBIO/74091-1/2020–2021 e do morador, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

No local de amostragem, foram distribuídos 10 recipientes de plástico branco (45x30x7,5cm) a uma distância de 10 metros. Os recipientes continham 1 L de água destilada esterilizada e foram mantidos ao nível do solo, protegidos do sol e da chuva. O monitoramento ocorreu diariamente até o décimo dia, conforme SILVA et al., (2021), e os imaturos, água e a matéria orgânica foram transferidos para tubos falcon de 50 mL esterilizados. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LCBBMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Manutenção do *Aedes aegypti* em laboratório

A manutenção dos insetos foi realizada de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do LCBBMD, com modificações. Inicialmente, foi feita a triagem no insetário, e as larvas e pupas foram identificadas pela morfologia externa, com auxílio de microscópio estereoscópico ZEISS Stemi 2000 50X e chaves de identificação como as de FORATTINI (2002), HARBACH (2022) E WRBU (2022). Após a identificação, foi feito o isolamento das bactérias de dez larvas e dez pupas, e as demais permaneceram em bandejas de plástico, contendo a água e a matéria orgânica coletada, visando à continuidade do ciclo biológico, a 27±2°C, 80-90% de umidade relativa e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuridão.

Os adultos foram alocados em gaiolas (18 x 17 cm) contendo copos plásticos revestidos com papel filtro e 70 mL de água destilada, utilizados como substrato para a oviposição. A solução de sacarose a 10% foi fornecida como fonte de carboidrato, e as fêmeas foram alimentadas com sangue de hamsters - *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (Rodentia: Cricetidae), durante 30

min. Os hamsters foram anestesiados de acordo com o procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (029/2021). Os ovos obtidos da geração F1 foram utilizados para o isolamento bacteriano.

Isolamento de bactérias

O isolamento bacteriano foi realizado em placa de Petri utilizando os seguintes meios de cultivo preparados conforme as recomendações dos fabricantes: ISP2 (10 g de amido, 10 g de extrato de malte, 4 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose e 10 g de ágar), Nutriente Agar- NA (3 g de Beef Extract, 5 g de Peptone e 15 g de Agar) e Luria Bertani - LB (10 g de Enzymatic Digest of Casein, 5 g de Yeast Extract, 10 g de Sodium Chloride e 10 g de Agar). Para evitar a contaminação fúngica, foi adicionado em cada placa, 20 µm/mL de Fluconazol.

Linhagens bacterianas foram isoladas conforme descrito por ROCHA et al., (2021), com adaptações. Além dos ovos que não foram pré-lavados, dez amostras de outros estágios de desenvolvimento (larvas de 4º ínstar, pupas e fêmeas adultas) de *Ae. aegypti* foram lavadas por 1 min em álcool 70% e depois em H₂O estéril antes de serem maceradas em microtubos contendo 1,5 mL de H₂O esterilizada e agitadas em vórtex por três minutos. Alíquotas de 50 µL de todas as amostras foram utilizadas para o isolamento bacteriano, em triplicata, em cada meio de cultivo. As amostras foram armazenadas em estufa B.O.D a 29 °C, por 24, 48 e 72 h para o crescimento das bactérias. Placas de controle negativo apenas com água estéril não resultaram em colônias.

Purificação, coloração de gram e preservação de isolados bacterianos

Colônias bacterianas morfologicamente distintas foram selecionadas para subcultura nos meios de cultivo (NA, LB e ISP2), objetivando a purificação pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas. As amostras foram armazenadas em estufa B.O.D a 29 °C durante 24 h para o crescimento das bactérias. A confirmação da pureza dos isolados foi realizada pela técnica de coloração de Gram, utilizando-se o kit Laborclin®. As lâminas contendo as amostras foram observadas em microscópio óptico (1000x de aumento). Os isolados foram preservados nos meios de cultivo (NB, LB e ISP2) líquido, com adição de 20% de glicerol (v/v) em microtubos de 2 mL e armazenados em freezer a -80°C. Todos os procedimentos foram realizados conforme descrito por ROCHA et al., (2021) e KATAK et al., (2021), com modificações.

Análises da abundância das bactérias isoladas

A média de isolados bacterianos obtidos para cada tipo de amostra (ovos, larvas, pupas e

fêmeas adultas) foi submetida ao teste de normalidade de Lilliefors (teste K) e posteriormente ao teste t de Student ($p \leq 0,05$), utilizando o software estatístico BioEstat versão 5.3 para Windows (Ayres et al., 2007).

Teste de catalase

Bactérias foram cultivadas nos respectivos meios de isolamento durante 24 h. Em seguida, 10 µL de Peróxido de hidrogênio a 3% (Himedia) foi adicionado na colônia bacteriana, e observou-se a presença ou ausência de formação de bolhas, parâmetro indicativo da síntese desta enzima (PRASTUJATI et al., 2022).

Biotipagem de isolado bacteriano

As linhagens foram classificadas de acordo com os seguintes critérios: (i) fontes de isolamento; (ii) tipo de parede celular (Gram positivas ou Gram negativas) e (iii) características morfológicas, incluindo forma, borda, estrutura, cor e brilho. Em seguida, representantes de cada grupo foram selecionados para a identificação molecular.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico das bactérias foi isolado utilizando o protocolo de extração de DNA de bactéria-CTAB. As bactérias foram reativadas nos meios de cultivo (NA, LB e ISP2) e armazenadas em estufa BOD a 29 °C durante 24 horas. Após isso, em tubos falcon com capacidade de 15 mL, contendo 7 mL dos meios de cultivo, a biomassa de cada bactéria foi inoculada e incubada em estufa rotativa a 180 rpm, a 29 °C, durante 24 horas. Em seguida, foram realizadas as seguintes etapas: i) centrifugação a 12.000 rpm em 10 minutos e remoção do sobrenadante; ii) adição de 700 µL de CTAB e 0,5g de sílica em pó; iii) maceração das amostras em TissueLyser, em rotação máxima por 6 minutos e incubação a 65 °C em banho maria, durante 30 minutos, sendo homogeneizados em intervalos de 10 minutos; iv) adição de 600 µL do solvente de extração CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) e homogeneização durante 5 minutos; v) centrifugação a 12.000 rpm durante 5 minutos e posterior transferência da fase superior aquosa para um novo tubo; vi) adição de 2/3 de isopropanol (-20 °C) e homogeneização para precipitar os ácidos nucleicos, e armazenamento a -20 °C por 30 minutos; vii) centrifugação a 7500 rpm durante 5 minutos, e descarte do sobrenadante; viii) lavagem do pellet duas vezes em 1 mL de etanol a 70%, durante 5 minutos respectivamente, e em 1 mL de etanol a 95% durante 3 minutos. Após a retirada de etanol, o pellet foi seco em fluxo laminar, ressuscitado em 50 µL de tampão TE, contendo 10 µg/mL de

RNAse. Em seguida, incubado a 37°C por 60 minutos para a digestão de RNA.

Para estimar a concentração e a quantidade do DNA por μL foi feita uma corrida de gel de eletroforese a 1,0%. O DNA foi também quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis, e armazenado a -20 °C para a realização das outras etapas.

Amplificação do gene 16S rRNA

O DNA dos representantes de cada grupo foi amplificado com os iniciadores para o gene 16S rRNA. Na amplificação por PCR foram utilizados o Master Mix GoTaq® DNA Polymerase 2x (Promega) e os primers 16S: 27F (Lane et al., 1985) 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R (DeLong, 1992) 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3', cuja porção amplificada corresponde a um fragmento de aproximadamente 1500 pb e compreende as regiões variáveis V1 a V9 do gene 16S rRNA.

A PCR foi realizada com volumes de 25 μL contendo: 2,5 μL de tampão de PCR 10X; 0,5 μL de MgCl_2 25 mM; 1 μL (10 pMol) de primer 5 μM (P027); 1 μL de dNTPs 10mM; 0,25 μL de Taq polimerase 5U/ μL ; 17,75 μL de água livre de nuclease e 2 μL do DNA genômico de cada bactéria. O programa de PCR teve uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos [94°C por 20 segundos, 59°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos], seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos do gene 16S rRNA amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (v/v), utilizando uma corrente a 90 Volts durante 1 hora e 20 minutos em tampão TEB [1X] (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2,5 mM de EDTA, pH 8,2). Em seguida, os fragmentos foram visualizados sob luz UV e fotografados em um aparelho TCL Documentation (Vilber Lourmat).

Sequenciamento do gene 16S rRNA

O produto da reação de PCR de amplificação do gene 16S rRNA foi purificado utilizando as enzimas Exonuclease (Exo) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ExoSAP. Em poços de uma placa de PCR, foi adicionado 5 μL da PCR de cada amostra e 0,5 μL de ExoSAP. As amostras foram incubadas em termociclador durante 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C. Utilizou-se o kit de sequenciamento BigDye Terminator V 3.1. (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram feitas em um volume final de 10 μL , sendo compostas por: 1,5 μL Tampão Bigdye, 0,5 μL Big Dye Terminator, 1 μL Primer

(10 pMol) (mesmo primer da PCR), 2 µL de água milli-Q e 5 µL da PCR do 16S rRNA. Em seguida, amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 2000 rcf por 30 segundos e incubadas em termociclador.

As reações de sequenciamento foram realizadas em um termociclador, sendo uma reação para cada primer e o perfil térmico consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, seguido de desnaturação das fitas moldes a 96 °C por 10 segundos, pareamento do primer a 50 °C por 5 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos. Os produtos da reação de sequenciamento de cada primer foram precipitados com etanol/EDTA/acetato de sódio, seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento de Sanger foi realizado por eletroforese capilar no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para a determinação das sequências (eletroferogramas).

Análise das sequências consenso

A qualidade dos eletroferogramas gerados a partir da leitura do 3500 Genetic Analyzer foi analisada utilizando o programa MEGAX. As atribuições taxonômicas das bactérias isoladas foram baseadas em comparações de sequências de consenso com sequências 16S no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) e no Projeto de banco de dados ribossômico, RDP-II (<https://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp>). Todas as sequências das bactérias identificadas neste trabalho foram depositadas no GenBank do NCBI.

Resultados

Isolados bacterianos obtidos das amostras de *Aedes aegypti*

As bactérias isoladas das amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas, nos meios de cultivo (NA, LB e ISP2), foram selecionadas com base nas características morfológicas das colônias, incluindo o tamanho, forma, cor e consistência. A partir da análise de aproximadamente 2.000 isolados iniciais, foram obtidas 415 bactérias (Tabela 1). A maior média de isolados (55.7 ± 7.2) ocorreu em larvas, verificando-se diferença estatisticamente significativa entre a média (29.3 ± 2.3) obtida nos ovos ($p = 0.0011$), pupas (24.3 ± 7.6) ($p < 0.001$) e fêmeas adultas (32.7 ± 7.5) ($p = 0.0026$), constatando-se o dobro do valor. No entanto, não houve diferença significativa ($p > 0.05$) na média de linhagens obtida entre as seguintes amostras: i) ovos e pupas, ii) ovos e fêmeas adultas, iii) pupas e fêmeas adultas.

Tabela 1: Total de linhagens bacterianas obtidas em cada amostra do mosquito (ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas) nos três meios de cultivo (NA, LB e ISP2).

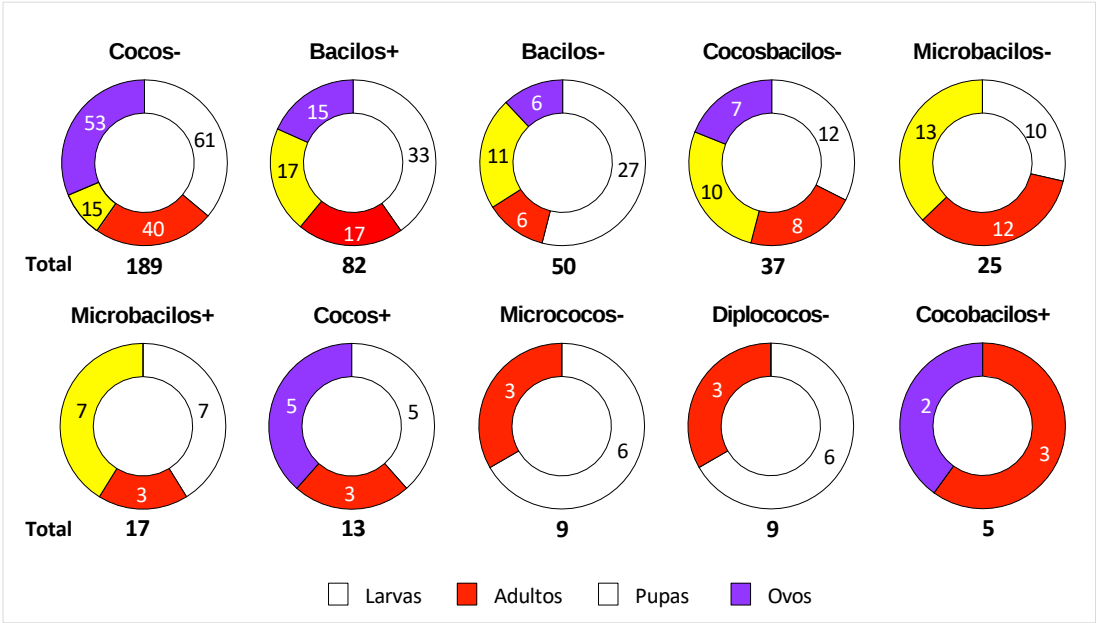
Linhagens bacterianas							
Tipo de amostra	NA	LB	ISP2	Mín.	Máx.	Mean ± sd	Total
Ovos	28	32	28	28	32	29.3 ± 2.3 a	88
Larvas	49	59	50	49	59	55.7 ± 7.2 b	158
Pupas	31	21	19	19	31	24.3 ± 7.6 a	71
Fêmeas adulta	25	33	40	25	40	32.7 ± 7.5 a	98

*SD: Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$).

Biotipagem de isolados bacterianos

A análise da coloração de Gram revelou que das 415 linhagens bacterianas observadas, trezentas são Gram negativas e cento e quinze Gram positivas. Para o teste de catalase, todas as linhagens foram positivas. Além disso, foram observados dez morfotipos bacterianos com base nas características morfológicas das colônias (Figura 1). Os resultados mostraram que houve maior predominância do morfotipo cocos negativos e menor quantidade de cocobacilos positivos.

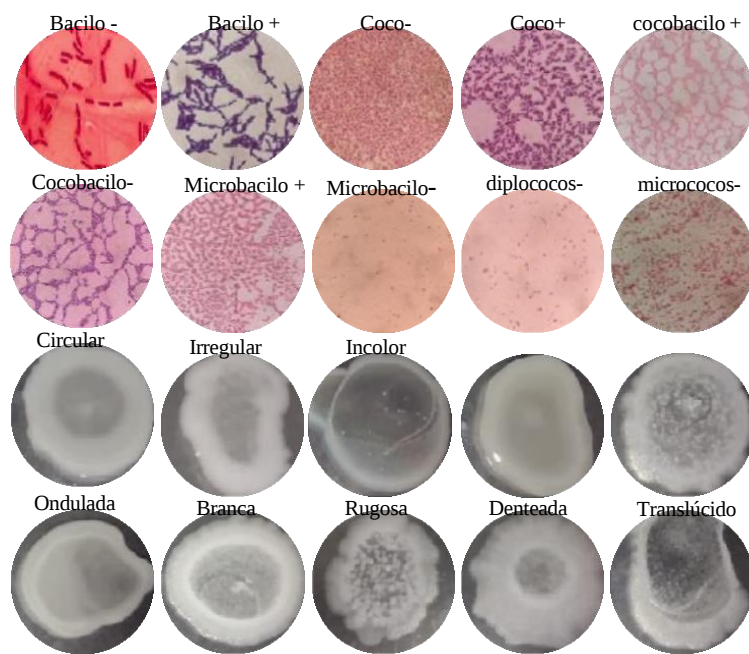
Figura 1: Perfil dos morfotipos bacterianos das bactérias isoladas das amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas de *Ae. aegypti*.



As colônias bacterianas demonstraram diversidade em relação a: (i) Formas: circulares ou irregulares, (ii) Características das bordas: lisas, lobadas, onduladas e denteadas, e (iii) Estruturas:

granulares, lisas, rugosas ou papilosas. As colônias também variaram em cor e brilho, incluindo incolor, translúcido, branco, pigmentado e transparente (Figura 02).

Figura 2: : Coloração de gram e características morfológicas das colônias bacterianas



Identificação molecular das bactérias

Dos 415 isolados obtidos das amostras, apenas uma parte pôde ser identificada. Portanto, colônias com características morfológicas e estruturais semelhantes foram agrupadas. Assim, 26 representantes das amostras de larvas, 18 de adultos, 14 de ovos e 10 de pupas foram identificados por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.

As sessenta e oito linhagens que representavam cada agrupamento fenotípico foram submetidas à identificação molecular por meio de caracteres genotípicos. A análise das 68 sequências de qualidade obtidas foi comparada utilizando a ferramenta Blastn no banco de dados, o que determinou que essas bactérias pertencem a 9 gêneros bacterianos. Os gêneros encontrados foram *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Delftia* e *Leclercia*. Entre esses, *Enterobacter* foi o mais predominante, com 33 representantes, seguido por *Bacillus* com 24, *Pseudomonas* com 4, *Sphingobacterium* com 2, e os demais apresentaram apenas 1 cada. O percentual de identidade das sequências variou entre 97% e 100%, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização morfológica e molecular de bactérias isoladas do ciclo biológico de

Linhagem	Meio de cultivo/amostra	Gram	Catalase	Identidade 16S %	Gênero
O3	ISP2/Ovo	-	+	98	<i>Enterobacter sp.</i>
O4	NA/Ovo	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
O5	LB/Ovo	-	+	98	<i>Enterobacter sp.</i>
O8	NA/Ovo	-	+	97	<i>Enterobacter sp.</i>
O12	NA/Ovo	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
O18	ISP2/Ovo	-	+	99	<i>Enterobacter sp.</i>
O25	NA/Ovo	-	+	97	<i>Enterobacter sp.</i>
O30	NA/Ovo	-	+	99	<i>Enterobacter sp.</i>
O32	ISP2/Ovo	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
O34	LB/Ovo	-	+	97	<i>Enterobacter sp.</i>
L21	LB/Larva	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
L2	LB/Larva	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
L56	LB/Larva	-	+	99	<i>Enterobacter sp.</i>
L69	LB/Larva	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
L85	LB/Larva	-	+	97	<i>Enterobacter sp.</i>
L90	LB/Larva	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
P11	ISP2/Pupa	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
P17	NA/Pupa	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
P7	ISP2/Pupa	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A15	LB/Adulto	-	+	97	<i>Enterobacter sp.</i>
A20	LB/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A21	NA/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A24	ISP2/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A30	ISP2/Adulto	-	+	99	<i>Enterobacter sp.</i>
A30	LB/Adulto	-	+	99	<i>Enterobacter sp.</i>
A31	LB/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A34	LB/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A36	ISP2/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A38	ISP2/Adulto	-	+	99	<i>Enterobacter sp.</i>
A4	NA/Adulto	-	+	97	<i>Enterobacter sp.</i>
A5	ISP2/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A5	LB/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
A8	ISP2/Adulto	-	+	100	<i>Enterobacter sp.</i>
O37	NA/Ovo	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
O5	ISP2/Ovo	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L11	LB/Larva	+	+	97	<i>Bacillus sp.</i>
L20	LB/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L20N	LB/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L25	LB/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L21	ISP2/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L30	LB/Larva	+	+	97	<i>Bacillus sp.</i>
L31	NA/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L37	ISP2/Larva	+	+	98	<i>Bacillus sp.</i>
L43	NA/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L49	ISP2/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L4	LB/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L60	LB/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L60	NA/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L61	LB/Larva	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
L82	LB/Larva	+	+	99	<i>Bacillus sp.</i>
P11	NA/Pupa	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
P19	LB/Pupa	+	+	98	<i>Bacillus sp.</i>
P19	NA/Pupa	+	+	99	<i>Bacillus sp.</i>
P23	NA/Pupa	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
P3	LB/Pupa	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
A24	LB/Pupa	+	+	99	<i>Bacillus sp.</i>
A4	LB/Adulto	+	+	100	<i>Bacillus sp.</i>
O35	LB/Ovo	-	+	99	<i>Pseudomonas sp.</i>
O28	NA/Ovo	-	+	99	<i>Pseudomonas sp.</i>
L16	LB/Larva	-	+	97	<i>Pseudomonas sp.</i>
L66	NA/Larva	-	+	98	<i>Pseudomonas sp.</i>
P16	LB/Pupa	-	+	100	<i>Sphingobacterium sp.</i>
P5	ISP2/Pupa	-	+	100	<i>Sphingobacterium sp.</i>
L16	ISP2/Larva	-	+	100	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
L79	LB/Larva	-	+	99	<i>Acinetobacter sp.</i>
L27	LB/Larva	-	+	97	<i>Paenibacillus sp.</i>
A13	LB/Adulto	-	+	97	<i>Delftia sp.</i>
A4	ISP2/Adulto	-	+	97	<i>Lecrercia sp.</i>

As linhagens identificadas pertencem a três filos bacterianos: Proteobacteria, Bacillota e Bacteroidetes (Figura 3). No total das linhagens, o filo Proteobacteria (60,30%) foi o mais abundante, seguido de Bacillota (36,76%) e Bacteroidetes (2,94%). Nas amostras de ovos, predominaram os filos Proteobacteria (85,71%) e Bacillota (14,29%). Nas larvas, também predominaram esses filos, mas com Bacillota (61,53%) mais abundante que Proteobacteria

(38,47%). Nas pupas, predominaram três filos, com maior abundância de Bacillota (50%), seguido de Proteobacteria (30%) e Bacteroidetes (20%). Nos adultos, *Enterobacter* (83,33%) foi o mais abundante, seguido de Bacillota (16,67%).

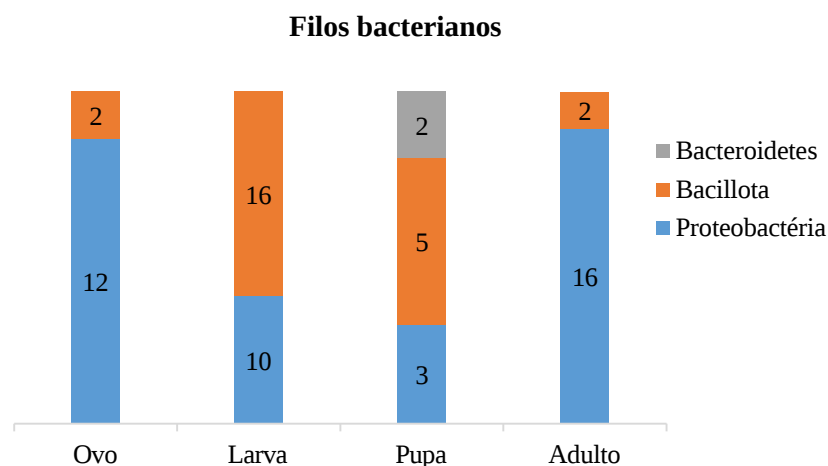


Figura 3: Abundância de bacterianas identificadas pertencentes ao seu respectivo filo isoladas de ovo, larva, pupa e fêmea adulta de *Ae. Aegypti*.

As bactérias também foram classificadas em sete famílias: Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Paenibacillaceae, Moraxellaceae, Sphingobacteriaceae e Comamonadaceae. Enterobacteriaceae foi mais abundante e presente em todas as amostras (ovos, larvas, pupas e adultos), seguida por Bacillaceae. Pseudomonadaceae foi identificada em amostras de ovos e larvas. Paenibacillaceae e Moraxellaceae foram identificadas somente em larvas, enquanto que Sphingobacteriaceae e Comamonadaceae, em pupas e adultos, respectivamente (Figura 4).

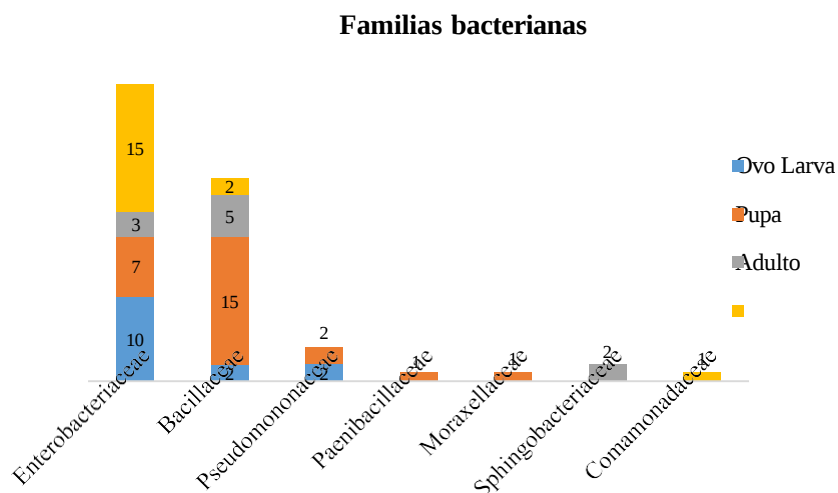


Figura 4: Abundância de espécies bacterianas identificadas pertencentes à sua respectiva família, isoladas de ovo, larva, pupa e fêmeas adultas de *Ae. Aegypti*.

De acordo com a ocorrência dos gêneros identificados, *Enterobacter* e *Bacillus* foram detectados em todas as amostras (ovos, larvas, pupas e adultos). *Pseudomonas* foi identificado em

larvas e ovos. *Acinetobacter*, *Paenibacillus* e *Stenotrophomonas* foram identificados somente em larvas. *Delftia* e *Leclercia* apenas em adultos, e *Sphingobacterium* em pupas.

Nas amostras de ovos, o gênero *Enterobacter* foi predominante, com dez linhagens bacterianas identificadas. Também foram identificadas duas linhagens de *Bacillus* e duas de *Pseudomonas*. Nas larvas, vinte e seis linhagens foram identificadas, sendo *Bacillus* o mais predominante com quinze isolados, seguido de *Enterobacter* com seis linhagens e *Pseudomonas* com duas linhagens. Os gêneros *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* e *Paenibacillus* foram identificados com uma linhagem de cada. Nas pupas, foram identificadas dez linhagens bacterianas, com *Bacillus* predominante com cinco linhagens, seguido de *Enterobacter* com três linhagens e *Sphingobacterium* com duas linhagens. Nas amostras de fêmeas adultas, foram identificadas dezoito bactérias, com *Enterobacter* sendo o mais predominante com quatorze linhagens, seguido por *Bacillus* com duas linhagens, e *Delftia* e *Leclercia* com uma linhagem cada.

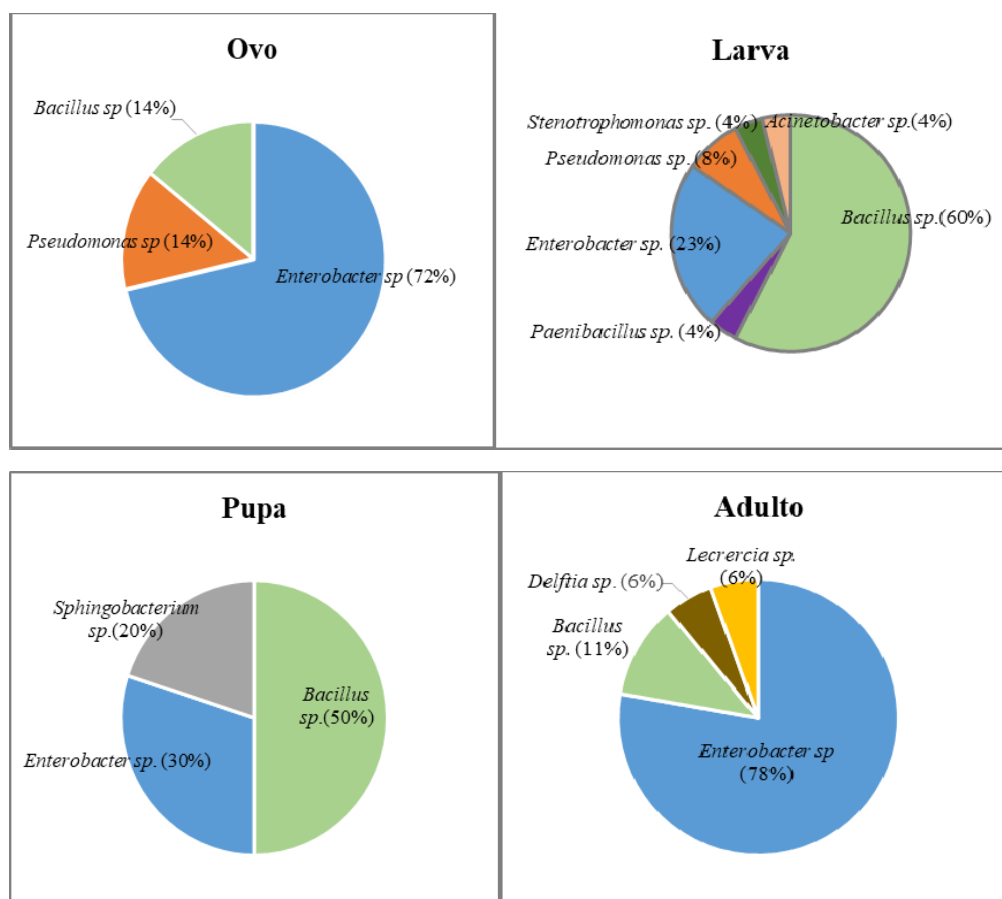


Figura 5: Ocorrência de gêneros bacterianos identificados nas amostras de ovos, larvas, pupas e fêmeas adultas de *Ae. Aegypti*.

Discussão

O *Ae. aegypti* é predominante na área urbana, devido à disponibilidade de criadouros artificiais para oviposição, ao aumento de sua densidade populacional e à transmissão de arbovírus. Nestes ambientes, há interação com uma diversidade de microrganismos que podem se abrigar no mosquito e desempenhar funções que interferem em seu ciclo biológico e na

competência vetorial. Espécies bacterianas como *Paenibacillus*, *Proteus* e outras, modulam a competência vetorial para arbovírus e patógenos, por meio de mecanismos como a ativação da resposta imune, competição e produção de moléculas antivirais (RAMIREZ et al., 2012, 2014).

Estudos sobre bactérias cultiváveis associadas ao *Ae. aegypti* na Amazônia Brasileira são limitados. Conhecer as bactérias predominantes no ciclo biológico deste mosquito pode demonstrar os gêneros com maior probabilidade de associação, pois as bactérias são adquiridas por herança vertical ou pela aquisição contínua do meio ambiente (HEDGE et al., 2018; TUANUDOM et al., 2021). Este trabalho teve como objetivo investigar a composição das bactérias cultiváveis presentes no ciclo biológico de *Ae. aegypti*. A identificação de novas bactérias e testes de efetores antivirais podem levar a estratégias mais eficazes para controlar a transmissão de arbovírus. As linhagens isoladas demonstraram diferentes perfis fenotípicos e morfotipos diversificados. Na análise bioquímica para o teste de catalase, todas as linhagens foram positivas, indicando a presença de uma enzima encontrada em bactérias aeróbicas, que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Estas análises forneceram conhecimento preliminar das bactérias, permitindo a seleção dos representantes que foram submetidos à identificação molecular pelo sequenciamento do gene *16S rRNA*.

Neste estudo, os filos bacterianos predominantes foram *Proteobacteria* e *Bacillota*, identificados em ovos, larvas, pupa e fêmeas adultas, enquanto que *Bacteroidetes* foi identificado somente em pupas. Esses dados corroboram com outros estudos, que mostraram que *Proteobacteria*, *Bacillota*, *Bacteroidetes* são comumente encontrados em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*, tanto em larvas quanto em adultos, em condições de campo ou laboratório (MANCINI et al., 2018; SILVA et al., 2021; RODPAI et al., 2023; HERNANDES et al., 2024; FRANCIS et al., 2024). Estudos que caracterizam a microbiota de *Ae. aegypti* em locais como Índia, Tailândia, Estados Unidos e Brasil também demonstraram perfil de diversidade bacteriana com predominância de *Proteobacteria* (YADAV et al., 2015; DAVID et al., 2016; MANCINI et al., 2018; HERNANDES et al., 2024).

Quando classificados em famílias, *Enterobacteriaceae* e *Bacillaceae* são predominantes em todas as amostras. *Pseudomonadaceae* foi identificada em ovos e larvas, enquanto que *Paenibacillaceae* e *Moraxellaceae* em larvas, e *Sphingobacteriaceae* e *Comamonadaceae* em pupas e fêmeas adultas, respectivamente. De acordo com CHEN et al., (2020), *Enterobacteriaceae* e *Bacillaceae* compreendem gêneros como *Enterobacter* e *Bacillus*, frequentemente associados a mosquitos. *Pseudomonadaceae* e *Moraxellaceae* são representadas principalmente pelos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, respectivamente, que também são comumente encontrados na microbiota do *Ae. aegypti* (ROSSO et al., 2018, BALTAR et al., 2023).

Os gêneros *Enterobacter* e *Bacillus* foram identificados em todas as amostras. Estes gêneros são amplamente distribuídos na natureza, e estes dados destacam a capacidade de

colonização e interação com o mosquito durante o desenvolvimento (FRANCIS et al., 2024). *Pseudomonas* foi identificado em larvas e ovos, enquanto que *Acinetobacter*, *Paenibacillus* e *Stenotrophomonas* somente em larvas. *Delftia* e *Leclercia* foram identificados somente em adultos e *Sphingobacterium* em pupas. Sendo assim, observou-se a modulação destes gêneros ao longo dos estágios biológicos.

Os resultados demonstram alguns dos principais membros de bactérias e corroboram com outros estudos, pois esses gêneros também foram observados em *Ae. aegypti* de campo (BUCK et al., 2016; BENNETT et al., 2019). A modulação das bactérias durante o ciclo biológico é determinada por vários fatores, incluindo as condições ambientais dos criadouros e fontes de alimentos, que também afetam a longevidade do mosquito (MANDA et al., 2007; MINARD et al., 2013; ROSSO et al., 2018; KANG et al., 2020).

Nas amostras de ovos, houve predominância de bactérias do gênero *Enterobacter*, seguido de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Um estudo realizado por COON et al. (2014) mostrou que a abundância de bactérias de gêneros como *Enterobacter* e *Pseudomonas* também é encontrada em ovos. Os gêneros identificados em ovos também foram detectados em larvas, sugerindo que essas bactérias podem ser transmitidas dos ovos para as larvas da próxima geração.

As bactérias identificadas nas larvas pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* e *Paenibacillus*, destacando a diversidade bacteriana na fase larval. Essas bactérias, na maioria das vezes, são adquiridas após a eclosão, quando as larvas se alimentam da matéria orgânica e bactérias, desempenhando funções nutricionais e metabólicas essenciais ao seu desenvolvimento (COON et al., 2014; VALZANIA et al., 2018; AKORLI et al., 2019; JUMA et al., 2021). *Bacillus* foi predominante, o que pode ser devido às suas características fisiológicas e bioquímicas que facilitam a sua adaptação e proliferação em diferentes substratos. Membros deste gênero são capazes de formar esporos resistentes, e além disso, causam antibiose em outras bactérias, proporcionando vantagens competitivas em ambientes, como o trato digestivo de larvas (AZIZ et al., 2024).

A colonização de *Enterobacter* em larvas pode ocasionar a modulação na expressão de genes do sistema imunológico e, dependendo da colonização de outros microrganismos, pode ser benéfica ao desenvolvimento larval (CARLSON et al., 2020). Membros do gênero *Stenotrophomonas* também foram observados em associação com as espécies de insetos como *Anopheles stephensi* e *Ae. aegypti* (HUGLES et al., 2016). Embora ainda existam lacunas de conhecimento sobre essa associação, há evidências de que também podem influenciar nas vias do sistema imunológico do mosquito.

A interação entre bactérias *Paenibacillus* e mosquitos durante o desenvolvimento larval pode afetar algumas vias metabólicas e a aptidão dos adultos. A exposição de larvas de *Ae. aegypti* a *Paenibacillus* modulou o metabolismo lipídico, resultando em armazenamento de níveis

elevados de lipídios, resistência à fome e menor proliferação de DENV em fêmeas adultas (GIRAUD et al., 2022). Bactérias do gênero *Acinetobacter* foram encontradas em menor abundância nas larvas, mas espécies desse gênero podem estar envolvidas na digestão sanguínea e nas interações com patógenos em mosquitos *Aedes* (MINARDI et al., 2013).

As linhagens bacterianas identificadas em pupas podem evidenciar a ocorrência de variações na microbiota ao longo do ciclo biológico do mosquito. O gênero *Bacillus* foi mais predominante nas amostras, seguido por *Enterobacter*. A presença do gênero *Sphingobacterium*, embora em menor quantidade, é significativa e pode determinar uma possível associação benéfica para a fase adulta, pois, em outro estudo como o de MUTURI et al. (2021), foi identificado em adultos recém-emergidos sem contato com fonte alimentícia.

Em mosquitos adultos, o gênero *Enterobacter* foi o mais predominante, seguido por *Bacillus*. Os gêneros *Delftia* e *Leclercia*, identificados apenas em adultos, não são comumente associados à microbiota de *Ae. aegypti*, mas podem indicar uma associação com o ambiente do adulto. *Delftia* são microrganismos ambientais com ampla distribuição geográfica e capacidades metabólicas adaptáveis a diversos ambientes, frequentemente isolados de amostras de solos, vegetais e água (BRAÑA et al., 2016; BHAT et al., 2022). Sendo assim, estudos mais aprofundados são necessários para entender a modulação da microbiota bacteriana e as possíveis interações de *Delftia* e *Leclercia* com o mosquito.

Na fase adulta, as bactérias são adquiridas de forma transestadial (LINDH et al., 2008) e por meio de fontes alimentares (LINDH et al., 2008; SAAB et al., 2020). Neste experimento, foram utilizados mosquitos recém-emergidos para o isolamento bacteriano, sendo que diversos fatores podem ter contribuído para a modulação da diversidade bacteriana. Esses resultados são semelhantes aos achados de WU et al. (2019) e CHEN et al. (2020), que também encontraram diversos gêneros bacterianos que podem ter sido influenciados pela idade, longevidade e associações benéficas ou antagônicas.

A maior quantidade de bactérias foi encontrada nas amostras de larvas, e a menor quantidade nas pupas. Esses resultados são semelhantes a outras pesquisas, que também identificaram a maior diversidade de bactérias em larvas (RODPAI et al., 2023). As fêmeas adultas utilizadas eram recém-emergidas e sem repasto sanguíneo, mas provavelmente adquiriram bactérias do ambiente aquático. Compreender a diversidade bacteriana, suas interações e funções nos mosquitos, bem como o potencial metabólico das bactérias, pode ser importante para a implementação de estratégias de controle populacional deste vetor. Evidências adicionais de bactérias simbióticas que colonizam e se associam de forma estável aos mosquitos, transportando genes efetores ou bloqueando a entrada de patógenos, podem ser uma ferramenta interessante para o controle genético de insetos vetores de doenças.

Conclusão

Este estudo investigou a diversidade bacteriana ao longo do ciclo biológico do *Ae. aegypti*. A presença de diversos gêneros bacterianos sugere que esses microrganismos podem desempenhar papel fundamental na biologia, na competência e na capacidade vetorial do mosquito. A identificação molecular de algumas bactérias permitiu uma melhor compreensão da microbiota associada ao *Ae. aegypti* e pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle desse vetor.

Referências

- Akorli, J; Namaali, P. A; Ametsi, G. W; Egyirifa, R. K; Pels, N. A. P. (2019). Generational Conservation Of Composition And Diversity Of Field-Acquired Midgut Microbiota In *Anopheles Gambiae* (Sensu Lato) During Colonization In The Laboratory. *Parasit. Vectors* 12, 27.
- Aziz, S., Jamshed, S.A., Mukhtar, T. (2024). Evaluation Of *Bacillus* Spp. As Biocontrol Agents Against Chili Leaf Spot Caused By *Xanthomonas Vesicatoria*. *J Plant Dis Prot* 131, 987997.
- Baltar, J. M., Pavan, M. G., Corrêa-Antônio, J., Couto-Lima, D., Maciel-De-Freitas, R., & David, M. R. (2023). Gut Bacterial Diversity Of Field And Laboratory-Reared *Aedes Albopictus* Populations Of Rio De Janeiro, Brazil. *Viruses*, 15(6), 1309.
- Bennett Kl, Gomez-Martinez C, Chin Y, Saltonstall K, Mcmillan Wo, Rovira Jr, Loaiza Jr (2019) Dynamics And Diversity Of Bacteria Associated With The Disease Vectors *Aedes Aegypti* And *Aedes Albopictus*. *Sci Rep* 9(1):12160.
- Bhat, S. V., Maughan, H., Cameron, A. D., & Yost, C. K. (2022). Phylogenomic Analysis Of The Genus *Delftia* Reveals Distinct Major Lineages With Ecological Specializations. *Microbial Genomics*, 8(9), 000864.
- Braña, V., Cagide, C., Morel, M.A. (2016). The Sustainable Use Of *Delftia* In Agriculture, Bioremediation, And Bioproducts Synthesis. In: Castro-Sowinski, S. (Eds) *Microbial Models: From Environmental To Industrial Sustainability*. Microorganisms For Sustainability, Vol 1. Springer, Singapore.
- Buck M, Nilsson Lkj, Brunius C, Dabire´ Rk, Hopkins R, Terenius O.(2016). Bacterial Associations Reveal Spatial Population Dynamics In *Anopheles Gambiae* Mosquitoes. *Nature Scientific Reports* 6:22806.
- Caragata, E.P; Tikhe, C.V; Dimopoulos, G. (2019). Curious Entanglements: Interactions Between Mosquitoes, Their Microbiota, And Arboviruses. *Curr Res Virol*. Aug 1; 37:26–36.
- Carlson, J. S., Short, S. M., Anglero-Rodriguez, Y. I., & Dimopoulos, G. (2020). Larval Exposure To Bacteria Modulates Arbovirus Infection And Immune Gene Expression In Adult *Aedes Aegypti*. *Developmental And Comparative Immunology*, 104, 103540.
- Chen, S.; Zhang, D.; Augustinos, A.; Doudoumis, V.; Bel Mokhtar, N.; Maiga, H.; Tsiamis, G.; Bourtzis, K. (2020). Multiple Factors Determine The Structure Of Bacterial Communities Associated With *Aedes Albopictus* Under Artificial Rearing Conditions. *Front. Microbiol.* 11, 605.
- Coon K L, Vogel K J, Brown M R, Strand M R. (2014). Mosquitoes Rely On Their Gut Microbiota For Development. *Molecular Ecology*. 23(11), 2727–2739.Pmid:24766707.

- Coon, K.L; Vogel, K.J; Brown, M.R; Strand, M.R. (2014). Mosquitoes Rely On Their Gut Microbiota For Development. *Mol Ecol.*(11):2727–39.
- David, M. R., Santos, L. M. B. D., Vicente, A. C. P., & Maciel-De-Freitas, R. (2016). Effects Of Environment, Dietary Regime And Ageing On The Dengue Vector Microbiota: Evidence Of A Core Microbiota Throughout *Aedes Aegypti* Lifespan. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(9), 577-587.
- De Gregorio, E., Silvestro, G., Petrillo, M., Carlomagno, M. S., And Di Nocera, P. P. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence Repeats In *Yersinia*: Genomic Organization And Functional Properties. *Journal Of Bacteriology*, P. 7945–7954, 2005.
- Delong, E. F. (1992). *Archaea* In Coastal Marine Environments. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 89(12), 5685-5689.
- Dickson, L.B; Jiolle, D; Minard, G; Moltini-Conclois, I; Volant, S; Ghoulane, A; Et Al. (2017). The Transmission Effects Of Larval Exposure To Different Environmental Bacteria Lead To Variation Of Adult Characteristics In A Mosquito Vector. *Sci. Av.* 3:E1700585.
- Dueholm, M.K.D; Nierychlo, M; Andersen, K.S Et Al.(2022). Midas 4: A Global Catalog Of Complete 16s Rna Gene Sequences And Taxonomy For Studies Of Bacterial Communities In Wastewater Treatment Plants. *Nat Commun* 13, 1908.
- Francis, C. S., Sebastian, H., Sudhikumar, A. V., & Aneesh, E. M. (2024). Symbiotic Secrets: Exploring The Gut Microbiome Of *Aedes Aegypti* Larvae And Its Role In Mosquito Physiology. *International Journal Of Tropical Insect Science*, 1-17.
- Gaio, A.D.E.O; Gusmão, D.S; Santos, A.V; Berbert-Molina, M.A; Pimenta, P.F; Lemos, F.J. (2011). Contribution Of Midgut Bacteria To Blood Digestion And Egg Production In *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). *688 Parasit Vectors*. 14;4(1):105.
- Giraud, É., Varet, H., Legendre, R., Sismeiro, O., Aubry, F., Dabo, S., ... & Lambrechts, L. (2022). Mosquito-Bacteria Interactions During Larval Development Trigger Metabolic Changes With Carry-Over Effects On Adult Fitness. *Molecular Ecology*, 31(5), 1444-1460.
- Gusmão, D.S; Santos, A.V; Marini, D.C; Russo, É.D.E.S; Peixoto, A.M.D; Bacci, J.M; Et Al. (2007). First Isolation Of Microorganisms From The Gut Diverticulum Of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae): New 708 Perspectives For An Insect-Bacteria Association. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(8):919–24.
- Harbach Re (2007) The Culicidae (Diptera): Uma Revisão De Taxonomia, Classificação E Filogenia. *Zootaxa* 1668(1):591–638.
- Hegde, S; Khanipov, K; Albayrak, L; Golovko, G; Pimenova, M; Saldaña, M; Rojas, M.M; Hornett, E.A; Motl, G.C; Fredregill, C. (2018). Interaction Networks Of Microbiomes And Community Structure Of *Aedes Aegypti*, *Aedes Albopictus* And *Culex Quinquefasciatus* Mosquito Vectors Reared In The Laboratory And Collected In The Field. *Frente. Microbiol.* 2160.
- Hernández, A. M., Alcaraz, L. D., Hernández-Álvarez, C., Romero, M. F., Jara-Servín, A., Barajas, H., ... & Peimbert, M. (2024). Revealing The Microbiome Diversity And Biocontrol Potential Of Field *Aedes Ssp.*: Implications For Disease Vector Management. *Plos One*, 19(4), E0302328.
- Huang, T. P., Tzeng, D. D. S., Wong, A. C., Chen, C. H., Lu, K. M., Lee, Y. H., ... & Tzeng, K. C. (2012). Dna Polymorphisms And Biocontrol Of *Bacillus* Antagonistic To Citrus Bacterial Canker With Indication Of The Interference Of Phyllosphere Biofilms.
- Hughes, G. L., Raygoza Garay, J. A., Koundal, V., Rasgon, J. L., And Mwangi, M. M. (2016). Genome Sequence Of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain Smas1, Isolated From The Asian Malaria Mosquito *Anopheles Stephensi*. *Genome Announc.* 4:E00086.
- Juma, E.O; Allan, B.F; Kim, C.H; Et Al. (2021). The Larval Environment Strongly Influences The Bacterial Communities Of *Aedes Triseriatus* And *Aedes Japonicus* (Diptera: Culicidae). *Sci Rep* 11, 7910.

- Kang, X.; Wang, Y.; Li, S.; Sun, X.; Lu, X.; Rajaofera, M.J.N.; Lu, Y.; Kang, L.; Zheng, A.; Zou, Z.; Et Al. (2020). Comparative Analysis Of The Gut Microbiota Of Adult Mosquitoes From Eight Locations In Hainan, China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 596750.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid Determination Of 16s Ribosomal Rna Sequences For Phylogenetic Analyses. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Laporta Gz, Potter Am, Oliveira Jf, Bourke Bp, Pecor Db, Linton Ym (2023) Distribuição Global De *Aedes Aegypti* E *Aedes Albopictus* Em Um Cenário De Mudança Climática De Rivalidade Regional. *Insetos* 14(1):49.
- Lindh, J.M; Borg-Karlson, A.K; Faye, I. (2008). Transstadial And Horizontal Transfer Of Bacteria Within A Colony Of *Anopheles Gambiae* (Diptera: Culicidae) And Oviposition Response To Bacteria-Containing Water. *Acta Trop.*107(3):242–50.
- Li, Y., Chang, L., Xu, K., Zhang, S., Gao, F., & Fan, Y. (2023). Research Progresses On The Function And Detection Methods Of Insect Gut Microbes. *Microorganisms*, 11(5), 1208.
- Mancini, M. V., Damiani, C., Accoti, A., Tallarita, M., Nunzi, E., Cappelli, A., Bozic, J., Catanzani, R., Rossi, R., Valzano, M, Serrao, A., Ricci, I., & Spaccapelo, R. (2018). Estimating Bacteria Diversity In Different Organs Of Nine Species Of Mosquito By Next Generation Sequencing. *Bmc Microbiology*, 18(1), 1-10.
- Mancini, M.V.; Damiani, C.; Accoti, A.; Tallarita, M.; Nunzi, E.; Cappelli, A.; Bozic, J.; Catanzani, R.; Rossi, P.; Valzano, M.; Et Al. (2018). Estimating Bacteria Diversity In Different Organs Of Nine Species Of Mosquito By Next Generation Sequencing. *Bmc Microbiol.*18, 126.
- Manda, H., Gouagna, L. C., Nyandat, E., Kabiru, E. W., Jackson, R. R., Foster, W. A., ... & Hassanali, A. (2007). Discriminative Feeding Behaviour Of *Anopheles Gambiae* Ss On Endemic Plants In Western Kenya. *Medical And Veterinary Entomology*, 21(1), 103-111.
- Minard G, Mavingui P, Moro Cv. (2013). Diversity And Function Of Bacterial Microbiota In The Mosquito Holobiont. *Parasit Vectors*. 6:146.
- Minard, G.; Tran, F.H.; Raharimalala, F.N.; Hellard, E.; Ravelonandro, P.; Mavingui, P.; Moro, C.V. (2013). Prevalence, Genomic And Metabolic Profiles Of *Acinetobacter* And *Asaia* Associated With Field-Caught *Aedes Albopictus* From Madagascar. *Fems Microbiol. Ecol.* 83, 63–73.
- Muturi, E. J., Njoroge, T. M., Dunlap, C., & Cáceres, C. E. (2021). Blood Meal Source And Mixed Blood-Feeding Influence Gut Bacterial Community Composition In *Aedes Aegypti*. *Parasites & Vectors*, 14, 1-10.
- Prastujati, A. U., Hilmi, M., Khusna, A., Arief, I. I., Makmur, S., & Maulida, Q. (2022, April). Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria Of Bekamal (Banyuwangi Traditional Fermented Meat). In *Iop Conference Series: Earth And Environmental Science* (Vol. 1020, No. 1, P. 012026). Iop Publishing.
- Ramirez Jl, Short Sm, Bahia Ac, Saraiva Rg, Dong Y, Kang S, Tripathi A, Mlambo G, Dimopoulos G. (2014). Chromobacterium Csp_P Reduces Malaria And Dengue Infection In Mosquito Vectors And Tementomopathogenic And In Vitroanti-Pathogenactivities. *Plos Pathog.*10, E1004398.
- Ramirez Jl, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale Jm, Dimopoulos G. (2012). Reciprocal Tripartite Interactions Between The *Aedes Aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System And The Dengue Virus Influence Vector Competence. *Plos Negl. Troop. Dis.*6, E1561.
- Rodpai, R., Boonroumkaew, P., Sadaow, L., Sanpool, O., Janwan, P., Thanchomnang, T., ... & Maleewong, W. (2023). Microbiome Composition And Microbial Community Structure In Mosquito Vectors *Aedes Aegypti* And *Aedes Albopictus* In Northeastern Thailand, A Dengue-Endemic Area. *Insects*, 14(2), 184.
- Rosso, F., Tagliapietra, V., Albanese, D., Pindo, M., Baldacchino, F., Arnoldi, D., ... & Rizzoli,

- A. (2018). Reduced Diversity Of Gut Microbiota In Two *Aedes* Mosquitoes Species In Areas Of Recent Invasion. *Scientific Reports*, 8(1), 16091.
- Rosso, F.; Tagliapietra, V.; Albanese, D.; Pindo, M.; Baldacchino, F.; Arnoldi, D.; Donati, C.; Rizzoli, A. (2018). Reduced Diversity Of Gut Microbiota In Two *Aedes* Mosquitoes Species In Areas Of Recent Invasion. *Sci. Rep.* 8, 16091.
- Scolari, Francesca; Casiraghi, Maurizio; Bonizzoni, Mariangela. (2019). *Aedes Spp.* And Their Microbiota: A Review. *Frontiers In Microbiology*, V. 10, P. 469067.
- Saab, S.A; Dohna, H.Z.U; Nilsson, L.K.J; Onorati, P; Nakhleh, J; Terenius, O; Et Al. (2020). The Environment And Species Affect Gut Bacteria Composition In Laboratory Co- Cultured *Anopheles Gambiae* And *Aedes Albopictus* Mosquitoes. *Sci Rep.* 25;10(1):3352.
- Saraiva, R.G; Kang, S; Simões, M.L; Angleró-Rodríguez, Y.I; Dimopoulos, G. (2016). Mosquito Gut Antiparasitic And Antiviral Immunity. *Dev Comp Immunol.* 64:53–64.
- Silva, E.B.; Matsena Zingoni, Z.; Koekemoer, L.L.; Dahan-Moss, Y.L. (2021). Microbiota Identified From Preserved *Anopheles*. *Malar. J.* 20, 230.
- Souza-Neto, J.A; Powell, J.R; Bonizzoni, M. (2019). *Aedes Aegypti* Vector Competence Studies: A Review. *Infect. Genet. Evol.* 67, 191–209.
- Tuanudom, R.; Yurayart, N.; Rodkhum, C.; Tiawsirisup, S. (2021). Midgut Microbiota Diversity In Laboratory-Colonized And Field-Collected *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae): A Preliminary Study. *Heliyon*.E08259.
- Valiente Moro, C., Tran, F. H., Nantenaina Raharimalala, F., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2013). Diversity Of Culturable Bacteria Including *Pantoea* In Wild Mosquito *Aedes Albopictus*. *Bmc Microbiology*, 13, 1-11.
- Valiente Moro, C., Tran, F.H., Nantenaina Raharimalala, F. Et Al. (2013). Diversity Of Culturable Bacteria Including *Pantoea* In Wild Mosquito *Aedes Albopictus*. *Bmc Microbiol* 13,70 .
- Valzania, L; Martinson, V.G; Harrison, R.E; Boyd, B.M; Coon, K.L; Brown, M.R; Strand, M.R. (2018). Both Living Bacteria And Eukaryotes In The Mosquito Gut Promote Growth Of Larvae. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 12(7), E0006638.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, R. J. (1991). Distribution Of Repetitive Dna Sequences In Eubacteria And Application To Fingerprinting Of Bacterial Genomes. *Nucleic Acids Research*, V. 19, P. 6823–6831.
- Vijayan A, Rumbo M, Carnoy C, Sirard Jc (2018). Defesas Antimicrobianas Compartimentadas Em Resposta À Flagelina. *Tendências Microbiol* 26(5):423–435.
- Weaver, S.C. (2018). Prediction And Prevention Of Urban Arbovirus Epidemics: A Challenge For The Global Virology Community. *Antiviral Res.* 156:80–4.
- Wu, P; Sun, P; Nie, K; Zhu, Y; Shi, M; Xiao, C; Et Al. (2019). A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness To Arboviruses. *Cell Host Microbe.* 25(1):101-112.E5.
- Yadav, K. K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H. K., Prasad, G. B. K. S., & Veer, V. (2015). Molecular Characterization Of Midgut Microbiota Of *Aedes Albopictus* And *Aedes Aegypti* From Arunachal Pradesh, India. *Parasites & Vectors*, 8(1), 641.

CAPÍTULO II

Artigo publicado no Journal of Invertebrate Pathology

Journal of Invertebrate Pathology 204 (2024) 108094



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Bacteria isolated from *Aedes aegypti* with potential vector control applications

Juan Campos de Oliveira^a, Ricardo de Melo Katak^b, Veranilce Alves Muniz^a,
Marta Rodrigues de Oliveira^c, Elerson Matos Rocha^d, William Ribeiro da Silva^e,
Edson Júnior do Carmo^{a,f}, Rosemary Aparecida Roque^b, Osvaldo Marinotti^g, Olle Terenius^{h,*},
Spartaco Astolfi-Filho^{a,f}

^a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC/UFAM, Brazil

^b Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia-INPA, Brazil

^c Department of Entomology and Acarology, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", University of São Paulo - ESALQ - USP, Brazil

^d School of Agricultural Sciences, Department of Bioprocesses and Biotechnology, Central Multiuser Laboratory, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Entomologia - PPGENT/INPA, Brazil

^f Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFAM, Brazil

^g Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA

^h Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, P.O. Box 596, SE-751 24 Uppsala, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Aedes aegypti
Biological control
Cultivable bacteria

ABSTRACT

Highly anthropophilic and adapted to urban environments, *Aedes aegypti* mosquitoes are the main vectors of arboviruses that cause human diseases such as dengue, Zika, and chikungunya fever, especially in countries with tropical and subtropical climates. Microorganisms with mosquitocidal and larvicidal activities have been suggested as environmentally safe alternatives to chemical or mechanical mosquito control methods. Here, we analyzed cultivable bacteria isolated from all stages of the mosquito life cycle for their larvicidal activity against *Ae. aegypti*. A total of 424 bacterial strains isolated from eggs, larvae, pupae, or adult *Ae. aegypti* were analyzed for the pathogenic potential of their crude cultures against larvae of this same mosquito species. Nine strains displayed larvicidal activity comparable to the strain AM65-52, reisolated from commercial BTI-based product VectoBac® WG. 16S rRNA gene sequencing revealed that the set of larvicidal strains contains two representatives of the genus *Bacillus*, five *Enterobacter*, and two *Stenotrophomonas*. This study demonstrates that some bacteria isolated from *Ae. aegypti* are pathogenic for the mosquito from which they were isolated. The data are promising for developing novel bioinsecticides for the control of these medically important mosquitoes.

1. Introduction

Aedes aegypti mosquitoes are the main vectors responsible for the transmission of arboviruses that cause diseases such as urban yellow fever, dengue, chikungunya, Zika fever, and others, which infect thousands of people around the world (Camara, 2016, Kraemer et al., 2019, Souza-Neto et al., 2019). Nowadays, chemical insecticides are the main vector control tools used against *Ae. aegypti*. Due to their continuous application in the field, for the management of agricultural and medical insect pests, chemical insecticides cause environmental pollution, food contamination, death of non-target organisms, and selection of naturally

resistant insects (Amelia-Yap et al., 2018, Dufour et al., 2019, Vontas et al., 2020, De Almeida Rocha et al., 2021).

Thus, the search for efficient and ecologically safe *Ae. aegypti* control agents has been intense. Identification, isolation, and characterization of environmental microorganisms and their metabolites with entomopathogenic activities have provided promising alternatives (Saldana et al., 2017, Soares-da-Silva et al., 2017, Dahmana et al., 2020, Katak et al., 2023, 2021, De Oliveira et al., 2021). For example, the genera *Bacillus*, *Brevibacillus*, and *Lysinibacillus* harbor bacterial species useful for the control of insect vectors of diseases, such as mosquitoes of the genera *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* (Barbieri et al., 2021, Katak et al., 2021).

* Corresponding author.

E-mail address: olle.terenius@icm.uu.se (O. Terenius).

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108094>

Received 3 November 2023; Received in revised form 13 February 2024; Accepted 10 March 2024

Available online 11 March 2024

0022-2011/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Bacteria isolated from *Aedes aegypti* with potential vector control applications

Juan Campos de Oliveira¹, Ricardo de Melo Katak², Veranilce Alves Muniz¹, Marta Rodrigues de Oliveira³, Elerson Matos Rocha⁴, William Ribeiro da Silva⁵, Edson Júnior do Carmo^{1,6}, Rosemary Aparecida Roque², Osvaldo Marinotti⁷, Olle Terenius^{8*}, Spartaco Astolfi-Filho^{1,6}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC/UFAM

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

³ Department of Entomology and Acarology, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo – ESALQ - USP

⁴ School of Agricultural Sciences, Department of Bioprocesses and Biotechnology, Central Multiuser Laboratory, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Entomologia - PPGENT/INPA

⁶ Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFAM

⁷ Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA

⁸ Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, P.O. Box 596, SE-751 24, Uppsala, Sweden.

*Corresponding author: olle.terenius@icm.uu.se

Abstract

Highly anthropophilic and adapted to urban environments, *Aedes aegypti* mosquitoes are the main vectors of arboviruses that cause human diseases such as dengue, Zika, and chikungunya fever, especially in countries with tropical and subtropical climates. Microorganisms with mosquitocidal and larvicidal activities have been suggested as environmentally safe alternatives to chemical or mechanical mosquito control methods. Here, we analyzed cultivable bacteria isolated from all stages of the mosquito life cycle for their larvicidal activity against *Ae. aegypti*. A total of 424 bacterial strains isolated from eggs, larvae, pupae, or adult *Ae. aegypti* were analyzed for the pathogenic potential of their crude cultures against larvae of this same mosquito species. Nine strains displayed larvicidal activity comparable to the strain AM65-52, reisolated from commercial BTi-based product VectoBac® WG. 16S rRNA gene sequencing revealed that the set of larvicidal strains contains two representatives of the genus *Bacillus*, five *Enterobacter*, and two *Stenotrophomonas*. This study demonstrates that some bacteria isolated from *Ae. aegypti* are pathogenic for the mosquito from which they were isolated. The data are promising for developing novel bioinsecticides for the control of these medically important mosquitoes.

Keywords: *Aedes aegypti*, biological control, cultivable bacteria

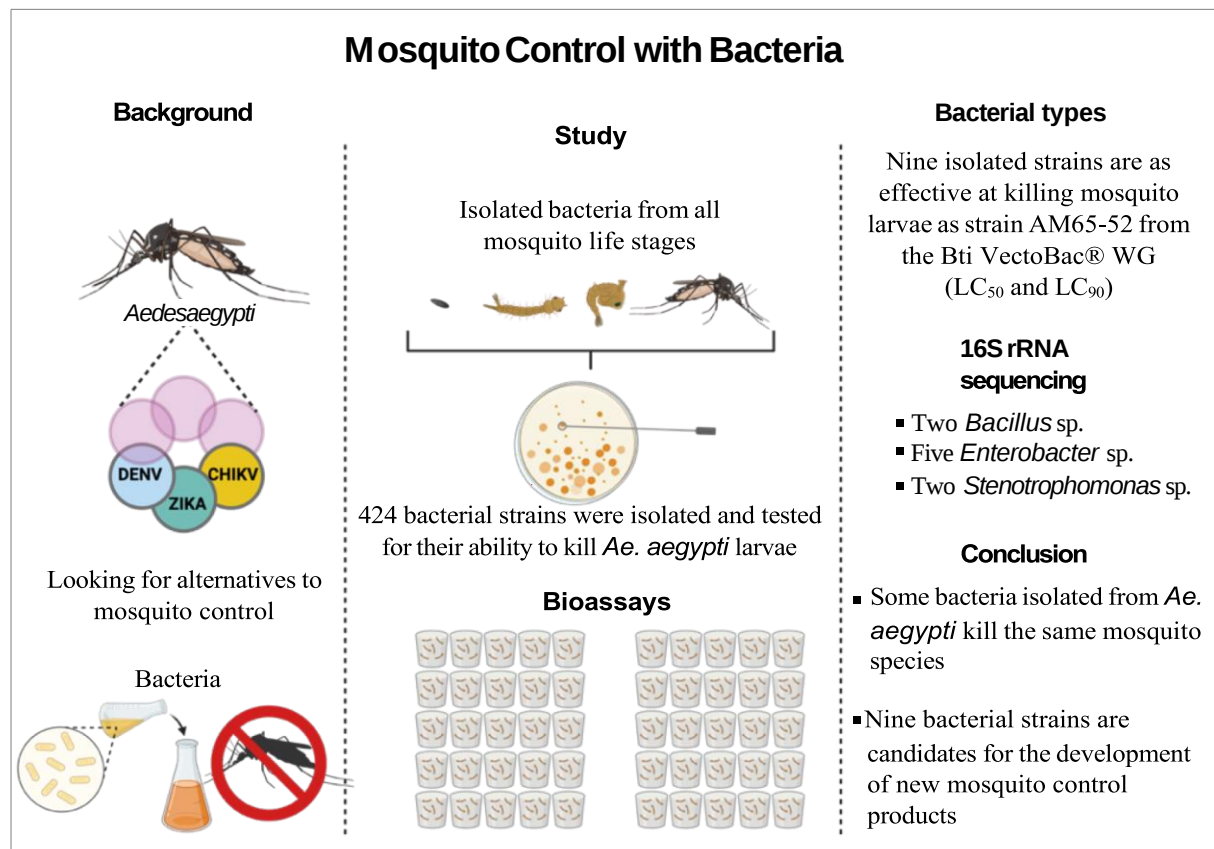


Figura 6:. Graphical abstract

Introduction

Aedes aegypti mosquitoes are the main vectors responsible for the transmission of arboviruses that cause diseases such as urban yellow fever, dengue, chikungunya, Zika fever, and others, which infect thousands of people around the world (Camara, 2016, Kraemer et al., 2019, Souza-Neto et al., 2019). Nowadays, chemical insecticides are the main vector control tools used against *Ae. aegypti*. Due to their continuous application in the field, for the management of agricultural and medical insect pests, chemical insecticides cause environmental pollution, food contamination, death of non-target organisms, and selection of naturally resistant insects (Amelia-Yap et al., 2018, Dusfour et al. 2019, Vontas et al., 2020, De Almeida et al., 2021).

Thus, the search for efficient and ecologically safe *Ae. aegypti* control agents has been intense. Identification, isolation, and characterization of environmental microorganisms and their metabolites with entomopathogenic activities have provided promising alternatives (Saldaña et al., 2017, Soares-da-Silva et al., 2017, Dahmana et al., 2020, Katak et al., 2023, 2021, De Oliveira et al., 2021). For example, the genera *Bacillus*, *Brevibacillus*, and *Lysinibacillus* harbor bacterial species useful for the control of insect vectors of diseases, such as mosquitoes of the genera *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* (Barbieri et al., 2021, Katak et al., 2021). These bacteria synthesize a wealth of molecules and virulence factors for mosquitoes, including the proteins Cry, Cyt, Vip, Mpp,

Tpp, CpbB, chitinases, and others (Bravo et al., 2007, Palma et al., 2014, Marche et al., 2017, Crickmore et al., 2021), which are currently used in various insect biological control programs (Valtierra-de-Luiz et al., 2020).

While mosquito-associated bacteria have been demonstrated to positively impact mosquito fitness, facilitate the acquisition of nutrients (Gaio et al., 2011), provide defense against pathogens (Oliver et al., 2003, Dong et al., 2009) and influence vectorial capacity, modulating the transmission of arboviruses (Weiss and Aksoy, 2011, Jupatanakul et al., 2014), until the writing of this article, no study focused on the bacteria present in *Ae. aegypti* with antagonistic relationships with the host mosquito. Here, we demonstrate that the mosquito microbiota should be further explored as a source of bacteria with entomopathogenic properties that can be developed in new products for the control of *Ae. aegypti*.

Materials and methods

Field collection of *Aedes aegypti* and laboratory breeding

Samples of *Ae. aegypti* larvae and pupae and breeding water were collected in the city of Manaus/Brazil (GPS coordinates -3.0726016 S, -59.9284962 W) in an area of high vector density, according to data from the local mosquito control program (Secretaria Municipal de Saúde do Amazonas - SEMSA). The collections were carried out in September 2020, with government authorization (SISBIO/74091-1/2020–2021) and the consent of the property owner who signed a free and informed consent form. Ten plastic trays (45x30x7.5cm) with 1000 ml of sterile distilled water were placed at the collection site, monitored for ten days as per Silva et al. (2021). After this period, containers with larvae, pupae, and organic matter were moved to the laboratory (Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue - LCBBMD) at INPA. Larvae and pupae were identified using entomological taxonomic keys (Forattini, 2002, Harbach, 2022, WRBU, 2022). The insectary-maintained conditions were 27±2 °C, 80-90% relative humidity, and a 12/12 light/dark cycle. Field-collected larvae were kept in the laboratory with the same water and organic matter. Adult *Ae. aegypti* females were fed hamster blood (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839) and provided with a 10% sucrose solution. Hamsters were anesthetized following INPA's approved ethics protocol (029/2021). After the blood meal, eggs were collected for three days. Some eggs were used for bacterial isolation, while the rest were stored for 72 hours and then immersed in containers with distilled water to stimulate larval hatching for bioassays. Lab-reared larvae followed similar procedures to field-collected ones, with fish food (Tetramin) added to their diet.

Isolation of bacteria

Bacterial strains were isolated as described by Rocha et al. (2021), with adaptations. Apart from eggs that were not prewashed, samples of other developmental stages (4th instar larvae, pupae, and adult females) of *Ae. aegypti* were washed for 1 minute in 70% alcohol and then in sterile H₂O before being macerated in microtubes containing 1.5 ml of sterilized H₂O and vortexed for three minutes. Three replicates, 50 µl aliquots from all samples, were spread on Petri dishes containing Nutrient Agar (NA), Luria-Bertani Agar (LB) or ISP2 medium. Fluconazole (20 mg/ml) was added to the medium to prevent fungal growth. All Petri dishes were incubated at 29 °C for 24, 48 and 72 h. Negative control plates with only sterile water did not result in colonies.

Morphological and molecular characterization of bacteria

Bacterial colonies used in the selective bioassays were examined for size, shape, texture, elevation, color, and Gram stain at 100X magnification. Genomic DNA from the nine bacterial strains in the quantitative bioassays was extracted using InstaGene™ Matrix (BioRad) following the manufacturer's instructions. DNA was quantified with a Thermo Scientific™ NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer and adjusted to 150 ng/µl. Bacterial 16S rRNA genes were PCR-amplified using GoTaq® DNA Polymerase 2× (Promega) and primers 16S08F (5'-GYCCADACWCCTACGG-3') and 16S08R (5'-CACGAGCTGACGAC-3') (Arruda et al., 2021). The amplicon corresponds to a fragment of approximately 700 bp and comprises the variable regions V2 to V6 of the 16S rRNA gene. Each reaction consisted of 25 µl of the 2X master mix; 2 µl DNA (150 ng/µl); 21 µl of milli-Q H₂O and 1 µl (10 pMol) of each primer. The PCR program had an initial denaturation at 94°C for 7 min, followed by 30 cycles of [94°C for 45s, 50°C for 30s, 72°C for 60s], followed by a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were evaluated on 1% agarose gel stained with UniSafe Dye 0.03% (v/v) and visualized under UV light. Sanger sequencing in both directions using the primers V2 and V6 (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) Sequencing Reaction and Ethanol/EDTA/Sodium Acetate precipitation reaction according to manufacturer's suggested protocol) was performed by capillary electrophoresis in a ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Electropherograms were analyzed using the programs Chromas Lite and Geneious 4.8.3. Taxonomic assignments of the isolated bacteria were based on consensus sequence comparisons with 16S sequences in GenBank applying BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the Ribosomal Database Project, RDP-II (<http://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp>).

Assays for mosquito larvicidal activity of bacterial cultures

Individual colonies (bacterial strains) were inoculated in 5 ml of the same culture medium from which they were isolated, and these initial cultures were kept in a shaker incubator at 29 °C and 180 rpm for 24 h. Fifty microlitres of the initial cultures were inoculated in 50 ml of the same medium and incubated under the same conditions for 72 h. The optical densities of the bacterial cultures were monitored and the values at the stationary phase, 72 h, are shown in Table 1. Bioassays were performed according to WHO guidelines (2005), as described by Katak et al. (2021). Bioassays were carried out in three replicates, each with three cups and each cup containing 9 ml of distilled water, 1 ml of bacterial culture, and fish food (Tetramin). Ten third-instar larvae of the first generation of *Ae. aegypti* from the specimens collected in the field were placed in each cup. Larval mortality was determined at 24, 48 and 72 h after exposure to bacterial cultures. No mortality was observed at any time in negative controls without bacteria. The strain AM65-52 of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, reisolated from the product VectoBac® WG, free from the additives present in the formulation, was tested as a positive control. Strains resulting in 100% mortality were further investigated and lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) were determined.

LC₅₀ and LC₉₀ determination Bacterial cultures

Bacterial strains were inoculated in 2 ml of the culture medium from which they were isolated and kept in a shaker incubator at 30°C and 180 rpm for 24 h. Fifty µl of each culture were transferred to 100 ml of fresh medium, followed by incubation at 30 °C and 180 rpm for 72 h. Biological assays were carried out as described by WHO (2005) and Katak et al. (2021). These tests were carried out in five replicates, each containing 150 ml of water, 20 third-instar larvae and 1000, 900, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 125, 100, 75 or 50 µl of bacterial culture. Dead larvae were counted at 24, 48, and 72 hours after exposure. Negative and positive controls were included as described above, using strain AM65-52 as active strain. Data from concentrations that caused between 10% and about 95% mortality of mosquito larvae were used for statistical analyses. LC₅₀ and LC₉₀ were evaluated using Probit, with $p \leq 0.05$ (Finney, 1971), using the statistical software Polo Plus 1.0 statistical software (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) (Robertson et al., 2017). Lethal concentrations and confidence interval (95% CI) were analyzed using the Lilliefors normality test (K samples), analysis of variance (ANOVA), Tukey's multiple comparison tests ($p \leq 0.05$) and Student's t- test with BioEstat 5.3 software for Windows (Ayres et al., 2007).

Bacterial metabolites

Bacterial strains were inoculated into 1000 ml of medium as in 2.4. After 120 hours of incubation, cultures were filtered through a 0.22 μ M Millipore Membrane. The filtrate for each strain was partitioned in a separation funnel with a mixture of ethyl acetate (AcOET) and isopropanol (iPr-OH) 9:1 volume/volume (v/v) three times, each time using 300 ml of the solvent mixture (Rakhmawatie et al., 2021). The pooled solvent fractions were concentrated in a rotary evaporator (Tecnal[®]), under reduced pressure with a vacuum pump and at 45 °C. Dried extracts were weighed and stored in a desiccator with activated silica.

Bioassays followed the criteria established by Dulmage et al. (1990) and WHO (2005) and were conducted under controlled conditions of temperature, humidity, and photoperiod, as mentioned above. Bioassays were carried out in triplicate, in 150 ml plastic plates containing 120 ml of distilled water, 20 third instar larvae, powdered larval food (Teklad Global 18%) and concentrations of 0.01 to 250 μ g/ml of extracted bacterial metabolites (De Oliveira et al., 2021). All metabolites were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; Thermo Fischer Scientific). Mortality readings were recorded 24, 48 and 72 h after exposure to bacterial extracts (Danga et al., 2014). The DMSO solvent was used as a negative control, and Temephos (Pestanal Sigma- Aldrich) as a positive control. LC50 and LC90, statistical analyses were conducted as in

Results

Selective bioassays for mosquito larvicidal activity

A total of 424 bacterial strains were isolated from *Ae. aegypti*, 88 from eggs, 166 from larvae, 72 from pupae, and 98 from adult female mosquitoes. We examined the pathogenic potential of these 424 bacterial strains against *Ae. aegypti* larvae, and found nine strains that, under our assay conditions, caused 100% mortality in 24h (Fig. 7).

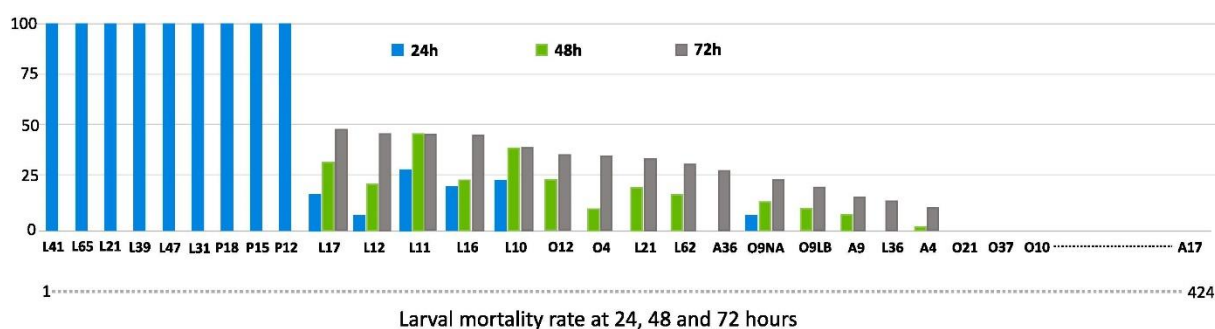


Figure 7: Mortality of third instar *Ae. aegypti* larvae exposed to isolated bacterial strains.

Mortality was assessed after 24, 48, and 72 hours of exposure to bacteria. Among the bacterial strains isolated from *Ae. aegypti*, nine led to 100% mortality within 24 hours, while other fifteen strains caused mortality below 50%. The remaining 415 strains showed no mortality during the evaluation period. All tests were performed in triplicate, and detailed results are available in Table S1

Taxonomic assignment of active strains

The 16S rRNA gene of the nine strains pathogenic to *Ae. aegypti* larvae included two *Bacillus* representatives, five *Enterobacter*, and two *Stenotrophomonas*, with over 98.5% identity with sequences in the NCBI database. However, only genus-level classification was possible for these isolated lineages due to the limited resolution of the 16S rRNA locus (Table 3).

Table 3: Characterization of isolated bacteria with pathogenicity against *Ae. Aegypti* larvae.

Strain	Culture medium/sample	OD600 nm (72h)	Gram stain	Catalase activity	16S Seq. Identity %	Best match GenBank acc. n° Genus
L65	ISP2/Larvae	1.15	+	+	99.01	OP692702 - <i>Bacillus</i> sp.
L21	LB/Larvae	2.6	-	+	98.58	OP692703 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.
L31	LB/Larvae	2.0	-	+	98.87	OP692704 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.
L39	LB/Larvae	2.5	-	+	99.00	OP692705 - <i>Enterobacter</i> sp.
L41	LB/Larvae	2.7	-	+	99.29	OP692706 - <i>Enterobacter</i> sp.
P12	NA/Pupae	1.25	+	+	98.86	OP692707 - <i>Bacillus</i> sp.
P15	NA/Pupae	2.7	-	+	99.00	OP692708 - <i>Enterobacter</i> sp.
P18	NA/Pupae	2.1	-	+	99.29	OP692709 - <i>Enterobacter</i> sp.
L47	NA/Larvae	2.7	-	+	99.01	OP692710 - <i>Enterobacter</i> sp.

In quantitative bioassays, the pathogenicity of bacterial cultures from the nine most active strains against *Ae. aegypti* larvae (Fig. 1 and Table 1), measured as larvae mortality, was generally comparable to strain AM65-52 cultures. For most assays, the estimated lethal concentration values and their 95% confidence intervals for the nine strains were not significantly different ($p > 0.05$) from those of strain AM65-52 cultures. However, there was a significant difference ($p < 0.00045$) between the LC50 values obtained for P18 (123 μ L, SE: 2.4 ± 0.15) and strain AM65-52 (182 μ L, SE: 2.2 ± 0.2) at 48 hours, when P18 was more efficient. The estimated LC90 values for all tested strains were not statistically different from strain AM65-52 at 24 hours of exposure. In contrast, statistically significant differences in LC90 were found at 48 hours (L41 and L47) and 72 hours for L41 (356 μ L, SE: 4.5 ± 0.3), P12 (418 μ L, SE: 2.9 ± 0.5), and L47 (389 μ L, SE: 9.1 ± 0.8) compared to strain AM65-52 (261 μ L; SE: 4.5 ± 0.3) (Table 4).

Table 4: LC50 and LC90 values of bacterial cultures against *Ae. aegypti* larvae.

Inter	Strain	LC ₅₀ (CI 95%)	χ^2	df	Slope $\pm$ SE	LC ₉₀ (CI 95%)	χ^2	df	Slope $\pm$ SE
24 h	Strain AM65-52	250 (165 - 346) ^a	73.9	4	3.2 ± 0.18	528 (452 - 645) ^a	9.7	3	4.2 ± 0.38
	L65 - <i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	20.4 ± 1.11	944 (888 - 1087) ^a	6.7	2	20.4 ± 1.11
	L21 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.	381(359 - 399) ^a	11.5	4	10.3 ± 0.48	507 (483 - 542) ^a	10.3	4	10.3 ± 0.48
	L31 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.	527 (320 - 607) ^a	0.9	5	1.0 ± 0.33	6776 (2933 - 3372) ^a	1.6	7	1.2 ± 0.26
	L39 - <i>Enterobacter</i> sp.	396 (361 - 425) ^a	3.9	8	2.9 ± 0.22	1078 (999 - 1193) ^a	3.9	8	2.9 ± 0.22
	L41 - <i>Enterobacter</i> sp.	397 (362 - 424) ^a	2.0	5	2.5 ± 0.27	1104 (1001 - 1001) ^a	0.8	4	3.2 ± 0.54
	P12 - <i>Bacillus</i> sp.	398 (301 - 449) ^a	9.8	4	2.7 ± 0.32	709 (668 - 818) ^a	10.4	3	10.2 ± 0.84
	P15 - <i>Enterobacter</i> sp.	274 (249 - 294) ^a	2.5	5	2.5 ± 0.22	701 (659 - 785) ^a	4.5	4	4.8 ± 0.61
	P18 - <i>Enterobacter</i> sp.	232 (213 - 248) ^a	2.1	4	2.6 ± 0.24	582 (517 - 725) ^a	9.0	4	3.8 ± 0.32
	L47 - <i>Enterobacter</i> sp.	482 (346 - 522) ^a	4.5	2	9.4 ± 0.97	647 (620 - 682) ^a	9.5	4	10.1 ± 0.87
	Strain AM65-52	182 (166 - 195) ^a	1.7	5	2.2 ± 0.16	505 (435 - 604) ^a	9.5	3	4.6 ± 0.40
	L65 - <i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	863 (831 - 946) ^a	5.5	2	25.4 ± 1.71
	L21 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.	353 (345 - 361) ^a	0.1	1	9.3 ± 0.87	-	-	-	-
	L31 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.	452 (181 - 556) ^a	0.3	3	1.0 ± 0.36	-	-	-	-

48 h	L39 - <i>Enterobacter</i> sp.	373 (339 - 402) ^a	2.8	8	3.1 ± 0.23	955 (897 - 1036) ^a	2.8	8	3.1 ± 0.23
	L41 - <i>Enterobacter</i> sp.	337 (305 - 362) ^a	2.0	4	2.3 ± 0.28	856 (809 - 929) ^b	8.2	6	4.8 ± 0.40
	P12 - <i>Bacillus</i> sp.	301 (286 - 314) ^a	0.7	4	3.7 ± 0.27	650 (593 - 758) ^a	5.3	4	3.9 ± 0.36
	P15 - <i>Enterobacter</i> sp.	237 (220 - 252) ^{a,b}	3.5	7	2.7 ± 0.16	659 (591 - 854) ^a	7.5	4	3.3 ± 0.44
	P18 - <i>Enterobacter</i> sp.	123 (112 - 132) ^b	1.1	2	2.4 ± 0.24	372 (314 - 500) ^a	4.1	3	2.7 ± 0.23
	L47 - <i>Enterobacter</i> sp.	353 (330 - 372) ^a	6.0	6	6.0 ± 0.34	574 (544 - 605) ^b	8.1	4	8.5 ± 0.84
72 h	Strain AM65-52	-	-	-	-	293 (261 - 343) ^a	14.5	4	4.6 ± 0.39
	L65 - <i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	818 (798 - 866) ^a	2.8	2	31.9 ± 3.00
	L21 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.	331 (300 - 354) ^a	7.4	2	12.7 ± 0.76	418 (385 - 511) ^a	7.4	2	12.7 ± 0.76
	L31 - <i>Stenotrophomonas</i> sp.	490 (268 - 572) ^a	24.5	6	2.5 ± 0.33	1032 (864 - 2230) ^a	85.0	6	5.0 ± 0.36
	L39 - <i>Enterobacter</i> sp.	361 (318 - 395) ^a	19.2	8	3.8 ± 0.22	789 (728 - 882) ^a	19.2	8	3.8 ± 0.22
	L41 - <i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	356 (301 - 391) ^c	3.7	4	2.9 ± 0.53
	P12 - <i>Bacillus</i> sp.	199 (126 - 254) ^b	10.0	3	1.9 ± 0.21	485 (418 - 690) ^b	8.6	3	4.4 ± 0.37
	P15 - <i>Enterobacter</i> sp.	178 (152 - 199) ^b	5.5	4	2.4 ± 0.19	-	-	-	-
	P18 - <i>Enterobacter</i> sp.	101 (93 - 112) ^b	1.8	2	2.2 ± 0.26	-	-	-	-
	L47 - <i>Enterobacter</i> sp.	175 (132 - 206) ^b	9.4	4	2.0 ± 0.18	428 (389 - 545) ^b	6.0	2	9.2 ± 0.83

* Values expressed as microliters of 72 h bacterial culture per assay. The assays were carried out in five replicates, each containing 150 ml of water, 20 third-instar larvae and 1000, 900, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 125, 100, 75 or 50 µl bacterial cultures. Dead larvae were counted at 24, 48, and 72 hours after exposure to bacteria. LC₅₀ and LC₉₀ were evaluated using Probit, with $p \leq 0.05$. Statistical comparisons and confidence intervals (95% CI) were analyzed using the Lilliefors normality test (K samples), analysis of variance (ANOVA), Tukey's multiple comparison test ($p \leq 0.05$) and Student t-test. For all variables in each column with the same letter (a.b.c), the differences between values are not statistically significant. LC = lethal concentration; CI = confidence interval; χ^2 = chi-square; df = degrees of freedom; strain AM65-52 as a positive control.

Bacterial metabolites

Metabolic extracts from strains P18, L47, and L65 were tested for their efficacy in killing larvae of *Ae. aegypti*. The LC₅₀ and LC₉₀ values observed for P18 were not statistically different ($p < 0.05$) at 24 h and 48 h intervals when compared with the insecticide temephos (Table 5). The extracts from the L65 and L47 cultures were in general less effective, with values of LC₅₀ and LC₉₀ higher than those of the temephos or P18 extracts (Table 3).

Table 5: LC₅₀ and LC₉₀ values of bacterial metabolites against *Ae. aegypti* larvae:.

Inter	Extracts	LC ₅₀ µg/ml (CI 95%)	χ^2	df	Slope ± SE	LC ₉₀ µg/ml (CI 95%)	χ^2	df	Slope ± SE
24 h	Temephos	42 (21 - 60) ^a	10.5	3	2.0 ± 0.14	184 (134 - 329) ^a	10.5	3	2.0 ± 0.14
	P18 - <i>Enterobacter</i> sp.	41 (29 - 52) ^a	13.4	4	1.8 ± 0.10	199 (148 - 310) ^a	13.7	4	1.7 ± 0.10
	L65 - <i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
	L47 - <i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
48 h	Temephos	30 (14 - 42) ^a	6.3	3	2.4 ± 0.22	102 (81 - 144) ^a	6.3	3	2.4 ± 0.22
	P18 - <i>Enterobacter</i> sp.	27 (16 - 36) ^{ab}	10.4	3	2.2 ± 0.14	103 (77 - 175) ^a	10.4	3	2.2 ± 0.14
	L65 - <i>Bacillus</i> sp.	177 (124 - 268) ^b	5.0	3	0.9 ± 0.09	-	-	-	-
	L47 - <i>Enterobacter</i> sp.	439 (271 - 1423) ^{ab}	14.5	3	1.3 ± 0.10	-	-	-	-
72 h	Temephos	-	-	-	-	-	-	-	-
	P18 - <i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
	L65 - <i>Bacillus</i> sp.	71 (13 - 125) ^a	31.9	3	1.5 ± 0.10	499 (243 - 1504)	31.9	3	1.5 ± 0.10
	L47 - <i>Enterobacter</i> sp.	191 (142 - 272) ^a	12.7	3	1.8 ± 0.10	-	-	-	-

* Inter = Interval. LC₅₀ and LC₉₀ were evaluated using Probit and statistical analyzes were conducted as described in Table 2.

Discussion

Arbovirus transmission patterns are influenced by multiple factors, including vectorial capacity (Valderrama et al., 2017). Thus, the control of *Ae. aegypti* is necessary to reduce the mortality caused by dengue, urban yellow fever, Zika, chikungunya viruses, and other human pathogens. The efficacy of chemical insecticides used for this purpose are compromised by the

development of resistance in mosquitoes, prompting the search for new insecticides, especially biological ones (Amelia-Yap et al., 2018).

In the last decade, there has been increased interest in research on insect microbiota. Bacteria associated with insect disease vectors have drawn special attention for their interactions with both insect hosts and the pathogenic organisms they transmit (Thongsripong et al., 2018, Da Silva Gonçalves et al., 2019, Caragata and Short, 2022). The complexity of the mosquito bacterial microbiota has been actively investigated and bacterial genera already detected in these insects include *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteobacteria* (Minard et al., 2015, Wang et al., 2018, Scolari et al., 2021). Studies on the diversity of cultivable bacteria associated with *Ae. aegypti* in the Brazilian Amazon are still scarce. Here, we explore the cultivable bacterial microbiota of the *Ae. aegypti* and we identified

new entomopathogenic bacterial strains with activity against larvae of this same mosquito species.

Four hundred twenty-four bacterial strains isolated from *Ae. aegypti* eggs, larvae, pupae or adult females were used in this work. Nine were found to be pathogenic for larvae of this same mosquito, with a lethality of 100% within 24 hours of exposure, under the experimental conditions described here. After sequencing the 16S rRNA, it became evident that these strains fall into the genera *Enterobacter* (five isolates), *Bacillus* (two isolates), and *Stenotrophomonas* (two isolates).

Members of the *Enterobacter* genus are ubiquitously found in terrestrial and aquatic environments and as commensals in the intestinal tracts of humans and animals; however, they can cause opportunistic infections and become pathogens (Davin-Regli et al., 2019). Likewise, *Enterobacter spp.* have been found as inhabitants of the gut of many insect species, contributing to nutrition, protection from parasites and pathogens, modulation of immune responses, and communication (Engel and Moran, 2013, Oliver and Martinez, 2014) but, as evidenced in this and other work (Stathopoulou et al., 2021) *Enterobacter* strains may exhibit insecticidal activity against their hosts. Harikrishnan et al., (2023) described a strain of *Enterobacter cloacae* with larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. The active metabolites identified in that study were rhamnolipid biosurfactants. Yoshida et al., (2001) identified an insecticidal molecule produced by *Enterobacter aerogenes* found in the saliva of *Myrmeleon bore* larvae.

In general, *Enterobacter* strains P18 and P15 had the lowest values of LC50 and LC90, similar to those of strain AM65-52. Additional research is necessary to determine how strains isolated in our work cause the death of *Ae. aegypti* larvae. It is worth mentioning that to date there have been no reports on the biological activities of metabolic extracts from *Enterobacter sp.* strains against *Ae. aegypti* larvae.

Stenotrophomonas sp. has been found in association with many insects, including *Ae. aegypti* (Yadav et al., 2015). It was determined that some isolated strains of *Stenotrophomonas maltophilia* produce a rhamnolipid biosurfactant and a chitinase that have been investigated as

potential biocontrol agents of insect pests (Deepali et al., 2014, Jabeen et al., 2018). Possibly, similar molecules produced by the strains isolated in this study are responsible for the observed larvicide activity. The *Stenotrophomonas* strain L21 revealed to be more effective in killing mosquito larvae than *Stenotrophomonas* L31, indicating these two strains produce different quantities of larvicidal metabolites or have distinct mechanisms of pathogenicity.

The genus *Bacillus* contains several species of bacteria with entomopathogenic activity against insects of multiple orders, including Diptera, Lepidoptera, and Coleoptera (Lone et al., 2017, Falqueto et al., 2021). Products based on the *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) have been successfully applied around the world for at least three decades (Merritt et al., 1989, Regis et al., 2000, Dambach et al., 2020). These products, including the positive control used in this study, strain AM65-52, predominate in bioinsecticide markets worldwide, being ecologically safe based and specific to target organisms. In this study we identified two *Bacillus* sp. isolates (L65 and P12) with activity against *Ae. aegypti*.

The exploration and isolation of these microorganisms to control mosquito larvae can provide new products and active metabolites against disease vectors (Katak et al., 2023). Data obtained from the larvicidal activity of metabolic extracts from P18, L47 and L65 cultures showed efficacy against *Ae. aegypti* larvae. Although we have not investigated the mechanisms and molecules involved in the entomopathogenic capacity of the bacteria isolated and tested in this work, we hypothesize that the observed larvicidal activity is associated with the synthesis of toxic molecules during *in vitro* culture.

Conclusion

Nine bacterial strains isolated from *Ae. aegypti* showed larvicidal activity similar to that of the strain AM65-52 from commercially available VectoBac® WG product, against this vector mosquito. The data obtained are relevant for the development of new bacterial larvicides for use in vector control programs. The bacteria from strain P18, as well as their extracted metabolites, showed to be consistently active as larvicides, with activity comparable to strain AM65-52 and Temephos, respectively. More studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the observed larval mortality.

Acknowledgements

We thank the Graduate Program in Biotechnology/PPGBIOTEC-UFAM and the Malaria and Dengue Laboratory/INPA for the space, materials, and equipment necessary for the development of the work. To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This study was funded by Chamada Universal MCTIC/CNPQ –

407885/2022-6 and Prodoc-AM/FAPEAM -003/2022. This study is part of JCO doctoral thesis.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Amelia-Yap, Z. H., Chen, C. D., Sofian-Azirun, M., & Low, V. L. (2018). Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-17.
- Arruda, A., Ferreira, G. E., Santos Júnior, A., Matos, N. B., Carvalho, T. S., Ozaki, L. S., ... & Silva, A. A. (2021). Diversity of culturable bacteria isolated from the feces of wild *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Brazilian Amazon. *Journal of Medical Entomology*, 58(4), 1900-1907.
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., & Santos, A. A. (2007). *Aplicações Estatísticas Nas Áreas Das Ciências Biológicas e Médicas*; Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará, Brasil; MCT/CNPQ: Brasília, Brasil.
- Barbieri, G., Ferrari, C., Mamberti, S., Gabrieli, P., Castelli, M., Sassera, D., ... & Albertini, A. M. (2021). Identification of a Novel *Brevibacillus laterosporus* Strain with Insecticidal Activity Against *Aedes albopictus* Larvae. *Frontiers in microbiology*, 12, 624014.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Camara, T. N. L. (2016). Emerging arboviruses, and new challenges for public health in Brazil. *Rev Saude Publica*, 50 (36), 1-7.
- Caragata, E. P., & Short, S. M. (2022). Vector microbiota and immunity: modulating arthropod susceptibility to vertebrate pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, 100875.
- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., & Bonning, B. C. (2021). A structure based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 186, 107438.
- Da Silva Gonçalves, D., Iturbe-Ormaetxe, I., Martins-da-Silva, A., Telleria, EL, Rocha, MN, Traub-Csekö, YM, ... & Moreira, LA (2019). Introduction of *Wolbachia* in cell lines of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its effects on the expression of genes related to immunity and interaction with *Leishmania infantum*. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1-13.
- Dahmana, H., Raoult, D., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2020). Insecticidal activity of bacteria from larvae breeding site with Natural Larvae Mortality: Screening of Separated Supernatant and Pellet Fractions. *Pathogens*, 9(6), 486.
- Dambach, P., Winkler, V., Bärnighausen, T., Traoré, I., Ouedraogo, S., Sié, A., & Louis, V. R. (2020). Biological larvicides against *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) malaria vector mosquitoes—Long-term observations and repeatability assessment during an additional intervention year of a large-scale field trial in rural Burkina Faso. *Global Health Action*, 13(1), 18298.
- Danga, Y. S. P., Nukenine, E. N., Younoussa, L., & Esimone, C. O. (2014). Phytochemicals and larvicidal activity of *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) leaf extracts against *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

- Culicidae). J. Pure Appl. Zool, 2(2), 160-171.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter spp.*: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clinical microbiology reviews, 32(4), e00002-19.
- De Almeida Rocha, D., da Costa, L. M., Pessoa, G. D. Á. C., & Obara, M. T. (2021). Methods to detect insecticide resistance in sand flies: A systematic review. Acta Tropica, 213, 105747.
- De Oliveira, M. R., Katak, R. D. M., da Silva, G. F., Marinotti, O., Terenius, O., Tadei, W. P., ... & de Souza, A. Q. L. (2021). Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*. Frontiers in Microbiology, 12, 743246.
- Deepali, K., Sneha, P., & Sucheta, P. (2014). Larvicidal activity of rhamnolipid biosurfactant produced by *Stenotrophomonas maltophilia*. Int J Sci Eng Res, 5(4), 60-3.
- Dong, Y., Manfredini, F., & Dimopoulos, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS pathogens, 5(5), e1000423.
- Dulmage, H. T., Yousten, A. A., Singer, S. L. L. A., & Lacey, L. A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus* (No. TDR/BCV/90.1. Unpublished). World Health Organization.
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J. P., Weetman, D., Fonseca, D. M., Corbel, V., ... & Chandre, F. (2019). Management of insecticide resistance in the main vectors of *Aedes* arboviruses: advances and challenges. PLoS neglected tropical diseases, 13 (10), e0007615.
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. FEMS microbiology reviews, 37(5), 699-735.
- Falqueto, S. A., Pitaluga, B. F., de Sousa, J. R., Targanski, S. K., Campos, M. G., de Oliveira Mendes, T. A., ... & Soares, M. A. (2021). *Bacillus* spp. metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. Journal of Invertebrate Pathology, 179, 107525.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. J. Pharm. Sci., 60, 1432.
- Forattini, O. P. (2002). Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia, vol. 2. EDUSP, São Paulo, 549.
- Gaio, A. D. O., Gusmão, D. S., Santos, A. V., Berbert-Molina, M. A., Pimenta, P. F., & Lemos, F. J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). Parasites & vectors, 4(1), 1-10.
- Harbach, R. E. (2022). Mosquito Taxonomic Inventory (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>) Accessed on 07/14/2022.
- Harikrishnan, S., Sudarshan, S., Sivasubramani, K., Nandini, M. S., Narenkumar, J., Ramachandran, V., ... & Jayalakshmi, S. (2023). Larvicidal and anti-termite activities of microbial biosurfactant produced by *Enterobacter cloacae* SJ2 isolated from marine sponge *Clathria* sp. Scientific Reports, 13(1), 15153.
- Jabeen, F., Hussain, A., Manzoor, M., Younis, T., Rasul, A., & Qazi, J. I. (2018). Potential of bacterial chitinolytic, *Stenotrophomonas maltophilia*, in biological control of termites. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28(1), 1-10.
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. Viruses, 6(11), 4294-4313.
- Katak, R.M., Cintra, A.M., Burini, B.C., Marinotti, O., Souza-Neto, J.A., Rocha, E.M.

- Biotechnological potential of microorganisms for mosquito population control and reduction in vector competence. *Insects* 2023, 14, 718.
- Katak, R. M., Rocha, E. M., Oliveira, J. C., Muniz, V. A., Oliveira, M. R., Ferreira, F. A., ... & Tadei, W. P. (2021). Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of supernatant and pellet fractions from cultured *Bacillus* spp. isolated from Amazonian microenvironments. *Tropical medicine and infectious disease*, 6(2), 104.
- Kraemer, M.U., Reiner, R. C., Brady, O. J., Messina, J. P., Gilbert, M., Pigott, D. M., ... & Golding, N. (2019). Past and future spread of the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* arbovirus vectors. *Nature microbiology*, 4(5), 854-863.
- Lone, S. A., Malik, A., & Padaria, J. C. (2017). Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from northwestern Himalayas toxic against *Helicoverpa armigera*. *Microbiologyopen*, 6(6), e00484.
- Marche, M. G., Mura, M. E., Falchi, G., & Ruiiu, L. (2017). Spore surface proteins of *Brevibacillus laterosporus* are involved in insect pathogenesis. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Merritt, R. W., Walker, E. D., Wilzbach, M. A., Cummins, K. W., & Morgan, W. T. (1989). A broad evaluation of Bti for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 5(3), 397-415.
- Minard, G., Tran, F. H., Van, V. T., Goubert, C., Bellet, C., Lambert, G., ... & Valiente Moro, C. (2015). French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Frontiers in Microbiology*, 6, 970.
- Oliver, K. M., & Martinez, A. J. (2014). How resident microbes modulate ecologically important traits of insects. *Current Opinion in Insect Science*, 4, 1-7.
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1803-1807.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325.
- Rakhmawatie, M. D., Wibawa, T., Lisdiyanti, P., Pratiwi, W. R., & Damayanti, E. (2021). Potential secondary metabolite from Indonesian Actinobacteria (InaCC A758) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(8), 1058.
- Regis, L., da Silva, S. B., & Melo-Santos, M. A. V. (2000). The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 207-210.
- Robertson, J. L., Jones, M. M., Olguin, E., & Alberts, B. (2017). Bioassays with arthropods.
- Rocha, E. M., Marinotti, O., Serrão, D. M., Correa, L. V., Katak, R. D. M., de Oliveira, J. C.,... & Tadei, W. P. (2021). Culturable bacteria associated with *Anopheles darlingi* and their paratransgenesis potential. *Malaria journal*, 20(1), 1-9.
- Saldaña, M. A., Hegde, S., & Hughes, G. L. (2017). Microbial control of arthropod-borne disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 81-93.
- Scolari, F., Sandionigi, A., Carlassara, M., Bruno, A., Casiraghi, M., & Bonizzoni, M. (2021). Exploring changes in the microbiota of *Aedes albopictus*: comparison among breeding site water, larvae, and adults. *Frontiers in Microbiology*, 12, 624170.

- Soares-da-Silva, J., Queirós, S. G., de Aguiar, J. S., Viana, J. L., dos RAV Neta, M., da Silva, M. C., ... & Tadei, W. P. (2017). Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. *Acta tropica*, 176, 197-205.
- Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, genetics and evolution*, 67, 191-209.
- Stathopoulou, P. M., Asimakis, E., & Tsiamis, G. (2021). *Enterobacter*: One Bacterium-Multiple Functions. In *Area-Wide Integrated Pest Management* (pp. 917-945).
- Thongsripong, P., Chandler, J.A., Green, A.B., Kittayapong, P., Wilcox, B.A., Kapan, D.D., & Bennett, S.N. (2018). Microbiota associated with mosquito vectors: Metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts in habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. *Ecology and evolution*, 8(2), 1352-1368.
- Valderrama, A., Díaz, Y., & López-Vergès, S. (2017). Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 541-547.
- Valtierra-de-Luis, D., Villanueva, M., Lai, L., Williams, T., & Caballero, P. (2020). Potential of Cry10Aa and Cyt2Ba, two minority δ -endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, for the control of *Aedes aegypti* larvae. *Toxins*, 12(6), 355.
- Vontas, J., Katsavou, E., & Mavridis, K. (2020). Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pesticide biochemistry and physiology*, 170, 104666.
- Wang, X. M., Liu, T., Wu, Y., Zhong, D. B., Zhou, G. F., Su, X.H., et al. (2018). Assembly of bacterial microbiota in *Aedes albopictus* mosquitoes and their impacts on larval development. *Mol. Eco* 27, 2972-2985.
- Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, 27(11), 514-522.
- WHO - World Health Organization. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides (No. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13).
- WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit (2022). Mosquito identification resources. Available in: <http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html. Accessed on 08/10/2022
- Yadav, K. K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H. K., Prasad, G. B. K. S., & Veer, V. (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-8.
- Yoshida, N., Oeda, K., Watanabe, E., Mikami, T., Fukita, Y., Nishimura, K., ... & Matsuda, K. (2001). Chaperonin turned insect toxin. *Nature*, 411(6833), 44-44.

CAPÍTULO III

Atividade larvívica de *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. em *Aedes aegypti*

Juan Campos de Oliveira¹, Elerson Matos Rocha², Izane Maria de Souza¹, Jackeline Andrade¹, Veranilce Alves Muniz¹, Rosemary Aparecida Roque², Spartaco Astolfi Filho^{1,3} e Ricardo de Melo Katak⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC/UFAM ² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. ³ Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFAM. ⁴ Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ-AM

RESUMO

Aedes aegypti é o vetor primário dos arbovírus da dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela Urbana e entre outros, essas doenças, principalmente a dengue é atualmente umas das principais ameaças à saúde humana no mundo todo. O uso de inseticidas sintéticos no controle vetorial tem ocasionado problemas, incluindo o aumento da seleção de insetos resistentes aos inseticidas, contaminação ambiental e perigo a saúde humana. Deste modo, são necessários urgentemente novas alternativas de controle. Microrganismos entomopatogênicos, como fungos e bactérias tem sido bastante utilizados para o controle biológico desses vetores. Bactérias do gênero *Bacillus*, por exemplo, produzem uma diversidade de moléculas que podem ser eficazes no controle de diversas ordens de insetos vetores de arbovírus. Neste estudo, foram avaliadas as frações do pellet e do sobrenadante de bactérias quanto a toxicidade em larvas de *Ae. aegypti*. Os resultados mostraram que a fração dos componentes celulares (pellets) e do sobrenadante secretado da linhagem P18NA-*Enterobacter* sp. ocasionaram 100% de mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* no intervalo de 24 horas. O mesmo perfil de mortalidade foi observado para a linhagem padrão BtiAM65-52 para o sobrenadante secretado e o pellet. A linhagem L65-*Bacillus* sp. apresentou 100% de mortalidade para as larvas de *Ae. aegypti* quando expostas ao pellet e, 98% de mortalidade quando as larvas foram expostas até 72 horas no sobrenadante secretado. O modo de ação dessas linhagens pode ter sido ocasionado por infecção bacteriana ou por ação de metabólitos secundários. Dessa forma, rastrear os princípios ativos das linhagens é uma alternativa para encontrar novas moléculas e caracterizar os seus componentes celulares, a fim de identificar seus mecanismos de ação. Este estudo demonstra a capacidade dessas bactérias para uso no controle populacional das larvas de *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: Microparasitismo, Metabólitos secundários, *Aedes aegypti*, controle vetorial

ABSTRACT

Aedes aegypti is the primary vector of the arboviruses that cause dengue, Zika, Chikungunya, Urban Yellow Fever, and others. These diseases, especially dengue, are currently one of the main threats to human health worldwide. The use of synthetic insecticides in vector control has caused problems, including the increased selection of insects resistant to insecticides, environmental contamination, and danger to human health. Therefore, new control alternatives are urgently needed. Entomopathogenic microorganisms, such as fungi and bacteria, have been widely used for the biological control of these vectors. Bacteria of the genus *Bacillus*, for example, produce a diversity of molecules that can be effective in controlling several orders of insect vectors of arboviruses. In this study, the fractions of the pellet and the supernatant of bacteria were evaluated for toxicity in *Ae. aegypti* larvae. The results showed that the fraction of cellular components (pellets) and secreted supernatant of the P18NA-*Enterobacter* sp. strain caused 100% mortality in *Ae. aegypti* larvae within 24 hours. The same mortality profile was observed for the standard strain BtiAM65-52 for the secreted supernatant and the pellet. The L65-*Bacillus* sp. strain showed 100% mortality for *Ae. aegypti* larvae when exposed to the pellet and 98% mortality when the larvae were exposed to the secreted supernatant for up to 72 hours. The mode of action of these strains may have been caused by bacterial infection or by the action of secondary metabolites. Thus, tracking the active principles of the strains is an alternative to find new molecules and characterize their cellular components in order to identify their mechanisms of action. This study demonstrates the capacity of these bacteria for use in the population control of *Ae. aegypti* larvae.

Keywords: Microparasitism, Secondary metabolites, *Aedes aegypti*, vector control

Introdução

A competência vetorial do *Ae. aegypti* a vírus como os da Dengue, Zika e Chikungunya, tornou esta espécie uma ameaça à saúde pública em todo o mundo (MANIMEGALAI et al., 2021; ECDC 2022). Os inseticidas químicos são usados como principal ferramenta para o controle de mosquitos, porém, não são tão eficazes devido à seleção de mosquitos resistentes, efeitos adversos no meio ambiente e em organismos não alvo (MAHESWARAN & IGNACIMUTHU, 2014; RANI et al., 2021). Esses fatos ressaltam a necessidade de desenvolver novas medidas eficientes e ambientalmente seguras para o controle de mosquitos vetores e das doenças que eles transmitem (RAGUVARAN et al., 2022; KATAK et al., 2023).

Bactérias da família *Bacillaceae* infectam insetos e produzem toxinas com propriedades inseticidas. Espécies como *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lbs) são amplamente conhecidas por sua atividade larvicida contra diversas espécies de mosquitos (SANTANA-MARTINEZ et al., 2019; SUKUMAM & MAHESWARAN, 2020). Estudos sobre a toxicidade de metabólitos bacterianos em larvas de *Ae. aegypti* e *Anopheles stephensi* destacam que esses compostos apresentam mecanismos de ação larvicida e podem ser uma alternativa eficaz e ecológica (REVATHI et al., 2013; PRADEEP et al., 2015; FALQUETO et al., 2021; KATAK et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2024).

As bactérias como *Bacillus* produzem metabólitos secundários com mecanismos de ação de antibiose, antifúngicos, antioxidantes, inseticidas, entre outros (STEIN, 2005). O uso de bioinseticidas à base de bactérias apresenta vantagens como a biodegradabilidade, facilidade de produção e menor probabilidade de desenvolvimento de resistência nos insetos (CHIO et al., 2022). Nesse sentido, encontrar novas bactérias micróbios com potencial larvicida tem sido objetivo de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo.

O isolamento de bactérias cultiváveis para esta finalidade tem limitações pelo fato de que os meios de cultura nem sempre atendem aos requisitos para o crescimento de muitas espécies de bactérias (VARTOUKIAN et al., 2010). Portanto, a busca por bactérias entomopatogênicas é frequentemente limitada àquelas que crescem em meios de cultura disponíveis comercialmente. Sendo assim, foi avaliada a toxicidade larvicida dos componentes celulares e do sobrenadante secretado de duas bactérias isoladas de *Ae. aegypti*, com o objetivo de encontrar os seus princípios ativos.

Material e métodos

Reativação das bactérias e condições de cultivo

Foram utilizadas nove linhagens bacterianas, sendo cinco (L47, P18, L39, P15, L41) do gênero *Enterobacter*, duas (L21, L31) do gênero *Stenotrophomonas*, e duas do gênero *Bacillus* (L65 e P12), isoladas de larvas e pupas de *Ae. aegypti* (OLIVEIRA et al., 2024). Além dessas, a linhagem padrão *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* BtiAM62-52, obtida do produto comercial Vectobac® WG, foi utilizada como controle positivo.

As linhagens foram cultivadas em meio Nutriente Ágar (NA) e armazenadas em estufa B.O.D a 29°C por 24 horas. Em seguida, uma amostra da biomassa de cada cultura bacteriana foi adicionada a tubos de ensaio de 20 mL contendo 5 mL do meio de cultivo Nutriente Broth (NB). As amostras foram mantidas em estufa a 29°C e 180 rpm por 24 horas. Após isso, 50 µL de cada cultivo bacteriano foram transferidos para cinco frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio NB e armazenados em estufa a 29°C e 180 rpm por 72 horas. Estes procedimentos foram realizados em triplicata, com base na metodologia de Marche et al. (2017), com adaptações.

O cultivo das bactérias foi centrifugado a 4°C e 5.000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi filtrado em um sistema de vácuo em membrana Millipore 0,22 µm. Em seguida, o pellet foi congelado a -20°C por 1 hora e submetido à liofilização no Liofilizador- Enterprise I, TERRONI, por 48 horas a 150 mmHg (KATAK et al., 2021).

Obtenção de larvas de *Aedes aegypti*

As larvas foram obtidas do insetário do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LCBMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Inicialmente, os ovos foram colocados em bacias de plástico e adicionados 200 mL de água. Após a eclosão das larvas, foi adicionada a alimentação, que consistiu na mistura da ração (Teklab global) e da ração Whiskas®. Ao atingirem o terceiro estágio, as larvas foram separadas para a realização dos ensaios biológicos (LIMA et al., 2009).

Ensaio biológicos com larvas de *Aedes aegypti*

A toxicidade das frações foi avaliada em larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* sob condições controladas. Para a diluição das amostras, utilizou-se: (i) 50 mg de pellet + 10 mL de água destilada para alcançar uma concentração de 0,5 mg/mL homogêneas em vórtex (Katak et al., 2021). As larvas também foram expostas ao sobrenadante secretado das linhagens utilizando alíquotas de 1000, 500, 250 e 125 µL.

Os bioensaios foram realizados em quintuplicata, utilizando copos descartáveis com capacidade de 150 mL, contendo 120 mL de água destilada, 20 larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, 1 mg de ração e uma concentração de 5 mg/mL de cada fração. No controle negativo, não foi adicionada fração bacteriana, enquanto no controle positivo foi adicionada a fração da cepa padrão BtiAM62-52. Os ensaios biológicos foram repetidos três vezes, e a mortalidade das larvas foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de exposição.

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Cinco larvas mortas, expostas à concentração de 0,5 mg/mL do pellet da linhagem P18-*Enterobacter* sp., e cinco larvas do controle negativo, foram submetidas à análise eletrônica de varredura (MEV). As larvas foram fixadas por 12 horas em uma solução de glutaraldeído a 2,5%, com 0,1 M de sódio cacodilato a pH 7,3. Em seguida, foram lavadas e armazenadas em tampão cacodilato 0,2 M antes da pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora e três lavagens por 10 minutos em água destilada. A desidratação foi realizada utilizando uma série de etanol nas concentrações de 50%, 70%, 90%, durante 10 minutos e a 100% por 20 minutos. As larvas desidratadas foram secas em ponto crítico com CO₂ e montadas em lâminas de vidro com fita de carbono dupla face. Todas as amostras foram revestidas por pulverização com Pt (20 nm) em uma unidade Blazers SCd 030 (Oerlikon Balzers Coating, Balzers, Liechtenstein) antes da observação em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-840^a (JEOL, Tóquio, Japão) com uma Tensão de aceleração de 20 KV.

Resultados

Ensaio biológicos com larvas de *Aedes aegypti*

A exposição das larvas de *Ae. aegypti* aos componentes celulares (pellets) e ao sobrenadante secretado da linhagem P18NA-*Enterobacter* sp. causou 100% de mortalidade nas larvas em 24 horas. O mesmo perfil de mortalidade foi observado para a linhagem padrão BtiAM65-62 (Figura 2 A). A linhagem L65-*Bacillus* sp. apresentou 100% de mortalidade quando as larvas foram expostas ao pellet e, no sobrenadante secretado, 50%, 60% e 97% de mortalidade nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 8). A mortalidade das demais linhagens (L47, L39, P15, L41, L21, L31 e P12) quando as larvas foram expostas ao pellet variou de 100% a 67% até 72 horas e, no sobrenadante secretado, a mortalidade variou de 73% a 13% até 72 horas.

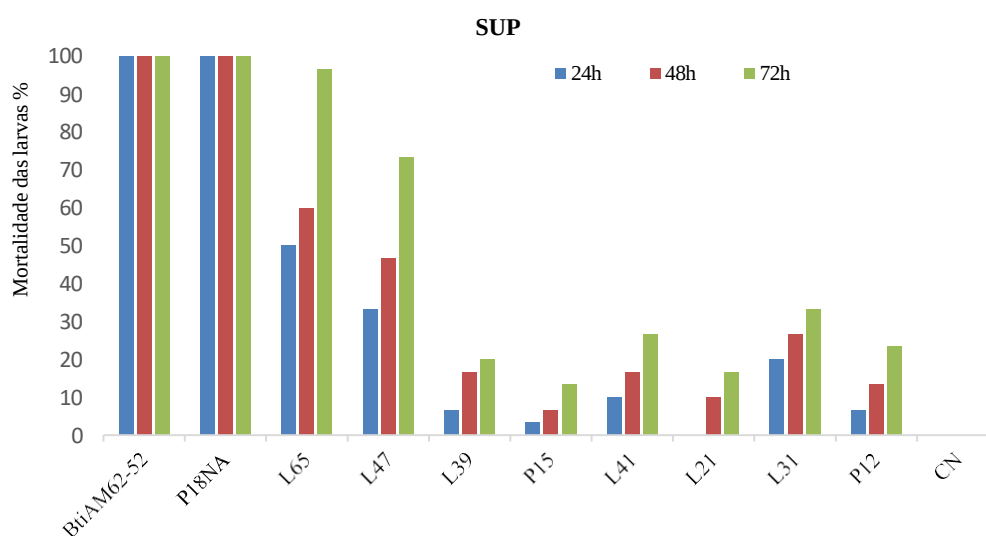
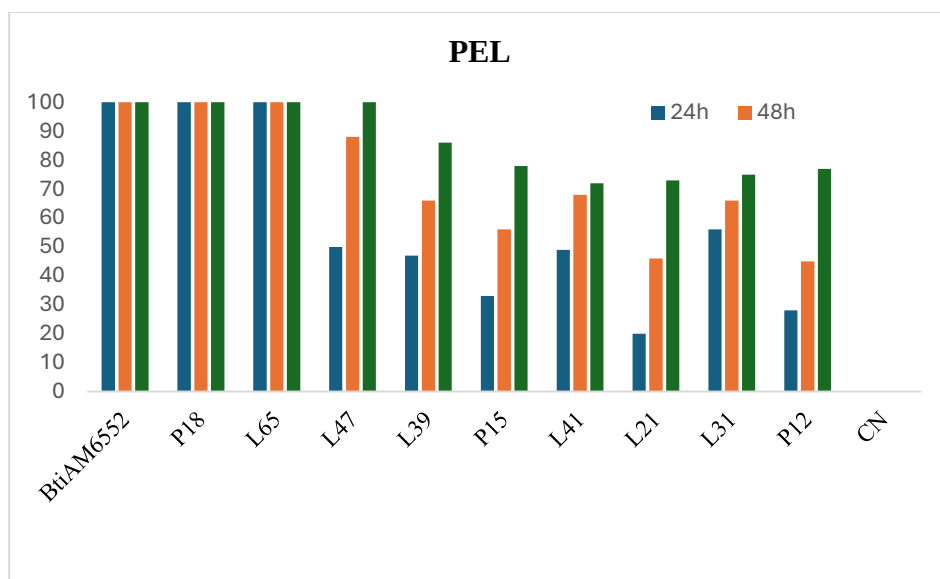


Figura 8: Atividade larvívora de frações de culturas microbianas. PEL= Pellet e SUP= Sobrenadante. (A) PEL = 0,5 mg/ml de pellet liofilizado (B) SUP = Aliquotas de 1000, 500, 250 e 125 ml do sobrenadante. A mortalidade das larvas foi avaliada em 24, 48 e 72 horas. CN – controle negativo com água no lugar de frações de cultura microbiana.

Estudos de microscopia

Análise da infecção da fração do pellet em larvas de *Aedes aegypti* por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As análises realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostraram que as linhagens P18NA-*Enterobacter* apresentaram colonização na superfície das larvas,

principalmente na região da boca, abdômen, tórax e sifão. Em relação à análise das larvas controle, sem a fração de pellet, não foram observadas colonizações bacterianas nessas regiões .(Figura 9).

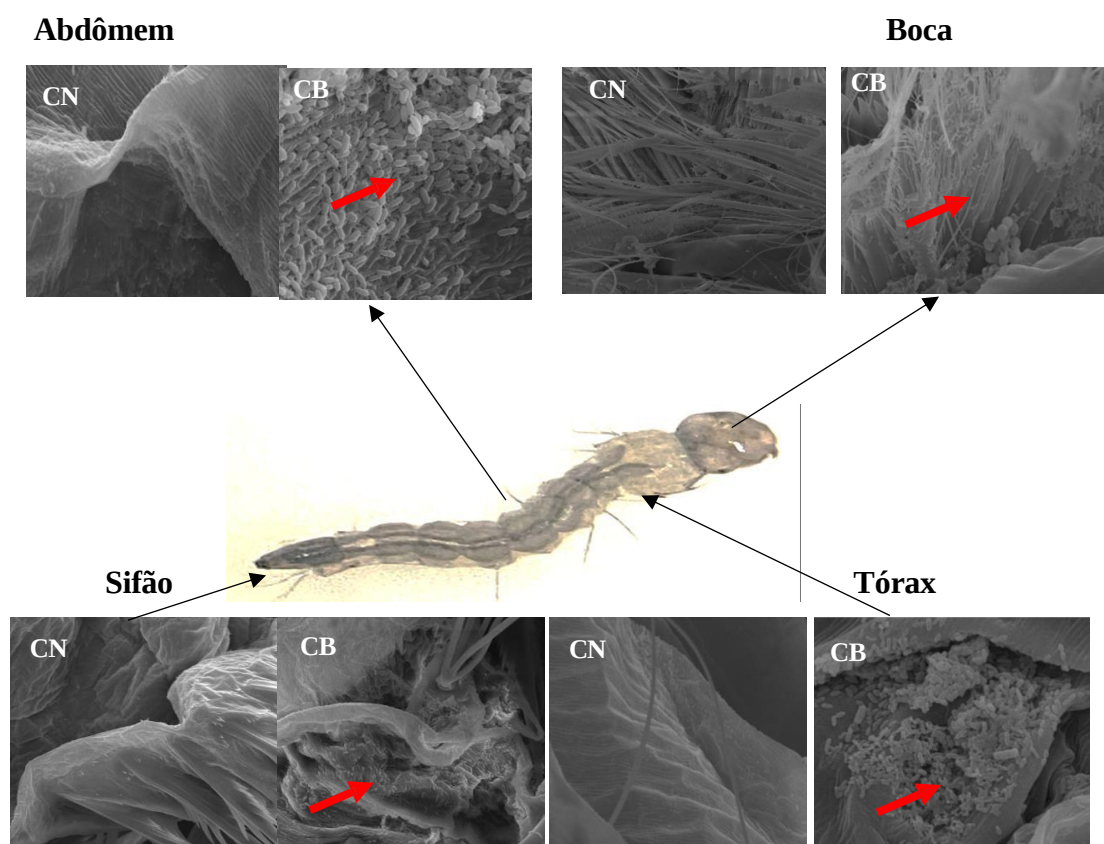


Figura 9: Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de *Ae. aegypti* expostas a fração do pellet (PEL) da linhagem P18NA- *Enterobacter* sp.* CN=Controle negativo. CB= Contaminação bacteriana. As setas vermelhas indicam possíveis colonizações de bactérias nas superfícies das estruturas das larvas.

Discussão

A necessidade de novos métodos para o controle populacional de *Ae. aegypti* é crucial, principalmente considerando que os inseticidas químicos podem levar à seleção de mosquitos resistentes, contaminar o meio ambiente e causar efeitos adversos em organismos não- alvo (Amelia-Yap et al., 2018). Neste estudo, a fração dos componentes celulares (pellets) na concentração de 0,5 mg/mL das linhagens P18NA-*Enterobacter* sp. e L65ISP2-*Bacillus* sp. causou 100% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* nas primeiras 24 horas. Em relação à fração do sobrenadante, somente a linhagem P18NA-*Enterobacter* sp. causou 100% de mortalidade das larvas em até 72 horas, nas concentrações de 1000 e 500 mL.

O mecanismo de ação das bactérias contra larvas de *Ae. aegypti* pode ocorrer por meio de vários mecanismos. Um deles pode ser durante a esporulação, no qual as bactérias produzem endotoxinas que são armazenadas nas inclusões parasporais (pellets) e produzem metabólitos secundários (sobrenadante) que são liberados das células para o meio de cultivo (Dahmana et al., 2020; Katak et al., 2021; Falqueto et al., 2021). Conhecer parâmetros como a composição do meio de cultivo, temperatura, pH, entre outros, que interferem na expressão de genes e na síntese de

biomoléculas no metabolismo bacteriano, é fundamental para identificar novas bactérias com atividade larvicida (Costa & Badino, 2012; Carboué et al., 2020; Jiang et al., 2020).

O potencial da atividade larvicida entre as frações sobrenadante e pellet de culturas das linhagens de *Bacillus* e *Enterobacter*, observado neste estudo, destaca a necessidade de identificação e caracterização dos componentes responsáveis pelos mecanismos de ação. Falqueto et al. (2021) demonstraram que os sobrenadantes secretados de cultivos de linhagens de *B. safensis*, *B. paranthracis* e *B. velezensis*, assim como extratos metabólicos e moléculas de lipopeptídeos, são tóxicos para *Ae. aegypti*. O sequenciamento completo do genoma e a análise por espectrometria de massa dessas bactérias isoladas demonstraram que esses microrganismos sintetizam bacteriocina, beta-lactona e terpenos potencialmente tóxicos para larvas de mosquitos. Além disso, os metabólitos secretados por bactérias podem inibir o funcionamento da enzima acetilcolinesterase em mosquitos, ocasionando a morte do organismo (Abu-Hussien et al., 2024).

O mecanismo de ação larvicida das frações de pellet pode ter sido ocasionado pela toxicidade das células bacterianas após serem ingeridas pelas larvas. Bactérias como *B. thuringiensis*, durante a esporulação, produzem uma proteína cristalina (delta-endotoxina) com capacidade de induzir a lise das células intestinais quando ingerida por insetos suscetíveis (Nielsen-Leroux et al., 2012).

As análises por microscopia revelaram o potencial de colonização das bactérias nas superfícies das larvas, enfatizando a ocorrência de interações antagônicas que podem ter ocasionado a mortalidade das larvas. Este fato evidencia uma interação de microparasitismo, uma vez que as bactérias podem formar biofilmes para auxiliar nesse processo. Além disso, também há implicações ecológicas, como a exclusão de outros microrganismos do nicho ou o aumento da produção de biomoléculas (Stein, 2005).

Devido à diversidade bacteriana durante o ciclo biológico de *Ae. aegypti*, algumas bactérias podem mudar seus comportamentos de simbióticos para antagônicos. Bactérias dos gêneros *Chromobacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Enterobacter*, isoladas da microbiota de mosquitos, apresentaram patogenicidade larvicida no próprio hospedeiro (Short et al., 2018; Caragata et al., 2020; Oliveira et al., 2024). Microrganismos associados aos mosquitos desempenham funções na regulação de mecanismos imunológicos do hospedeiro e na secreção de metabólitos. Essas interações podem ser benéficas ou prejudiciais ao próprio hospedeiro. Estudos sobre os mecanismos de respostas imunológicas dos mosquitos podem fornecer novas ideias para o controle da densidade dos mosquitos e para o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças transmitidas.

Conclusão

A compreensão dos mecanismos de interação entre bactérias e insetos é fundamental para o desenvolvimento de novos bioinseticidas para o controle vetorial. Neste estudo, princípios ativos derivados do metabolismo secundário das bactérias podem ter contribuído para a mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*. No entanto, os componentes celulares das linhagens demonstraram ser os mais eficientes no controle dessas larvas. As análises de microscopia mostraram o potencial de colonização das bactérias nas superfícies externas das larvas, evidenciando um grande potencial de microparasitismo. A caracterização dos principais metabólitos produzidos pelas bactérias ativas é essencial para o desenvolvimento de novos princípios ativos voltados para o controle de mosquitos. Esse trabalho pode contribuir para a implementação de novas estratégias de controle vetorial que sejam mais eficazes e sustentáveis.

Referências Bibliográficas

- Amelia-Yap, Z.H; Chen, C.D; Sofian-Azirun, M; Low, V.L. (2018). Pyrethroid Resistance In The Dengue Vector *Aedes Aegypti* In Southeast Asia: Present Situation And Prospects For Management. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-17.
- Caragata, E.P, Otero, L.M, Tikhe, C.V, Barrera, R., Dimopoulos, G. (2021). Microbial Diversity Of Adult *Aedes Aegypti* And Water Collected From Different Aquatic Mosquito Habitats In Puerto Rico. *Microb. Echo*.
- Carboué, Q., Rébufa, C., Hamrouni, R., Roussos, S., & Bombarda, I. (2020). Statistical Approach To Evaluate Effect Of Temperature And Moisture Content On The Production Of Antioxidant Naphtho-Gamma-Pyrones And Hydroxycinnamic Acids By *Aspergillus Tubingensis* In Solid-State Fermentation. *Bioprocess And Biosystems Engineering*, 43, 2283-2294.
- Chio, E.H.; Li, Q.X. (2022) Pesticide Research And Development: General Discussion And Spinosad Case. *J. Agric. Food Chem.* 70, 8913–8919.
- Coon, K.L; Vogel, K.J; Brown, M.R; Strand, M.R (2014). Mosquitoes Depend On Their Gut Microbiota For Development. *Mol. Echo.* 23, 2727–2739.
- Costa, C.L.L; Badino, A.C. (2012). Production Of Clavulanic Acid By *Streptomyces Clavuligerus* In Batch Cultures And With Glycerol Pulses Under Different Temperature Conditions. *Biochem. Eng. J.*, V.69, P.1-7.
- Dahmana, H.; Raoult, D.; Fenollar, F.; Mediannikov, O. (2020). Insecticidal Activity Of Bacteria From Larvae Breeding Site With Natural Larvae Mortality: Screening Of Separated Supernatant And Pellet Fractions. *Pathogens* , 9, 486.
- Ecdc (2022). European Centre For Disease Prevention And Controlvector-Borne Diseases. Found At: <https://www.ecdc.europa.eu/en/Climate-Change/Climate-Change-Europe/Vector-Borne-Diseases>.
- Fenibo Eo, Ijoma Gn, Matambo T. (2021).Biopesticides In Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed By Green Chemistry Principles. *Front Sustain Food Syst.* 5.
- Jiang, J., Zu, Y., Li, X., Meng, Q., & Long, X. (2020). Recent Advances In Industrial Fermentation Of Rhamnolipids: Process Optimization And Foam Control.

Bioresource Technology, 298, 122394.

- Katak, R.M; Rocha, E.M; Oliveira, J.C; Muniz, V.A; Oliveira, M.R; Ferreira, F.A.S; Silva, W.R; Roque, R.A; Souza, A.Q.L; Souza-Neto, J.A.; Terenius, O; Marinotti, O; Tadei, W. (2021). Larvicidal Activities Against *Aedes Aegypti* Of Supernatant And Pellet Fractions From Cultured *Bacillus Spp.* Isolated From Amazonian Microenvironments. Trop. Med. Infect. Dis, 6, 104.
- Manimegalai, T; Raguvanan, K; Kalpana, M; Maheswaran, R. (2020). Green Synthesis Of Silver Nanoparticle Using *Leonotis Nepetifolia* And Their Toxicity Against Vector Mosquitoes Of *Aedes Aegypti* And *Culex Quinquefasciatus* And Agricultural Pests Of *Spodoptera Litura* And *Helicoverpa Armigera*. Environ Sci Pollut Res.
- Mookherjee, A; Mitra M; Kutty, N.N; Et Al. (2020). Characterization Of The Endometabolome Exhibiting Antimicrobial And Antioxidant Activities Of The Endophytic Fungus *Cercospora* Sp. Pm018. S Afr J Bot.
- Pradeep, F.S; Palaniswamy, M; Ravi, S; Et Al. (2015) Atividade Larvicida De Um Novo Pigmento Do Tipo Isoquinolina De *Fusarium Moniliforme* Kumbf1201 Contra *Aedes Aegypti* E *Anopheles Stephensi*. Process Biochem 50:1479-1486.
- Raguvanan, K; Kalpana, M; Manimegalai, T; Maheswaran, R. (2022). Larvicidal, Antibacterial, Antibiofilm, And Anti-Quorum Sensing Activities Of Silver Nanoparticles Biosynthesized From *Streptomyces Sclerotialus* Culture Filtrate. Mater Lett 316:132000.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An Extensive Review On The Consequences Of Chemical Pesticides On Human Health And Environment. *Journal Of Cleaner Production*, 283, 124657.
- Revathi, K; Chandrasekaran, R; Thanigaivel, A; Et Al. (2013). Efeitos De Metabólitos De *Bacillus Subtilis* Em Larvas De *Aedes Aegypti* L. Pestic Biochem Physiol 107:369– 376.
- Santana-Martinez, J. C., Silva, J. J., & Dussan, J. (2019). Efficacy Of *Lysinibacillus Sphaericus* Against Mixed-Cultures Of Field-Collected And Laboratory Larvae Of *Aedes Aegypti* And *Culex Quinquefasciatus*. *Bulletin Of Entomological Research*, 109(1), 111-118.
- Scolari, F., Sandionigi, A., Carlassara, M., Bruno, A., Casiraghi, M., Bonizzoni, M. (2021). Exploring Changes In The Microbiota Of *Aedes Albopictus*: Comparison Between Water, Larvae And Adults At The Breeding Site. Front. Microbiol. 12:624170.
- Stein, T.(2005). *Bacillus Subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses And Specific Functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–57.
- Sukumaran, S; Maheswaran, R. (2020). Larvicidal Activity Of *Elytraria Acaulis* Against *Culex Quinquefasciatus* And *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae). J Arthropod Borne Dis 14:293–301.
- Vartoukian, S.R.; Palmer, R.M.; Wade, W.G.(2010). Strategies For Culture Of ‘Unculturable’ Bacteria. *Fems Microbiol. Lett.* 309, 1–7.

CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo obter e caracterizar bactérias presentes em diferentes fases do ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*, visando conhecer sua diversidade e avaliar seu potencial larvicida. Foram isoladas 424 bactérias, todas positivas para o teste de catalase. Ao avaliar seu potencial larvicida, nove linhagens apresentaram atividade comparável à linhagem padrão BtiAM65-52. Entre as bactérias com atividade larvicida, duas eram do gênero *Bacillus*, cinco eram *Enterobacter* e duas eram *Stenotrophomonas*.

Quatrocentas e quinze bactérias foram analisadas quanto à diversidade bacteriana, sendo 300 Gram negativas e 115 Gram positivas, observando-se 10 morfotipos diferentes. As bactérias foram agrupadas de acordo com suas características morfológicas, e a identificação molecular de um representante de cada grupo foi realizada por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Os gêneros bacterianos identificados foram: *Acinetobacter*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Sphingobacterium*.

Além disso, foram realizados testes para avaliar a toxicidade das frações do sobrenadante e do pellet dos cultivos de nove bactérias. A fração dos componentes celulares (pellets) e do sobrenadante secretado da linhagem P18NA-*Enterobacter* sp. causou 100% de mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* no intervalo de 24 horas. O mesmo perfil de mortalidade foi observado para a linhagem padrão BtiAM65-52, tanto para o sobrenadante secretado quanto para o pellet. A linhagem L65-*Bacillus* sp. apresentou 100% de mortalidade para as larvas de *Ae. aegypti* quando expostas ao pellet e 98% de mortalidade quando as larvas foram expostas até 72 horas no sobrenadante secretado.

Os resultados obtidos indicam a presença de uma grande diversidade de bactérias associadas ao mosquito *Ae. aegypti*, incluindo linhagens com potencial larvicida e toxicidade comparável à linhagem padrão BtiAM65-52. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de mosquitos transmissores de doenças, baseadas na utilização de bactérias benéficas.

No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a eficácia dessas bactérias em condições de campo, bem como para avaliar sua segurança e possíveis efeitos adversos sobre outras espécies animais e o meio ambiente. Além disso, é importante investigar a interação dessas bactérias com outros microrganismos presentes no ambiente, a fim de compreender melhor a dinâmica das comunidades microbianas associadas aos mosquitos e seus potenciais efeitos na transmissão de doenças.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-MARCELINO, L; MENDOZA-DE-GIVES, P; AL-ANI, L.K.T; LÓPEZ-ARELLANO, M.E; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, O; VILLAR-LUNA, E; REYES-GUERRERO DE. (2020). Use of molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for the control of phytopathogens and agricultural pests. Pp: 333-349. In: SHARMA, V; SALWAN, R; AL-ANI, L.K.T (eds). **Molecular Aspects of Beneficial Microbes of Plants in Agriculture**.
- AKORLI J, NAMAALI PA, AMETSI GW, EGYIRIFA RK, PELS NAP. (2019). Generational conservation of composition and diversity of field-acquired midgut microbiota in *Anopheles gambiae* (sensu lato) during colonization in the laboratory. *Parasit. Vectors* 12, 27.
- AKORLI J, NAMAALI PA, AMETSI GW, EGYIRIFA RK, PELS NAP. (2019). Generational conservation of composition and diversity of field-acquired midgut microbiota in *Anopheles gambiae* (sensu lato) during colonization in the laboratory. *Parasit. Vectors* 12, 27.
- AKORLI, J; NAMAALI, P.A; AMETSI, G.W; EGYIRIFA, R.K; PELS, N.A.P. (2019). Generational conservation of composition and diversity of field-acquired midgut microbiota in *Anopheles gambiae* (sensu lato) during colonization in the laboratory. **Parasit. Vectors** 12, 27.
- ALVES, S. B. (1998). **Controle Microbiano de Insetos**. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba São Paulo. 1163 pp.
- AMELIA-YAP, Z.H; CHEN, C.D; SOFIAN-AZIRUN, M; LOW, V.L. (2018). Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. **Parasites & vectors**, 11(1), 1-17.
- AMOA-BOSOMEM, M; KOBAYASHI, D; ITOKAWA, K; MUROTA, K; FAIZAH, A.N; AZERIGYIK, F.A; HAYASHI, T; OHASHI, M; BONNEY, J.H.K; DADZIE, S; et al. Determination of vector competence of *Aedes aegypti* from Ghana in the transmission of dengue virus serotypes 1 and 2. **Parasite Vectors** 2021, 14, 228.
- ANOOPKUMAR, A.N & ANEESH, E.M. (2021). Environmental epidemiology and neurological manifestations of dengue serotypes with special inference on molecular trends, virus detection and pathogenicity. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, no. 8, p. 11217-11239.
- ANSARI, M.Z; YADAV, G; GOKHALE, R.S; MOHANTY, D. (2004). NRPS-PKS: A knowledge-based resource for analyzing NRPS/PKS megasynthases. **Nucleic Acid Screening** 32(2): W405-W413.
- ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2022). Ministério da Saúde. Vacina da dengue terá alteração de bula.
- AUBRY, F; DABO, S; MANET, C; FILIPOVIC, I; ROSE, N.H; MIOT, E.F; MARTYNOW, D; BAIDALIUK, A; MERKLING, S.H; DICKSON, L.B; et al. (2020). Enhanced Zika virus susceptibility of globally invasive *Aedes aegypti* populations. **Science**, 370, 991–996.
- AYALA, A.M; VERA, N.S; CHIAPPERO, M.B; ALMIRON, W.R; GARDENAL, C.N. (2020). Urban populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) of central Argentina: Dispersion patterns assessed by Bayesian and multivariate methods. **J. Med. Entomol.** 57 , 1069-1076.

BADOR, J., NICOLAS, B., CHAPUIS, A., VARIN, V., DULLIER-TAILLEFUMIER, N., DE CURRAIZE, C.. (2020). PCR de 16S rRNA em amostras clínicas: impacto no diagnóstico e manejo terapêutico. **Med. Mal. Infectar.** 50, 63–73.

BARBIERI, G; FERRARI, C; PAOLO, G; CASTELLI, M; SASSERA, D; URSINO, E; VIOLA; SCOFFONE, V.C; GIACOMO, R; CLEMENTI, E; SACCHI, L; FERRARI, E; GASPERI, G; ALBERTINI, A.M. (2021). Identification of a Novel *Brevibacillus laterosporus* Strain With Insecticidal Activity Against *Aedes albopictus* Larvae. **Front. Microbiol.**

BARBOSA, LCB; FARIAS, D.L; SILVA, I.D.M.G; MELO, F.L; RIBEIRO, B.M; AGUIAR, R.W.D.S. (2015). Genomic sequence design of *Bacillus thuringiensis* 147, a Brazilian strain with high insecticidal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, 822-823.

BENELLI, G; JEFFRIES, C. L; WALKER, T. (2016). Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. **Insects**, 7(4), 52

BRAVO, A; GILL, S.S; SOBÉRON, M. (2007). Mode de action of *Bacillus thuringiensis* Cry e Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49, 423–435.

BUNNEFELD, L; HEARN, J; PEDRA, G.N; LOHSE, K. (2018). Dados de todo o genoma revelam a história complexa de uma comunidade ecológica diversificada. **Proc. Nacional Acad. Sci. EUA** 115, E6507 – E6515.

CAMPBELL, L. P; LUTHER, C; MOO-LLANES, D; RAMSEY, J. M; DANIS-LOZANO, R; PETERSON, A.T. (2015). Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370: 20140135.

CARAGATA, E.P; OTERO, L.M; CARLSON, J.S; DIZAJI, N.B; DIMOPOULOS, G. 2020. A non-live preparation of *Chromobacterium* sp. Panama (Csp_P) is a highly effective mosquito larvae biopesticide app. **Environment. Microbiol.** 10.1128/AEM.00240-20.

CARAGATA, ERIC.P; SHORT, S.M. (2022). Vector microbiota and immunity: modulating arthropod susceptibility to vertebrate pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, p. 100875.

CARTHEY, A.J; BLUMSTEIN, D.T; GALLAGHER, R. V; TETU, S. G; EGILLINGS, M. R. (2019). Conservando o holonótico. *O Funct. O Ecol.* 34, 764–776.

CHAVES, B.A; GODOY, R.S.M; CAMPOLINA, T.B; JUNIOR, A.B.V; PAZ, A.D.C; VAZ, E.B.D.C; SILVA, B.M; BIRTH, R.M; GUERRA, M.D.G.V.B; LACERDA, M.V.G; MONTEIRO, W.M; SECUNDINO, N.F.C; PIMENTA, P.F.P. (2022). Susceptibility to dengue infection of five populations of *Aedes aegypti* from Manaus (Brazil) after challenge with virus serotypes 1–4. **Virus**, 14, 20.

CHAVSHIN, A; OSHAGHI, M; VATANDOOST, H; YAKHCHALI, B; ZARENEJAD, F; TERENIUS, O. (2015). Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas*

transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi*. **Parasit Vectors**. 8(1):36.

CHEN, R; VASILAKIS, N. (2011). Dengue — Quo tu et quo vadis? *Virus*, 3, 1562-1608.

CHEN, Y., LIU, S. A., MOU, H., MA, Y., LI, M., & HU, X. (2017). Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments. *Frontiers in microbiology*, 8, 871.

CHRISTOPHERS, S.R. (1960). *Aedes aegypti* (L.): the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press.

COON KL, VOGEL KJ, BROWN MR, STRAND MR. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol. Ecol.* 23, 2727–2739.

COON, K.L; BROWN, M.R; STRAND, M.R. (2016). Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular ecology*, vol. 25, no. 22, pg. 5806-5826.

CORREA MA, MATUSOVSKY B, BRACKNEY DE, STEVEN B. (2018). Generation of axenic *Aedes aegypti* demonstrate live bacteria are not required for mosquito development. *Nat. Commun.* 9, 4464.

DA COSTA, C.F; DOS PASSOS, R.A; LIMA, J.B; ROQUE, R.A; DE SOUZA, S.V; CAMPOLINA, T.B; SECUNDINO, N.F; PIMENTA, P.F. (2017). Transovarian transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. **Parasitic vectors** 10:249.

DA SILVA GONÇALVES, D; ITURBE-ORMAETXE, I; MARTINS-DA-SILVA, A; TELLERIA, E.L; ROCHA, M.N; TRAUB-CSEKÖ, Y.M. et al. (2019). *Wolbachia* introduction into *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) cell lines and its effects on immune-related gene expression and interaction with *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, 12, 33.

DA SILVA, J.L.R; SCHWALM, F.U; SILVA, C.E; DA COSTA, M; HEERMANN, R, DA SILVA, O.S. (2017). Larvicidal and growth-inhibitory activity of culture fluids of entomopathogenic bacteria against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J Eco Entomol.** 110:378–85.

DE ALMEIDA ROCHA, D; DA COSTA, L.M; PESSOA, G.D Á. C., & OBARA, M.T. (2021). Methods to detect insecticide resistance in sand flies: A systematic review. **Acta Tropica**, 213, 105747.

DELAUX, P.M; SCHORNACK, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. **Science** 371, eaba6605.

DENNISON NJ, JUPATANAKUL N, DIMOPOULOS G, DIMOPOULOS G, DIMOPOULOS G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 3, 6–13.

DESPRÉS, L; LAGNEAU, C; FRUTOS, R. (2011). Using the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in mosquito control.

DICKSON, L.B; JOLLE, D; MINARD, G; MOLTINI-CONCLOIS, I; VOLANT, S; GHOZLANE, A; et al. (2017). The transmission effects of larval exposure to different environmental bacteria lead to variation of adult characteristics in a mosquito vector. *Sci. Av.*

3:e1700585.

DINGLASAN, R.R; DEVENPORT, M; FLORENS, L; JOHNSON, J.R; MCHUGH, C.A; DONNELLY-DOMAN, M; et al. (2009). The adult midgut peritrophic matrix proteome of *Anopheles gambiae*. Insect biochemistry. Mol. Biol. 2009;39:125–34. PMID:19038338.

DONOVAN, W.P; ENGLEMAN, J.T; DONOVAN, J.C; BAUM, J.A; BUNKERS, G.J; CHI, D.J; CLINTON, W.P; ENGLISH, L; HECK, G.R; ILAGAN, O.M. (2015). Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2006;72:713–719.

DUSFOUR, I; VONTAS, J; DAVID, J.P; WEETMAN, D; FONSECA, D.M; CORBEL, V; ... & CHANDRE, F. (2019). Management of insecticide resistance in the main vectors of *Aedes* arboviruses: advances and challenges. PLoS neglected tropical diseases, 13 (10), e0007615.

DUTRA, H.L.C; ROCHA, M.N; DIAS, F.B.S; MANSUR, S.B; CARAGATA, E.P; MOREIRA, L.A. (2016). *Wolbachia* bloqueia isolados de vírus Zika atualmente circulantes em mosquitos *Aedes aegypti* brasileiros. *Micróbio Hospedeiro Celular*.19(6):771–4.

ENGEL, P; MORAN, N.A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 37(5):699-735.

FELDHAAAR, H. 2011. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecol. Entomol.** 36, 533–543.

FORATTINI, O. P. (2002). *Culicidologia Médica*. Universidade de São Paulo, São Paulo Brasil. 880pp.

GABRIELI, P; CACCIA, S; VAROTTO-BOCCAZZI, I; ARNOLDI, I; BARBIERI, G; COMANDATORE, F; EPIS, S. (2021). Mosquito Trilogy: Microbiota, Immunity and Pathogens, and Their Implications for the Control of Disease Transmission. *Frontiers in microbiology*,12, 630438.

GAIO ADO, GUSMÃO DS, SANTOS AV, BERBERT-MOLINA MA, PIMENTA PF, LEMOS FJ. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) *Parasit Vectors* 4, 105.

GAO H., CUI C., WANG L., JACOBS-LORENA M., WANG S.(2020). Microbiota de mosquitos e implicações para o controle de doenças, *Tendências em parasitologia*, 36(2): 98-111.

GENDRIN, M; CHRISTOPHIDES, G.K. (2013). The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: ***Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors***. IntechOpen.Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. 31:32–43.

GIMONNEAU, G; MAJOLINE, T. T; LUC, A; ANNE, B; PARFAIT H. A; SANDRINE, E.

N; RICHARD, C; ISABELLE, M. (2014). Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages, **Infection, Genetics and Evolution**, Volume 28, Pages 715-724, ISSN 1567-1348.

GODOY, R.S.M; FELIX, L.D.S; ORFANÓ, A.D.S; CHAVES, B.A; NOGUEIRA, P.M; COSTA, B.D.A; SOARES, A.S; OLIVEIRA, C.C.A; NACIF-PIMENTA, R; SILVA, B.M; et al. (2021). Dengue and Zika virus infection patterns vary among field populations of *Aedes aegypti* in Belo Horizonte, an endemic Brazilian city. **PLoS Negl. Troop Des.**15, e0009839.

GÓMEZ-GOVEA MA et al. (2022). Suppression of midgut microbiota impact pyrethroid susceptibility in *Aedes aegypti*. *Front. Microbiol.* 13, 761459.

GOND, S. K., BERGEN, M. S., TORRES, M. S., & WHITE JR, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus spp.* produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological research*, 172, 79-87.

GOPALAN, R; JEYARAJ, J; SAKKANAN, I. (2020). Larvicidal and histopathological efficacy of inhabitant pathogenic bacterial strains to reduce the dengue vector competence. **Pest Manag Sci** 2020; 76: 3587–3595.

GUBLER, D.J. (2011). Emerging vector-borne flavivirus diseases: are vaccines the solution? *Specialist Rev Vaccines*. 10:563–5.

GUÉGAN, M; ZOUACHE, K; DÉMICHEL, C. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. **Microbiome**, 6, 49.

HARBACH, R.E. (2022). Mosquito Taxonomic Inventory.

JABER, S; MERCIER, A; KNIO, K; BRUN, S; KAMBRIS, Z. (2016). Isolation of fungi from dead arthropods and identification of a new natural mosquito pathogen. **Parasitic vectors**. 9:491.

JUMA, E.O; ALLAN, B.F; KIM, CH; et al. (2021). The larval environment strongly influences the bacterial communities of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). **Sci Rep** 11, 7910.

KAJLA, M.K. (2019). Symbiotic bacteria as potential agents for mosquito control. **Parasitol Trends**. 36:4–7.

KALLAS, E. G., PRECIOSO, A. R., PALACIOS, R., THOMÉ, B., BRAGA, P. E., VANNI, T., ... & KALIL, J. (2020). Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, 20(7), 839-850.

KAMAL, M; KENAWY, M.A; RADY, M.H; KHALED, A.S; SAMY, A.M. (2018). Mapping of the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae.albopictus* under climate change. **PLoS ONE**, 13, e0210122.

KATAK, R.M; ROCHA, E.M; OLIVEIRA, J.C; MUNIZ, V.A; OLIVEIRA, M.R; FERREIRA, F.A.S; SILVA, W.R; ROQUE, R.A; SOUZA, A.Q.L; SOUZA-NETO, J.A.; TEREINIUS, O; MARINOTTI, O; TADEI, W. (2021). Larvicidal Activities against *Aedes aegypti* of

Supernatant and Pellet Fractions from Cultured *Bacillus* spp. Isolated from Amazonian Microenvironments. **Trop. Med. Infect. Dis**, 6, 104.

KATO, N; MUELLER, C.R; FUCHS, J.F; MCELROY, K; WESSELY, V; HIGGS, S; et al. (2008). Evaluation of the function of a type I peritrophic matrix as a physical barrier to the invasion of the midgut epithelium by mosquito-borne pathogens in *Aedes aegypti*. **Vector-borne zoonotic disease**. 8:701–12.pmid:18627241.

KHEDHER, S. B., BOUKEDI, H., KILANI-FEKI, O., CHAIB, I., LAARIF, A., ABDELKEFI-MESRATI, L., & TOUNSI, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 42-47.

KIM, C.H, LAMPMAN, L.R, MUTURI, E.J. (2015). Bacterial Communities and Midgut Microbiota Associated with Mosquito Populations from Waste Tires in East-Central Illinois. **J Med Entomol**. 52(1):63-75.

KIM, I.H; ARYAL, S.K; AGHAI, D.T; CASANOVA-TORRES, A.M; HILLMAN, K; KOZUCH, M.P; et al. (2017). The insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus innexi* has attenuated virulence in several insect model hosts yet encodes a potent mosquitocidal toxin. **BMC Genomics**.18:927.

KOZLOVA EV et al. (2021). Microbial interactions in the mosquito gut determine *Serratia* colonization and blood-feeding propensity. *ISME J*. 15, 93–108.

KRAEMER, M.U.G; REINER, R.C.J.R; BRADY, O.J; MESSINA, J.P; GILBERT, M; PIGOTT, D.M; et al. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nat Microbiol**. 4(5):854-63.

KRAEMER, M.U.G; SINKA, M.E; DUDA, K.A; MYLNE, A; SHEARER, F.M; BARKER, C.M. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Elife*. Jun; 4:e08347.

LEFÈVRE, T; VANTAUX, A; DABIRÉ, K.R; MOULINE, K; COHUET, A. (2013). Determinantes não genéticos da competência do mosquito para parasitas da malária. **PLoS Pathog**. 9: e1003365. 10.1371/journal.ppat.1003365.

LETA, S; BEYENE, T.J; DE CLERCQ, E.M; AMENU, K; KRAEMER, M.U; Revie, C.W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases** 67: 25-35.

LIMA- CAMARA, T.N. (2016). Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 50.

LIN D, ZHENG X, SANOGO B, DING T, SUN X, WU Z. (2021). Bacterial composition of midgut and entire body of laboratory colonies of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Southern China. *Parasit. Vectors* 14, 586.

LIN D, ZHENG X, SANOGO B, DING T, SUN X, WU Z. (2021). Bacterial composition of midgut and entire body of laboratory colonies of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Southern China. *Parasit. Vectors* 14, 586.

LIN, D; ZHENG, X; SANOGO, B; DING, T; SUN, X; WU, Z. (2021). Bacterial composition

of midgut and entire body of laboratory colonies of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Southern China. **Parasites Vectors** 14, 586.

MAITRA, A; CUNHA-MACHADO, A.S; DE SOUZA LEANDRO, A; DA COSTA, F.M; SCARPASSA, V.M. (2019). Exploring deeper genetic structures: *Aedes aegypti* in Brazil. **Acta Tropica**, 195,68-77.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M.D.F.F.D. (2016). Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 49: 4-10.

MINARD G; TRAN FH; RAHARIMALALA FN; HELLARD E; RAVELONANDRO P; MAVINGUI P; et al; (2012). Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. **FEMS Microbiol Ecol.**83(1):63-73.

MINARD, G; TRAN, F.H; VAN, V.T; GOUBERT, C; BELLET, C; LAMBERT, G; et al. (2015). French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. **Front Microbiol.** 6:970.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2022. Boletim Epidemiológico, Volume 53, N.º 38, ISSN 9352-7864.

MONTEIRO, F. A; SHAMA, R; MARTINS, A. J; GLORIA-SORIA, A; BROWN, J. E. (2014). Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. **PLoS Negl Trop Dis** 8(9): e3167.

MUTURI, E. J., RAMIREZ, J. L., ROONEY, A. P. & KIM, C.-H. (2017). Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 11, e0005377.

PARTHIPAN, P., SARANKUMAR, R. K., JAGANATHAN, A., AMUTHAVALLI, P., BABUJANARTHANAM, R., RAHMAN, P. K., ... & RAJASEKAR, A. (2018). Biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* A1 and *Pseudomonas stutzeri* NA3 reduce longevity and fecundity of *Anopheles stephensi* and show high toxicity against young instars. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 10471-10481.

PASSOS, R.A.D. (2011). Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado do Amazonas e o efeito do tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 mantidas em laboratório. Tese (doutorado) -INPA, Manaus.31:32–43.

PEREIRA, J.O; DE SOUZA, A.Q.L; DE SOUZA A.D.L; DE CASTRO FRANÇA S; DE OLIVEIRA, L.A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. (2017). In: DE AZEVEDO, J; QUECINE, M.

(eds) Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. Springer, Cham.

PERNICE, M; SIMPSON, S.J; PONTON, A.N.D.F. (2014). Towards an integrated understanding of gut microbiota using insects as model systems. **Journal of Insect Physiology** 69: 12–18.

PIETRI, J.E; DEBRUHL, H; SULLIVAN, W. (2016). A rica vida somática de *Wolbachia*. *Microbiologia Open*, 50, 923-936.

PINCEBOURDE, S., MURDOCK, C. C., & VICKERS, M. E. A. (2016). Fine-scale microclimatic variation can shape the responses of organisms to global change in both natural and urban. **PLoS Negl Trop Dis** 8(9): e3167.

POWELL, J.R, TABACHNICK, W.J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 108 Suppl 1:11-7.

POWELL, J.R. (2019). An evolutionary perspective on vector-borne diseases. **Front. Gene**, 10, 1266.

QIU LN, ZHANG WW, GONG AJ, ZHENG SJ, ZHAO DD, ZHAO WY, FAN RR. (2023). Espécies de micróbios corrosivos e mecanismos de corrosão, Gongcheng Kexue Xuebao (Chinese Journal of Engineering), 45(6): 927-940.

RAMIREZ JL, SHORT SM, BAHIA AC, SARAIVA RG, DONG Y, KANG S, TRIPATHI A, MLAMBO G, DIMOPOULOS G. (2014) *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. *PLoS Pathog*. 10, e1004398.

RAMIREZ JL, SOUZA-NETO J, TORRES COSME R, ROVIRA J, ORTIZ A, PASCALE JM,

DIMOPOULOS G. (2012) Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 6, e1561.

RIBEIRO, M.S; FERREIRA, D.F; AZEVEDO, R.C; SANTOS, G.B.G; MEDRONHO, R.A.

(2021). Larval indices of *Aedes aegypti* and increase in dengue: an ecological study in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Public Health**. 37(7): 1-13.

RODGERS, F.H; GENDRIN, M; WYER, C.A.S; CHRISTOPHIDES, G.K. (2017).

Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. **PLOS Pathogens** 13(5): e1006391.

ROMOLI O, SCHÖNBECK JC, HAPFELMEIER S, GENDRIN M. (2021). Production of germ-free mosquitoes via transient colonisation allows stage-specific investigation of host-microbiota interactions. *Nat. Commun*. 12, 942.

SALDAÑA, M.A; HEGDE, S; HUGHES, G.L. (2017). Microbial control of arthropod borne disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 112: 81-93.

SCATES, S.S; O'NEAL, S.T; ANDERSON, T.D. (2019). Bacterial-mediated modification of insecticide toxicity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Biochemistry and Physiology of Pesticides**, v. 161, p. 77-85.

SCOLARI F, CASIRAGHI M, BONIZZONI M. (2019). *Aedes spp.* and their microbiota: a review. *Front. Microbiol.* 10, 2036.

SCOLARI F, CASIRAGHI M, BONIZZONI M. (2019). *Aedes spp.* and their microbiota: a review. *Front. Microbiol.* 10, 2036.

SCOLARI, F; CASIRAGHI, M; BONIZZONI, M. (2019). *Aedes spp.* e sua microbiota: uma revisão. *Frente. Microbiol.* 10 : 2036 .

SCOLARI, F; SANDIONIGI, A; CARLASSARA, M; BRUNO, A; CASIRAGHI, M; BONIZZONI, M. (2021). Exploring Changes in the Microbiota of *Aedes albopictus*: Comparison Among Breeding Site Water, Larvae, and Adults. **JOURNAL=Frontiers in Microbiology**. VOLUME=12.

SEYEDSAYAMDOST, M. R. (2019). Toward a global picture of bacterial secondary metabolism. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Volume 46, Issue 3–4, pp 301–311.

SHORT, S.M; VAN TOL, S; MACLEOD, H.J; & DIMOPOULOS, G. (2018). Hydrogen cyanide produced by the soil bacterium *Chromobacterium sp.* Panama contributes to mortality in *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Scientific reports**, 8(1), 1-13.

SHRAGAI, T; TESLA, B; MURDOCK, C; & LC; H. (2017). Zika and chikungunya: mosquito- borne viruses in a changing world. **Ann N Y Acad Sci**.

SILVA, H.H; SILVA, I.G. (1999). Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 32, no. 4, pp. 349-355.

SIM, S; JUPATANAKUL, N; RAMIREZ, J.L; KANG S; ROMERO-VIVAS, C.M; MOHAMMED, H; et al. (2013). Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. **PLoS Negl Trop Dis**. 7(7):e2295.

SIMMONS, C.P; FARRAR, J.J; CHAU, N.V.V; WILLS, B. (2012). Dengue. **New England Journal of Medicine**. 366: 1423-32.

SOARES-DA-SILVAA, J; QUEIRÓS, S.G; AGUIAR, J.S; VIANA, J.L; NETA, R.A.V; MARIA, C; DA SILVA, C.M; PINHEIRO, C.S.V; POLANCZYKD, R.A; CARVALHO-ZILSEE, G.A; TADEI, W.P. (2017). Molecular characterization of the gene profile of

Bacillus thuringiensis Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta Tropica** 176- 197–205.

SONG, GQ, CAO, Y., LI, H., MA, K., ZHAO, XY, ZOU, KN. (2018). Progresso no sequenciamento do gene 16S rRNA na ciência forense. *Fa Yi Xue Za Zhi* 34, 542–548.

TALYULI, O; BOTTINO-ROJAS, V; POLYCARPO, C.R; OLIVEIRA, P.L; PAIVA-SILVA, G.O. (2021). Non-immune Traits Triggered by Blood Intake Impact Vectorial Competence. **Frontiers in physiology**, 12, 638033.

TERRA, W.R. (1990). Evolution of Digestive System of Insects. **Annu Rev Entomol.** 35:181- 200.

THONGSRIPONG, P; CHANDLER, J.A; GREEN, A.B; KITTAYAPONG, P; WILCOX, B.A; KAPAN, D.D; BENNETT, S.N. (2018). Microbiota associated with mosquito vectors: Metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts in habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. **Ecology and evolution**, 8(2), 1352-1368.

TSUKUDA, M., KITAHARA, K. E MIYAZAKI, K. (2017). A análise comparativa da função do RNA revela alta similaridade funcional entre rRNAs 16S bacterianos distantemente relacionados. **Ciência. Rep.** 7:9993.

VALDERRAMA, A; DIAZ, Y; LOPEZ-VERGES, S. (2017). Flavivirus interaction with their mosquitoes vectors and their impact on human health in the Americas. **Biochemistry. Biophys. Res. Ordinary.** 2017, 492, 541-547.

VALZANIA, L; MARTINSON, V.G; HARRISON, R.E; BOYD, B.M; COON, K.L; BROWN, M.R; STRAND, M.R. (2018). Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae. **PLoS neglected tropical diseases**, 12(7), e0006638.

VEGA-RÚA, A.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (2014). High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **Journal of Virology** 88: 6294-6306.

VERONESI, R; CARRIERI, M; MACCAGNANI, B; MAINI, S; BELLINI, R. (2015). *Macrocyclus albidus* (Copepoda: Cyclopidae) for the Biocontrol of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* in Italy. **Journal of the American Mosquito Control Association**

VIEIRA, C.S; WANIEK, P.J; MATTOS, D.P; CASTRO, D.P; MELLO, C.B; RATCLIFFE NA; et al. (2014). Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. **Parasit Vectors.** 7:232.

VILLEGAS, L.E; CAMPOLINA, T.B; BARNABAS, N.R; ORFANO, A.S; CHAVES, B.A; NORRIS, D.E; PEPPER, P.F; SECUNDINO, N.F.C. (2018). Zika virus infection modulates bacterial diversity associated with *Aedes aegypti*, as revealed by metagenomic analysis.

PLoS ONE,13, e0190352.

VONTAS, J; KATSAVOU, E.V.A; MAVRIDIS, K. (2020). Resistance to cytochrome P450-based metabolic insecticides in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: muddying the waters. **Biochemistry and Physiology of Pesticides**, v. 170, p. 104666.

WANG X et al. (2018). Bacterial microbiota assemblage in *Aedes albopictus* mosquitoes and its impacts on larval development. *Mol. Ecol.* 27, 2972–2985.

WANG X et al. (2018). Bacterial microbiota assemblage in *Aedes albopictus* mosquitoes and its impacts on larval development. *Mol. Ecol.* 27, 2972–2985.

WANG Y, EUM JH, HARRISON RE, VALZANIA L, YANG X, JOHNSON JA, HUCK DT, BROWN MR, STRAND MR. (2021). Riboflavin instability is a key factor underlying the requirement of a gut microbiota for mosquito development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 118, e2101080118.

WANG, H; ZHANG, C; CHENG, P; WANG, Y; LIU, H; WANG, H., ... & GONG, M. (2021). Differences in the intestinal microbiota between insecticide-resistant and-sensitive *Aedes albopictus* based on full-length 16S rRNA sequencing. **Microbiology Open**, 10(2), e1177.

WANG, S., & JACOBS-LORENA, M. (2013). Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. **Trends in Biotechnology**, 31, 185–193.

WANG, S; DOS-SANTOS, A; HUANG, W; LIU, K.C; OSHAGHI, M.A; WEI, G; et al. (2017). Conduzindo a refratariedade do mosquito ao *Plasmodium falciparum* com bactérias simbióticas projetadas. **Ciência**. 357(6358):1399–402.

WANG, X.M; LIU, T; WU, Y; ZHONG, D.B; ZHOU, G.F; SU, X.H; et al. (2018). Assembly of bacterial microbiota in *Aedes albopictus* mosquitoes and their impacts on larval development. **Molecular Ecology** 27, 2972-2985.

WANG, X; LIU, T; WU, Y; ZHONG, D; ZHOU, G; SU, X., ... & YAN, G. (2018). Bacterial microbiota a assemblage in *Aedes albopictus* mosquitoes and its impacts on larval development. **Molecular ecology**, 27(14), 2972-2985.

WANG, Y; GILBREATH, T.M; KUKUTLA, P; YAN, G.Y; XU, J.N. (2011). Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **PLoS ONE**, 6, Artigo e24767.

WEISS, B.L; SAVAGE, A.F; GRIFFITH, B.C; WU, Y; AKSOY, S. (2014). The peritrophic matrix mediates the results of differential infection in the tsetse fly intestine after challenge with commensal, pathogenic and parasitic microbes. **J. Immunol. American**

Association of Immunologists; 193:773-82.

WRBU.Walter Reed Biosystematics Unit. (2022). Mosquito identification resources. Disponível em: <http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html>.

YADAV, K.K; DATTA, S; NAGLOT, A; BORA, A; HMUAKA, V; et al. (2016) Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. **PLOS ONE** 11(12): e0167409.

YANG X.F., GUO R., YAO Y.L., ZHU W.J., HONG L.D., HONG C.L., ZHU F.X., AND WANG W.P.(2023). Effects of microbial agents on plant growth, soil fertility and microbial communities under continuous cropping strawberry, Henongxue Bao (Journal of Nuclear Agricultural Sciences), 37(6): 1253-1262.

YIMER, M; BEYENE, N., & SHEWAFERA, A. (2016). *Aedes aegypti* as a Vector of Flavivirus. **Journal of Tropical Diseases**, 04.

YOOYANGKET, T; MUANGPAT, P; POLSEELA, R; TANDHAVANANT, S; THANWISAI A; VITTA, A. (2018). Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbioticbacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **PLoS ONE**.13:e0195681.

ZHANG, Q. X., ZHANG, Y., SHAN, H. H., TONG, Y. H., CHEN, X. J., & LIU, F. Q. (2017). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 25000-25009.

ZHENG, H.U.A; AMELIA-YAP; ADZZIE, S.A; SAZALY, A; VAN, L.L. (2022). *Streptomyces* derivatives as an insecticide: Current perspectives, challenges and future research needs for mosquito control, **Acta Tropica**, Volume 229,106381, ISSN 0001-706X