



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



JAKELINE ANDRADE DE SOUZA

POTENCIAL LARVICIDA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES
AMAZÔNICOS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)

MANAUS – AM

2024

JAKELINE ANDRADE DE SOUZA

**POTENCIAL LARVICIDA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES
AMAZÔNICOS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rosemary Aparecida Roque - INPA

Coorientador: Dr. Ricardo de Melo Katak – ILMD/FIOCRUZ-AM

MANAUS – AM

2024

Ficha Catalográfica

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

S729p Souza, Jakeline Andrade de
Potencial larvicida de bactérias isoladas de ambientes
amazônicos para o controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) /
Jakeline Andrade de Souza . 2024
60 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rosemary Aparecida Roque
Coorientadora: Ricardo de Melo Katak
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. Controle biológico. 3.
Diversidade microbiana. 4. Metabólitos. I. Roque, Rosemary
Aparecida. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora, que me iluminaram e abençoaram em todos os meus passos nessa trajetória.

A minha mãe, Maria Gorete que não mede esforços para que eu realize meus sonhos e alcance meus objetivos e que me apoiou de maneira incondicional.

A minha família, que também não mediram esforços para que eu conseguisse finalizar o mestrado, me dando todo auxílio e suporte necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas
pela oportunidade na realização de um dos sonhos da minha vida.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A minha orientadora, Dra. Rosemary Aparecida Roque pelo total apoio na realização deste trabalho. Muito obrigada por todo ensinamento e contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meu orientador e amigo, Dr. Ricardo de Melo Katak, por todo apoio, amizade, ajuda constante e pela grande paciência comigo, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos do Laboratório Malária e Dengue do INPA, em especial ao Clã Parintins: Izane Maria Matos, Juan Campos de Oliveira, Veranilce Alves Muniz, Ana Claudia. Foi um prazer e uma grande honra poder ter a colaboração e a amizade de vocês ao longo desses anos.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor dos arbovírus da Dengue, Febre Amarela Urbana, Zika e Chikungunya. Uma das principais ferramentas utilizadas no controle deste vetor são os inseticidas químicos, porém, o uso contínuo pode provocar fatores negativos no meio ambiente e na saúde humana, como também pode selecionar mosquitos resistentes. Neste sentido, encontrar novas alternativas para o seu controle, como o controle biológico utilizando microrganismos entomopatogênicos pode ser uma alternativa biotecnológica promissora no controle de vetores de doenças. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial químico e biológico de bactérias amazônicas isoladas de sedimentos para o controle de *Ae. aegypti* em condições de laboratório. A coleta das amostras foram obtidas de três lagos do município de Parintins, área peri-urbana do município. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Malária e Dengue do INPA, onde foi realizado os seguintes procedimentos: isolamento em dois meios de cultivo (NA e BDA), purificação, coloração de Gram e em seguida a preservação e armazenamento das bactérias. Para os ensaios biológicos foi utilizado 50 µL do pré-inóculo adicionado em 5 mL dos respectivos meios. A mortalidade das larvas foi avaliada até 72 horas após exposição aos cultivos bacterianos. Foram isoladas 50 bactérias utilizando os meios NA (23) e BDA (27). Das 50 bactérias, 2 linhagens ativas (P2LM3NA e P2LM5NA) para larvas de *Ae. aegypti* foram identificadas por meio de sequenciamento do gene *16s rRNA*. A linhagem P2LM5NA foi selecionada para obtenção de extratos e avaliar seu potencial larvicida. A exposição das larvas de *Ae. aegypti* ao extrato metabólico do sobrenadante da linhagem P2LM5NA revelou 100% de mortalidade das larvas de L3 no período de 24 horas em duas concentrações testadas. O extrato obtido do componente celular apresentou 70% de atividade após 72 horas de exposição na concentração de 100 µL. O sequenciamento do gene *rRNA 16S* e a análise BLAST permitiu a identificação das linhagens bacterianas deste estudo, onde foi possível observar que as linhagens bacterianas ativas contra *Ae. aegypti* apresentam similaridade de 99,88% (P2LM5NA) e 97% (P2LM3NA) com o gênero *Bacillus*. Foram isoladas espécies bacterianas que exibem notável atividade larvicida em comparação com a de um produto comercial Natular® DT. As linhagens bacterianas com potencial larvicida isoladas de três lagos amazônicos, obtidas neste estudo, poderão ser novos agentes entomopatogênicos para o controle biológico de populações de *A. aegypti*.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias entomopatogênicas, Controle biológico, Diversidade microbiana

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of the arboviruses that cause Dengue, Urban Yellow Fever, Zika and Chikungunya. One of the main tools used to control this vector is chemical insecticides, however, their continued use can cause negative effects on the environment and human health, as well as selecting resistant mosquitoes. In this sense, finding new alternatives for its control, such as biological control using entomopathogenic microorganisms, can be a promising biotechnological alternative in the control of disease vectors. Therefore, this study aims to evaluate the chemical and biological potential of Amazonian bacteria isolated from sediments for the control of *Ae. aegypti* under laboratory conditions. The samples were collected from three lakes in the municipality of Parintins, a peri-urban area of the municipality. The samples were then sent to the INPA Malaria and Dengue Laboratory, where the following procedures were performed: isolation in two culture media (NA and PDA), purification, Gram staining, and then preservation and storage of the bacteria. For the biological assays, 50 μ L of the pre-inoculum added to 5 mL of the respective media was used. Larval mortality was assessed up to 72 hours after exposure to bacterial cultures. A total of 50 bacteria were isolated using NA (23) and PDA (27) media. Of the 50 bacteria, 2 active strains (P2LM3NA and P2LM5NA) for *Ae. aegypti* larvae were identified by sequencing the 16S rRNA gene. The P2LM5NA strain was selected to obtain extracts and evaluate its larvicidal potential. The exposure of *Ae. aegypti* to the metabolic extract of the supernatant of the P2LM5NA strain revealed 100% mortality of L3 larvae within 24 hours at two concentrations tested. The extract obtained from the cellular component showed 70% activity after 72 hours of exposure at a concentration of 100 μ L. Sequencing of the 16S rRNA gene and BLAST analysis allowed the identification of the bacterial strains of this study, where it was possible to observe that the bacterial strains active against *Ae. aegypti* present similarity of 99.88% (P2LM5NA) and 97% (P2LM3NA) with the genus *Bacillus*. Bacterial species that exhibit remarkable larvicidal activity were isolated compared to that of a commercial product Natular® DT. The bacterial strains with larvicidal potential isolated from three Amazonian lakes, obtained in this study, may be new entomopathogenic agents for the biological control of *A. aegypti* populations.

KEYWORDS: Entomopathogenic bacteria, Biological control, Microbial diversity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inseticidas recomendados pelo Ministério da Saúde	16
Tabela 2. Localização e características dos locais de coleta	24
Tabela 3. Características fenotípicas de linhagens bacterianas isoladas de ambientes amazônicos	37
Tabela 4: Percentual de mortalidade das larvas de <i>A. aegypti</i> após exposição em linhagens bacterianas cultivadas em meio NB em 48, 72, 96 e 120h	41
Tabela 5: Dados dos parâmetros observados na produção dos extratos das linhagens bacterianas	41
Tabela 6: Identificação molecular de linhagens bacterianas por meio do sequenciamento do gene <i>16SrRNA</i>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 2: Manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório para realização dos bioensaios.	22
Figura 3: Locais de coleta de amostras.....	23
Figura 4. Quantidade de bactérias isoladas em meio de cultivo BDA e NA	33
Figura 5: Morfologia microscópica das linhagens bacterianas	35
Figura 6: Percentual de mortalidade das larvas de <i>A. aegypti</i> após exposição em cultivos de linhagens bacterianas em meio NA em 24, 48, 72 h	38
Figura 7: Percentual de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após exposição em cultivo de linhagens bacterianas	40
Figura 8. Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas aos componentes celulares	43
Figura 9. Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao sobrenadante	44
Figura 10. Porcentagem de mortalidade com extratos do sobrenadante	46
Figura 11. Porcentagem de mortalidade com extratos do componente celular	46
Figura 12: Perfil eletroforético de extração de DNA genômico	47
Figura 13: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene <i>16S rRNA</i>	48

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. <i>Aedes aegypti</i> : aspectos gerais	13
2.2. Controle vetorial de <i>Aedes aegypti</i>	15
2.3. Biodiversidade Amazônica	18
2.4. Bactérias entomopatogênicas	18
2.5. Metabólitos secundários	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral:	21
3.2. Específicos:	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Criação e manutenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	22
4.2. Coleta das amostras	23
4.3. Isolamento bacteriano das amostras de sedimentos do fundo de lagos	24
4.4. Caracterização morfológica das bactérias	25
4.5. Preservação das bactérias	25
4.6. Ensaio biológicos	26
4.6.1. Reativação e condições de cultivo das linhagens bacterianas	26
4.6.4. Escala preparativa para o de cultivo das linhagens bacterianas	27
4.6.5. Montagem dos bioensaios	27
4.6.6. Produção de extratos metabólicos das linhagens bacterianas	28
4.7. Identificação molecular das linhagens bacterianas ativas contra <i>Aedes aegypti</i> ..	29
4.7.1. Extração de DNA Genômico	29
4.7.2. Amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1. Isolamento das bactérias	32
5.2. Caracterização morfológica das bactérias	34
5.3. Bioensaios seletivos das linhagens bacterianas	39
5.3.1. Bioensaios com o sobrenadante secretado (SUP) e os componentes celulares (PEL) das linhagens bacterianas	42
5.3.2. Atividade larvicida com extrato metabólico da linhagem bacteriana P2LM5NA para o controle de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	44

5.4. Identificação molecular das linhagens ativas.....	47
5.4.1. Perfil do DNA genômico	47
6. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor de vários arbovírus causadores de doenças, como a Dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela urbana, as quais acometem milhares de pessoas em todo mundo e necessitam de controle e prevenção mais eficazes (LETA et al., 2018, SOUZA-NETO et al., 2019; WHO, 2022). A dengue é uma infecção potencialmente mais grave devido ao seu componente hemorrágico que pode levar ao colapso circulatório (WEAVER et al., 2018).

O Brasil é um dos países da América Latina com as maiores notificações de dengue, com mais de 1.390.673 casos prováveis em 2022, quando comparado com o ano de 2021, houve um aumento de 162,5% de casos (BRASIL, 2023). Em 2024, no período entre as SE 1 e 26, foram notificados 6.215.201 casos prováveis de dengue no País, sendo 4.269 mortes confirmadas. Casos de Chikungunya houveram 233.225 casos prováveis e 134 óbitos. Zika, houveram 8.519 casos prováveis, sem óbitos. No Estado do Amazonas em 2024, houve o registro de 5.593 notificações de casos de dengue (BRASIL, 2024).

O controle vetorial é uma das medidas utilizadas para amenizar os impactos na Saúde Pública, sendo os inseticidas químicos ainda utilizados no combate aos mosquitos, como Praetrina, Clotianidina, Malation (BRASIL, 2023), porém o uso excessivo pode causar danos ao meio ambiente e selecionar mosquitos resistentes aos produtos. Dessa forma, são necessários métodos sustentáveis para reduzir a transmissão destes arbovírus.

Podemos citar que um desses métodos são as vacinas, da qual desempenham papel crucial na prevenção dessas doenças e tem sido uma ferramenta valiosa em programas de saúde pública em todo o mundo. A vacina Dengvaxia fabricada pela empresa Sanofi Pasteur e registrada no Brasil em dezembro de 2015, foi a primeira vacina desenvolvida contra a dengue no mundo, o imunizante é indicado para pessoas entre 9 e 45 anos, que já tenham sido infectados por pelo menos um dos sorotipos da dengue e que moram em áreas em que essa infecção é mais comum. A proteção foi de 93% contra casos graves da doença, reduziu até 80% das internações e a eficácia global foi de pouco mais de 60% contra todos os tipos do vírus.

A vacina Qdenga da empresa Takeda Pharma Ltda, eficaz contra os quatro diferentes sorotipos do vírus causador da doença, conferindo assim uma ampla proteção contra a dengue (BRASIL, 2023). Esta vacina foi incorporada no Programa Nacional de Imunização – PNI, Sistema Único de Saúde (SUS), o Brasil é o primeiro país do mundo a oferecer o imunizante no sistema público universal. A Qdenga demonstrou ser eficaz

contra o DENV-1 em 69,8% dos casos; contra o DENV-2 em 95,1%; e contra o DENV-3 em 48,9%.

Contudo, ainda são necessárias medidas alternativas e eficazes para reduzir a transmissão de arbovírus por insetos vetores e a principal estratégia tem sido o controle vetorial, principalmente utilizando compostos de substâncias orgânicas e inorgânicas. Neste contexto, surge como medida alternativa, o controle biológico, utilizando microrganismos entomopatogênicos como vírus, fungos e bactérias para o controle de insetos vetores de doenças. Estudos envolvendo bactérias entomopatogênicas, têm se mostrado uma boa alternativa para reduzir a densidade populacional desses mosquitos, com consequente redução da circulação do vírus. Bactérias entomopatogênicas como *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti), *Lysinibacillus* (LBs) são promissores para o controle de diversas ordens de insetos, principalmente vetores de doenças (LUIZ ROSA DA SILVA et al., 2017; VITTA et al., 2018; DAHMANA et al., 2020; FALQUETO et al., 2021).

Considerando que a biodiversidade microbiana da Amazônia é um dos maiores reservatórios de diversidade do planeta, as espécies microbianas que residem nesta localidade podem apresentar diversas aplicações biotecnológicas. As bactérias com potencial entomopatogênico, desde que sejam cultiváveis, podem ser isoladas por técnicas convencionais com diferentes meios de cultivos, com isso, metabólitos derivados de bactérias isoladas podem conter novas moléculas com propriedades inseticidas que podem ser utilizadas como ferramentas biológicas para o controle de doenças transmitidas por mosquitos (DAHMANA et al., 2020; KATAK et al., 2021).

Neste sentido, há a necessidade de buscar novos microrganismos da biota amazônica para o controle de mosquitos vetores de doenças. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial metabólico de bactérias isoladas de ambientes amazônicos para o controle biológico de larvas de contra *Ae. aegypti*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Aedes aegypti*: aspectos gerais

O mosquito *Ae. aegypti* pertence à família Culicidae, ordem Diptera e subordem Nematocera, que incluem 40 gêneros distribuídos nas subfamílias Anophelinae e Culicinae (WRBU, 2022). A ocorrência deste vetor foi descrita no ano de 1762 por Linnaeus no Egito, com a presença nos trópicos e subtrópicos, no continente Americano, no sudeste da Ásia e na Índia (CHRISTOPHERS, 1960; KRAEMER et al., 2015). Trata-se de uma espécie de origem africana, considerada a de maior importância epidemiológica na América Latina, sua distribuição pelo planeta ocorreu principalmente devido a escravidão do povo Africano, e está presente nas áreas tropicais e subtropicais. O mosquito circula pelo Brasil desde o período colonial, o vetor foi transportado em navios negreiros, durante o tráfico de escravos, provavelmente dentro de tambores de água.

A primeira grande aparição da espécie no cenário brasileiro, aconteceu durante a grande epidemia de febre amarela. A adaptação do *Ae. aegypti* no Brasil se deu pelo clima tropical, com altas temperaturas, umidade e estação chuvosa, que facilitaram a fixação do mosquito em muitas localidades do país (GARCIA, 2019; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016).

O ciclo biológico deste mosquito é do tipo holometábolo, isto é, passa pelas seguintes fases: ovo, larva (quatro estádios L1, L2, L3 e L4), pupa e adultos (Figura 1). O período compreendido entre a oviposição até a fase adulta decorrem em média de 7 à 10 dias em condições favoráveis de temperatura e disponibilidade de alimentos. Os ovos são depositados, individualmente, pelas fêmeas nas paredes internas de recipientes próximos à superfície da água, embora parte das posturas possam ser realizadas diretamente na água (GOMES et al., 2006). Os ovos podem resistir às condições adversas por um longo período, em virtude de um processo denominado quiescência, o que ajuda muito no sucesso reprodutivo desses mosquitos, em contato com a água as larvas eclodem e seu tamanho varia entre 0,6 a 0,7mm. Os ovos suportam grandes períodos de seca, podendo persistir na natureza por aproximadamente 18 meses, sem sofrer nenhum dano (DICKENS et al., 2018). As larvas vivem na água se alimentando e vão até a superfície para realizar as trocas gasosas e passam por quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4) e sua atividade alimentar é intensa e rápida. O corpo da larva é composto de cabeça, tórax e abdômen.

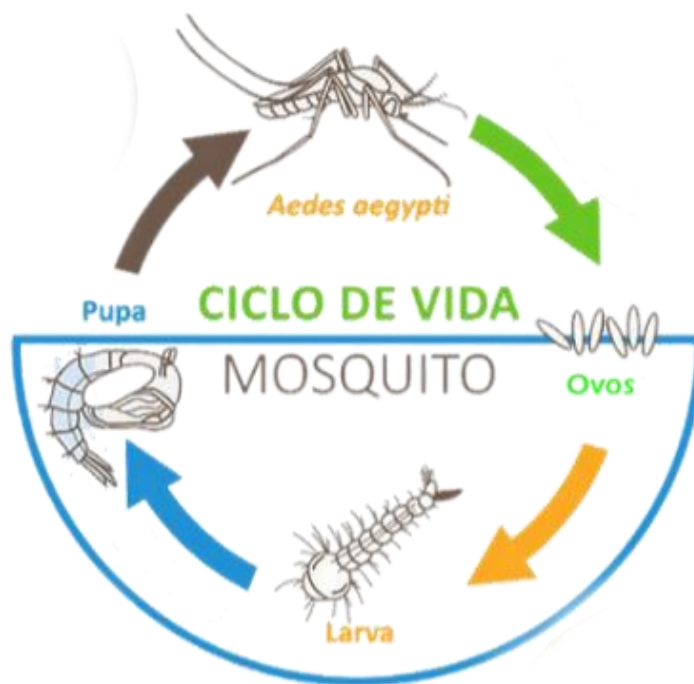


Figura 1: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Fonte: <https://www.ecologiaesaude.com/post/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti>.

O mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão de diversos arbovírus de grande importância para saúde pública, como Dengue, Zika, Febre amarela urbana e Chikungunya (LETA et al., 2018, SOUZA-NETO et al., 2019; WHO, 2022;).

A dengue é a arbovirose urbana mais prevalente nas Américas, principalmente no Brasil. É uma doença febril que tem se mostrado de grande importância na Saúde Pública nos últimos anos. O vírus dengue (DENV) é transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Ae. aegypti* e possui quatro sorotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). O período do ano com maior transmissão da doença ocorre nos meses mais chuvosos de cada região, geralmente de novembro a março. O acúmulo de água parada contribui para a proliferação do mosquito e, conseqüentemente, maior disseminação da doença (BRASIL, 2023). Até a semana epidemiológica 32 casos foram notificados 1.518.268 casos de Dengue no Brasil, segundo o Ministério da Saúde.

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae* transmitido ao ser humano por meio da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente da espécie *Ae. aegypti*. Ressalta-se também os modos de transmissão vertical, sexual e por transfusão sanguínea. A infecção pelo ZIKV pode causar uma doença febril, em que exantemas e dores articulares são sinais e sintomas bastante comuns, muito embora

evidências apontem que aproximadamente 80% dos indivíduos infectados sejam assintomáticos. Há duas complicações neurológicas graves relacionadas ao ZIKV: a (1) Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma condição rara em que o sistema imunológico de uma pessoa ataca os nervos periféricos, e (2) microcefalia, a manifestação mais grave de um espectro de problemas congênitos. Gestantes infectadas podem transmitir o vírus ao feto e essa forma de transmissão da infecção pode resultar em aborto espontâneo, óbito fetal ou malformações congênitas, como a microcefalia (BRASIL, 2023).

A febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda, causada por um vírus transmitido por mosquitos vetores, e possui dois ciclos de transmissão: silvestre (quando há transmissão em área rural ou de floresta) e urbano (quando a transmissão ocorre em área urbana). O vírus é transmitido pela picada dos mosquitos transmissores infectados e não há transmissão direta de pessoa a pessoa. A febre amarela tem importância epidemiológica por sua gravidade clínica e potencial de disseminação em áreas urbanas infestadas pelo mosquito *A. aegypti*. É uma doença de notificação compulsória imediata, ou seja, todo evento suspeito, tanto morte de primatas não humanos, quanto casos humanos com sintomatologia compatível, deve ser prontamente comunicado às autoridades locais competentes, em até 24 horas após a suspeita inicial. Às autoridades estaduais de saúde cabe notificar os eventos de febre amarela suspeitos ao Ministério da Saúde. A Febre Amarela Silvestre (FAS) é uma doença endêmica na região amazônica do Brasil. No entanto, surtos da doença ocorrem principalmente na região sudeste (BRASIL, 2023).

Chikungunya é uma arbovirose cujo agente etiológico é transmitido pela picada de fêmeas infectadas do gênero *Aedes*. No Brasil, até o momento, o vetor envolvido na transmissão do vírus Chikungunya (CHIKV) é o *Ae. aegypti* (Organización Panamericana de la Salud, 2011). O vírus CHIKV foi introduzido no continente americano em 2013 e ocasionou um importante onda epidêmica em diversos países da América Central e ilhas do Caribe (BRASIL, 2023).

2.2. Controle vetorial de *Aedes aegypti*

Devido à suscetibilidade de transmissão dos agentes patogênicos, associado aos aspectos biológicos desse mosquito e a grande quantidade de criadouros artificiais disponíveis, que favorece o desenvolvimento deste vetor, diversos métodos de manejo

foram desenvolvidos para o controle das formas imaturas e dos adultos desta espécie (BRAGA & VALLE, 2007; ZARA et al., 2016; CARVALHO & MOREIRA, 2017).

A dengue é um dos principais desafios de Saúde Pública no Brasil e as atividades de prevenção e controle dessa patologia vêm sendo baseadas na estratégia de gestão integrada proposta em políticas de saúde (PESSOA et al., 2016, WILSON et al., 2020). Segundo Santos et al. (2016), as formas de controle químico e mecânico do *Ae. aegypti*, são as mais difundidas por serem realizadas por agentes de endemias nas residências ou locais públicos. O controle desses vetores é um método de relevância para minimizar a transmissão de agentes da doença por mosquitos e limitar o impacto das doenças transmitidas por vetores. Um dos objetivos das agências globais de saúde, são as medidas de controle do *Ae. aegypti*, no qual resultam em redução da densidade populacional, redução do tempo de vida e visam à eliminação das larvas ou dos mosquitos adultos. Porém, o uso prolongado de inseticidas sintéticos, podem selecionar populações de mosquitos resistentes. Com relação às larvas, pode-se incluir a eliminação ou modificação dos seus habitats, como, por exemplo, a drenagem ou aplicação de larvicidas nos possíveis criadouros.

O controle químico, utilizando larvicidas e adulticidas inclui componentes químicos que agem no sistema nervoso central, fazendo com que sejam pesticidas de ação rápida. A Tabela 1 mostra os inseticidas recomendados para uso em saúde pública (BRASIL, 2023).

Tabela 1: Inseticidas recomendados pelo Ministério da Saúde

PRODUTO	NOME COMUM	GRUPO QUÍMICO
Praetrina 0,75% (piretroide) e imidacloprida 3% (neonotinoide) e 96,25% de sistemas de solvente.	Cielo	Piretroides / neonotinoides
Clotianidina 50% (500g/kg) (neonotinoide) e deltametrina 6,25% (62,5g/kg) (piretroide)	Fludora	Neonotinoides / piretroides
Espinosade espinosina A e espinosina D, A:D, proporções no intervalo 50:50	Natular DT	Espinosinas
Malationa 40,9% (malathion)	Komvector TM 44EW (Bayer)	Organofosforados

Bendiocarbe	Ficam VC (Bayer)	Carbamato
Piriproxyfen	Limitor (Rozama) Sumilav (Sumitomo)	Éter piridiloxipropileno
Clotianidina 50%	Sumishield 50 WG	Neonicotonoides

No entanto, a errônea utilização destes inseticidas químicos, seja por uma quantidade exagerada durante a aplicação ou muitas aplicações seguidas em áreas com surtos da doença, podem deixar uma carga residual tóxica no ambiente, que pode gerar danos ambientais como também promover uma seleção de vetores resistentes, além da intoxicação de seres humanos e animais que habitam aquela área (BRAGA et al., 2004, MIRESMAILLI; ISMAN 2014, ANHOLETI et al., 2015, MOYES et al., 2017).

Com os efeitos negativos destes compostos químicos sobre o meio ambiente e saúde humana, tem-se buscado outras alternativas, como o estudo de substâncias naturais e sustentáveis, não-nocivas aos organismos não alvos, como os metabólitos produzidos por microrganismos com diferentes atividades biológicas, como bioinseticidas e biolarvicidas (LACEY et al., 2008; BANERJEE, 2020). Um dos organismos mais utilizados nesse controle é a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* (Bti), que tem sido muito estudada para uso no controle microbiano de insetos devido sua especificidade e baixo impacto no meio ambiente. Um dos mecanismos de ação deste microrganismo é a produção de toxinas Cry e Cyt, específicas para as larvas dessas espécies, que causam lise das células epiteliais do intestino, resultando na morte do inseto (MENDOZA-ALMANZA et al., 2020; RITCHIE et al., 2010). As proteínas Cry agem ligando-se a receptores e criando poros na membrana levando à mortalidade celular pelo desequilíbrio osmótico (BERRY et al., 2002; BRAVO et al., 2011).

O controle biológico é um método ecológico e sustentável, pois tem uma taxa lenta de desenvolvimento de resistência a insetos. Para a utilização destes compostos de origem natural, há necessidade de estudos de eficácia e custo-efetividade em comparação ao controle químico convencional.

2.3. Biodiversidade Amazônica

A Amazônia abrange uma área de aproximadamente 4,2 milhões de quilômetros quadrados de floresta tropical, dentro do território brasileiro, representando cerca de 20% da biodiversidade mundial e destacando-se por possuir a maior diversidade de animais e de plantas do planeta (SOUZA et al., 2004; COSTA E ALVES, 2018). A biodiversidade envolve uma variedade de espécies da flora, fauna e microrganismos. Estes organismos desempenham diversas funções ecológicas para estabilidade dos ecossistemas. Apesar da diversidade de espécies descritas, pouco se conhece do conjunto de espécies com as quais compartilhamos a vida no planeta (LEWINSOHN E PRADO, 2005; BRASIL/MMA, 2018). A Floresta Amazônica possui uma alta diversidade vegetal, e traz consigo, uma vasta diversidade microbiana associada. Dentre os microrganismos presentes nos tecidos vegetais, destacam-se os fungos e as bactérias (SOUZA et al., 2004).

Em sedimentos aquáticos a densidade bacteriana pode ser até três ordens de magnitude maior que a coluna d'água (FORSBERG, 1989; FENCHEL et al., 2012) pertencentes a milhares de espécies de bactérias. No entanto, mesmo com toda essa abundância e riqueza, ainda existe uma lacuna do conhecimento quanto a diversidade destes microrganismos em sedimentos aquáticos, a biodiversidade amazônica certamente representa uma fonte significativa para a prospecção de microrganismos.

Estudos baseados na análise da diversidade de bactérias no meio ambiente, por meio de métodos moleculares revelaram uma rica diversidade de organismos ainda não cultivados (LUDWIG et al., 1997). Wittmann et al. (2017) enfatizaram que os estudos sobre a biodiversidade terrestre e marinha estão aumentando, porém, as águas doces dos rios tropicais vêm sendo negligenciadas e com isso estudos sobre a microbiota dos rios e lagos amazônicos podem resultar em descobertas de novos microrganismos com potencial biotecnológico, capazes de sintetizar novas moléculas para o controle de pragas e doenças importantes para o país.

2.4. Bactérias entomopatogênicas

As bactérias entomopatogênicas são um grupo de microrganismos que desempenham um papel importante no controle global de insetos e pragas, e têm sido estudadas detalhadamente por muitos pesquisadores em todo o mundo (SCHISLER et al., 2004; CHENG et al., 2010; WANG et al., 2010; KONG et al., 2016; SALEHI JOUZANI

et al., 2017; KARABÖRKLÜ et al., 2018). Grande parte dessas bactérias pertencem as famílias Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae e Micrococcaceae. Bactérias esporulantes são as mais utilizadas comercialmente, devido à presença de estruturas de resistência denominadas endósporos que garantem sua manutenção em ambientes com condições desfavoráveis. Estas bactérias devem apresentar alta virulência e capacidade invasora, além da produção de toxinas (FALQUETO et al., 2021).

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lbs), são amplamente conhecidos por sua atividade larvicida contra várias espécies de mosquitos (MARGALITH et al., 2000; SANTANA-MARTINEZ et al., 2019). Devido à sua alta eficácia, segurança e mecanismos de ação bem caracterizados de suas toxinas, várias cepas de Bti e Lbs são incluídas em formulações de larvicidas biológicos disponíveis comercialmente e aprovadas por órgãos reguladores como a Organização Mundial da Saúde e a Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos Estados Unidos da América (KATAK et al., 2023).

O *B. thuringiensis* (Bt) é a bactéria mais conhecida como agente de biocontrole entomopatogênico, pois tem rápida ação no hospedeiro, é uma bactéria gram-positiva aeróbica e formadora de esporos. As espécies de Bt produzem diferentes tipos de proteínas de cristal parasporal ou δ -endotoxinas (Cry), proteínas inseticidas vegetativas (VIPs) e proteínas citolíticas (Cyt). Essas proteínas são tóxicas para uma ampla gama de pragas das ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Homoptera, Orthoptera, e Mallophaga, bem como nematoides, ácaros e protozoários (SCHNEPF et al., 1998; 2008, SALEHI JOUZANI et al., 2017; KARABÖRKLÜ et al., 2018; ZHANG et al., 2018; PENG et al., 2019; FRENTZEL et al., 2020).

L. sphaericus produz diferentes proteínas mosquitocidas, como esfaericolisina, mosquitocida (Mtx), toxinas Cry48/Cry49 e binárias (Bin). A toxina bin consiste em duas proteínas denominadas Bin B e Bin A de tamanho 51 e 42 kDa, respectivamente e após digestão no intestino médio de larvas de mosquito; Bin B e Bin A são reduzidos a fragmentos menores de 43 e 39 kDa, respectivamente (SILVA-FILHA et al., 2021). Relatórios anteriores mostram que o uso de uma formulação de *L. sphaericus* seria mais econômico do que o uso de inseticidas sintéticos. A fusão de diferentes proteínas inseticidas como Cyt 1Aa (*B. thuringiensis* var. *israelensis*) e Bin A (*L. sphaericus*) produz proteínas altamente tóxicas contra mosquitos como *C. quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae* e *Ae. Aegypti* (BIDESHI et al., 2017).

2.5. Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos especiais com estruturas diferentes dos metabólitos primários, é geralmente restrito a pequenas moléculas, suas substâncias são produzidas pelas células em resposta a uma determinada condição. Por meio do metabolismo são formados diferentes metabólitos, que estão relacionados a defesa da célula frente a situação adversa, sendo separados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos policetídeo-peptídeos (KEMKEN E ROHFS, 2010; ROZE et al., 2011).

Os estudos dos metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX, interessados nessas substâncias pela sua importância como drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais. Desde a sua descoberta, os metabólitos secundários apresentam um importante impacto na saúde humana, na nutrição e na sociedade como um todo. Já foram utilizados para inúmeras aplicações como antiparasitários, antimaláricos, imunossuppressores, anticâncer e antimicrobianos (PURVES et al., 2016; GOLDFARB & PIMENTEL & PIMENTEL, 2009).

A produção de metabólitos secundários cumpre muitas funções que beneficiam o organismo que os produz, e estes apresentam diferentes estruturas químicas, assim como atividades biológicas variadas, da qual são tiradas informações obtidas dos microrganismos e essas informações são relevantes para a classificação e identificação (WAN & JIANG, 2016; KATAK et al, 2020). Estudos sobre a prospecção química e biológica de produtos naturais oriundos de microrganismos como fungos e bactérias revelaram que estes organismos são considerados um grande reservatório para a produção de metabólitos biologicamente ativos. Cada espécie ou gênero produz compostos e moléculas específicos em seu metabolismo servindo estes tanto para funções fisiológicas quanto predatórias ou de interação entre microrganismos (O'BRIEN AND WRIGHT, 2011). A busca de novos compostos com atividades inseticidas é desafiadora, porém a busca de metabólitos secundários produzidos por microrganismos ainda representa uma importante fonte de compostos com potente atividade biológica contra diversos microrganismos patogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral:

Avaliar o potencial biológico de bactérias amazônicas isoladas de sedimentos para o controle de *Aedes aegypti* em condições de laboratório.

3.2.Específicos:

- Isolar linhagens bacterianas de sedimentos do fundo de lagos do município de Parintins/AM;
- Selecionar bactérias com patogenicidade para larvas de *Ae. aegypti* por meio de bioensaios;
- Identificar as linhagens ativas pelo sequenciamento do gene *16S rRNA* ;
- Avaliar o potencial larvicida de extratos metabólicos produzidos por linhagens bacterianas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Criação e manutenção das larvas de *Aedes aegypti*

Para a criação das larvas de *Ae. aegypti* foram utilizados ovos oriundos da colônia mantida no insetário do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue do INPA (o SISBIO/74091-1/2020–2021). Os ovos foram colocados em bandejas retangulares contendo água destilada para a eclosão das larvas, com adição de alimento que consistiu na mistura de ração para roedores (Teklab global[®]) e da ração para gatos Wiskas[®], na proporção de 1:1 (LIMA et al., 2009). As larvas foram mantidas em temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa em torno de 70 a 80% e fotoperíodo de 12L:12E. Foram selecionadas para os bioensaios larvas de 3º estágio (L3), e as demais permaneceram na bandeja até a fase de pupa. Em seguida, as pupas foram separadas e transferidas para copos de plásticos contendo 100 mL de água e inseridas em gaiolas padronizadas para a emergência dos adultos e manutenção da colônia (Figura 2).

Para a alimentação dos machos e fêmeas, foi adicionada a um *Erlenmeyer* solução de sacarose a 10% embebido em um pavio confeccionado com gaze e algodão. No repasto sanguíneo das fêmeas utilizou-se hamsters (*Mesocricetus auratus*) devidamente anestesiado, conforme o procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA 01280.000901/2023-60).

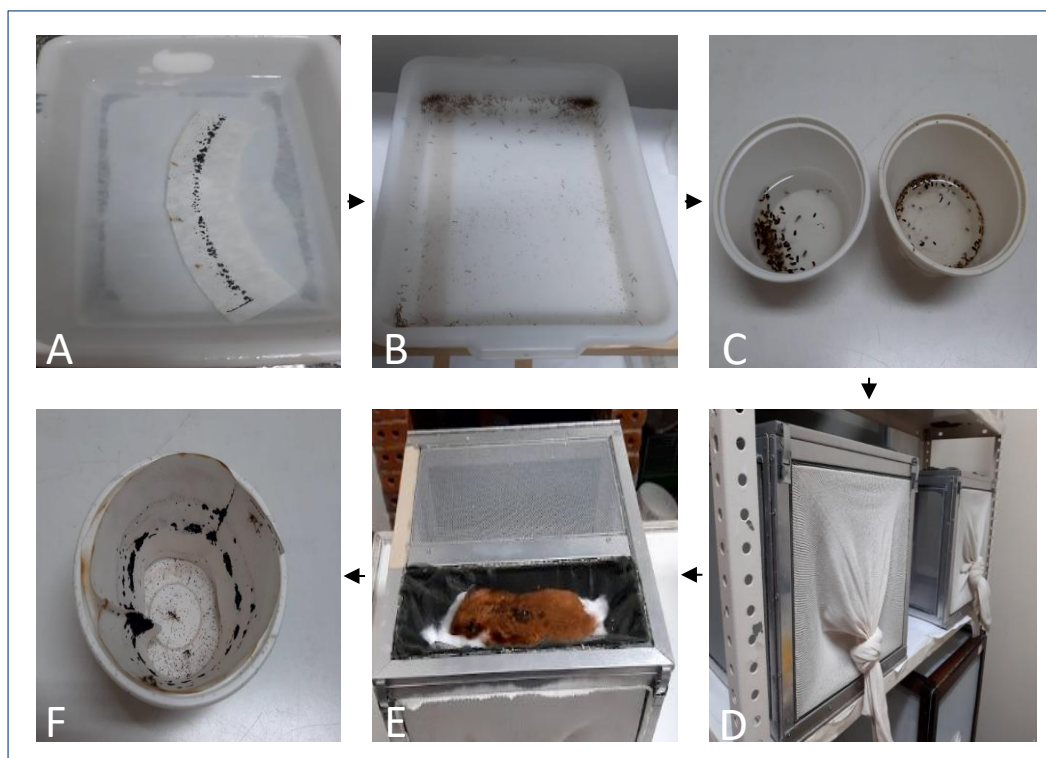


Figura 2: Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório para realização dos bioensaios. A: Disposição dos ovos em bacias com água; B: Larvas após eclosão; C: Pupas; D: Gaiolas para mosquitos adultos; E: Repasto sanguíneo; F: Ovos de *Aedes aegypti*.

4.2. Coleta das amostras

As amostras de sedimentos do fundo de lagos foram coletadas no município de Parintins, Estado do Amazonas, Brasil. A coleta do material biológico foi realizada sob a permissão oficial 87276-1 concedida pelo 'Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade' (SISBIO) do Ministério do Meio Ambiente (MMA).

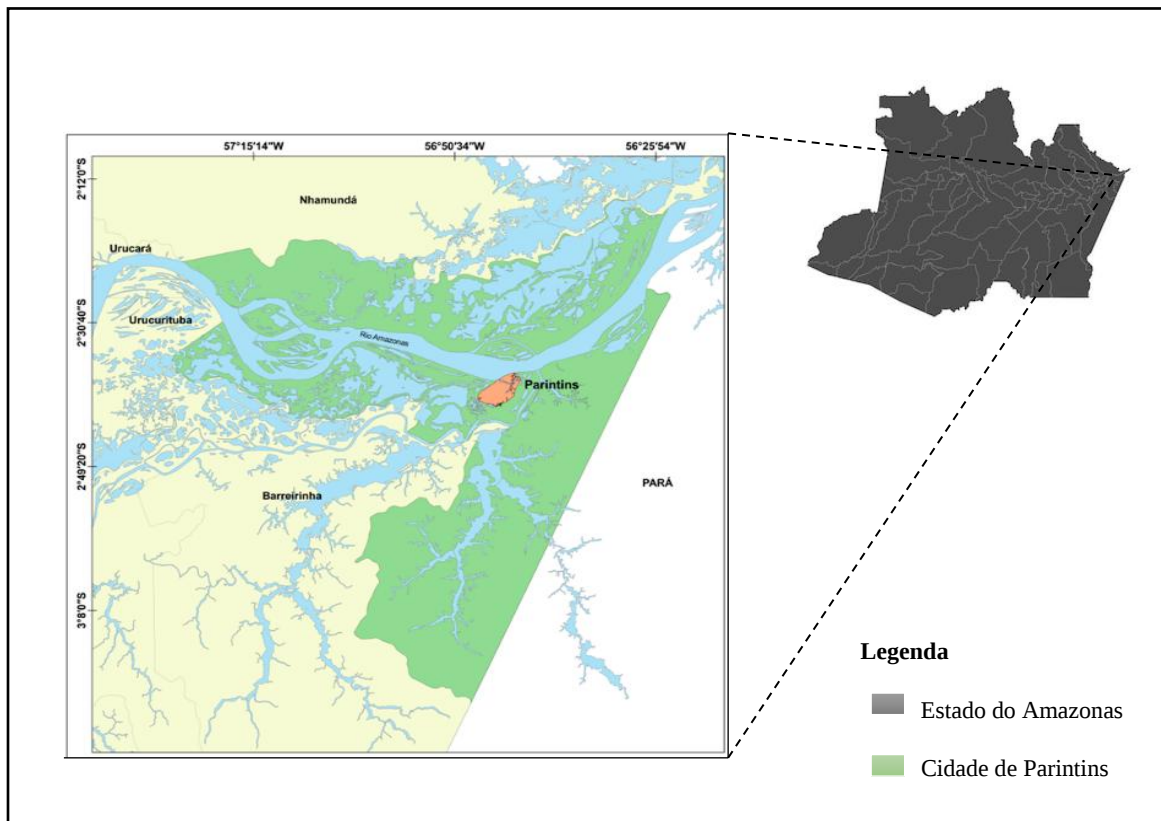


Figura 3: Locais de coleta de amostras. Coordenadas GPS, datas de coletas e as descrições dos locais de coleta estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Localização e características dos locais de coleta

Município	Local de Coleta	GPS - Coordenadas	Descrição	Tipo de amostra
Parintins	P1	Macurany 2° 40' 11.016" S 56° 44' 43.512" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago
	P2	Macurany 2° 40' 14.5" S 56° 44' 46.68" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago
	P3	Macurany 2° 40' 30.5724" S 56° 45' 48.7296" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago
	P4	Parananema 2° 40' 59.5" S 56° 46' 43.4" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago
	P5	Aninga 2° 40' 9" S 56° 46' 44" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago
	P6	Aninga 2° 40' 9" S 56° 46' 44" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago
	P7	Aninga 2° 40' 15" S 56° 47' 45" W	Lago natural	Sedimentos de fundo do lago

Para a coletas das amostras foram utilizados os seguintes materiais: bandejas plásticas retangulares e pipetas de plásticos previamente esterilizados com álcool 70% e expostos a luz ultravioleta por 15 min, outros materiais como tubos Falcon de 50 mL e espátulas foram esterilizados em autoclave à temperatura de 127° por 20 min.

As amostras de sedimentos dos lagos foram realizadas em profundidade de 1,5 metro, por meio da utilização de uma draga. Todas as amostras foram colocadas individualmente em tubos Falcon de 50 mL com auxílio de espátulas, armazenadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas ao Laboratório de Malária e Dengue – INPA para a realização das etapas posteriores.

4.3. Isolamento bacteriano das amostras de sedimentos do fundo de lagos

Para a diluição das amostras foram retirados 1 g das amostras e adicionados em tubos Falcon de 50 mL, com 10 mL de água destilada esterilizada, as amostras foram rotacionadas em Vórtex por 10 min. Em seguida foi feita a diluição seriada até 10⁻³ mL.

No isolamento das bactérias foram utilizados 20 µL das diluições das amostras de sedimentos. As amostras foram espalhadas com o auxílio de uma alça de vidro do tipo drigalsk em meio de cultivo sólido BDA (200g/L batata, 20g/L dextrose e 2g/L extrato de levedura) e Nutriente Ágar Kasvi® (5g de tecido animal, 5g cloreto de sódio, 1.5g extrato de carne, 1.5g de extrato de levedura) contidos em placas de Petri de 9 cm de

diâmetro. Em seguida, as placas foram vedadas com filme de cloreto de polivinil (PVC) e identificadas de acordo com a origem e armazenadas em estufa incubadora do tipo BOD à temperatura de 29 °C para o crescimento das bactérias por um período de 120 horas.

Após esse período, as colônias bacterianas crescidas nas placas foram isoladas, com o auxílio de uma alça de platina, por meio da técnica do esgotamento por estrias cruzadas a partir de uma única colônia. Para impedir o crescimento de fungos no meio de cultivo, foram adicionados fluconazol a 20 µm/mL. Todos os meios de cultivo, bem como placas de Petri e outras vidrarias foram esterilizados em autoclave à temperatura de 127 °C por 15 min à 20 min.

4.4. Caracterização morfológica das bactérias

As colônias bacterianas crescidas foram utilizadas para a técnica de coloração de Gram, para caracterização da parede celular se positivo ou negativo e a forma celular (bastonete, coco, espirilo e outras). Inicialmente, foram adicionados 10 µL de água destilada esterilizada em lâminas de vidro esterilizadas. Em seguida, foi adicionada uma colônia isolada de bactéria com uma alça de platina flambada em bico de Bunsen, a colônia foi friccionada e espalhada na lâmina para a homogeneização e fixação. Posteriormente, foi adicionado os reagentes, primeiro o reagente cristal violeta de genciana por 1 min e em seguida lavada em água corrente. Em seguida, usou-se o lugol por 60 s e o descolorante de solução álcool-acetona durante 15 s, seguido de lavagem em água corrente. Por último, foi adicionada a solução de Fucsina durante 30 s e lavadas novamente em água corrente. Após esse procedimento, as lâminas secas, foram visualizadas em microscópio óptico na lente objetiva de 100X, utilizando-se óleo de imersão (Martinez e Taddei, 2008).

4.5. Preservação das bactérias

Após o isolamento e visualização das bactérias no microscópio, uma colônia de cada bactéria foi colocada em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura líquido BDA e NB, em seguida foram armazenados em estufa rotativa à 180 rpm por 24 h para crescimento bacteriano. Após essa etapa, foram utilizados 800 µL do cultivo bacteriano, da qual foram adicionados em microtubos de 2 mL previamente esterilizados com a adição de 20% de glicerol, em seguida os microtubos foram armazenados em freezer a -

20°C (DE VOS et al., 2009; ROCHA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2024). As linhagens bacterianas foram armazenadas na coleção de bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue - INPA.

4.6. Ensaios biológicos

4.6.1. Reativação e condições de cultivo das linhagens bacterianas

Neste estudo, foram utilizadas as 50 linhagens obtidas do isolamento das amostras coletadas nos três locais. Como controle positivo utilizou-se a linhagem padrão *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Bti AM65-52 obtida da reativação do produto comercial Vectobac® WG para comparar a atividade larvicida das linhagens isoladas.

As linhagens foram reativadas em placa de Petri nos respectivos meios que foram preservados contendo Ágar Nutriente (NA) e Batata Dextrose Ágar (BDA) à 30 °C durante 24 horas. Após isso, uma colônia de cada bactéria foi adicionada em 3 mL dos respectivos meios por 180 rpm, 30 °C durante 24 horas. Em seguida, 20 µL do pré-inóculo foi adicionado em 5 mL dos respectivos meios. Os cultivos foram agitados em 180 rpm, 30 °C durante 72 horas.

4.6.2. Bioensaios seletivos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue do INPA. Os ensaios foram realizados em copos descartáveis de 50 mL, contendo 9 mL de água destilada, 1 mg de ração para alimentação das larvas, 10 larvas de *Ae. aegypti* e 1 mL ($\sim 24 \times 10^8$ células/mL) de cada cultivo bacteriano (OMS, 2005, KATAK et al., 2021). A mortalidade das larvas foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de exposição aos cultivos bacterianos. Para o controle positivo utilizou-se a linhagem padrão AM 65-52 nas mesmas condições anteriores e para o controle negativo utilizou-se as mesmas condições, sem cultivo de bactérias. Os experimentos foram realizados em condições controladas, com temperatura de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 70 a 80%, fotofase de 12L:12D. Todos os testes foram realizados em quintuplicata. As linhagens que apresentaram mortalidade acima de 50% foram selecionadas para os bioensaios posteriores.

4.6.3. Bioensaios com o sobrenadante secretado e os componentes celulares das bactérias

Na realização dos bioensaios foram utilizados o sobrenadante secretado (SUP) e os componentes celulares (PEL) das linhagens P2LM3NA e P2LM5NA da qual obtiveram 100% de mortalidade e em larvas de *Ae. Aegypti* nos testes preliminares incluindo a linhagem padrão BtAM65-52.

4.6.4. Escala preparativa para o de cultivo das linhagens bacterianas

As linhagens foram cultivadas no respectivo meio de preservação Nutriente Ágar (NA) Kalsvi® (5g de tecido animal, 5g cloreto de sódio, 1.5g extrato de carne, 1.5g de extrato de levedura). Posteriormente, em tubos de ensaios contendo 5 mL do meio líquido Nutriente Broth foi adicionado uma colônia de cada linhagem e incubados na estufa rotativa a 30 °C, 180 rpm, por 24 h. Após isso, 100 µL do cultivo de cada linhagem foram transferidos para *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 100 mL dos respectivos meios em quintuplicata. Os cultivos bacterianos foram incubados a 30 °C, 180 rpm por 120 horas, até atingir o nível 8 de crescimento comparado a turbidez da escala de Macfarland (24×10^8 cel/mL). Em seguida, 40 mL das amostras foram distribuídas em tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 4 °C e 5000 xg por 40 min. O pellet foi congelado a -80 °C por 1h e submetido à liofilização (Liofilizador-Enterprise I, TERRONI) por 48 h a 150 mmHg. Em seguida, obteve-se o peso bruto e os valores de rendimento da biomassa de cada amostra. O sobrenadante foi filtrado sob o sistema de vácuo em membrana Millipore 0,22 µM com auxílio de bomba de vácuo, visando a ausência de células bacterianas (DAHMANA et al., 2020; KATAK et al., 2021).

4.6.5. Montagem dos bioensaios

Inicialmente as amostras dos componentes celulares (PEL) foram preparadas da seguinte forma: 50 mg das amostras foram pesadas e adicionados 10 mL de água destilada, posteriormente foram homogeneizados em vórtex por 10 minutos para obter a concentração 5 mg/mL.

Os ensaios biológicos com os componentes celulares e os sobrenadantes secretados das linhagens foram realizados em quintuplicata, onde foi preparado uma réplica de cinco copos plásticos de 150 mL, contendo 120 mL de água destilada, 20 larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, 1 g de ração e as concentrações de 0.04, 0.03, 0.02 e 0.01 mg/mL do pellet e alíquotas de 1000, 500, 250, 125 µL do sobrenadante. A leitura de mortalidade foi avaliada no intervalo de 24h após a exposição. Os experimentos foram realizados de acordo com a metodologia de Dimalge et al (1990) e WHO (2005) com algumas modificações.

4.6.6. Produção de extratos metabólicos das linhagens bacterianas

As linhagens que apresentaram atividade larvicida nas frações do sobrenadante e dos componentes celulares foram utilizados nesta etapa. O sobrenadante e o componente celular das linhagens foram obtidos de acordo com as etapas descritas anteriormente.

Os componentes celulares das linhagens foram recobertos com Metanol (MeOH) e Acetato de etila (AcOEt) na proporção 1:1. O SUP obtido das cepas foi recoberto com 20% da mistura de Acetato de etila (AcOEt) e Isopropanol (iPr-OH) 9:1 volume/volume (v/v).

O componente celular das réplicas das mesmas linhagens foram reunidos e macerados com a mistura de MeOH e AcOEt 1:1 por 48 h, depois filtrado para a obtenção dos extratos. Todos os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida com bomba de vácuo e mantidos em dessecador com sílica ativada. Após secos, os extratos foram pesados e armazenados para os estudos posteriores.

Para a obtenção dos extratos metabólicos do sobrenadante foi adicionado ao sobrenadante, 20% de uma solução contendo Acetato de Etila (AcOEt) e Isopropanol (iPr-OH) na proporção de 9:1 volume/volume (v/v) (Souza, 2004). Após a homogeneização, as amostras foram armazenadas por 48h. Posteriormente, foi realizada a técnica de partição líquido-líquido desta mistura, em funil de separação, utilizando 20% da mistura de AcOEt e iPrOH na proporção de 9:1 (v/v). Essa etapa foi repetida três vezes. Em seguida, as amostras foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida com bomba de vácuo (MaxPump) e temperatura de 30 °C. Os extratos obtidos foram secos em dessecador com sílica ativa, pesados para a análise dos rendimentos e armazenados para os estudos posteriores.

4.6.7. Ensaio larvícida com os extratos

Os ensaios biológicos foram realizados em triplicata, onde foi preparada uma réplica de três copos plásticos contendo 10 mL de água destilada, 10 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*, 1 g de ração para as larvas, e os extratos das linhagens bacterianas, na concentração de 100, 60, 35 µM/mL. Como controle negativo foi usado DMSO (Dimetilsulfóxido), nas mesmas condições. Para o controle positivo foi utilizado o inseticida comercial Natular DT Espinosade constituída dos metabólitos (espinosina A e D) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a aplicação dos extratos metabólicos, as leituras de mortalidade ocorreram nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os bioensaios foram conduzidos em condições controladas, com temperatura de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 70 a 80%, fotofase de 12L/12D. Os extratos metabólicos que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50% foram considerados tóxicos para as larvas de *Ae. Aegypti*. Os dados de mortalidade foram calculados por meio da fórmula:

$$\% = \frac{\text{Quantidade de larvas mortas}}{\text{Dividido pelo número total de larvas}} \times 100$$

4.7. Identificação molecular das linhagens bacterianas ativas contra *Aedes aegypti*

As duas linhagens (P2LM3/NA e P2LM5/NA) ativas para larvas de *Ae. aegypti* foram identificadas por meio do sequenciamento do gene *16s rRNA*.

4.7.1. Extração de DNA Genômico

Para o isolamento do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), seguindo as seguintes condições. As bactérias foram reativadas nos respectivos meios de cultivo (NA, BDA) e armazenadas em estufa BOD a 29 °C durante 24h. 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 em seguida incubados em estufa rotativa a 180 rpm, a 29 °C, durante 24 h. Em seguida, foram realizadas as seguintes etapas: i) centrifugação a 12.000 rpm em 10 min; ii) remoção do sobrenadante; iii) adição de 700 µL de CTAB; iv) transferência da amostra para um

microtubo de 2 mL, contendo 0,5g de sílica em pó; (v) maceração das amostras em Tissuelyser, em rotação máxima por 6 minutos; vi) incubação a 65 °C em banho maria, durante 30 min, sendo que a cada 10 min, os tubos foram agitados para homogeneizar a suspensão; vii) adição de 600 µL do solvente orgânico de extração CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) e homogeneização das amostras invertendo as mesmas durante 5 minutos; viii) centrifugação a 12000 rpm durante 5 min; xix) com cuidado para evitar perturbar a interface entre as fases formadas, a fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo; x) seguido da adição de 2/3 de isopropanol frio (-20 °C) e homogeneização para precipitar os ácidos nucleicos, e posterior armazenamento a -20 °C por 30 min; xi) centrifugação a 7500 rpm durante 5 min, e em seguida o sobrenadante foi descartado; xii) lavagem do pellet duas vezes em 1mL de etanol a 70%, deixando imerso o pellet durante 5 min cada vez, posteriormente em 1 mL de etanol a 95% durante 3 minutos. Após a retirada máxima de etanol, o pellet foi seco em fluxo laminar; xiii) em seguida foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE, contendo 10 µg/mL de RNA. Em seguida incubado a 37 °C por 60 min para a ingestão de RNA.

Para estimar a concentração do DNA por µL e consequentemente a quantidade total de DNA extraído foi feito uma corrida de um minigel de eletroforese a 1,0%. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis, e armazenado a -20 °C para a realização das etapas posteriores.

4.7.2. Amplificação do gene 16S rRNA

O DNA das linhagens P2LM3/NA e P2LM5/NA bactérias ativas para *Ae. aegypti* 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 de µl contendo: 2,5 µl de tampão de PCR 10X; 0,5 µl de MgCL₂ 25 mM; 1 µl (10 pMol) de primer 5µM (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 min, seguido de 40 ciclos [94°C por 20s, 59°C por 30s, 72°C por 60s], seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os fragmentos do gene *16S rRNA* amplificados na PCR 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 1:20h 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).

4.7.3. Sequenciamento do gene *16S rRNA*

O produto da reação de PCR de amplificação do gene *16S rRNA* foram purificados através da ação de duas enzimas, a Exonuclease (Exo) e a Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ExoSAP. Inicialmente, adicionou-se 5 µl do produto da PCR de cada amostra em poços de uma placa de PCR, e em seguida, foi adicionado 0,5 µl de ExoSAP individualmente. A placa contendo as amostras foi incubada em termociclador durante 15 min a 37°C e posteriormente por 15 min 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 de amplificação do *16SrRNA*. Em seguida, amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 2000 rcf por 30 seg 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 min, seguido de desnaturação das fitas moldes a 96 °C por 10 s, pareamento do primer a 50 °C por 5 s, extensão a 60 °C por 4 min.

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).

4.7.4. Análise das sequências consenso

A qualidade dos eletroferogramas gerados a partir da leitura do 3500 Genetic Analyzer foram analisados utilizando o programa MEGAX. As atribuições taxonômicas das bactérias isoladas foram baseadas em comparações de sequências de consenso com sequências do gene *16S rRNA* no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://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 ([//rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp)).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Isolamento das bactérias

Foram isoladas 50 linhagens bacterianas de amostras de sedimentos de riachos e lagos, sendo vinte três linhagens no meio NA (23) e vinte e sete no BDA (27) (Figura 4). Estes isolados foram obtidos de sete pontos de três locais de coletas na cidade de Parintins/AM, sendo dezenove do Lago do Macurany, dezesseis do Lago do Parananema e quinze do Lago do Aningá.

O Lago do Macurany, possui uma região de contraste quanto à ocupação urbana e a presença de vegetação, no qual há muita atividade antrópica. Os lagos Parananema e Aningá estão localizados na área periurbana de Parintins-AM, sendo as suas margens ocupadas predominantemente por vegetação, embora existam pequenas comunidades nas proximidades de ambos (SOUZA, 2013). Quanto ao potencial da fauna e da flora desses lagos ainda não foram explorados, principalmente quanto a composição microbiana dessa Região, no qual podem ser fontes promissoras para diversas pesquisas biológicas.

Diante disso, a introdução de sedimentos e matéria orgânica proporciona os elementos fundamentais para formar a estrutura física do habitat, oferece abrigos e, substratos. Além disso, serve como reservatório e fonte de nutrientes essenciais para manter a vida das plantas e animais aquáticos. Estes organismos desempenham um papel crucial na purificação da água, na decomposição e no ciclo de nutrientes. Além disso, os sedimentos de lagos de água doce podem conter uma variedade de substâncias químicas. Portanto, hospedam uma elevada biomassa microbiana que, juntamente com a atividade, é geralmente mais elevada perto da superfície do sedimento e continua a diminuir com a

profundidade. Diante disso, as bactérias constituem um componente importante da cadeia alimentar, do processo de decomposição e da ciclagem de nutrientes.

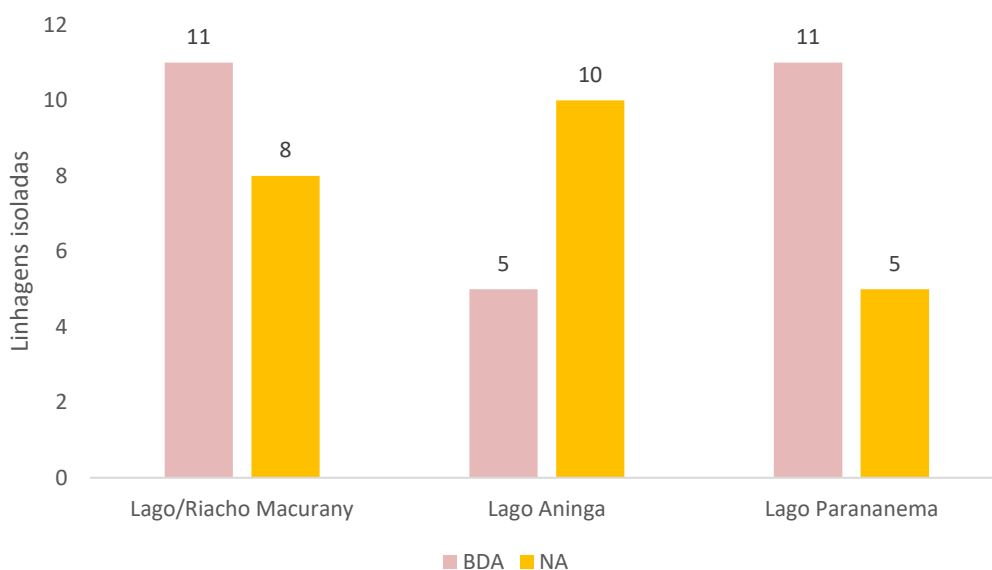


Figura 4. Quantidade de bactérias isoladas em meio de cultivo BDA e NA dos lagos Macurany, Parananema e Aninga, localizados no município de Parintins/AM.

Os diferentes meios de cultivos são essenciais para selecionar diferentes microrganismos, no qual esses podem expressar diferentes fenótipos e genótipos importantes para novas descobertas. A grande diversidade microbiana faz com que os microrganismos reajam de forma diferente quando cultivados em condições diversas de meios de cultivo, tais como fontes de carbono, nitrogênio, pH, temperatura, pressão de oxigênio (SALANITRO et al., 1974; PAYNE E MORTON, 1992; SON et al., 2002; CHO E GIOVANNONI, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; LEITE, 2012). Essas diferenças de meios de cultivos podem também favorecer o crescimento de microrganismos na presença ou ausência de oxigênio, visto que essas linhagens foram isoladas de uma profundidade de 1,5 metros de sedimentos de lagos amazônicos.

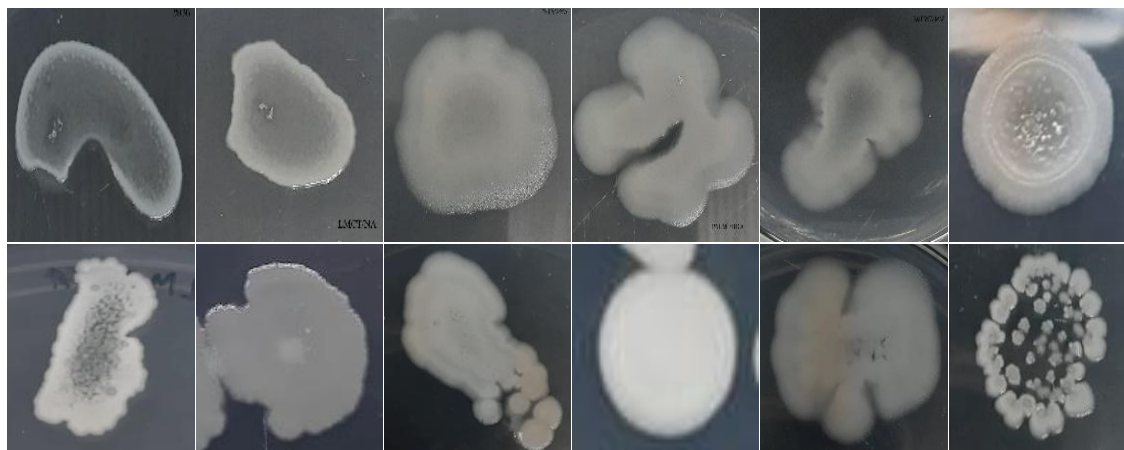
Existem poucas evidências de isolamento de bactérias nessa região, uma vez que esses microrganismos podem apresentar um grande potencial metabólico inexplorado para diversas aplicações. Diante disso, este estudo são os primeiros relatos da diversidade de microrganismos cultiváveis isolados desses ambientes, sendo necessários mais estudos e mais evidências para caracterizar a microbiota dessa localidade.

O isolamento de novas linhagens bacterianas é uma oportunidade para descobrir novos agentes, além disso, conhecer o potencial desses microrganismos em diversas aplicações sejam para área da saúde, agroindústria e biotecnológica.

5.2. Caracterização morfológica das bactérias

Os resultados observados da caracterização macro e micromorfológica das linhagens mostraram que as colônias bacterianas apresentaram variações morfológicas distintas, como diâmetro, forma, elevação, textura da superfície, cor, consistência e forma de adesão das mesmas em meios de cultura. Partindo dessas características morfológicas, verificou-se que entre as 50 colônias bacterianas isoladas, 25 apresentaram forma irregular, 12 forma circular, 8 puntiforme, 4 rizoide e 1 fuziforme. As margens das colônias foram divididas em ondulada (21), inteira (15), lobulada (13) e fusiforme (1) (Quadro 1 e Tabela 3). Destas 50 linhagens, oito apresentaram características de Gram negativas e 42 Gram positivas. A biotipagem e a seleção fenotípica é fundamental para auxiliar no isolamento e na caracterização de microrganismos.

Quadro 1: Morfologia das colônias bacterianas por características macro e micromorfológicas. Caracterização macro e micromorfológica de linhagens bacterianas isoladas de sedimentos nos meios de cultivo NA e BDA.



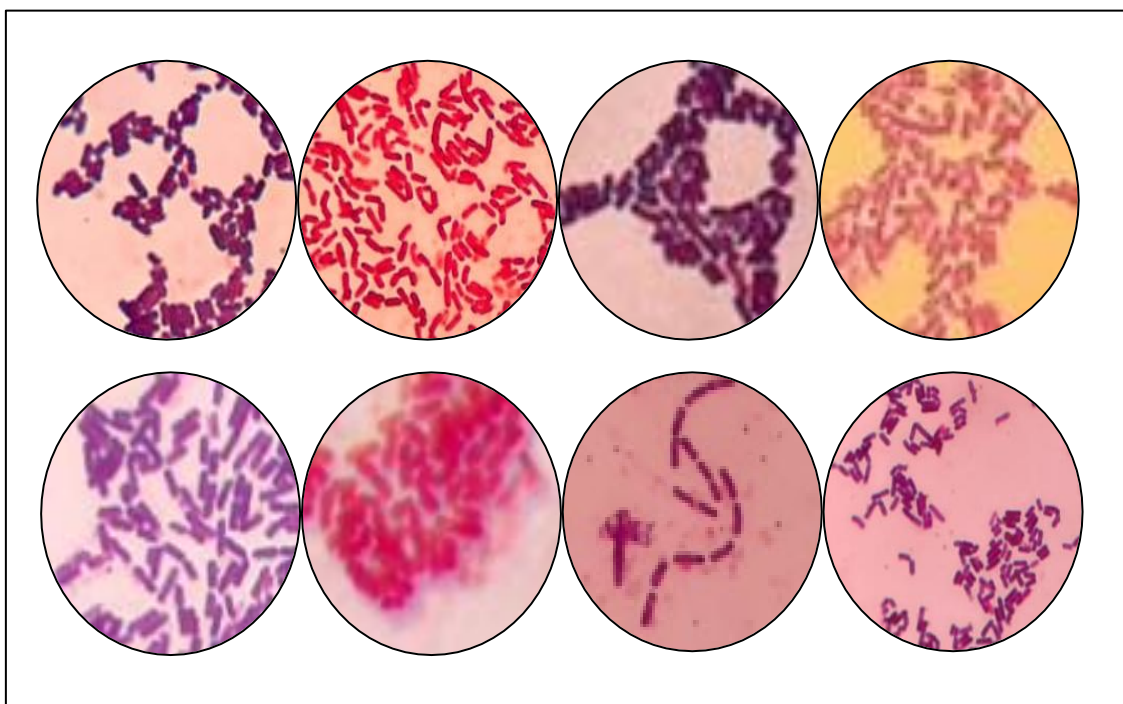


Figura 5: Morfologia microscópica das linhagens bacterianas, mostrando bactérias gram positiva e negativa.

Estas colônias bacterianas foram isoladas em dois meios de cultivos, vale salientar que as características fenotípicas mudam de acordo com o meio de cultivo selecionado, pois, a composição do meio de cultivo, bem como as condições de incubação podem exercer forte influência na variedade nos fenótipos dessas bactérias. Segundo Hungria e Silva (2011), as características fenotípicas de um determinado microrganismo são instáveis, dependendo do ambiente que se encontram, ocorrem alterações e pode haver diferenças em cada meio de cultivo. Portanto, podemos ver no quadro 1 as diferenças fenotípicas das linhagens, em como elas diferem uma das outras.

A identificação de espécies microbianas por métodos fenotípicos, como morfologia, bioquímica, coloração de gram e dentre outros, pode ser incerta, complicada e demorada. Por outro lado, análises morfológicas são de grande importância para a avaliação da diversidade bacteriana, visto que serve como complemento para outras análises polifásicas, como técnicas moleculares e quimiotaxômicas.

Segundo Sousa et al. (2013), a taxa de crescimento, densidade de colônias nas placas, meios de cultivo, formação de biofilme, características genéticas da bactéria podem interferir nos aspectos das colônias. Contudo, além da análise microscópica de bactérias, o registro das colônias do crescimento microbiano, na escala macroscópica, é

de grande importância para a avaliação de diversidade, pois serve como um complemento importante para as análises genéticas (FONSECA et al., 2000; PRAYITNO E ROLFE, 2010; COBO et al., 2017).

Tabela 3. Características fenotípicas de linhagens bacterianas isoladas de ambientes amazônicos.

NUM	CÓD LINHAGEM	FORMA	MARGEM	SUPERFÍCIE	CONSISTENCIA	COLORAÇÃO	DENSIDADE	ELEVAÇÃO
1	P2SLNA	irregular	inteira	brilhante	mucosa	branca	translúcida	plana
2	LMCTNA	irregular	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translúcida	plana
3	P3LMNA	puntiforme	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translúcida	convexa
4	P4LM4NA	irregular	ondulada	brilhante	seca	branca	opaca	elevada
5	P4LM2NA	irregular	ondulada	rugosa/lisa	seca	branca	opaca	convexa
6	P6LMNA	irregular	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translúcida	irregular
7	P6LM1NA	irregular	lobulada	rugosa	seca	branca	opaca	convexa
8	LMCT2NA	irregular	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translúcida	plana
9	JP1BDA	irregular	ondulada	brilhante	mucosa	branca	opaca	elevada
10	P1LMBDA	puntiforme	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translúcida	irregular
11	P1LMNA	circular	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translúcida/opaca	plana
12	P6LM1BDA	irregular	lobulada	rugosa/lisa	seca	branca	opaca	elevada
13	P6LM2NA	irregular	ondulada	lisa	seca	branca	opaca	plana
14	P2LM2NA	circular	ondulada	rugosa/lisa	seca	branca	opaca	plana
15	P2SL2NA	irregular	ondulada	rugosa	mucosa	branca	opaca	plana
16	P2LMNA	irregular	lobulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
17	P4LMNA	circular	inteira	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
18	P4LM3NA	circular	inteira	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
19	P2LM4NA	circular	inteira	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
20	P2LM5NA	irregular	lobulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
21	P4LM3NA	irregular	lobulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	irregular
22	P2LM6BDA	circular	inteira	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
23	P2LM7BDA	irregular	lobulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
24	P2SL2BDA	irregular	lobulada	rugosa	seca	branca	opaca	irregular

25	JP5BDA	irregular	ondulada	lisa	seca	branca	opaca	plana
26	P4LM1BDA	puntiforme	inteira	brilhante	mucosa	branca	translucido	convexa
27	P2SL2BDA	irregular	ondulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
28	P6LM2BDA	irregular	lobulada	lisa	seca	branca	opaca/translucido	plana
29	P6LMNA	circular	inteira	lisa	seca	branca	opaca	plana
30	P6LM3NA	circular	inteira	rugosa	seca	branca	opaca	plana
31	P1LMBDA	puntiforme	inteira	lisa	seca	branca	opaca	plana
32	P2SLBDA	irregular	ondulada	rugosa	mucosa	branca	opaca	irregular
33	P3LM3.1BDA	puntiforme	inteira	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
34	P3LM3BDA	rizoide	lobulada	rugosa	seca	branca	opaca	plana
35	P4LMBDA	circular	fusiforme	brilhante	seca	branca	translucido	plana
36	P4LM1BDA.2	irregular	ondulada	rugosa	mucosa	branca	translucido	convexa
37	P2SLBDA	rizoide	lobulada	brilhante	mucosa	branca	translucido	convexa
38	P4LM1.2BDA	rizoide	lobulada	rugosa	seca	branca	opaca	plana
39	P4LM1BDA	fuziforme	ondulada	brilhante	seca	branca	translucido	plana
40	P2LM3NA	irregular	lobulada	brilhante	mucosa	branca	translucido	plana
41	JP5BDA2.1	circular	inteira	brilhante	mucosa	branca	translucido	plana
42	P4LM1BDA.2	irregular	ondulada	brilhante	seca	branca	translucido	plana
43	P4LM1.2BDA.2	rizoide	lobulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
44	P3LM2BDA	circular	inteira	lisa	seca	branca	opaca	plana
45	P6LMBDA	irregular	ondulada	lisa/rugosa	seca	branca	opaca	plana
46	P7LMBDA	circular	inteira	brilhante	seca	branca	opaca	convexa
47	LMCTBDA	puntiforme	ondulada	brilhante	mucosa	branca	translucido	irregular
48	P4LM1.2.2BDA	irregular	ondulada	rugosa	seca	branca	translucido/opaca	irregular
49	P4LM2BDA	puntiforme	inteira	brilhante	mucosa	branca	translucido	irregular
50	P4LM1.2BDA.2.2	puntiforme	inteira	brilhante	mucosa	branca	translucido	irregular

5.3. Bioensaios seletivos das linhagens bacterianas

A exposição de larvas de *Ae. aegypti* aos cultivos das bactérias revelaram que das 50 linhagens isoladas, cinco linhagens em meio NA e três linhagens em meio BDA apresentaram atividade larvicida acima de 50 % até 72 horas de exposição. As linhagens P2LM3NA, P2LM5NA, P6LMNA, P6LM2NA e P6LM3NA apresentaram 100% de mortalidade no intervalo de 24 horas. O mesmo perfil de mortalidade foi observado para a linhagem padrão AM62-52 (Figura 6). As demais linhagens apresentaram, no máximo, 30% de mortalidade até 72 horas de exposição.

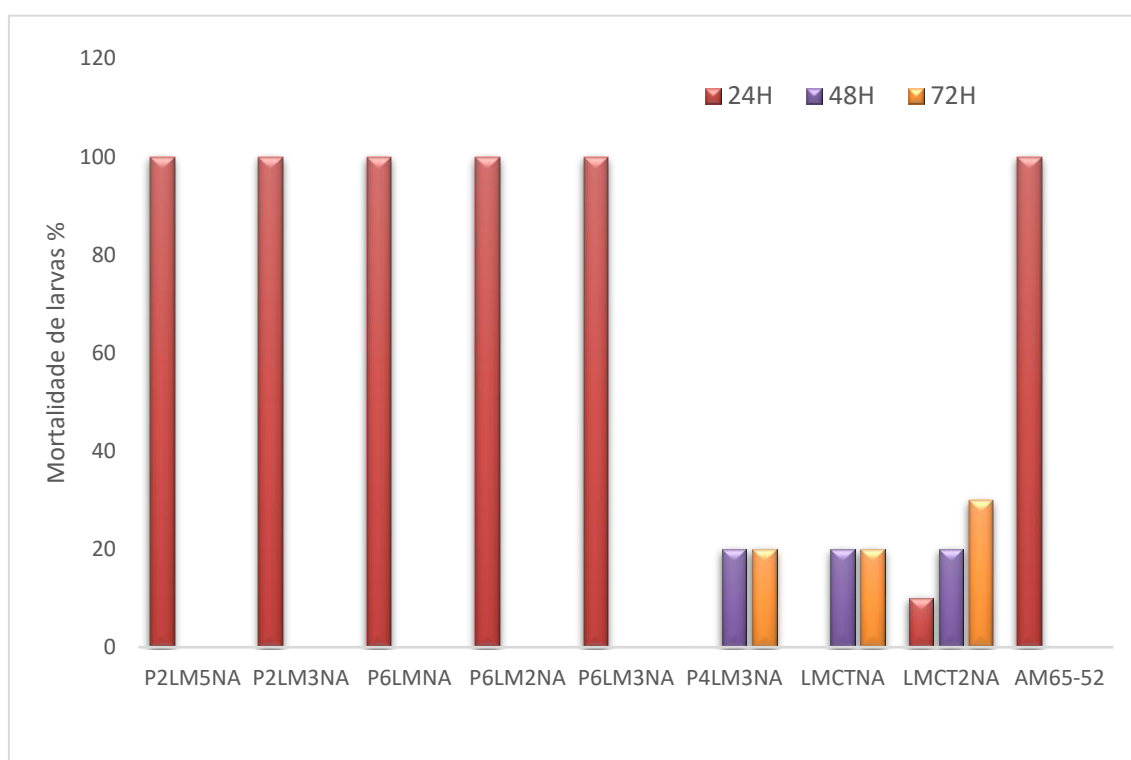


Figura 6: Percentual de mortalidade das larvas de *A. aegypti* após exposição em cultivos de linhagens bacterianas em meio NA em 24, 48, 72 h.

Em relação ao cultivo das linhagens isoladas no meio BDA, três linhagens apresentaram mortalidade acima de 50% no intervalo de 48 horas. As linhagens P4LM1BDA, P2SL2BDA e P4LM1BDA.2 apresentaram 100, 80 e 70% de mortalidade, respectivamente (Figura 7). Em relação a exposição no intervalo de 72 h, a linhagem P2SL2BDA apresentou 100 % de mortalidade.

As demais linhagens apresentaram, no máximo, 40% de mortalidade em até 72 horas de exposição (Figura 6).

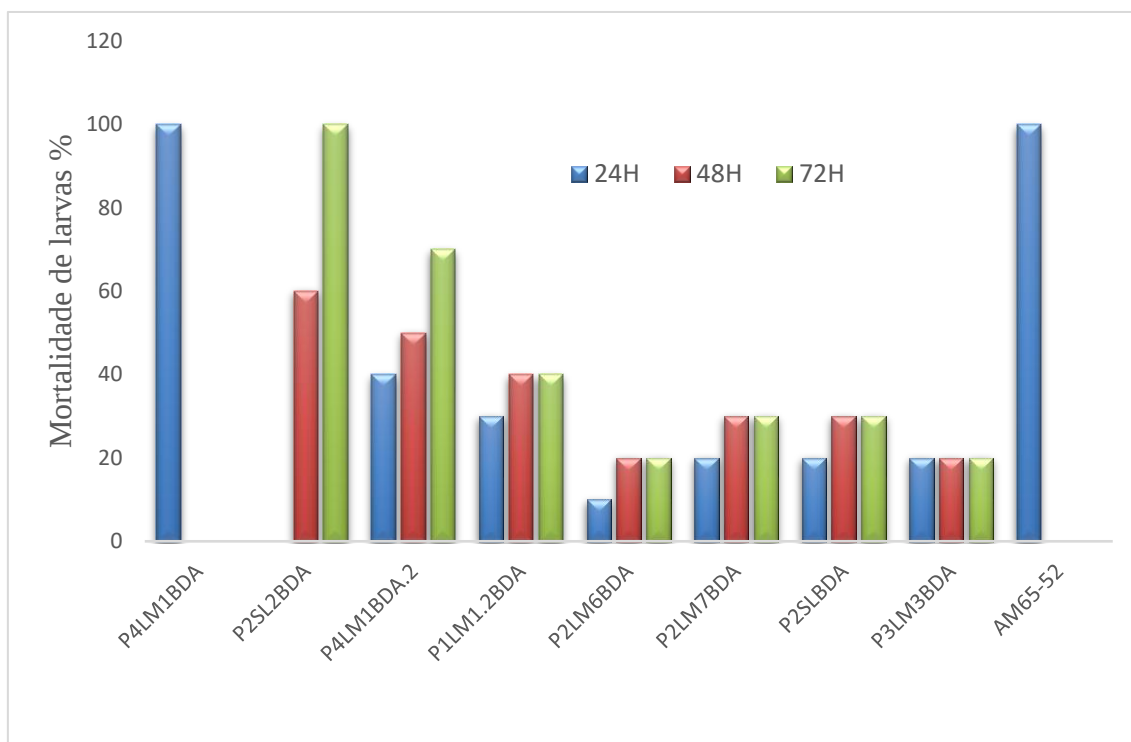


Figura 7: Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* após exposição em cultivo de linhagens bacterianas em meio BDA em 24, 48, 72 h.

Bactérias entomopatogênicas possuem um alto valor para utilização no controle biológico, pois produzem e secretam diversas moléculas com grande potencial inseticida ou podem contribuir para redução da competência vetorial (KATAK et al. 2023; SINGH et al. 2019).

As linhagens (P2LM5NA e P2LM3NA) pré-selecionadas com atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* após a exposição de 24 horas foram testadas em diferentes tempos de cultivos para observar se as mesmas ainda continuariam apresentando eficácia. Os resultados mostraram que as duas linhagens (P2LM5NA e P2LM3NA) nos cultivos de 48, 72, 96 e 120 horas, apresentaram 100% mortalidade em todos os tempos avaliados. O mesmo perfil de mortalidade foi observado para a linhagem padrão AM65-52 (Tabela 4).

Esses cultivos são necessários para a escala preparativa dos extratos, visto que a produção de metabólitos secundários de origem microbiana depende dos estágios de crescimento, como por exemplo, a fase vegetativa e estacionária, há uma curva de crescimento onde podemos observar que em cada estágio podem ser liberados moléculas

como proteínas, ativação enzimática e produção de metabólitos, na qual podem ser controlados variando o conteúdo de nutrientes presentes nos meios de cultura. Assim como também processos vitais das células microbianas, tais como a duplicação de cromossomos ou níveis intermitentes de atividades metabólicas primárias (SCHAREK-TEDIN et al., 2013; CORUJO et al., 2016). A atividade de biocontrole dessas linhagens podem ser mediadas por seus metabólitos secundários e primários, quanto mais metabólitos a bactéria produz, mais forte é a eficiência do biocontrole. As linhagens isoladas apresentam potencial larvicida quando comparadas a linhagem padrão, podendo ser um novo agente controle biológico de insetos vetores nessa região.

Tabela 4: Percentual de mortalidade das larvas de *A. aegypti* após exposição em linhagens bacterianas cultivadas em meio NB em 48, 72, 96 e 120h.

LINHAGENS	MEIO NUTRIENTE BROTH			
	48h (%)	72h (%)	96h (%)	120h (%)
P2LM5NA	100	100	100	100
P2LM3NA	100	100	100	100
AM65-52	100	100	100	100

Portanto, é importante conhecer parâmetros na produção dos extratos, uma vez que estas linhagens tem potencial larvicida e pode ajudar no controle vetorial. Diante disso podemos observar os parâmetros de pH, Nitrito, Glicose e Proteínas na produção de extratos das linhagens bacterianas (Tabela 5). Não foi possível mensurar a glicose no cultivo das linhagens bacterianas devido ao meio de cultivo utilizado, pois o mesmo é ausente de glicose. Diante desses resultados, torna-se necessário avaliar as fases de vida desses microrganismos e os parâmetros que influenciam a produção dos metabólitos, pois trata de linhagens isoladas de sedimentos de fundos de lagos amazônicos.

Tabela 5: Dados dos parâmetros observados na produção dos extratos das linhagens bacterianas.

Linhagens	pH	Nitrito	Glicose	Proteína
P2LM5NA	7	Negativo	Negativo	Positivo
P2LM3NA	7	Negativo	Negativo	Positivo

5.3.1. Bioensaios com o sobrenadante secretado (SUP) e os componentes celulares (PEL) das linhagens bacterianas

As frações do sobrenadante secretado das linhagens P2LM3NA e P2LM5NA mostraram baixa atividade larvicida. A mortalidade foi de 10 e 5% para as linhagens P2LM3NA e P2LM5NA utilizando 1000 µL do sobrenadante, respectivamente (Figura 8). Segundo Dahmana et al (2020), a baixa mortalidade das larvas expostas ao sobrenadante de linhagens bacterianas pode estar relacionada à baixa ou ausência de metabólitos ativos secretados do sobrenadante ou a produção de seus metabólitos ativos necessita de uma otimização dos parâmetros para garantir a produção ideal.

Por outro lado, os componentes celulares (PEL) das linhagens P2LM3NA e P2LM5NA causaram 100% de mortalidade nas larvas de *A. aegypti* em todas as concentrações testadas (0.04, 0.03; 0.02 e 0.01 mg/mL) (Figura 8). O mesmo perfil de mortalidade foi observado para linhagem padrão AM65-52. Segundo Muniaraj et al (2012), larvas de *Ae. aegypti* se alimentam por infiltração, ingerindo diversos sedimentos presentes em seu habitat, assim como diversos microrganismos ativos como bactérias e fungos. Com isso, ao ingerir esporos ou células bacterianas, estes secretam enzimas, toxinas ou outros metabólitos inseticidas, o que pode causar a patogenicidade ou morte das larvas. Outro ponto importante que podemos citar é que quanto mais velho o estágio larval, menor é a sensibilidade à toxina bacteriana, pois as larvas em seu quarto estágio (L4) apresentam hábitos alimentares menores, em comparação com as larvas mais jovens, resultando na redução do consumo de toxinas bacterianas.

Vários estudos de grandes coleções de microrganismos já identificaram diversas espécies de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Brevibacillus* entre outros com atividade biológica agindo de forma direta nos organismos alvos (microparasitismo), incluindo a atividade inseticida (DARRIET et al., 2022.; FAVRET et al., 1985.; ORLOVA et al., 1998). Os componentes celulares podem conter uma variedade de fatores de virulência como, esporos, proteínas inseticidas e moléculas citoplasmáticas desconhecidas (VILAS-BÔAS et al., 2012). Dahmana et al (2020) encontraram frações ativas dos componentes celulares de linhagens de *Streptomyces* e *Bacillus* ativos contra *Ae. albopictus*. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com o estudo de Katak et al (2021), no qual relataram atividade larvicida dos componentes celulares de linhagens de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp. contra larva de *Ae. aegypti*.

Os resultados das linhagens P2LM3NA e P2LM5NA mostraram que esses microrganismos apresentam o mesmo perfil de mortalidade que a linhagem padrão AM 65-52. Com isso a busca por novas moléculas inseticidas e novos agentes entomopatogênicos que sejam ecologicamente seguras para o meio ambiente é uma necessidade mundial devido ao grande número de espécies de mosquitos resistentes aos inseticidas químicos (DHANASEKARAN et al, 2014; RAOULT et al, 2017).

Dessa forma, identificar os princípios ativos e os mecanismos são etapas cruciais para serem realizados em pesquisas posteriores, uma vez que é uma oportunidade para encontrar novas moléculas ou agentes de controle biológico para mosquitos vetores de doenças.

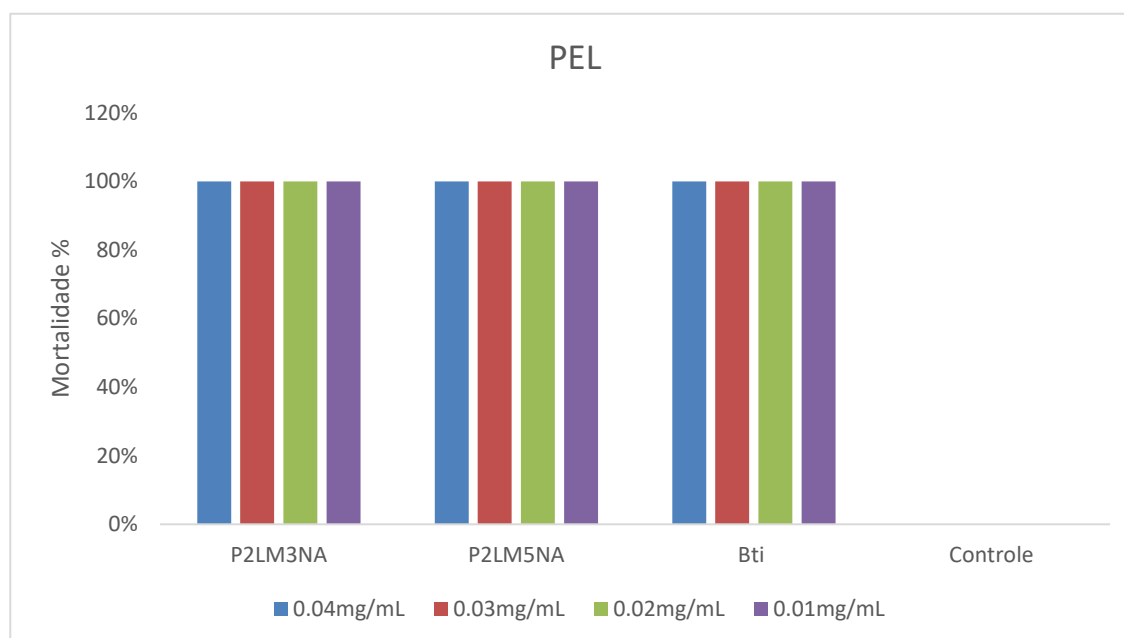


Figura 8. Porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas aos componentes celulares (PEL) P2LM3NA e P2LM5NA no intervalo de 24 horas. Componentes celulares linhagem padrão AM65-52 utilizado como controle positivo.

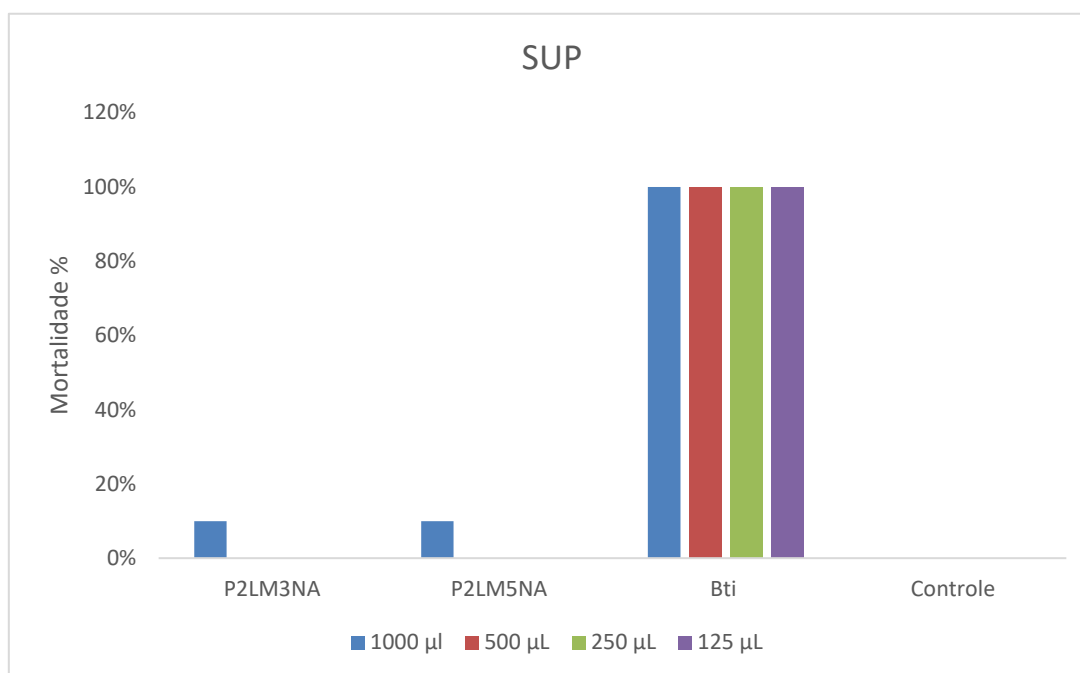


Figura 9. Porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao sobrenadante secretado (SUP) das linhagens P2LM3NA e P2LM5NA no intervalo de 24 horas. Componentes celulares linhagem padrão AM65-52 utilizado como controle positivo.

5.3.2. Atividade larvicida com extrato metabólico da linhagem bacteriana P2LM5NA para o controle de larvas de *Aedes aegypti*

A linhagem P2LM5NA foi selecionada para obtenção de extratos e avaliar seu potencial larvicida.

A exposição das larvas de *Ae. aegypti* ao extrato metabólico do sobrenadante da linhagem P2LM5NA revelou 100% de mortalidade das larvas de L3 no período de 24 horas em duas concentrações testadas (Figura 10). O extrato obtido do componente celular apresentou 70% de atividade após 72 horas de exposição na concentração de 100µL (Figura 11).

Em testes anteriores, o sobrenadante quando testado, não apresentou resultados significativos em larvas de *Ae. aegypti*, onde obteve apenas 10% de mortalidade (Figura 9). Por outro lado, quando foi testado como extratos metabólicos apresentou 100% de mortalidade. Os resultados obtidos mostraram que os extratos metabólicos foram mais eficazes que o sobrenadante secretado, sendo que o processo de extração utilizando solventes químicos, como acetato e isopropanol podem ajudar na obtenção de metabólitos ativos. Estudo realizado por Oliveira et al (2021) e Oliveira et al (2024), realizaram a

extração de metabólitos por acetato/isopropanol do sobrenadante secretado de fungos e bactérias de ambientes, no qual obtiveram resultados significativos contra larvas de *Ae. aegypti*.

Dessa forma, essas espécies que apresentaram potencial larvicida podem ser um reservatório de moléculas bioinseticidas para o controle de culicídeos. Contudo, estudos sobre a otimização dos parâmetros são necessários para garantir sua produção em grande escala.

Estudo realizado por Dahmana et al (2020) mostraram que o sobrenadante secretado de linhagens de *B. paranthracis* e *B. safensis* contra larvas de *Ae. albopictus* mataram 100% no intervalo de 24 horas. Falqueto et al (2021) encontraram princípios ativos como lipopeptídeos ativos contra larvas de *Ae. aegypti*. Além disso, Revathi et al (2013), demonstraram que as larvas de *Ae. aegypti* são suscetíveis aos metabólitos secundários de *B. subtilis* e que a mortalidade é dependente da dose aplicada.

Bactérias do gênero *Bacillus* produzem metabólitos durante o crescimento bacteriano em meios adequados, da qual pode ser útil como agente de controle biológico contra vetores de importância médica e agrícola. A linhagem de *B. velezensis* -WLYS23 tem grande potencial como agente de biocontrole para controle de doenças na aquicultura de água doce (ZHANG et al., 2021). Outras linhagens de *Bacillus* como, *B. nealsonii* tem potencial para controlar larvas de *Ae. albopictus* (DAHMANA et al., 2020).

Espécies de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dominaram o mercado de agentes de controle de pragas de insetos porque é eficiente e específico, não afeta os inimigos naturais e é menos propenso ao desenvolvimento de resistência em espécies-alvo quando comparado com inseticidas químicos. A subespécie *B. thuringiensis* var. *israelensis*, conhecida como Bti, tem sido a base para diversos produtos microbianos utilizado para controlar larvas de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* no mundo todo (LACEY et al., 2015, DERUA et al., 2019).

Diante do potencial dessas bactérias para o controle biológico de *Ae. aegypti*, são necessários mais estudos para caracterizar os compostos ativos destas linhagens, pois são promissores como agentes de biocontrole de mosquitos vetores.

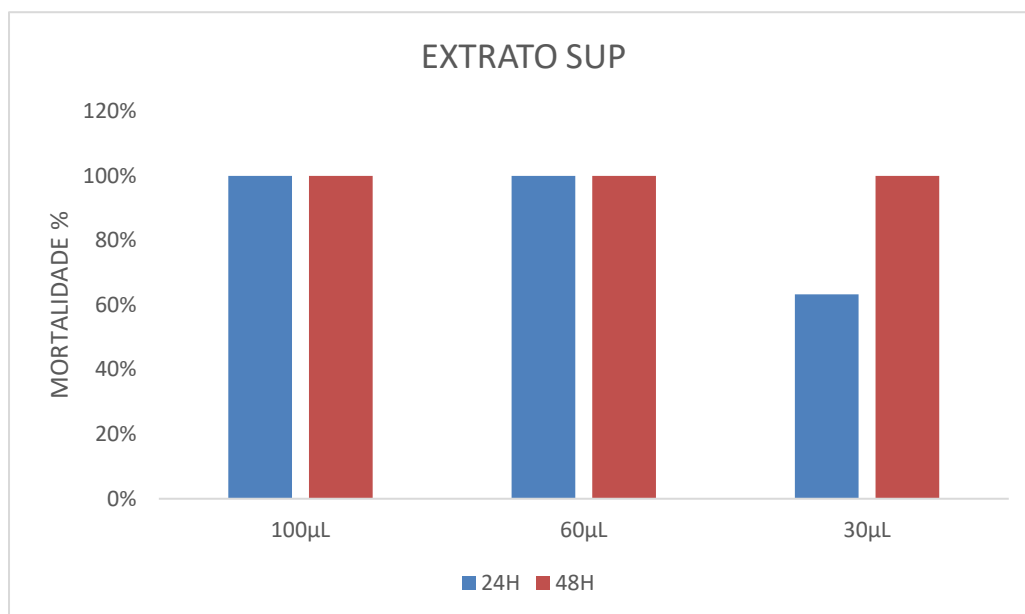


Figura 10. Porcentagem de mortalidade com extratos do SUP da linhagem P2LM5NA em larvas de *A. aegypti* no intervalo de 24, 48 e 72 horas.

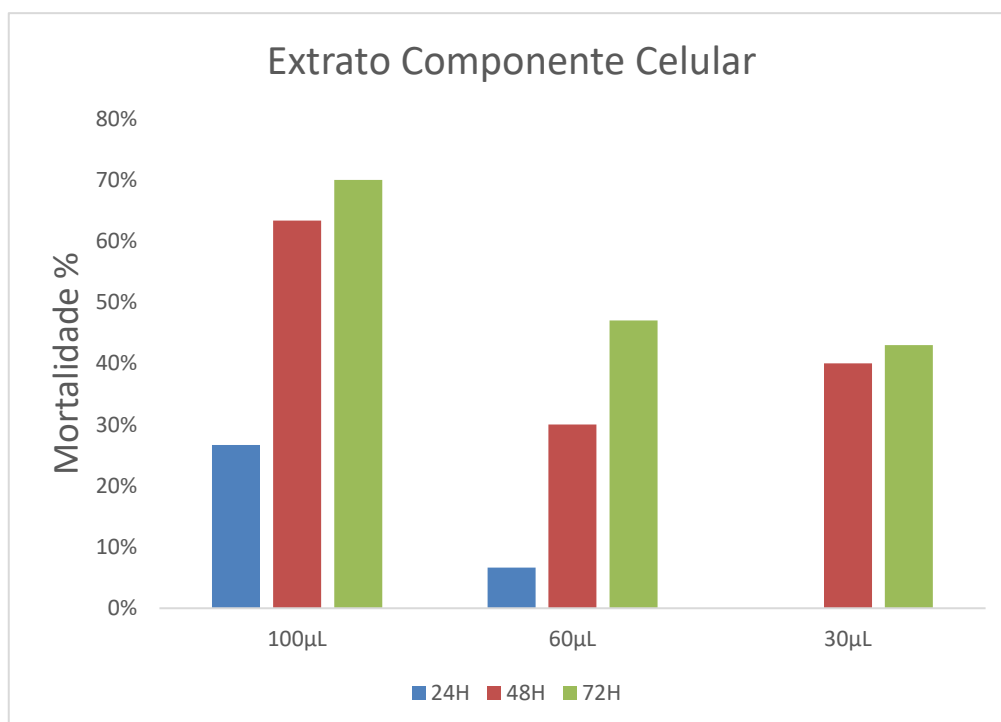


Figura 11. Porcentagem de mortalidade com extratos do PEL da linhagem P2LM5NA em larvas de *A. aegypti* no intervalo de 24, 48 e 72 horas.

5.4. Identificação molecular das linhagens ativas

5.4.1. Perfil do DNA genômico

O perfil eletroforético de extração de DNA genômico das linhagens ativas demonstraram bandas de DNA com boa qualidade (Figura 12). Os dados relacionados a espectrofotometria de luz ultravioleta visível na escala de 260-280 demonstraram boa integridade no DNA.

Uma boa qualidade dos perfis é necessária, visto que perfis eletroforético com bandas pouco definidas podem resultar na falha da PCR. Como também uma baixa concentração do DNA pode comprometer as amplificações dos marcadores moleculares.

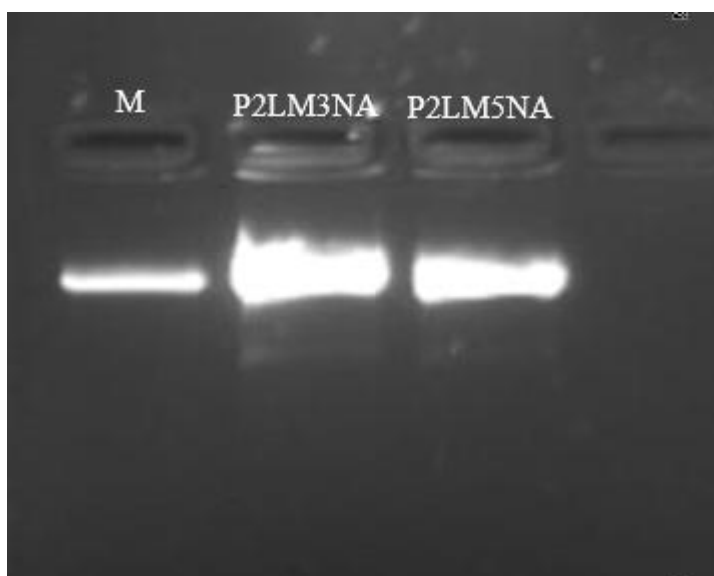


Figura 12: Perfil eletroforético de extração de DNA genômico das amostras de linhagens bacterianas ativas contra *Aedes. aegypti*. coluna 01: M; marcador lambda 1KB; coluna 2 P2LM3NA; coluna 3: P2LM5NA

5.4.2. Amplificação do DNA do gene 16S rRNA

Em relação ao perfil eletroforético de amplificação do gene 16S rRNA das linhagens P2LM3NA e P2LM5NA, a sequência nucleotídica para a amplificação e sequenciamento utilizada neste estudo, possui aproximadamente 1500 nucleotídeos (Figura 13). A sequência do gene 16S rRNA é composta de regiões conservadas, úteis

para determinar as relações de distância, enquanto que as regiões variáveis são utilizadas para distinguir organismos estreitamente relacionados (BECKER et al., 2004; PEI et al., 2009).

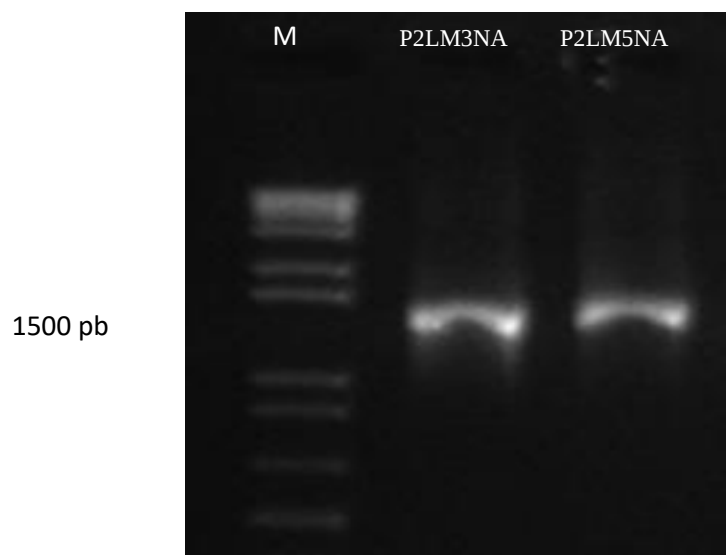


Figura 13: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene *16S rRNA* de linhagens bacterianas. Coluna 1: Marcado molecular 1Kb; coluna 2: Linhagem P2LM3NA; coluna 3: Linhagem P2LM5NA.

A utilização da região do gene *rRNA 16S* e a análise BLAST permitiu a identificação das linhagens bacterianas deste estudo, onde foi possível observar que as linhagens bacterianas ativas contra *Ae. aegypti* apresentam similaridade de 99,88% (P2LM5NA) e 97% (P2LM3NA) com o gênero *Bacillus* (Tabela 5).

Estas linhagens bacterianas foram isoladas de sedimentos do Lago Macurany, local com bastante vegetação ao redor e áreas alagadas, no qual são permanentemente inundadas em função da precipitação, alternando o período de inundação (cheia) com períodos de solo seco (estiagem). No entanto, vale ressaltar que apesar da diversidade microbiana encontrada, as técnicas convencionais e avançadas não permitem avaliar a potencial ecologia microbiana dessas bactérias.

Bactérias do gênero *Bacillus* são onipresentes em uma ampla variedade de ambientes terrestres e aquáticos, no qual possuem uma ampla gama de habilidades fisiológicas. Esses microrganismos podem crescer em todos os ambientes e competir desejavelmente em outros organismos, especialmente através de sua capacidade de

formar esporos extremamente resistentes e de produzir metabólitos. Embora a caracterização inicial das espécies de *Bacillus* tenha ocorrido há cerca de 150 anos, a classificação taxonômica de *Bacillus* permanece notoriamente confusa (ZEIGLER & PERKINS, 2021).

A análise da sequência do gene *rRNA 16S* tem sido promissora uma vez que, este gene é considerado universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências estão disponíveis em bancos de dados permitindo, assim, a comparação das sequências de linhagens bacterianas desconhecidas (STACKEBRANDT E GOEBEL, 1994; CLARRIDGE, 2004; VINJE et al., 2014). O desenvolvimento da filogenia de *Bacillus* tem sido um reflexo notável dos avanços contínuos nos métodos utilizados para caracterização e identificação bacteriana. No entanto, também levou a um gênero complexo contendo centenas de táxons agrupados sob o mesmo nome de gênero, mas sem quaisquer características bem definidas que sejam comumente compartilhadas e exclusivas entre eles (LOGAN & DE VOS, 2009).

A caracterização precisa do gênero *Bacillus* fornece informações para inferir o parentesco evolutivo e a diversidade genética entre as espécies, onde a análise filogenética ajuda no delineamento de espécies e na identificação de novas cepas, tornando a caracterização e a filogenia do gênero *Bacillus* mutuamente informativas e complementares (XU e KOVÁCS, 2024).

Tabela 6: Identificação molecular de linhagens bacterianas por meio do sequenciamento do gene *16SrRNA*

Nº	Linhagem	Substrato	Identificação Molecular	Percentual Identidade	Morfologia	GRAM
1	P2LM5NA	Sedimentos	<i>Bacillus</i> sp.	99,88%	Bacilos	+
2	P2LM3NA	Sedimentos	<i>Bacillus</i> sp.	97%	Bacilos	+

6. CONCLUSÕES

Lagos amazônicos apresentam e abrigam uma rica diversidade de linhagens bacterianas ainda desconhecidas.

As linhagens bacterianas isoladas de sedimentos de lagos amazônicos demonstraram potencial larvicida contra *Ae. aegypti*. Da qual apresentaram potencial para secretar metabólitos capazes de controlar populações de *Ae. aegypti*.

Foram isoladas espécies bacterianas que exibem notável atividade inseticida em comparação com a de um produto comercial e com a cepa padrão.

Extratos metabólicos da linhagem P2LM5NA, sequenciada e identificada como gênero *Bacillus sp.* apresentaram eficácia contra larvas de *Ae. Aegypti*. Dessa forma, torna-se imprescindível o estudo sobre os extratos metabólicos para investigar os componentes ativos dessa linhagem, assim como a identificação molecular de outros microrganismos ativos.

As linhagens bacterianas com potencial larvicida isoladas de três lagos amazônicos, obtidas neste estudo, poderão ser novos agentes entomopatogênicos e um reservatório de novas moléculas para o controle biológico de populações de culicídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANHOLETI, M. C., DUPRAT, R. C., FIGUEIREDO, M. R., KAPLAN, M. A., SANTOS, M. G., GONZALEZ, M. S., ... & MELLO, C. B. Biocontrol evaluation of extracts and a major component, clusianone, from *Clusia fluminensis* Planch. & Triana against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, 629-635, 2015.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G. & VON EIFF C. Development and evaluation of a qualitycontrolled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNAbased identification of *Staphylococcus* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.

BIDESHI, D. K., PARK, H. W., HICE, R. H., WIRTH, M. C., & FEDERICI, B. A. Highly effective broad spectrum chimeric larvicide that targets vector mosquitoes using a lipophilic protein. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11282, 2017.

BRAGA, I.A; & VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 16: 279-93, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Qdenga (Vacina dengue 1, 2, 3 e 4): novo registro. Brasília: Ministério da Saúde. 2023a. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/qdenga-vacina-dengue-1-2-3-e-4-atenuada-novo-registro>. Acesso em 11 de Jun de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Situação Epidemiológica da Dengue Brasília: Ministério da Saúde. 2023b. Nota Técnica nº 9/2023-CGARB/DEDT/SVSA/MS. [Aplicação de inseticidas — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses). Acesso em 11 de Jun de 2023.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Boletim Situação Epidemiológica da Dengue Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em 28 de Jul de 2024.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, jul. 2011.

CARVALHO, F.D; MOREIRA, L. A. Por que o *Aedes aegypti* Linnaeus é tão bem-sucedido como espécie?. **Entomologia Neotropical**, v. 46, n. 3, pág. 243-255, 2017.

CHENG, S.H. YANG, S.A. PALANIYANDI, J.S. HAN, T.M. YOON, T.J. KIM, J.W. SUH: Complexo de Azalomycin F é uma substância antifúngica produzida por *Streptomyces malaysiensis* MJM1968 isolada do solo agrícola. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, pp. 545 552, 10.3839/jksabc.2010.084, 2010.

CHO, J. C.; GIOVANNONI, S. J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology Journal.**, v. 70, n.1, p. 432- 440. doi: 10.1128/AEM.70.1.432-440. 2004

CHRISTOPHERS, Samuel Rickard. *Aedes aegypti: o mosquito da febre amarela*. Arquivo da CUP, 1960.

CORUJO, V. Fernández et al. Production of bacterial nanocellulose from non-conventional fermentation media. In: **Multifunctional polymeric nanocomposites based on cellulosic reinforcements**. William Andrew Publishing, p. 39-59, 2016.

COSTA, J.F.V. DA; ALVES, N.S.M. Os recursos estratégicos da Amazônia brasileira e a cobiça internacional. **Revista Perspectiva: reflexões sobre a temática internacional** 11: 65–86, 2018.

DAHMANA, Handi; MEDIANNIKOV, Oleg. Emergência/ressurgimento de doenças transmitidas por mosquitos e como efetivamente controlá-las biologicamente. **Patógenos** , v. 9, n. 4, pág. 310, 2020.

DARRIET, Frederic; HOUGARD, Jean-Marc. An isolate of *Bacillus circulans* toxic to mosquito larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News**, v. 18, n. 1, p. 65-67, 2002.

DATASUS: **O DATASUS**. Casos Prováveis por Faixa Etária Segundo Ano 1º Sintoma(s) Período: 2007 -2013.

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/denguebr.def>, 2019 (acesso em 28 de novembro de 2023).

DELLAGLIO, F., DICKS, L. M. T., DU TOIT, M., & TORRIANI, S. Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989) Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 41(2), 340-342, 1991.

DUMALGE, H.T; CORREA, J.A; GALLEGOS-MORAES, G. **Potential for improved Formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through Standartization and Fermentation Developent.** Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies, 110-133, 1990.

KATAK, R. D. 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**, 14(9), 718, 2023.

DERUA, Y. A., TUNGU, P. K., MALIMA, R. C., MWINGIRA, V., KIMAMBO, A. G., BATENGANA, B. M., ... & KISINZA, W. N. Laboratory and semi-field evaluation of the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bactivec®) and *Bacillus sphaericus* (Griselesf®) for control of mosquito vectors in northeastern Tanzania. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, 2, 100089, 2022.

DICKENS, B. L., SUN, H., JIT, M., COOK, A. R., & CARRASCO, L. R. Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **BMJ global health**, 3(4), e000801, 2018.

FALQUETO, S. A., PITALUGA, B. F., DE SOUSA, J. R., TARGANSKI, S. K., CAMPOS, M. G., DE OLIVEIRA MENDES, T. A., ... & SOARES, M. A. *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, 2021.

FAVRET, Montgomery E.; YOUSTEN, Allan A. Atividade inseticida de *Bacillus laterosporus*. **Revista de Patologia de Invertebrados**, v. 2, pág. 195-203, 1985.

FERREIRA-DE-BRITO, Anielly et al. Primeira detecção de infecção natural do *Aedes aegypti* com o vírus Zika no Brasil e em toda a América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 655-658, 2016.

FRENTZEL, H., JURASCHEK, K., PAULY, N., KELNER-BURGOS, Y., & WICHMANN-SCHAUER, H. Indications of biopesticidal *Bacillus thuringiensis* strains in bell pepper and tomato. **International journal of food microbiology**, 321, 108542, 2020.

GARCÍA, C. L., BETANZOS REYES, Á. F., ARENAS MONREAL, M. D. L. L., TENAHUA QUITL, I., & DE ÁVILA ARROYO, M. L. (2019). Description of the dengue problem with a focus on the social determinants of health in a community: field study. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, 17(2), 6-15, 2019.

GOMES, A.S.; SCIAVICO, C.J.S.; EIRAS, A.E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.39, n.4, p.327-332, 2006. doi: 10.1590/S0037- 86822006000400002.

HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. 2011.

JOUZANI, Gholamreza Salehi; VALIJANIAN, Elena; SHARAFI, Reza. *Bacillus thuringiensis*: um inseticida de sucesso com novas características e novidades ambientais. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 101, p. 2691-2711, 2017.

KARABÖRKLÜ, Salih; AZIZOGLU, Ugur; AZIZOGLU, Zehra Busra. Recombinant entomopathogenic agents: a review of biotechnological approaches to pest insect control. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-12, 2018.

KATAK, R. M., ROCHA, E. M., OLIVEIRA, J. C., MUNIZ, V. A., OLIVEIRA, M. R., FERREIRA, F. A., ... & TADEI, W. P. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of supernatant and pellet fractions from cultured *Bacillus* spp. isolated from Amazonian microenvironments. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 2, p. 104, 2021.

KATAK, Ricardo de Melo. Análises moleculares de linhagens de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp., isolados da Amazônia brasileira, ativas contra *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. 2020. 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

KRAEMER, Moritz UG et al. A distribuição global dos vetores de arbovírus *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. **elife** , v. 4, p. e08347, 2015.

KEMPKEN, Frank; ROHLFS, Marko. Biossíntese de metabólitos secundários fúngicos – uma estratégia de defesa química contra animais antagônicos?. **Ecologia fúngica**, v. 3, n. 3, pág. 107-114, 2010.

LACEY, Emerson S.; RAY, Anandasankar; CARDE, Ring T. Encontros imediatos: contribuições do dióxido de carbono e odor da pele humana para encontrar e pousar em um hospedeiro em *Aedes aegypti*. **Entomologia fisiológica**, v. 39, n. 1, pág. 60-68, 2014.

LEITE S. S. Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum*. Bahia, Brasil. (Msc. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz). 68p. 2012.

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

LEWINSOHN, Thomas M.; PRADO, Paulo I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LOGAN, N.; DE VOS, P. Genus *Bacillus* cohn 1872. In: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rayney F, et al., editors. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* Bergey's Man. Syst. Bacteriol, v. 4. p. 21-128, 2009.

LUIZ ROSA DA SILVA, João et al. Larvicidal and growth-inhibitory activity of entomopathogenic bacteria culture fluids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 2, p. 378-385, 2017.

MARGALITH, Y.; BEN-DOV, E. Biological Control by *Bacillus Thuringiensis Subsp. Israelensis*. **Insect pest management: techniques for environmental protection**, 243–301, 2000.

MENDOZA-ALMANZA, G., ESPARZA-IBARRA, E. L., AYALA-LUJÁN, J. L., MERCADO-REYES, M., GODINA-GONZÁLEZ, S., HERNÁNDEZ-BARRALES, M., & OLMOS-SOTO, J. O espectro citocida das toxinas de *Bacillus thuringiensis*: de insetos a células cancerígenas humanas. **Toxinas**, v. 12, n. 5, pág. 301, 2020.

MIRESMAILLI, Saber; ISMAN, Murray B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in plant science**, v. 19, n. 1, p. 29-35, 2014.

MOYES, C. L., VONTAS, J., MARTINS, A. J., NG, L. C., KOOU, S. Y., DUSFOUR, I., ... & WEETMAN, D. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS doenças tropicais negligenciadas**, v. 11, n. 7, pág. e0005625, 2017.

O'BRIEN, Jonathan; WRIGHT, Gerard D. Uma perspectiva ecológica do metabolismo secundário microbiano. **Opinião Atual em Biotecnologia**, v. 22, n. 4, pág. 552-558, 2011.

ORGANIZATION, W.H. Report of the Seventh WHOPEs Working Group Meeting: WHO/HQ, Geneva, 2-4 December 2003: **Review of** : Vectobac WG Permanet Gokilaht-S 5EC. 2004.

OLIVEIRA, W. F.; CARDOSO, W. M.; MARQUES, L. C. L.; SALLES, R. P. R.; AGUIAR FILHO, J. L. C.; TEIXEIRA, R. S. C.; ROMÃO, J. M.; LIMA, A. C. P. 2004.

Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 552, p. 211-214. 2004.

OLIVEIRA, MR; KATAK, RDM; SILVA, GF; MARINOTTI, O; TERENIUS, O; TADEI, WP; SOUZA, AQL. Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*, **Frontiers in Microbiology** 12, 743246, 2021.

ORLOVA, M. V., SMIRNOVA, T. A., GANUSHKINA, L. A., YACUBOVICH, V. Y., & AZIZBEKYAN, R. R. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, pág. 2723-2725, 1998.

PAYNE, M. P.; MORTON, R.J. Effect of culture media and incubation temperature on growth of selected strains of *Francisella tularensis* **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 264-269. 1992.

PEI, ANNA; NOSSA, CARLOS W.; CHOKS, POOJA; BLASER, MARTIN.J; YANG, LIYING; ROSMARIN, DAVID M.; PEI, ZHIHENG Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. **Plos One**. v.4, p. 1-9, 2009.

PENG ET AL., 2019 Q. PENG, Q. YU, F. SON Expression of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**., 103, pp. 1617-1626, 2019.

PESSOA, João Paulo de Moraes et al. Controle da dengue: os consensos produzidos por Agentes de Combate às Endemias e Agentes Comunitários de Saúde sobre as ações integradas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 2329-2338, 2016.

PRAYITNO, JOKO; ROLFE, BARRY. Caracterização de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de arroz. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 17, n. 2, pág. 73-78, 2010.

ROZE, L. V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.48, p.35-48, 2011.

SALANITRO, J. P.; FAIRCHILDS, I. G.; ZGORNICKI, Y. D. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 678–687. 1974.

SANTANA-MARTINEZ, J.C.; SILVA, J.J.; DUSSAN, J. Efficacy of *Lysinibacillus Sphaericus* against Mixed-Cultures of Field-Collected and Laboratory Larvae of *Aedes Aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of entomological research** 109, 111–118, 2019.

JOUZANI, Gholamreza Salehi; VALIJANIAN, Elena; SHARAFI, Reza. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 2691-2711, 2017.

SCHNEPF ET AL., 1998 E. SCHNEPF, N. CRICKMORE, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUM, J. FEITELSON, D.R. ZEIGLER, D.H. DEAN *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology an Molecular Biology Reviews.**, 62 (3), pp. 775-806, 1998.

SILVA-FILHA, M. H. N. L., ROMÃO, T. P., REZENDE, T. M. T., CARVALHO, K. D. S., GOUVEIA DE MENEZES, H. S., ALEXANDRE DO NASCIMENTO, N., ... & BRAVO, A. Toxinas bacterianas ativas contra mosquitos: modo de ação e resistência. **Toxinas**, v. 13, n. 8, pág. 523, 2021.

SINGH BP, Rateb ME, RODRIGUEZ-COUTO S, TEIXEIRA DE MORAES POLIZELI ML, Li WJ. Editorial: **microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technology Challenges**. *Front Microbiol* 10:914, 2019.

SCHISLER, DA et al. Formulação de *Bacillus* spp. para o controle biológico de doenças de plantas. **Fitopatologia**, v. 94, n. 11, pág. 1267-1271, 2004.

SOUSA, A. M.; MACHADO, I.; NICOLAU, A.; PEREIRA, M.O. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. **Journal Microbiological Methods**, v. 95, p. 327-335. 2013.

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. Estudos de competência vetorial do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Infecção, genética e evolução**, v. 67, p. 191-209, 2019.

STACKEBRANDT, E., & GOEBEL, B.M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16 s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**. p. 846-849, 1994.

VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade et al. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

VITTA, A., THIMPOO, P., MEESIL, W., YIMTHIN, T., FUKRUKSA, C., POLSEELA, R., ... & THANWISAI, A. Atividade larvicida das bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Jornal do Pacífico Asiático de Biomedicina Tropical**, v. 8, n. 1, pág. 31 de 2018.

WEAVER S.C., CHARLIER C., VASILAKIS N., LECUIT M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual review of medicine**, v. 69, n. 1, p. 395-408, 2018.

WHO 2022. DENGUE. [on-line]. Brasil, Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso em 13 dez. 2022.

WHO, 2023. Organização Mundial da Saúde (OMS) (who.int)._Acesso em 10 abril. 2023.

WILSON, Mary E. What goes on board aircraft? Passengers include *Aedes*, *Anopheles*, 2019-nCoV, dengue, Salmonella, Zika, et al. **Travel medicine and infectious disease**, v. 33, p. 101572, 2020.

XU, Xinming; KOVÁCS, Ákos T. How to identify and quantify the members of the *Bacillus* genus?. **Environmental Microbiology**, v. 26, n. 2, p. e16593, 2024.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZEIGLER, Daniel R.; PERKINS, John B. The genus *Bacillus*. In: **Practical handbook of microbiology**. CRC Press, 2021. p. 249-278.

ZHANG, X., GAO, T., PENG, Q., SONG, L., ZHANG, J., CHAI, Y., ... & SONG, F. A strong promoter of a non-*cry* gene directs expression of the *cry1Ac* gene in *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**., 102, pp. 3687-3699, 10.1007/s00253-018-8836-5, 2018.

ZHANG, X., ZHAN, Y., ZHANG, H., WANG, R., TAO, X., ZHANG, L., ... & LI, J. Inoculation of phosphate-solubilizing bacteria (*Bacillus*) regulates microbial interaction to improve phosphorus fractions mobilization during kitchen waste composting. **Bioresource Technology**, 340, 125714, 2021.