



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISES ÔMICAS DE *Bacillus* spp. ISOLADOS DE ECOSISTEMAS  
AMAZÔNICOS ATIVOS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*.**

**MANAUS-AM**

**2025**

**VERANILCE ALVES MUNIZ**

**ANÁLISES ÔMICAS DE *Bacillus* spp. ISOLADOS DE ECOSSISTEMAS  
AMAZÔNICOS ATIVOS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*.**

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

**ORIENTADOR:** Dr. Edmar Vaz de Andrade

**COORIENTADORA:** Dra. Rosemary Aparecida Roque

**COORIENTADOR:** Dr. Ricardo de Melo Katak

**MANAUS-AM**

**2025**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

- 
- M966a      Muniz, Veranilce Alves  
                Análises ômicas de *Bacillus* spp. isolados de ecossistemas amazônicos  
                ativos para o controle de *Aedes aegypti*. / Veranilce Alves Muniz. - 2025.  
                90 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Edmar Vaz de Andrade.  
                Coorientador(a): Ricardo de Melo Katak.  
                Coorientador(a): Rosemary Aparecida Roque.  
                Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de  
                Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2025.
1. *Bacillus thuringiensis*. 2. microbiota amazônica. 3. controle biológico.  
                4. abordagens ômicas. I. Andrade, Edmar Vaz de. II. Katak, Ricardo de  
                Melo. III. Rosemary Aparecida Roque. IV. Universidade Federal do  
                Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. V. Título
-

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, cuja presença e orientação foram fundamentais em cada passo desta jornada. Sua luz me guiou e me deu força para perseverar. Toda honra e glória a ti, Senhor Jesus.

À minha família (marido Paulo Afonso e filho David Luiz), aos meus pais (Vera Lúcia e João), irmãs (Veriane, Verijane, Luciana, Joane e Jovana), sobrinhas Juliane e Karina, cunhados e a minha sogra, meu sincero agradecimento a todos pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Vocês foram meu alicerce, sempre acreditando em mim e me motivando a buscar meus sonhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM, onde tive a oportunidade de realizar meu doutorado.

Aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ Universal e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro do projeto e à Capes pela concessão da bolsa.

Agradeço ao meu orientador, Edmar Vaz de Andrade, por sua orientação ao longo deste processo. Sua expertise e dedicação foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também aos meus coorientadores, Dr. Ricardo de Melo Katak, sua colaboração, orientação, ideias valiosas, incentivos e busca de parcerias, foi fundamental para que eu pudesse avançar e aprimorar este trabalho. À Dra. Rosemary Aparecida Roque, por suas orientações valiosas, apoio constante e insights que enriqueceram minha pesquisa.

Sou grata às instituições parceiras que contribuíram significativamente para a realização deste projeto: EMBRAPA (Dr. Gilvan Ferreira), FIOCRUZ (Dra. Priscila Aquino, Kemily, Sofia), Laboratório de Fitoquímica de Produtos Naturais (Dra. Cecília, Dr. Weison), CMABio (Joaquim). A colaboração foi essencial para o desenvolvimento das atividades deste trabalho, proporcionando recursos, conhecimento e infraestrutura indispensáveis.

Agradeço também a cada membro do meu grupo de pesquisa, Malaria e Dengue (INPA), Juan, Izane, Jakeline, Ana Cláudia, Rejane, Deidre, Laura, Cíndel, Anny, Marília, Augusto, cujos membros se tornaram amigos e colaboradores e ao meu amigo Dr. Elerson Matos.

À equipe do Laboratório de Proteômica (UFAM) Dra. Isabelle Cordeiro, Genilton, e demais colegas, a troca de ideias, discussões enriquecedoras e o apoio mútuo foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, agradeço aos amigos que estiveram ao meu lado durante todo esse percurso. Suas palavras de encorajamento, risadas e momentos compartilhados tornaram essa experiência mais leve e significativa.

A todos vocês, meu mais sincero obrigada!

## RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de arboviroses como dengue, Zika, febre amarela e chikungunya, representando um grave problema de saúde pública. O controle biológico, com destaque para o uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt), é uma alternativa amplamente utilizada. Fatores ambientais podem reduzir a eficácia dos biolarvicidas, e estudos indicam resistência de mosquitos a alguns deles. Assim, a busca por novos agentes entomopatogênicos, especialmente de fontes ambientais, é essencial. A Amazônia, com sua rica biodiversidade microbiana, oferece grande potencial inexplorado, e o avanço das técnicas moleculares, aliado às ferramentas de bioinformática e abordagens ômicas, tem ampliado as possibilidades de investigação e aplicação desses microrganismos. Este estudo teve como objetivo caracterizar a cepa amazônica *B. thuringiensis* GD02.13 e avaliar seu potencial larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor de arboviroses como dengue, zika e chikungunya. Neste estudo, foi caracterizada a cepa amazônica *B. thuringiensis* GD02.13, com foco em seu potencial larvicida contra *Aedes aegypti*. A cepa foi isolada da região amazônica e identificada como *B. thuringiensis* por análise filogenômica com base em 443 ortólogos. Seu genoma, de 6,6 Mb, revelou genes codificadores de toxinas inseticidas e 16 grupos de genes biossintéticos de metabólitos secundários. Bioensaios com esporos e cristais purificados em diferentes concentrações (0,1–0,4 µg/mL) mostraram 100% de mortalidade larval, superando a cepa comercial Bti AM65-52. Análises por cromatografia em camada delgada (CDC) identificaram compostos fenólicos, alcaloides e terpenos nos extratos bacterianos. A caracterização proteômica por SDS-PAGE e LC-MS/MS revelou toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa, além de proteínas relacionadas à virulência e resistência. Com base nesses resultados, a cepa GD02.13 de *B. thuringiensis* demonstra elevado potencial biotecnológico como fonte de bioinseticidas naturais eficazes, reforçando sua aplicabilidade no controle vetorial de mosquitos transmissores de doenças. Portanto, os dados obtidos neste estudo apoiam o desenvolvimento de novos produtos inseticidas baseados na cepa GD02.13-*B. thuringiensis*.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, microbiota amazônica, controle biológico, abordagens ômicas.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the primary vector of arboviruses such as dengue, Zika, yellow fever, and chikungunya, representing a serious public health problem. Biological control, particularly the use of *Bacillus thuringiensis* (Bt), is a widely used alternative. Environmental factors can reduce the effectiveness of biolarvicides, and studies indicate resistance of mosquitoes to some of them. Thus, the search for new entomopathogenic agents, especially from environmental sources, is essential. The Amazon, with its rich microbial biodiversity, offers significant unexplored potential, and advances in molecular techniques, combined with bioinformatics tools and omics approaches, have expanded the possibilities for the investigation and application of these microorganisms. This study aimed to characterize the Amazonian *B. thuringiensis* GD02.13 strain and evaluate its larvicidal potential against the *Aedes aegypti* mosquito, the main vector of arboviruses such as dengue, Zika, and chikungunya. The Amazonian *B. thuringiensis* GD02.13 strain was characterized, focusing on its larvicidal potential against *Aedes aegypti*. The strain was isolated from the Amazon region and identified as *B. thuringiensis* through phylogenetic analysis based on 443 orthologous genes. Its genome, of 6.6 Mb, revealed genes encoding insecticidal toxins and 16 biosynthetic gene clusters for secondary metabolites. Bioassays with purified spores and crystals at different concentrations (0.1–0.4 µg/mL) showed 100% larval mortality, outperforming the commercial strain Bti AM65-52. CCD analysis identified phenolic compounds, alkaloids, and terpenes in bacterial extracts. Proteomic characterization through SDS-PAGE and LC-MS/MS revealed Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa toxins, as well as proteins related to virulence and resistance. Based on these results, the GD02.13 strain of *B. thuringiensis* demonstrates significant biotechnological potential as a source of effective natural bioinsecticides, reinforcing its applicability in vector control of disease-transmitting mosquitoes. Therefore, the data obtained in this study support the development of new insecticidal products based on the GD02.13 *B. thuringiensis* strain.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Amazon microbiota, biological control, omics approaches.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: LC50 and LC90 values of bacterial metabolites against <i>A. aegypti</i> larvae ..... | 33 |
| Table 2: Features of the genome of <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13.....                  | 34 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Identificação de proteínas inseticidas e outras nos cristais da linhagem Bt GD02.13 detectada por análise LC-MS/MS..... | 69 |
| Tabela 2: Identificação de outras proteínas associada à virulência e patogenicidade de <i>B. thuringiensis</i> GD02.13 .....      | 70 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Ciclo de Vida do <i>Aedes aegypti</i> .....                                         | 12 |
| Figura 2: Cristais de proteína misturados com esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> . .... | 16 |

### CAPÍTULO I

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: GD02.13 morphology .....                                                                                                                                     | 34 |
| Figura 2: Phylogenetic inference of GD02.13 based on the whole genome by maximum likelihood.....                                                                       | 35 |
| Figura 3: Prediction of biosynthetic gene clusters (BGCs) in a <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13 strain using the antiSMASH database and the MIBiG repository..... | 36 |

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Mortalidade cumulativa de extratos metabólicos obtidos de diferentes intervalos de cultivo da linhagem GD02. 13 para larvas de <i>A. aegypti</i> em condições de laboratório..... | 49 |
| Figura 2: Cromatografia em camada delgada do extrato metabólico de <i>Bacillus thuringiensis</i> - GD02.13 indicando metabólitos secundários .....                                          | 51 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Separação de esporos, cristais e restos celulares por centrifugação .....                                                                                 | 59 |
| Figura 2: Atividade larvicida de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13 contra <i>Aedes aegypti</i> em comparação com a cepa referência AM65-52. ....     | 63 |
| Figura 3: Atividade larvicida de cristais de <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13 contra <i>Aedes aegypti</i> em comparação com a cepa referência Bti AM65-52..... | 64 |
| Figura 4: Gel de poliacrilamida 13% após eletroforese em gel de SDS-PAGE de proteínas ..                                                                            | 65 |
| Figura 5: Distribuição das anotações proteômicas da cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13 com base no componente celular.....                                  | 66 |
| Figura 6: Distribuição das anotações proteômicas da cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13 com base no processo biológico .....                                 | 67 |
| Figura 7: Distribuição das anotações proteômicas da cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> GD02.13 com base na função molecular .....                                   | 68 |

## SUMÁRIO

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                    | <b>9</b>  |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                          | <b>11</b> |
| 2.1 Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....                                                       | 11        |
| 2.2 Principais arbovírus transmitidos pelo <i>Aedes aegypti</i> .....                         | 13        |
| 2.3 Estratégias de Controle do <i>Aedes aegypti</i> .....                                     | 14        |
| 2.4 Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> no controle de mosquitos vetores .....                | 14        |
| 2.5 Fatores que afetam as proteínas e os esporos .....                                        | 17        |
| 2.6 A genômica aplicada ao estudo de microrganismos .....                                     | 18        |
| 2.7 Abordagem Proteômica.....                                                                 | 21        |
| 2.8 Prospecção metabolômica de metabólitos secundários de <i>Bacillus thuringiensis</i> ..... | 23        |
| 2.9 Regulamentação dos produtos bioinseticidas.....                                           | 25        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                                                     | <b>26</b> |
| 3.1 Geral.....                                                                                | 26        |
| 3.2 Específicos .....                                                                         | 26        |
| <b>CAPÍTULO I - .....</b>                                                                     | <b>27</b> |
| Abstract .....                                                                                | 28        |
| Introduction .....                                                                            | 28        |
| Methods.....                                                                                  | 30        |
| Results .....                                                                                 | 32        |
| Discussion .....                                                                              | 37        |
| References .....                                                                              | 39        |
| <b>CAPÍTULO II .....</b>                                                                      | <b>45</b> |
| Resumo.....                                                                                   | 45        |
| Introdução .....                                                                              | 45        |
| Material e Métodos .....                                                                      | 46        |
| Resultados e Discussão .....                                                                  | 48        |
| Conclusão.....                                                                                | 53        |
| Referências Bibliográficas .....                                                              | 53        |
| <b>Capítulo III.....</b>                                                                      | <b>56</b> |
| Resumo.....                                                                                   | 56        |
| Introdução .....                                                                              | 56        |
| Material e métodos.....                                                                       | 57        |
| Resultados .....                                                                              | 62        |
| Discussão.....                                                                                | 71        |
| Conclusão.....                                                                                | 73        |
| Referências Bibliográficas .....                                                              | 73        |
| <b>4. CONCLUSÃO .....</b>                                                                     | <b>77</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                    | <b>78</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais vetores de arbovírus é o mosquito *Aedes aegypti*, conhecido por seu comportamento antropofílico e ampla distribuição geográfica. Este mosquito possui competência e a capacidade de transmitir diversos vírus, como o dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) e febre amarela (BRASIL/MS, 2025). Essas infecções resultam em diversas arboviroses, que acarretam morbidade e mortalidade significativas na população em várias regiões do mundo. Essa situação representa um desafio sério para a saúde pública global (SOUZA-NETO et al., 2019; KRAEMER et al., 2019; WRBU, 2023).

No Brasil, o Ministério da Saúde incorporou a vacina Qdenga contra os sorotipos do vírus da dengue (DENV1-DENV4) no Programa Nacional de Imunização (PNI)/Sistema Único de Saúde (SUS). Essa vacina está disponível principalmente em regiões com maior incidência e transmissão dos vírus. Além disso, as vacinas para os demais arbovírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), que também são transmitidos pelo *A. aegypti*, ainda estão em fase de desenvolvimento (WANG et al., 2021; BRASIL/MS, 2025).

O controle vetorial continua a ser uma estratégia adotada pelos órgãos de saúde, utilizando métodos químicos, físicos e biológicos. Embora os produtos sintéticos sejam eficazes, seu uso indiscriminado e prologando pode causar danos à fauna associada, ao meio ambiente e resultar em problemas de saúde aos seres humanos (CATTEL et al., 2021; SCHUARTZ et al., 2024). Dessa forma, o controle biológico se apresenta como uma alternativa ecológica e eficaz no combate aos mosquitos vetores (ZARA et al., 2016; CERNA e MARTINEZ, 2023).

As bactérias do gênero *Bacillus* se destacam nesse contexto por produzirem moléculas com propriedades bioinseticidas, que causam patogenicidade, virulência e mortes dos insetos vetores de doenças. Este gênero é bastante diversificado e possui um elevado valor biotecnológico. Existem, inclusive, produtos bioinseticidas no mercado à base de espécies de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bt) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) (anteriormente conhecido como *Bacillus sphaericus*) (SANTANA-MARTINEZ et al., 2019; SUNARTI et al., 2025). *B. thuringiensis* é caracterizado pela produção de proteínas endotoxinas, enzimas hidrolíticas e outros metabólitos com propriedades inseticidas, eficazes contra insetos vetores de doenças e pragas agrícolas (BRAVO et al. 2013; OSMAN et al., 2015; VALTIERRA-DE-LUIS et al., 2020; LAZARTE et al., 2021; AZIZOGLU et al., 2023).

Apesar da eficácia dos biolarvicidas à base de Bt em criadouros de culicídeos, há algumas desvantagens desses produtos quanto à persistência no ambiente. Em condições de

campo, os bioinseticidas são afetados por vários fatores abióticos, como a luz solar, baixa estabilidade e períodos curtos de efeito residual. Isso limita a aplicação mais ampla e o tempo de persistência desses produtos no ambiente (ZEQUI et al., 2015; JIN et al., 2018; LI et al., 2022; LI et al., 2024).

Embora a resistência de campo aos cristais de Bti não tenha sido documentada, já foi detectada resistência à toxina Bin de *L. sphaericus* em populações de campo de *Culex pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* (PARIS et al., 2011; MOHIDDIN et al., 2016). Diante disso, é crucial buscar e identificar novos agentes larvicidas biológicos que não apenas apresentem maior eficácia, mas também maior adaptabilidade e tolerância a diversas condições climáticas locais, oferecendo vantagens em relação aos produtos comerciais provenientes de outras regiões (SU et al., 2019; SILVA-FILHA et al., 2021).

Avanços em técnicas biotecnológicas e abordagens moleculares resultaram em desenvolvimentos significativos e descobertas sobre as características e moléculas produzidas por esses microrganismos. Nesse contexto, a genômica, proteômica e metabolômica são fundamentais nessas pesquisas, pois contribuem para o entendimento do genoma, a identificação de moléculas secretadas por essas bactérias e a análise dos fatores de patogenicidade contra os mosquitos vetores. Além disso, métodos de mineração de genes e identificação de proteínas inseticidas são relevantes (KHURANA et al., 2020; GANGMEI et al., 2025).

Na região Amazônica, há uma abundância de microrganismos em diversos ambientes naturais, mas pouco deles são bem conhecidos (PEREIRA et al., 2017; GÓMEZ et al., 2024). Estudos com linhagens bacterianas isoladas da região amazônica demonstraram potencial larvicida contra o *A. aegypti*; no entanto, mais investigações são necessárias para caracterizar e identificar esses organismos e seus metabólitos responsáveis pela toxicidade em mosquito vetores (SOARES-SILVA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2021; KATAK et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2024, MUNIZ et al., 2025).

Este estudo realizou uma investigação das características genômicas, proteômicas e bioinseticidas de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis*, revelando informações relevantes sobre seu potencial entomopatogênico.

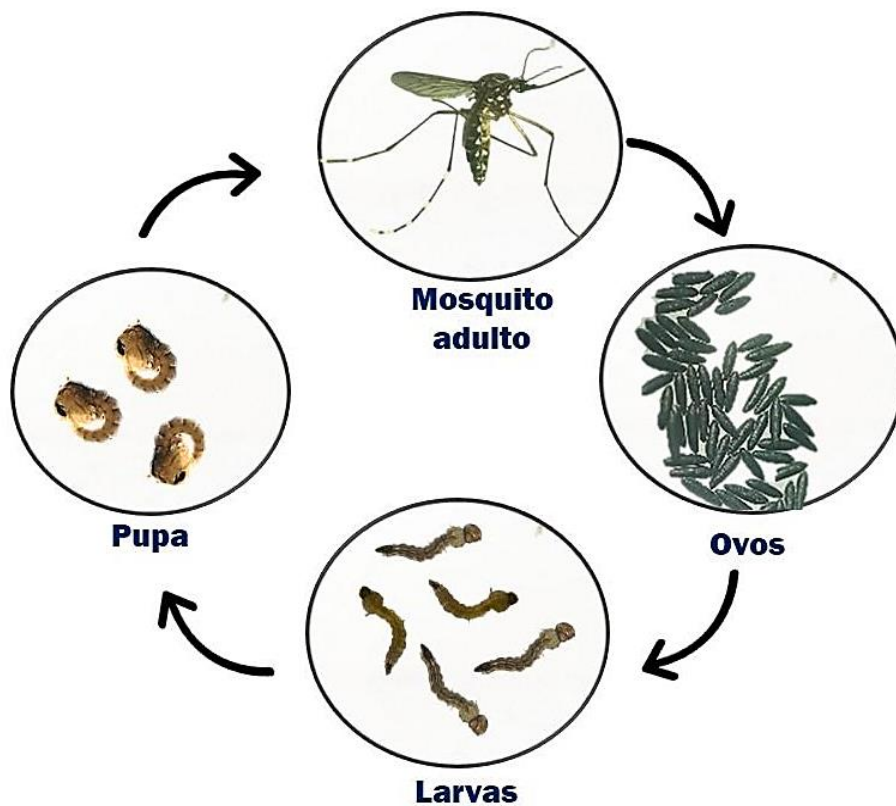
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) é um vetor de importância epidemiológica, pois transmite arbovírus que causam diversas arboviroses, impactando negativamente à saúde humana (MANIERO et al., 2016; BRASIL/MS et al., 2025). Originário da África, o *A. aegypti* apresenta uma distribuição global em áreas tropicais e subtropicais. Inicialmente relatado em regiões florestais africanas, o mosquito se adaptou aos ambientes domésticos à medida que a agricultura se desenvolveu na região, sendo atualmente encontrado quase universalmente (WRBU, 2023). No Brasil, os primeiros registros foram no século XIX, e hoje ele está presente em todos os estados brasileiros (KRAEMER et al., 2015; FIOCRUZ, 2023; BRASIL/MS, 2025).

Diante da problemática causada por esses vetores, é essencial compreender a biologia e o comportamento do *A. aegypti*. Este mosquito pertence ao gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia* e família Culicidae. *A. aegypti* apresenta características que o diferencia dos demais culicídeos, como a presença de listras brancas no tórax em formato de lira musical e manchas esbranquiçadas nas pernas. Seu ciclo de vida é holometábolo, ou seja, passa por uma metamorfose completa, que consiste em quatro fases: ovos, larvas em quatro estádios, pupa e adultos (Figura 2). As pupas e larvas se desenvolvem em ambientes aquáticos, enquanto os adultos são terrestres. As larvas se alimentam de partículas orgânicas presentes na água, como microalgas e microrganismos. Os ovos são longos, lisos, de formato ovóide, são depositados em recipientes naturais ou artificiais, onde podem sobreviver meses antes de eclodir (FORATTINI, 2002; ZETTEL e KAUFMAN, 2009; WRBU, 2024).

**Figura 1:** Ciclo de Vida do *Aedes aegypti*



Fonte: Laboratório de Malária e Dengue (INPA), 2024

O mosquito *A. aegypti* está presente em ambientes urbanos e semi-urbanos em associação próxima ao homem. A proliferação das populações desse vetor nas regiões tropicais e subtropicais está intimamente relacionada às mudanças climáticas (ASAD et al., 2018; BORGES et al., 2021; FACCHINELLI et al., 2023). Por isso, é fundamental conscientizar a importância de manter os ambientes livres de acumulação de água parada, que serve como criadouro artificial onde as fêmeas depositam seus ovos (BRASIL/MS, 2025).

As arboviroses acometem milhares de pessoas em várias regiões em todo o mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais. As características climáticas e sociais dessas áreas favorecem a proliferação dos mosquitos. As fêmeas do *A. aegypti* são hematófagas e se alimentam de sangue humano para obter as proteínas necessárias à maturação dos ovos. Uma vez infectadas pelo vírus, elas podem transmiti-lo a humanos saudáveis por meio da picada (FOSTER, 2019; BEHERA et al., 2023; LOPES et al., 2024).

## 2.2 Principais arbovírus transmitidos pelo *Aedes aegypti*

Os arbovírus transmitidos pelo *A. aegypti* que estão em circulação no Brasil são: chikungunya (CHIK), dengue (DEN) e o Zika Vírus (ZIK). O dengue e o Zika são pertencentes à família *Flaviviridae*, enquanto o vírus chikungunya pertence à família *Togaviridae* (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2015; HIGUERA et al., 2019). A incidência anual das arboviroses teve um aumento significativo com impacto negativo à saúde humana (JAFFAL et al., 2023; BRASIL/MS 2024). O arbovírus causador da dengue possui quatro sorotipos virais: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A dengue é uma das doenças que mais afeta os seres humanos, com disseminação principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (LOZOVEI, 2011; ROSENBLATT, 2020).

Atualmente, houve um aumento dos casos de arboviroses, representando um grande desafio para a saúde pública no Brasil. Essas doenças podem causar uma variedade de sintomas, desde febre leve até complicações mais sérias, sendo algumas delas fatais (PAJOR et al., 2024). Anualmente, são registrados e monitorados casos de morbidade e mortalidade em pessoas infectadas pelos vírus da dengue, chikungunya, Zika e febre amarela urbana. De acordo com dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, na Semana Epidemiológica 01 a 05 de 2025, ocorreram 1.158.637 casos prováveis de dengue e 791 óbitos confirmados. Em relação aos dados de Zika, ocorreram 2.340 casos prováveis e um óbito e para chikungunya, ocorreram 79.176 casos prováveis e 68 óbitos (BRASIL/MS, 2025).

Recentemente, foi disponibilizada a vacina Qdenga contra os quatro sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), distribuídas nos postos de vacinação pelo Ministério da Saúde por meio do Programa Nacional de Imunização (PNI) em algumas regiões prioritárias. Entretanto, as vacinas para os arbovírus chikungunya e Zika ainda estão em fase de estudos pré-clínicos e clínicos (SHAIKH et al., 2024; PENG et al., 2024). Assim, é necessário estabelecer um sistema de controle eficaz e abrangente para reduzir a densidade populacional de mosquitos vetores. Uma vez que as vacinas estão em desenvolvimento contra os demais arbovírus, o controle vetorial continua sendo uma estratégia importante como medida profilática. Isso ocorre através das ações adotadas pelos órgãos públicos de saúde (WANG et al., 2021; BRASIL/MS, 2024).

### 2.3 Estratégias de Controle do *Aedes aegypti*

Como já foi mencionado, o controle do vetor é fundamental para a diminuição da disseminação do vírus e, conseqüentemente, para a redução de doenças. Diversos métodos de controle vetorial são utilizados, incluindo o controle químico, físico e biológico. Embora o controle químico seja amplamente empregado, pode causar impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana (SMITH et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2017; CONWAY et al., 2023).

O controle biológico consiste na utilização de microrganismos que produzem fatores de patogenicidade e virulência nas diferentes fases de vida dos vetores. Um exemplo notável são as bactérias do gênero *Bacillus*, com destaque para *B. thuringiensis*, que produz moléculas como enzimas hidrolíticas, proteínas inseticidas e metabólitos secundários eficazes contra diferentes ordens de insetos (SINGH et al., 2023; PANDEY et al., 2024). Quando combinado com outras medidas, o controle biológico se apresenta como uma das melhores alternativas, pois não causa danos ao meio ambiente e nem à saúde humana. As moléculas naturais demonstraram ser mais eficazes e menos nocivas em comparação aos inseticidas sintéticos tradicionais (CERNA e MARTINEZ, 2023; GANGMEI et al., 2024).

Os biopesticidas, derivados de organismos vivos, incluindo animais, plantas e microrganismos, oferecem uma alternativa menos tóxica em relação aos pesticidas tradicionais. Eles são ecologicamente corretos e têm potencial para controlar pragas de insetos e vetores de doenças. Para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, o uso de biolarvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* (Bti) e espinosade — derivado da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* — é atualmente recomendado pelo Ministério da Saúde apenas em criadouros que não podem ser eliminados ou manejados de outra forma. Essa abordagem atende às recomendações de manejo para prevenir o desenvolvimento de resistência aos inseticidas (PAN et al., 2011; BRASIL/MS, 2025).

### 2.4 Bactérias do gênero *Bacillus* no controle de mosquitos vetores

Membros do gênero *Bacillus* são bactérias gram positivas, em forma de bastonetes e formadoras de esporos, pertencentes ao filo Bacillota (OREN et al., 2021). Este gênero inclui espécies com ampla variação no conteúdo de DNA genômico G+C, tornando-se evolutivamente e filogeneticamente heterogêneo. Entre bactérias, a porcentagem de pares de bases GC em um genoma, pode variar entre diferentes grupos taxonômicos. Essa medida é importante em estudos

de genética, pois implica na diversidade genética e a evolução das espécies, o que pode fornecer novidades sobre suas relações evolutivas (LOGAN et al., 2009; GUPTA et al., 2020; MAHAJAN et al., 2022; TENG et al., 2023).

As espécies de *Bacillus* despertam interesse biotecnológico devido à produção de toxinas inseticidas, probióticos, antifúngicos, biosurfactantes e antimicrobianos como lipopeptídeos, bacteriocinas, fengicina, petrobactina e diversas enzimas com aplicações na indústria. Assim, podem atuar como agentes de biocontrole de fitopatógenos, na degradação de poluentes ambientais, produzindo uma variedade de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e inseticida. Essas características fazem com que *Bacillus* seja um gênero altamente versátil e útil em várias áreas da biotecnologia (CHAABOUNI et al., 2012; SALAZAR et al., 2023).

Espécies desse gênero *Bacillus* já foram isoladas de diferentes ambientes e se destacam por seu potencial inseticida contra vetores dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (BRAVO et al., 2013; SOARES-SILVA et al., 2017; KATAK et al., 2021; FÁTIMA et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2024). Entre as bactérias patogênicas para insetos vetores de doenças, *B. thuringiensis* var. *israelensis* é amplamente estudado por suas características bioinseticidas e suas diversidade genética e metabólica. Os componentes celulares desse microrganismo incluem esporos e proteínas cristalinas, formando um complexo espora-cristal que compõe os produtos já disponíveis no mercado (LOGAN et al., 2009; RADHAKRISHNAN et al., 2017; CRICKMORE et al., 2021; FALQUETO et al., 2021).

Os produtos à base da subespécie *B. thuringiensis israelensis* estão comercialmente disponíveis sob os nomes Vectobac®, Teknar® e Bactimos®. Esses produtos são particularmente importantes, pois são amplamente utilizados no controle de dípteros que são vetores de doenças tropicais, como malária, dengue, Zika e chikungunya (DERUA et al. 2018; DAHMANA et al., 2020; AZIZOGLU et al., 2023). O Bti sintetiza proteínas cristalinas denominadas de  $\delta$ -endotoxinas (Cry e Cyt), que se formam durante esporulação e na fase estacionária de crescimento. Além disso, outras proteínas Vip, Sip, App, Gpp, Mcf, Mpf, Mpp, Mtx e Xpp já foram descritas com propriedades tóxicas a mosquitos vetores (Figura 3) (PALMA et al., 2014; BEL et al., 2020; CRICKMORE et al., 2021; AZIZOGLU et al., 2023).

**Figura 2:** Cristais de proteína misturados com esporos de *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Palma et al., 2014

O mecanismo de ação de proteínas das  $\delta$ -endotoxinas já foi elucidado e descreve como essas moléculas funcionam e interagem com o inseto alvo. Quando as larvas do inseto ingerem as protoxinas, o cristal da proteína é solubilizado pelo pH alcalino do intestino. Em seguida, as protoxinas são ativadas pela ação de proteases digestivas, resultando na forma ativa das toxinas. Essas protoxinas são clivadas e se ligam a receptores presentes nas superfícies das células epiteliais do intestino médio (PALMA et al., 2014; BRAVO et al., 2017).

Após a interação entre a proteína ativa e os receptores, ocorre uma mudança conformacional na molécula, permitindo sua inserção no epitélio intestinal da larva. Isso resulta na formação de oligômeros de toxinas e na formação de poros nas membranas celulares. Consequentemente, há um aumento do pH do lúmen intestinal, levando à paralisia geral, lise celular e ruptura da membrana basal (PARDO-LÓPEZ et al., 2013; CRICKMORE et al., 2021). Esse processo culmina na destruição do tecido intestinal do inseto, comprometendo sua capacidade de digestão e absorção de nutrientes. Além disso, a formação de poros nas células epiteliais provoca a perda de fluidos e eletrólitos, contribuindo ainda mais para a desidratação e morte da larva.

Além das moléculas já citadas, outras proteínas com toxicidade e modos de ação em larvas de insetos vetores incluem as endotoxinas proteínas citolíticas (Cyt), proteínas inseticidas vegetativas (Vips) e proteínas inseticidas secretadas (Sip), bem como enzimas hidrolíticas quitinases. Essas proteínas estão relacionadas a fatores de virulência e à

patogenicidade em insetos vetores (COSTA et al., 2010; MALOVICHKO et al., 2019). Além das endotoxinas, outras proteínas, como  $\beta$ -exotoxina conhecida como thuringiensina-fosfolipases e hemolisinas, apresentam mecanismos de interação sinérgica que contribuem para o aumento da eficiência inseticida (LÓPEZ-MOLINA et al., 2021; AZIZOGLU et al., 2023). Tanto as proteínas Cry quanto as Cyt são sintetizadas durante a fase de esporulação, embora apresentem homologias distintas (BRAVO et al., 2013). Outro fato importante para se destacado é que as proteínas vegetativas (Vip) podem estar presentes no sobrenadante do cultivo tanto na fase vegetativa quanto na fase de esporulação (BRAVO et al., 2011; GUPTA et al., 2021).

A bactéria *B. thuringiensis* possui um amplo espectro de mecanismos de ação contra insetos vetores de doenças e pragas agrícolas, contribuindo positivamente para o controle biológico (PALMA et al., 2014; CRICKMORE et al., 2021). Apesar do mecanismo de ação já elucidado, esses microrganismos produzem uma infinidade de outros metabólitos que precisam ser investigados quanto ao seu modo de ação nos insetos-alvos.

Atualmente, há um crescente interesse por parte dos pesquisadores na busca de novas bactérias entomopatogênicas e na caracterização novas moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos biolarvicidas. Essas alternativas podem auxiliar e ampliar os métodos de controle vetorial de mosquitos (FALQUETO et al., 2021; KATAK et al., 2023, SUNARTI et al., 2025). Diante da variabilidade das proteínas inseticidas já descritas, é fundamental compreender o modo de ação dessas moléculas. Assim, a busca por abordagens ômicas torna-se relevante para caracterizar esses microrganismos e suas moléculas, que podem ser essenciais no controle vetorial.

## 2.5 Fatores que afetam as proteínas e os esporos

Os biolarvicidas à base de *B. thuringiensis* (Bti) são amplamente utilizados em todo o mundo para controlar insetos vetores de doenças. Os principais ingredientes ativos desses larvicidas são cristais contendo protoxinas que, em sinergia, oferecem uma alta eficácia na eliminação de larvas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (PARDO-LÓPEZ et al., 2012; CARVALHO et al., 2018; SILVA-FILHA et al., 2021).

Em áreas com alta infestação, o uso contínuo de biolarvicidas é necessário, o que pode exercer pressão seletiva sobre os mosquitos. No entanto, estudos indicam que a exposição prolongada de *A. aegypti* ao Bti não induz resistência significativa, reforçando sua viabilidade sustentável no controle vetorial. No entanto, é fundamental desenvolver estratégias de manejo

para minimizar a pressão de seleção e explorar novas toxinas bacterianas para retardar o surgimento de resistência (POLANCZYK et al., 2017; CARVALHO et al., 2018; GANGA et al., 2023).

Embora as proteínas cristalinas e esporos de Bti sejam tóxicas para os insetos, as formulações à base de moléculas naturais podem ser influenciadas por diversos fatores e condições climáticas, afetando sua persistência no ambiente (ZEQUI et al., 2015; DO NASCIMENTO et al., 2022; DERUA et al., 2022). Além disso, as formulações de Bti, sendo preparações microbianas vivas, podem ser inativadas por radiação UV, temperaturas severas ou baixas e agentes químicos, o que pode comprometer a germinação dos esporos e o crescimento celular, resultando em problemas relacionados à persistência dos bioinseticidas (ZEQUI et al., 2015; ZOGO et al., 2019; LIANG et al., 2023; CHEN et al., 2024).

Estudos recentes buscam novas formulações de *B. thuringiensis israelensis* com o objetivo de preservar a toxina bacteriana por mais tempo no ambiente, que possuem maior persistência no campo (VIJAYAKUMAR et al., 2024). Portanto, é importante realizar pesquisas para identificar novos agentes larvicidas biológicos e novas moléculas inseticidas com características que possam melhorar a eficácia e a durabilidade dos biolarvicidas, como parte de uma estratégia para o controle sustentável dos mosquitos vetores (MOUSTAFA et al., 2018; FERNÁNDEZ-CHAPA et al., 2021). A utilização de um Bt nativo como agente de controle biológico é vantajosa para o controle de mosquitos, pois essas bactérias tendem a se adaptar melhor às condições ambientais locais, tornando o controle mais eficaz e duradouro. Comparadas às cepas importadas, as nativas podem ser mais eficazes, duráveis e apresentar menor risco de resistência. A diversidade genética das linhagens locais pode oferecer uma variedade de toxinas e mecanismos de ação, o que ajuda a retardar o desenvolvimento de resistência. Além disso, o uso de isolados locais reduz custos e promove soluções mais sustentáveis e eficientes no controle biológico (BRAVO et al., 2007; FAYAD et al., 2019; BRUHL et al., 2020).

## **2.6 A genômica aplicada ao estudo de microrganismos**

As abordagens ômicas relacionados à biotecnologia microbiana abrangem diversas disciplinas, incluindo a genômica comparativa, pan-genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Essas técnicas têm como objetivo caracterizar sequências genômicas, proteínas e enzimas expressas (proteômica), ácidos ribonucleicos (RNAs) e transcriptomas, além de oferecer ferramentas para analisar os produtos finais do metabolismo (metabolômica). A

genômica, proteômica, transcriptômica e a metabolômica são essenciais para investigar as interações complexas entre moléculas e contribuir para a compreensão do comportamento biológico de diferentes sistemas em organismos específicos (DE SOUSA et al., 2018; FERONE et al., 2020; ANAND et al., 2024).

Os membros do gênero *Bacillus* têm sido objeto de estudo por décadas, vem desempenhando uma variedade de funções no ecossistema devido à sua ampla distribuição em diversos ambientes naturais e suas características genéticas. No entanto, a classificação e a caracterização de *Bacillus* ainda representam desafios devido à sua estrutura taxonômica complexa e à evolução constante (LOGAN e DE VOS, 2009; PATEL e GUPTA, 2020). A história filogenética e evolutiva global deste gênero continua sendo bastante confusa e pouco elucidada. Isso se deve ao fato de que as espécies de *Bacillus* apresentam uma variedade significativa de propriedades fenotípicas e moleculares (ZEIGLER e PERKINS, 2021; XU et al., 2024).

O avanço na evolução de espécies do gênero *Bacillus* pode ser caracterizado por diversos fatores. Um deles é a elevada taxa de mutação, que gera uma significativa diversidade genética. Além disso, a transferência horizontal, na qual os genes são compartilhados entre diferentes espécies, permite a introdução de novas características adaptativas, como resistência a antibióticos e produção de metabólitos secundários, que contribui para o avanço do processo evolutivo de espécies desse gênero e suas habilidades metabólicas (PATIÑO-NAVARRETE e SANCHIS, 2017; GILLIS et al., 2018; SLOMKA et al., 2020).

Outro aspecto importante é que as espécies de *Bacillus* habitam uma ampla variedade de ambientes extremos, o que impõe diferentes pressões seletivas sobre elas. Além disso, a capacidade de formar esporos altamente resistentes é crucial para sua sobrevivência e reprodução em condições adversas (HURTADO-BAUTISTA et al., 2021; WANG et al., 2024).

Dentre as diversas técnicas moleculares disponíveis, o sequenciamento do gene 16S *rRNA* surgiu como um método rápido e econômico para classificar comunidades bacterianas, sendo ainda amplamente utilizado atualmente. Contudo, essa abordagem é insuficiente para diferenciar todas as espécies de *Bacillus*. Estudos revelam que 93,3 % dos membros do gênero *Bacillus* possuem múltiplas cópias dos genes 16S *rRNA*, e 55, 32% dos alelos 16S são idênticos a outras espécies. Essa alta multiplicidade de alelos nas espécies do gênero *Bacillus* resulta em uma extensa sobreposição entre elas; portanto, os amplicons obtidos nestes genomas raramente são exclusivos para as espécies individuais (PAN et al., 2023; STRUBE, 2021; XU et al., 2024).

A caracterização precisa de um membro deste gênero permite inferir relações evolutivas e diversidade genética entre as espécies, além de possibilitar a identificação de novas linhagens. Para caracterizar *Bacillus*, os pesquisadores desenvolveram uma variedade de métodos polifásicos que incluem caracterização fenotípica tradicional, análises moleculares baseadas em comparações genômicas e determinações quimiotaxonômicas (DUNLAP et al., 2020; XU et al., 2024).

O avanço das tecnologias do sequenciamento de nova geração (NGS) revolucionou os padrões para caracterização de novas cepas bacterianas, abrindo novos caminhos para o estudo das populações de *Bacillus* e seus diversos papéis ecológicos. Isso também resultou no desenvolvimento da pesquisa de microbioma. Além disso, essas tecnologias contribuíram significativamente para a descoberta de novas espécies de *Bacillus*, gerando uma enorme quantidade de sequências genômicas (SHENDURE e JI, 2008; LIU et al., 2017; TASSIOS et al., 2018; FAYAD et al., 2023).

Até o momento, mais de mil genomas completos de espécies de *Bacillus* foram depositados no National Center for Biotechnology Information (NCBI), e esse número continua a crescer. Para caracterizar sistematicamente novos isolados de *Bacillus*, são necessários testes bioquímicos, fenotípicos e genotípicos com análise do gene *16S rRNA* em comprimento total e a análise comparativa do genoma após o sequenciamento do genoma completo (WGS). Recentemente, a taxonomia de *Bacillus* foi revisada por meio de estudos filogenômicos e abordagens genômicas comparativas, levando à divisão do gênero em 23 novos gêneros (GUPTA et al., 2020; PATEL e GUPTA 2020).

O gênero *Bacillus* é um dos mais versáteis em termos de descoberta de novos táxons, levando à identificação de novos produtos naturais, peptídeos ribossomais, petrobactina e novas moléculas inseticidas. Como sideróforo, a petrobactina atua como um peptídeo que se liga a metais, reduzindo a disponibilidade de ferro para patógenos e, assim, contribuindo para a redução de microrganismos patogênicos. A genômica se destaca como uma abordagem eficaz para identificar microrganismos e suas moléculas, sendo especialmente útil no desenvolvimento de produtos biotecnológicos (PACHECO et al., 2021; PALMA et al., 2024).

Diversos genes presentes no genoma de *Bacillus* estão associados à síntese de uma ampla variedade de metabólitos secundários (ONGENA e JACQUES, 2008; COCHRANE e VEDERAS, 2016; SALAZAR et al., 2023). Considerando os desafios impostos pelas doenças transmitidas por mosquitos, estratégias biológicas baseadas em análises genômicas têm sido empregadas para investigar a variabilidade genética desses microrganismos. O principal

objetivo é identificar genes responsáveis pela codificação de moléculas com atividade contra mosquitos vetores (KHURANA et al., 2020; GANGMEI et al., 2024)

O estudo do genoma de bactérias entomopatogênicas, especialmente do *B. thuringiensis*, tem revelado propriedades inseticidas significativas. A anotação do genoma e a triagem de proteínas já conhecidas e eficazes contra diversas ordens de insetos são fundamentais nesse processo (ALVES et al., 2023; PALMA et al., 2024). Além disso, a análise genômica dos clusters de genes biossintéticos (BGCs) tem contribuído para identificação de metabólitos secundários com propriedades biotecnológicas, inclusive com toxicidade contra insetos vetores (JEONG et al., 2017; LECHUGA et al., 2020). O sequenciamento completo do genoma é uma estratégia inicial essencial para investigar as características genéticas de determinado microrganismo. Essas abordagens fornecem informações valiosas sobre a composição genética, o potencial da atividade inseticida e a capacidade biossintética. Os BGCs e as proteínas pesticidas identificadas ajudam na compreensão do potencial de biocontrole de cepas contra insetos vetores, além de elucidar o mecanismo patogênico e o fenótipo das espécies de *B. thuringiensis* (JEONG et al., 2017; LECHUGA et al., 2020; PALMA et al., 2024).

Além da abordagem genômica, a prospecção de genes relacionados a proteínas inseticidas é frequentemente realizada por meio de análises de loci gênicos utilizando técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), expressão gênica e abordagem proteômica. Essas metodologias têm sido cruciais para a descoberta de novos fatores relacionados à virulência das bactérias entomopatogênicas (RANG et al., 2015; ALVES et al., 2023).

Portanto, com a redução dos custos da tecnologia de sequenciamento de genoma de alto rendimento, a disponibilização de dados genômicos para cepas de Bt em bancos de dados públicos está crescendo exponencialmente. À medida que a área da genômica se expande, novas propriedades sobre o Bt são descobertas, o que deverá resultar no desenvolvimento de biolarvicidas mais eficientes e sustentáveis (ALVES et al., 2020; LI et al., 2024; GANGMEI et al., 2025).

## **2.7 Abordagem Proteômica**

A proteômica envolve uma série de aplicações e tecnologias destinadas à identificação e quantificação das proteínas presentes em uma célula, tecidos ou organismo (ASLAM et al., 2016; NOOR et al., 2021). As tecnologias baseadas na proteômica têm diversas utilidades, incluindo a compreensão dos mecanismos de patogenicidade e a interpretação das vias funcionais das proteínas. Essa abordagem não apenas permite a identificação de proteínas,

mas também a caracterização extensiva de sua estrutura primária, topologia, rede de interações, funções e regulação (DOHERTY e WHITFIELD, 2011; ARMENGAUD et al., 2013; OZMA et al., 2022).

Além disso, essa tecnologia tem sido utilizada para diferenciar entre cepas não patogênicas e patogênicas dentro da mesma espécie, identificando peptídeos específicos associados a fatores de virulência. Com o avanço das análises genômicas, os estudos fenotípicos passaram a ser complementados por dados genômicos, ampliando o conhecimento sobre os microrganismos. Posteriormente, o estudo de proteínas abriu o campo da proteômica com diversas aplicações, incluindo ferramentas de bioinformática utilizadas para a identificação de microrganismos (YEOH et al., 2020; PARIJA et al., 2023).

A espectrometria de massas para identificação rápida de microrganismos tem se expandido nos últimos anos. Técnicas como LC-MS-MS e MALDI-TOF têm sido utilizadas com sucesso para caracterizar toxinas, fatores de virulência e outras proteínas de diferentes espécies bacterianas (ARMENGAUD, 2013; MAPPA et al., 2021; ABELE et al., 2025).

A proteômica *shotgun* é uma abordagem que permite a análise do proteoma completo e a descoberta de novos biomarcadores. Diversos experimentos baseados em espectrometria de massas, juntamente com ferramentas bioquímicas e bioinformática, possibilitam quantificar de forma confiável níveis de milhares de proteínas bacterianas, oferecendo uma análise abrangente dos mecanismos de patogenicidade (SEMANJSKI et al., 2016; ABRIL et al., 2020; COORSSEN e PADULA, 2024).

Nos últimos anos, as possibilidades da proteômica e da bioinformática se expandiram consideravelmente. Isto se deve à combinação de tecnologias, sistemas de *software* e as capacidades de equipamentos analíticos, que permitem complementar os resultados da análise proteômica com dados genômicos, metabolômicos e transcriptômicos (GRUBBS et al., 2017; GOMIS-CEBOLLA et al., 2018; SHAROV et al., 2023). Na área de microbiologia, o estudo da proteômica é uma etapa crucial na sistematização da posição taxonômica das espécies e na análise da patogenicidade dos microrganismos. As primeiras abordagens em análise proteômica concentravam-se no estudo de uma ou várias proteínas. No entanto, o desenvolvimento de métodos de espectrometria de massa possibilitou a análise de misturas complexas de proteínas, considerando alterações sistêmicas em processos biológicos (MACCARRONE et al., 2017; SHAROV et al., 2023).

Independentemente das áreas de aplicação da proteômica, como medicina, pesquisa científica e diagnóstico, a análise proteômica em microbiologia visa, a determinação das características estruturais e funcionais de proteínas e peptídeos, bem como a medição

quantitativa do conteúdo de proteínas nas células ou tecidos. Essas análises incluem também a determinação dos mecanismos de patogenicidade e a influência de diversos fatores na expressão de proteínas em microrganismos (HUANG et al., 2012; HARITH et al., 2019; SHAROV et al., 2023).

A proteômica está sendo utilizada para a análise e identificação de proteínas de bactérias entomopatogênicas, fornecendo dados relevantes que contribuem para o controle biológico de insetos vetores de doenças humanas (ALVES et al., 2023; KUNNIKURUVAN et al., 2025). O uso dessas técnicas tem mostrado avanços significativos no controle de mosquitos utilizando *B. thuringiensis*. Esses estudos envolvem a identificação e caracterização de novas espécies e moléculas inseticidas (IBRAHIM et al., 2010; HOLMAN et al., 2012; CABALLERO et al., 2020). Portanto, estudos que combinam genômica e proteômica das proteínas inseticidas são essenciais para compreender os fatores de virulência e patogenicidade de cepas de Bt ou de um dado microrganismo.

## **2.8 Prospecção metabolômica de metabólitos secundários de *Bacillus* spp.**

As espécies de *Bacillus* produzem metabólitos secundários que são objetos de estudo na química de produtos naturais. Os *Bacillus* spp. são conhecidos por produzir esses compostos, que podem ser classificados em derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos policetídeo-peptídeos. Esses metabólitos apresentam diferentes estruturas químicas e diversas atividades biológicas (LIU et al., 2014; DAHMANA et al., 2020; YADAV et al., 2021; ZHANG et al., 2022). A ampla variabilidade estrutural desses compostos despertou o interesse de pesquisadores, que investigam suas atividades biológicas em extratos microbianos. (BAI et al., 2022; MUKHERJEE et al., 2024).

Dentre as diversas aplicações biológicas dos *Bacillus*, destacam-se as atividades antimicrobianas, antivirais, imunossupressoras e antitumorais, que permitem que essas bactérias sobrevivam em seus ambientes naturais. Essas descobertas ampliam a potencial importância industrial de *Bacillus* spp., especialmente de *B. thuringiensis*, um agente entomopatogênico (SANSINENEA et al., 2011; BAI et al., 2022; SALAZAR et al., 2023).

Em geral, os metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* servem como armas competitivas usadas contra outras bactérias, fungos, plantas e insetos (YARDIMCI et al., 2024; SURENDRA et al., 2025). Comparados aos inseticidas sintéticos tradicionais, os extratos bacterianos têm menor probabilidade de levar ao desenvolvimento de resistência aos mosquitos, pois frequentemente contêm numerosos compostos com atividade inseticida. Embora as

pesquisas sobre fontes naturais de novos compostos com ação mosquitocida tenha ressurgido, relativamente poucos produtos naturais conseguiram se tornar agentes de controle de vetores aprovados (DEMAIN e FANG, 2000; CHAABOUNI et al., 2012; GANGMEI et al., 2024).

A busca por microrganismos e seus metabólitos secundários tem sido investigada por meio do sequenciamento do genoma e predição de cluster de genes biossintéticos, responsáveis pela síntese desses compostos. Exemplos incluem fengicina, bacilibactina e petrobactina, que possuem propriedades antibacterianas, fungicidas e inseticidas. Estudos demonstraram os efeitos de metabólitos secundários de *Bacillus* spp. sobre larvas de *A. aegypti* (REVATHI et al., 2013; MEESIL et al., 2023; SHIKOV et al., 2024). A investigação destes autores envolveu o uso de ferramentas bioinformáticas para identificar genes ou agrupamentos de genes com similaridades a genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários já identificados e caracterizados na literatura ou em bancos de dados de proteínas.

Os diferentes subgrupos químicos, incluindo alcalóides, antracenos, azoximetoxitetra-hidropiranos, citocalasanos, 2,5-dicetopiperazinas, isocromanonas, naftoquinonas, pequenos ácidos orgânicos e seus ésteres metílicos, esteróis e terpenos (incluindo sesquiterpenos e diterpenos), foram testados quanto à sua atividade larvicida e adulticida contra *A. aegypti*, demonstrando eficácia contra dípteros (MASI et al., 2017; DHAYALAN et al., 2019). Os terpenoides (sesquiterpenos) previamente isolados do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* mostraram que seu modo de ação pode estar relacionado à sua natureza lipofílica, que lhes permite penetrar na membrana celular de bactérias patogênicas. Contudo, o mecanismo de ação desses compostos em insetos ainda não está totalmente elucidado (INOUE et al., 2004; JUSTICIA et al., 2005; MASI et al., 2017; IQBAL et al., 2023).

O sequenciamento do genoma de várias cepas de *B. thuringiensis* revelou que os metabólitos secundários, como petrobactina, bacilibactina, fengicina e panielamicina, são produzidos por clusters de NRPS/PKS. Outros genes, como a *zwiitermicina* e quitinases, estão envolvidos na capacidade antagônica de *B. thuringiensis*, com propriedades antibacterianas e fungicidas (DE ALMEIDA et al., 2021; KUKRETI et al., 2024; PALMA et al., 2024). A petrobactina é um forte antibiótico à base de sideróforos com ação em patógenos multirresistentes; atua como um peptídeo que se liga a metais, reduzindo a disponibilidade de ferro para os patógenos (DIMOPOULOU et al., 2021; SHIKOV et al., 2024).

Além de sua capacidade inseticida, as cepas de *B. thuringiensis* apresentam atividades nematocidas, bactericidas, fungicidas e promotoras do crescimento de plantas (UNZUE et al., 2022; MONTOYA-MARTÍNEZ et al., 2024). Além disso, já foram descritos peptídeos que compõem a bibacilina 1, modificados por uma lantipeptídeo sintetase de classe II de dois

componentes de *B. thuringiensis*, com atividade bactericida antimicrobiana (HETRICK et al., 2017; ONGPIPATTANAKUL et al., 2022; MOREIRA et al., 2024).

## **2.9 Regulamentação dos produtos bioinseticidas**

Um microorganismo entomopatogênico, para ser introduzido no mercado, deve ser altamente eficaz e preencher todos os requisitos e ser rigorosamente regulamentados pelas agências governamentais, como a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) na União Europeia. O objetivo dessas regulamentações é assegurar a segurança, eficácia e o impacto ambiental dos bioinseticidas (SANSINENEA et al., 2016; ANVISA, 2020; EPA, 2024).

*B. thuringiensis* (Bt) é uma bactéria entomopatogênica que preenche todos os requisitos e está sendo usada na agricultura e no controle de mosquitos. Entretanto, antes que os bioinseticidas à base de microrganismos sejam registrados pelas agências governamentais, eles devem passar por um processo rigoroso de avaliação. Isso inclui testes de laboratório para avaliar os efeitos na saúde da população a curto e longo prazo, além de vários estudos toxicológicos, ecotoxicológicos e estudos de eficiência e eficácia contra alvos específicos. (MITTAL et al., 2003; ARTAEGA et al., 2014; LI et al., 2024). Neste sentido, é fundamental garantir que esses produtos tenham alta qualidade e eficácia contra alvos específicos, sem apresentar riscos à saúde humana, animal ou ao meio ambiente.

Para otimizar o impacto dos programas de controle de vetores, é necessário realizar pesquisas contínuas que garantam a eficácia e a segurança dos produtos a longo prazo. Isso envolve estudos sobre métodos de aplicação, ajuste de dosagem e estratégias comunitárias, além da análise dos fatores que afetam a eficácia residual dos biolarvicidas no campo. A utilização de biopesticida à base de bactérias entomopatogênicas é essencial para melhorar a saúde pública e reduzir as populações de mosquitos (ZOGO et al., 2019; PANDEY et al., 2024).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Investigar as características bioinseticidas, genômicas e proteômica de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* para o controle de larvas do *Aedes aegypti*, visando o controle deste vetor.

#### 3.2 Específicos

- Obter e anotar o genoma de uma linhagem de *Bacillus* por meio do sequenciamento de nova geração;
- Realizar a identificação de Clusters Gênicos Biossintéticos (BGCS) da linhagem GD02.13, para mapear genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários;
- Realizar a mineração genômica para a anotação funcional de proteínas inseticidas;
- Avaliar a atividade larvicida dos extratos metabólicos da linhagem GD02.13 e caracterizar seus componentes ativos contra larvas de *A. aegypti*
- Analisar o perfil proteômico e atividade larvicida de esporos e cristais da linhagem GD02.13 contra larvas de *A. aegypti*.

# Capítulo I - Genomic and morphological features of an Amazonian *Bacillus thuringiensis* with mosquito larvicidal activity

Publicado no Journal AMB Express. <https://doi.org/10.1186/s13568-025-01850-4>

Muniz et al. *AMB Express* (2025) 15:39  
<https://doi.org/10.1186/s13568-025-01850-4>

AMB Express

## ORIGINAL ARTICLE

## Open Access



# Genomic and morphological features of an Amazonian *Bacillus thuringiensis* with mosquito larvicidal activity

Veranilce Alves Muniz<sup>1</sup>, Ricardo de Melo Katak<sup>3</sup>, Lillian Caesar<sup>7</sup>, Juan Campos de Oliveira<sup>1</sup>, Elerson Matos Rocha<sup>2</sup>, Marta Rodrigues de Oliveira<sup>4</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>6</sup>, Rosemary Aparecida Roque<sup>2</sup>, Osvaldo Marinotti<sup>7</sup>, Olle Terenius<sup>8\*</sup>  and Edmar Vaz de Andrade<sup>5</sup>

### Abstract

The occurrence of mosquito-borne diseases is increasing, and their geographical range is expanding due to climate change. New control measures are urgently needed to combat these debilitating and, in some cases, fatal diseases. Bacteria of the genus *Bacillus* are of interest due to the production of bioactive compounds, including those useful for insect control. The discovery and characterization of new species of *Bacillus* with mosquito larvicidal activity may offer opportunities to develop new products for vector control. In this study, we evaluated larvicidal activity, described morphological characteristics, and sequenced and analyzed the genome of a bacterial strain (GD02.13) isolated from the Amazon region. The metabolites produced by GD02.13 are as effective in killing *Aedes aegypti* larvae as the commercial product Natular™ DT (Spinosad). Furthermore, the morphological characteristics of the GD02.13 spores and crystal inclusions resemble those previously described for *B. thuringiensis*. A phylogenetic analysis based on 443 single-copy orthologs indicated that the bacterial strain GD02.13 belongs to the *Bacillus thuringiensis* species. Its genome, which was assembled and has a size of 6.6 Mb, contains 16 secondary metabolite biosynthetic gene clusters and genes encoding insecticidal proteins, predicted based on sequence similarity. The data obtained in this study support the development of new insecticide products based on the strain GD02.13 of *B. thuringiensis*.

**Keywords** *Bacillus* spp., Bioinsecticides, Vector control, Mosquito

\*Correspondence:

Olle Terenius  
[olle.terenius@icm.uu.se](mailto:olle.terenius@icm.uu.se)

<sup>1</sup>Graduate Program in Biotechnology - PPGBIOTEC, UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>2</sup>National Institute of Amazonian Research-INPA, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>3</sup>Osvaldo Cruz Foundation – Leônidas and Maria Deane Institute, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>4</sup>Department of Entomology and Acarology, Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, ESALQ – USP - Piracicaba, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Institute of Biological Sciences - ICB/UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>6</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>7</sup>Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA

<sup>8</sup>Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, P.O. Box 596, 751 24 Uppsala, Sweden



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## Genomic and morphological features of an Amazonian *Bacillus thuringiensis* with mosquito larvicidal activity

Veranilce Alves Muniz<sup>1</sup>, Ricardo de Melo Katak<sup>3</sup>, LÍlian Caesar<sup>7</sup>, Juan Campos de Oliveira<sup>1</sup>, Elerson Matos Rocha<sup>2</sup>, Marta Rodrigues de Oliveira<sup>4</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>6</sup>, Rosemary Aparecida Roque<sup>2</sup>, Osvaldo Marinotti<sup>7</sup>, Olle Terenius<sup>8\*</sup>  and Edmar Vaz de Andrade<sup>5</sup>

### Abstract

The occurrence of mosquito-borne diseases is increasing, and their geographical range is expanding due to climate change. New control measures are urgently needed to combat these debilitating and, in some cases, fatal diseases. Bacteria of the genus *Bacillus* are of interest due to the production of bioactive compounds, including those useful for insect control. The discovery and characterization of new species of *Bacillus* with mosquito larvicidal activity may offer opportunities to develop new products for vector control. In this study, we evaluated larvicidal activity, described morphological characteristics, and sequenced and analyzed the genome of a bacterial strain (GD02.13) isolated from the Amazon region. The metabolites produced by GD02.13 are as effective in killing *Aedes aegypti* larvae as the commercial product Natular™ DT (Spinosad). Furthermore, the morphological characteristics of the GD02.13 spores and crystal inclusions resemble those previously described for *B. thuringiensis*. A phylogenetic analysis based on 443 single-copy orthologs indicated that the bacterial strain GD02.13 belongs to the *Bacillus thuringiensis* species. Its genome, which was assembled and has a size of 6.6 Mb, contains 16 secondary metabolite biosynthetic gene clusters and genes encoding insecticidal proteins, predicted based on sequence similarity. The data obtained in this study support the development of new insecticide products based on the strain GD02.13 of *B. thuringiensis*.

**Keywords:** *Bacillus* spp., Bioinsecticides, Vector control, Mosquito

### Introduction

*Aedes aegypti* is the main vector of dengue, chikungunya, Zika, and urban yellow fever viruses, which infect thousands of people worldwide (Souza-Neto et al. 2019; Semenza et al. 2022; CDC 2016). Vector control measures targeting *A. aegypti* and other mosquitoes are carried out primarily using chemical insecticides. However, prolonged use of these chemicals harms the environment, human health, and nontarget organisms (Sene et al. 2021). Furthermore, the rapid spread of insecticide resistance highlights the difficulties in controlling vectors worldwide (Demirak and Canpolat 2022). Thus, the quest for sustainable and environmentally friendly alternatives to chemical control of mosquitoes offered numerous innovations (Weng et al. 2023; Aldridge et al. 2024).

Microorganisms have significant potential to control mosquito populations and reduce vector competence, making them alternatives to chemical insecticides (Katak et al. 2023). Bacteria from the Bacillaceae family are known to produce toxins with insecticidal properties and larvicidal activity against several species of mosquitoes (Margalith and Ben-Dov 2000; Boyce et al. 2013; Santana-Martinez et al. 2019). The genus *Bacillus* is a very diverse, evolutionarily and phylogenetically heterogeneous group, including Gram-positive and negative microorganisms, endospore-forming, rod-shaped, aerobic, or facultative anaerobic species, affiliated with the Firmicutes phylum (Logan et al. 2009; Parija 2023). In particular, the *Bacillus thuringiensis* species is relevant for the biological control of mosquitoes that transmit human diseases (Pardo-López et al. 2013; Crickmore et al. 2021; Sánchez-Yáñez et al. 2022; Gangmei et al. 2024; Shikov et al. 2024). Investigation of Bt mechanisms of action led to the discovery of numerous insecticidal molecules (Chaabouni et al. 2012; Salazar et al. 2023; Shikov et al. 2024), and Bt preparations are considered environmentally safe and reliable because they target and eliminate harmful insects without harming non-target animals and plants (Li et al. 2024). For these reasons, commercially available larvicide formulations including strains of Bt are endorsed by organizations such as the World Health Organization (WHO, 2023) and the Environmental Protection Agency (EPA) in the United States of America ([www.epa.gov/mosquitocontrol/bti-mosquito-control](http://www.epa.gov/mosquitocontrol/bti-mosquito-control)) (accessed on 12 April 2023).

The discovery of additional microorganisms with mosquitocidal and larvicidal activities, and the characterization of their active metabolites and mechanisms of action is desirable, as they may offer alternative, environmentally friendly insecticides (Vasanthakumari 2019; Ahsan and Shimizu 2021; Milugo et al. 2021; Edmond et al. 2021; Das and Deobhankar 2022; Teshome et al. 2023). The use of native bacterial strains as biological control agents can offer advantages to the management of mosquito populations. These native bacteria are more likely to thrive in local environmental conditions, resulting in more effective and long-lasting control. Furthermore, the genetic diversity of local strains can provide a variety of toxins and mechanisms of action, which helps delay the emergence of resistance in insects. The isolation, characterization, formulation, and finally, field evaluation of local isolates possibly contributes to cost reduction and promotes more sustainable and efficient solutions in biological control (Bravo et al. 2007; Fayad et al. 2019; Brühl et al. 2020).

The Amazon rainforest is an important reservoir of biodiversity on Earth, including fauna, flora, and microorganisms (Heckenberger 2007; Venturini et al. 2022). Bacterial strains previously isolated from Amazon environments showed larvicidal activity against *A. aegypti* (Katak et al. 2021; De Oliveira et al. 2024). In the present study, we further

characterized one of these strains, GD02.13, providing additional evaluation of its larvicidal activity, a morphological description, and whole genome sequencing and analysis.

## Methods

### Bacterial strains

The bacterial strain GD02.13 was previously isolated from lake water samples collected in the Municipality of Coari, Amazonas State, Brazil (4°06'45.5" S 63°07'44.0" W) (Katak et al. 2021), with the official permission (21263-1) granted by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) of the Brazilian Ministry of Environment (MMA). Frozen stocks are kept at the Malaria and Dengue Laboratory (National Institute of Amazonian Research - INPA). The AM65-52 strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) was obtained from the reactivation of the commercial product Vectobac® WG and used as a reference strain.

### Bioassays with fractionated metabolites

GD02.13 was reactivated from frozen stocks in Luria Bertani (LB) agar plates. An isolated colony was inoculated in 2 ml of LB broth and incubated at 30 °C, 180 rpm for 24 h. Then 50 µL of the culture was transferred to an Erlenmeyer flask containing 100 ml of LB broth and maintained under the same conditions. After 120 h of incubation, cultures were centrifuged for 20 min at 5000 g and the metabolites contained in the supernatant were extracted by a liquid-liquid partition with an equal volume of a mixture of 20% ethyl acetate (AcOEt) and isopropanol (iPr-OH) 9:1 volume/volume (v/v). The extraction was repeated three times, and all the extracted material was combined and dried in a rotary evaporator under vacuum at 45 °C. The recovered, dried sample (supernatant metabolites) was weighed and stored in a desiccator with activated silica (De Oliveira et al. 2021).

Bioassays followed the criteria established by WHO (2005) and Dulmage et al. (1990) and were conducted under controlled conditions of temperature, humidity, and photoperiod. Bioassays were carried out in triplicate, in 150 ml plastic flasks containing 10 ml of distilled water, 10 third instar larvae, larval food (powdered Teklad Global 18% Rodent Diet® pellets), and concentrations of dried supernatant metabolites ranging from 125 to 2.5 µg/ml. All metabolites were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; Thermo Fischer Scientific), and mortality readings were recorded at 24, 48, and 72 h after exposure to bacterial extracts (Danga et al. 2014). The DMSO solvent was used as a negative control and Natular™ DT (Spinosad) was the positive control. No mortality was observed when larvae were exposed only to DMSO.

The lethal concentration (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) was calculated using Probit, with  $p \leq 0.05$  (Finney 1952), and Polo Plus 1.0 statistical software (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) (Robertson et al. 2017). Lethal concentrations and confidence interval (95% CI) were analyzed using the Lilliefors normality test (K samples), Tukey's multiple comparison tests ( $p \leq 0.05$ ), and Student's t-test. The BioEstat 5.3 software for Windows was used for the statistical analysis (Ayres et al. 2007).

### **Scanning electron microscopy**

The GD02.13 and Bti strains were reactivated in solid nutrient agar culture plates (NA = beef extract 1 g, yeast extract 2 g, peptone 5 g, Agar 15 g, per liter, pH 6.8), at 30 °C for 24 h. Isolated colonies were inoculated in nutrient broth (NA minus agar) and incubated for five days at 30 °C in a rotary oven at 180 rpm. The cultures were then centrifuged at 6000 rpm, 4 °C for 20 min. The pellets were washed twice by resuspending in 1 M NaCl, 0.01% Triton X-100 solution followed by centrifugation, and the final pellets were lyophilized. Each lyophilized pellet was suspended in 1 ml of 0.15% NaCl and hexane was added at a rate less than or equal to 10% (50, 75, or 100 µl/ml of aqueous suspension) to minimize the risk of altering the crystals. The suspension was sonicated at 100 W for 10 min to dissipate agglomeration and then centrifuged at 6000 rpm for 10 min. The obtained pellet was resuspended in saline solution, the organic solvent was added again, and the same procedure was repeated four times. Lastly, the visible pellet was washed twice with cold distilled water. This procedure was carried out according to (Loutfi et al. 2020). A scanning electron microscope (JSM-IT500HR), at the Multiuser Center for the Analysis of Biomedical Phenomena at the State University of Amazonas (CMABio), was used to examine and photograph crystals and spores. The morphologies of GD02.13 crystals and spores were analyzed and compared with those of the reference strain AM65-52 (VectoBac WG) (Mounsef et al. 2014).

### **Genome sequencing, assembly and statistics**

Genomic DNA was extracted using the DNeasy PowerSoil Pro Kits – QIAGEN and sequencing was performed on an Illumina MiSeq instrument using the 2 × 150 bp paired-ends protocol. The “de novo” assembly was performed using SPAdes v.3.14.1 (Prjibelski et al. 2020), including the flag *--careful* to reduce the number of mismatches and short indels in the assembly. CheckM v.1.1.6 (Parks et al. 2015) was run as default to retrieve information on genome completeness and contamination. Reads were mapped against all contigs with Bowtie2

v.2.4.2 (Langmead and Salzberg 2012) using the flag *--no-discordant* to allow only alignments where both mates align equally, and the output was used with Samtools v.1.15.1 (Danecek et al. 2021) to recover genome average coverage.

### **Genome annotation and phylogeny**

The protein coding sequences present in the GD02.13 genome were predicted and annotated using the default parameters of Prokka v.1.14.6 (Seemann 2014). The 16S rRNA sequence was used as a query in BLASTn (Camacho et al. 2009) against the NCBI nt database (Sayers et al. 2022) to identify broad strain taxonomy and guide the choice of reference genomes to include in the phylogenetic analyses. OrthoFinder v.2.5.4 (Emms and Kelly 2019) was used as default to recover single-copy orthologs among all genomes, and IQ-TREE2 v.2.2.0.3 (Minh et al. 2020) was used to run the model test and infer phylogenetic trees by maximum likelihood.

### **Prediction of biosynthetic gene clusters and insecticidal genes**

The biosynthetic gene clusters were predicted from the strain genome with AntiSMASH v.7 (Blin et al. 2023) using the default website software. The identified clusters were searched against the MIBiG repository (Medema et al. 2015). To determine whether BGCs were integrated into the main chromosome, plasmid, or integrated bacteriophages, these two types of mobile genetic elements were predicted with GeNomad v.1.4.0 (Camargo et al. 2023) using the default command. The genes encoding insecticidal toxins were mined with BtiToxin\_Digger v1.0.10 (Liu et al. 2022), with the target insect species derived from the BPPRC specificity database (<https://www.bpprc-db.org/>, accessed on 21 March 2024) (Panneerselvam et al. 2022).

The sequencing reads used in the analysis, corresponding to the *Bacillus thuringiensis*-GD02.13 strain, have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as BioProject PRJNA1137396, Accession numbers SAMN42590146.

## **Results**

### **Larvicidal activity of GD02.13 metabolites**

Previously, we demonstrated that the bacterial strain GD02.13 is lethal to *A. aegypti* larvae in concentrations comparable to those observed with the Bti strain AM65-52.

Now, we demonstrate that metabolites extracted from GD02.13 are effective larvicides at concentrations equivalent to those of the commercial product Natular™ DT. While the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> determined for GD02.13 extract and Natular™ DT were similar at 24h of exposure, the LC<sub>90</sub> values of the GD02.13 extracts and Natular™ DT were statistically different ( $p \leq 0.05$ ) in the 48- and 72-hour intervals, with the GD02.13 extract being more efficient. Because of the high larval mortality observed after 48–72 h of exposure to Natular™ DT or GD02.13 extract (> 50%), at the concentrations applied in our assays, LC<sub>50</sub> values could not be estimated with our experimental protocol.

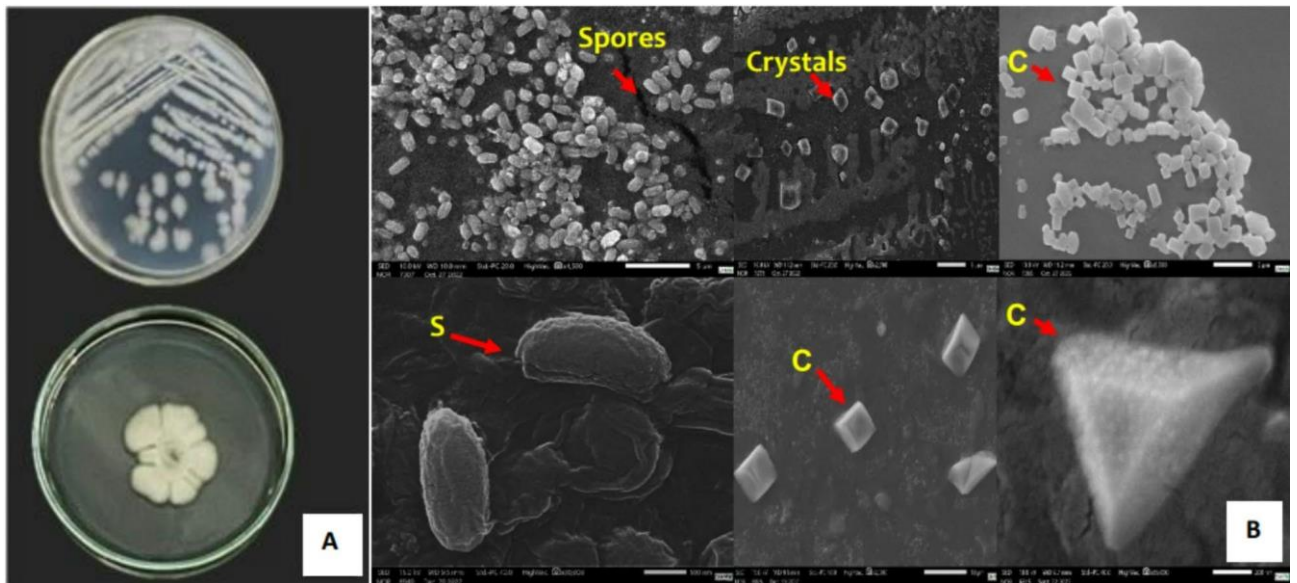
**Table 1 LC50 and LC90 values of bacterial metabolites against *A. aegypti* larvae**

| Interval | Strain   | LC <sub>50</sub> µg/ml (CI 95%) | $\chi^2$ | df | Slope ± SE | LC <sub>90</sub> µg/ml (CI 95%) | $\chi^2$ | df | Slope ± SE |
|----------|----------|---------------------------------|----------|----|------------|---------------------------------|----------|----|------------|
| 24 h     | Spinosad | 4.6 (3.4–5.7) <sup>a</sup>      |          | 7  | 1.8 ± 0.14 | 23.3 (18.2–32.6) <sup>b</sup>   | 8.9      | 7  | 1.8 ± 0.14 |
|          | GD02.13  | 3.2 (2.3–4.1) <sup>a</sup>      |          | 7  | 1.8 ± 0.17 | 15.6 (12.3–21.3) <sup>b</sup>   | 7.8      | 7  | 1.9 ± 0.17 |
| 48 h     | Spinosad | -                               | -        | -  | -          | 13.9 (11.5–17.6) <sup>c</sup>   | 5.4      | 7  | 1.8 ± 0.17 |
|          | GD02.13  | -                               | -        | -  | -          | 5.0 (4.1–6.3) <sup>d</sup>      | 3.5      | 7  | 2.2 ± 0.34 |
| 72 h     | Spinosad | -                               | -        | -  | -          | 6.1 (5.0–7.8) <sup>e</sup>      | 3.2      | 7  | 1.9 ± 0.28 |
|          | GD02.13  | -                               | -        | -  | -          | 2.3 (1.0–3.1) <sup>f</sup>      | 1.3      | 7  | 2.3 ± 0.72 |

Values expressed in micrograms of extracts per 72 h per assay. Dead larvae were counted 24, 48, and 72 hours after exposure to the extracts. LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were evaluated by Probit, with  $p \leq 0.05$ . Statistical comparisons and confidence intervals (95 % CI) were analyzed using the Lilliefors normality test (K samples), Tukey's multiple comparison test ( $p \leq 0.05$ ), and Student t-test. Student's t. For all variables in each column with the same letter (a.b.c.d.e.f), the differences between the values are not statistically significant LC = lethal concentration; CI = confidence interval;  $\chi^2$  = chi-square; df = degrees of freedom; Natular™ DT positive control

### Morphological characterization

The GD02.13 lineage grows in Nutrient Agar medium, forming flat, opaque colonies that are whitish-gray color, rounded, and with wavy margins. Scanning electron microscopy was performed to investigate the occurrence of crystalline inclusions and spores in GD02.13 bacteria. The images show that the GD02.13 strain contains inclusions and produces spores resembling those of *Bacillus thuringiensis*, with crystalline forms in cuboidal, spherical, and undefined shapes (Fig. 1).



**Fig. 1:** GD02.13 morphology A. Colony morphology of strain GD02.13 after one day of cultivation on Nutrient Agar medium B. Scanning electron micrograph of GD02.13 spores and crystals. Spores (S) and protein crystals (C)

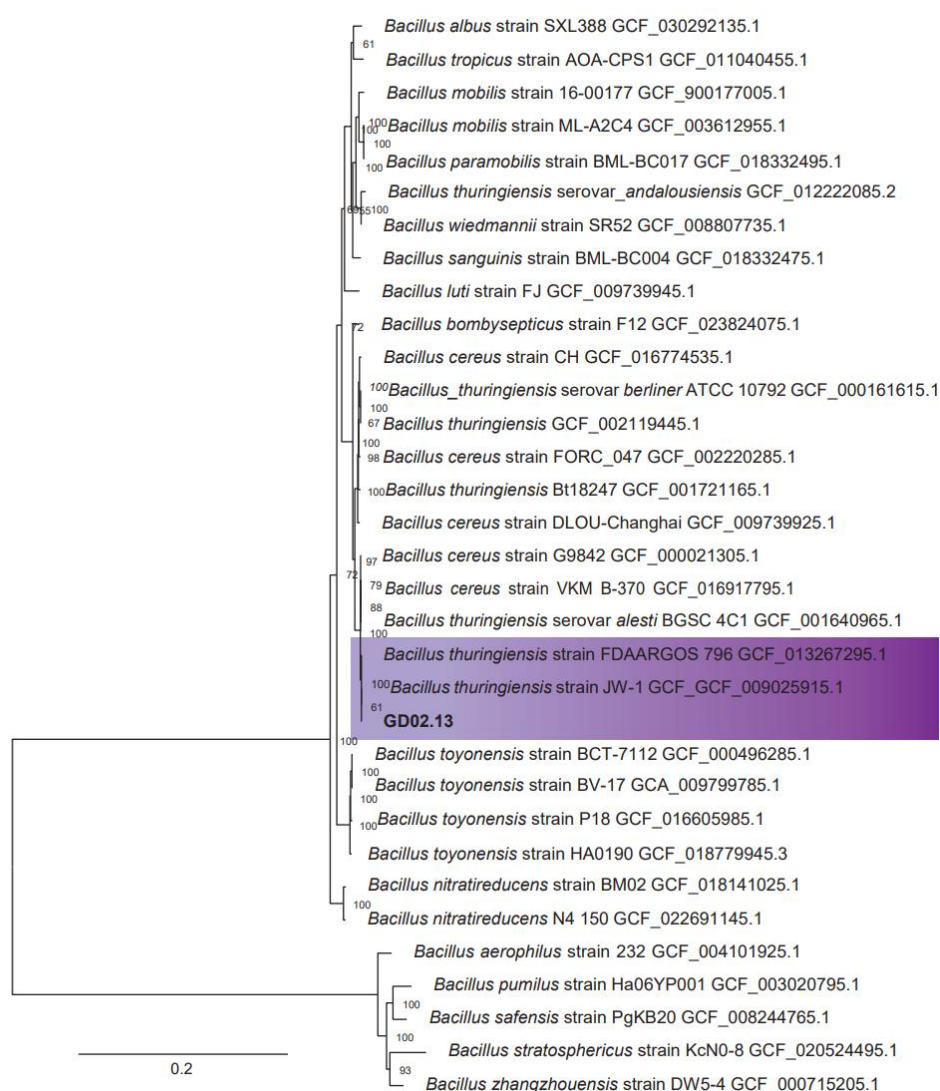
### Genome sequencing and phylogenetic analysis

Sequencing of the GD02.13 genome yielded 7,674,646 paired-end reads, which were assembled into 65 contigs > 2000 bp (Table 2). Smaller contigs were removed, as they likely represent assembly noise resulting from using short reads or due to complex genome regions. The assembly quality check also confirmed that the removal of small contigs does not affect the completeness of the genome and, in fact, improves cleanliness by eliminating misassembled contigs with extra single-copy genes (Table S2).

**Tabela 2:** Features of the genome of *Bacillus thuringiensis* GD02.13

| Species                 | Accession     | Size (Mb) | GC%   | N50     | Coverage | Contigs | Completeness | CD S |
|-------------------------|---------------|-----------|-------|---------|----------|---------|--------------|------|
| <i>B. thuringiensis</i> | SAMN425901.46 | 6.6       | 34.83 | 274.165 | 339.4    | 65      | 99.43        | 7367 |

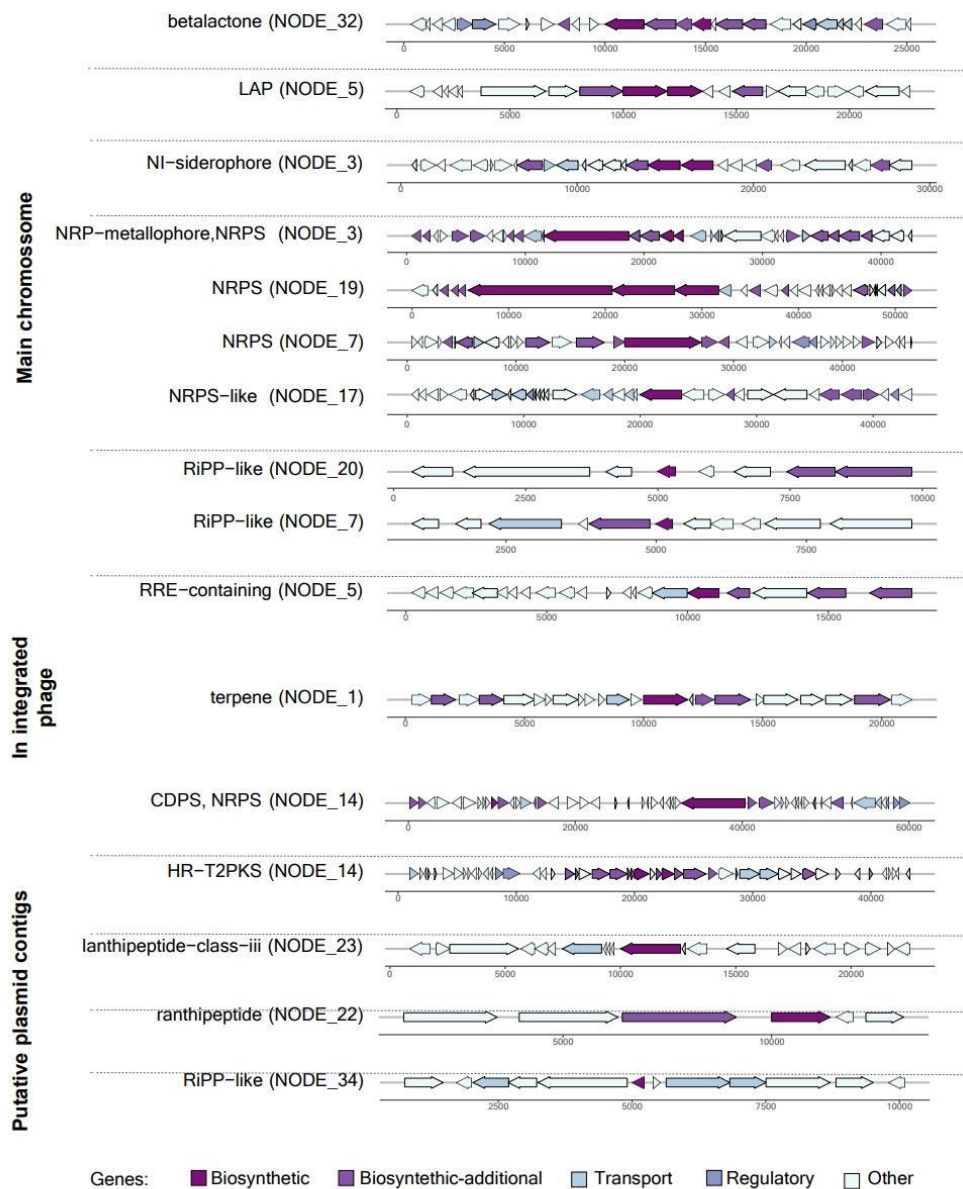
Phylogenetic inference based on 443 single-copy orthologs (bootstrap 1000, LG + F + G4 model) indicated that GD02.13 is a strain of *Bacillus thuringiensis* (Fig. 2) that clusters with two previously isolated *B. thuringiensis*, one from China (strain JW-1, GCF\_009025915.1) and another from the USA (strain FDAARGOS\_796, GCF\_013267295.1).



**Fig. 2:** Phylogenetic inference of GD02.13 based on the whole genome by maximum likelihood

### Analysis of biosynthetic gene clusters and insecticidal genes

A total of 16 biosynthetic gene clusters (BGC) were predicted in the GD02.13 genome (Fig. 3). Eleven BGCs are in the contigs comprising the main chromosome, while one terpene biosynthetic gene cluster is part of an integrated Caudoviricetes phage genome. Five BGCs, CDPNRPS, HRT2PKS, lanthipeptide class iii, ranthipeptide, and RiPPlike, were predicted to be in putative plasmids. It is worth mentioning that the petrobactin BGCs exhibited 100% similarity to the known entity, while bacillibactin, pulchenimic, fengycin, and cerecyclin varied between 85% and 30% similarity to their corresponding gene clusters (Table S1).



**Fig. 3:** Prediction of biosynthetic gene clusters (BGCs) in a *Bacillus thuringiensis* GD02.13 strain using the antiSMASH database and the MIBiG repository.

The genome encodes several proteins with high similarities with previously characterized *B. thuringiensis* insecticidal toxins, specifically Cry11Aa3, Cry6Ba3, Cry60Ba3, Cry6Aa3, CryBa, Cry4Ba, Cry4Ba2, Cry4ba4, Cryba2, Cry4Ba4 and Cyt (Table S3).

## Discussion

In our previous work (Katak et al. 2021) we isolated Amazonian-native environmental bacterial strains with larvicidal activities against *(A) aegypti*. One of those, named GD02.13, is as active in killing mosquito larvae as is the *(B) thuringiensis* strain AM65-52 (Vectobac WG) (Katak et al. 2021). To further assess the potential of GD02.13 for mosquito control applications, we compared the lethality of its metabolites with the commercial insecticide Natular™ DT, a product obtained from aerobic fermentation of *Sacharopolyspora spinosa*, and composed of a mixture of the metabolites, spinosad A and D (Fernandes et al. 2019; Vicari et al. 2023). The GD02.13 metabolites are lethal to *(A) aegypti* larvae, in concentrations equivalent to those of Natular™ DT. Furthermore, our study showed, through scanning electron microscopy, that GD02.13 produces crystals and spores (Fig. 1) with morphologies that resemble those of *(B) thuringiensis* strain AM65-52 (Vectobac® WG). The observed GD02.13 spores and various sizes and shapes of crystals are consistent with previous morphological descriptions of *Bacillus* strains (Fayad et al. 2019; Xie et al. 2019; Loutfi et al. 2020). These results support additional efforts to characterize GD02.13, its insecticidal metabolites and proteins, and their mechanisms of action.

Whole genome sequencing, analyses, and mining are powerful in establishing taxonomic assignment for bacteria belonging to species complexes, uncovering potential insecticidal candidates, understanding the genetic basis of their production, and discovering new active metabolites (Meesil et al. 2023; Albarano et al. 2020).

Accordingly, in the present study, we applied a genome-based multigene phylogeny approach that improves phylogenetic relationship assignments (Jeong Haeyoung et al. 2017; Lechuga et al. 2020; Patel et al. 2020). *B. thuringiensis* belongs to the *Bacillus cereus* complex or *B. cereus* s. l., in which taxonomic inconsistencies frequently cause problems with accurate species identification (Lazarte et al. 2018; Ehling-Schulz et al. 2019). According to our data and phylogenetic analysis, GD02.13 groups with *B. thuringiensis* strains JW1 (GCF\_009025915.1) and FDAARGOS\_796 (GCF\_013267295.1) (Fig. 2), indicating that GD02.13 is a new strain of *B. thuringiensis*.

It is well established that *B. thuringiensis* produces secondary metabolites with larvicidal activity against several insects, including medically important mosquito species (Dahmana et al. 2020; Falqueto et al. 2021; Sujayanand et al. 2023). These metabolites are frequently synthesized by genes arranged in clusters (Biosynthetic Gene Clusters - BGCs). Relevantly, we identified several BCGs in the genome of GD02.13. Among them, BGCs associated with the synthesis of Lantipeptides, Rantipeptides, ribosomally synthesized and

post-translationally modified peptides (RiPPs), type II polyketides (T2PKS) (Fig. 3), Petrobactin, molybdenum cofactor and Fengycin (Table S1) were previously described by Shikov et al. (2024) to be present in the genome of the *B. thuringiensis* highly insecticidal strain 800/15. One terpene biosynthetic gene cluster is within the sequence of an integrated Caudoviricetes phage. Caudovirales, have been identified in many species of the *B. cereus* group (Gillis and Mahillon 2014).

In addition to the identified BCGs, GD02.13 contains genes coding for insecticidal proteins. In general, genes coding for insecticidal proteins are located on plasmids, as revealed in the sequenced and assembled GD02.13 genome and GD02.13 plasmids. The genes identified in this study code for a series of insecticidal proteins, including well-characterized Cry and Cyt toxins that are active against numerous insects of the order Diptera, including *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* species, vectors of human diseases. These proteins accumulate during sporulation in large parasporal crystals that consist mainly of Cry proteins and, in some strains, cytotoxic Cyt proteins (Fayad et al. 2019; Xie et al. 2019; Loutfi et al. 2020).

In summary, we added information about the larvicidal properties of GD02.13 metabolites, by comparing its activity with the commercial product Natular™ DT. Whole genome sequencing and analysis revealed several potential insecticidal candidates including secondary metabolites and proteins. Isolation and characterization of these potential active molecules will further inform about the mechanisms by which GD02.13 kills mosquito larvae. Assays on medium and large scales under natural conditions will be necessary to evaluate GD02.13 performance and stability and advise about formulations that may be applied for mosquito control. GD02.13 and other larvicidal native bacterial strains are expected to facilitate area-wide control or elimination of *Ae. aegypti* if properly developed and adopted as part of an integrated pest management strategy.

### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Abbreviations

**SISBIO:** Biodiversity Authorization and Information System

**MMA:** Brazilian Ministry of Environment

**Bti:** *Bacillus thuringiensis israelensis*

**LB:** Luria Bertani

**AcOEt:** Ethyl acetate

**iPr-OH:** Isopropanol

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**NA:** Nutrient agar

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**BGC:** Biosynthetic gene clusters

**SIT:** Sterile insect technique

**IIT:** Incompatible insect technique

**Lbs:** *Lysinibacillus sphaericus*

**EPA:** Environmental Protection Agency

## References

- Ahsan N, Shimizu M (2021) *Lysinibacillus* species: their potential as effective bioremediation, biostimulant, and biocontrol agents. *Rev Agric Sci* 9:103–116. [https://doi.org/10.7831/ras.9.0\\_103](https://doi.org/10.7831/ras.9.0_103)
- Albarano L, Esposito R, Ruocco N, Costantini M (2020) Genome mining as new challenge in natural products discovery. *Mar Drugs* 18(4):199. <https://doi.org/10.3390/md18040199>
- Aldridge RL, Gibson S, Linthicum KJ (2024) *Aedes aegypti* controls A. *aegypti*: SIT and IIT—an overview. *J Am Mosq Control Assoc* 40:32–49. <https://doi.org/10.2987/23-7154>
- Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AA (2007) BioEstat Versão 5.3: aplicações estatísticas Nas áreas Das ciências biológicas e médicas; sociedade civil Mamirauá: Belém. Brasília, Brasil, Pará, Brasil; MCT/CNPQ
- Blin K, Shaw S, Augustijn HE, Reitz ZL, Biermann F, Alanjary M, Weber T (2023) AntiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Res* 51(W1):W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O (2013) *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop Med Int Health* 18:564–577. <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Brühl CA, Després L, Frör O, Patil CD, Poulin B, Tetreau G, Allgeier S (2020) Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). *Sci Total Environ* 724:137800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137800>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatic* 10:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Camargo AP, Roux S, Schulz F, Babinski M, Xu Y, Hu B, Kyrpides NC (2023) Identifica-

- tion of mobile genetic elements with GeNomad. *Nat Biotechnol* 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01953-y>
- Center for Disease Control and Prevention CDC (2016) Mosquito-borne diseases. [cited 2024 Dec 02]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/outdoor/mosquito-borne/default.html>
- Chaabouni I, Guesmi A, Cherif A (2012) Secondary metabolites of *Bacillus*: potentials in biotechnology. *Bacillus thuringiensis Biotech* 347–366. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_18)
- Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC (2021) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol* 186:107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
- Dahmana H, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O (2020) Insecticidal activity of bacteria from larvae breeding site with natural larvae mortality: screening of separated supernatant and pellet fractions. *Pathogens* 9:486. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060486>
- Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM, Li H (2021) Twelve years of samtools and BCFtools. *Gigascience* 10:giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Danga YSP, Nukenine EN, Younoussa L, Esimone CO (2014) Phytochemicals and larvicidal activity of *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) leaf extracts against *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Pure Appl Zool* 2:160–171
- Das BP, Deobhankar K (2022) Management of insect borne human diseases—a case study on novel Bio-Larvicide for mosquito borne diseases including dengue. *Indian J Entomol* 84:61–76. <https://doi.org/10.55446/IJE.2022.915>
- De Oliveira MR, Katak RM, Da Silva GF, Marinotti O, Terenius O, Tadei WP, Souza AQL (2021) Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*. *Front Microbiol* 12:743246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743246>
- De Oliveira JC, Katak RM, Muniz VA, De Oliveira MR, Rocha EM, Da Silva WR, Astolfi-Filho S (2024) Bacteria isolated from *Aedes aegypti* with potential vector control applications. *J Invertebr Pathol* 204:108094. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108094>
- Demirak MSS, Canpolat E (2022) Plant-based bioinsecticides for mosquito control: impact on insecticide resistance and disease transmission. *Insects* 13(2):162. <https://doi.org/10.3390/insects13020162>
- Dulmage HT, Yousten AA, Singer SLLA, Lacey LA (1990) Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus* (No. TDR/BCV/90.1. Unpublished). World Health Organization
- Edmond K, Aurelie FDG, Nadège S-C, Roland B, Landre D-D, Abdou T, Serges D, Flobert N, Parfait A-A, Sinclair WC (2021) Efficacy of the microbial larvicide VectoMax® G against *Anopheles gambiae* Sl and *Culex* spp. Larvae under laboratory and open field trial experiments in the City of Yaoundé, Cameroon. *Adv Entomol* 10:34–51. <https://doi.org/10.4236/ae.2022.101003>
- Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM (2019) The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiol Spectr* 7:10–1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>

- Emms DM, Kelly S (2019) OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol* 20:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y>
- Falqueto SA, Pitaluga BF, de Sousa JR, Targanski SK, Campos MG, Mendes TADO, Da Silva GF, Silva DHS, Soares MA (2021) *Bacillus* spp. Metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. *J Invertebr Pathol* 179:107525. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107525>
- Fayad N, Patiño-Navarrete R, Kambris Z, Antoun M, Osta M, Chopineau J, Kallassy Awad M (2019) Characterization and whole genome sequencing of AR23, a highly toxic *Bacillus thuringiensis* strain isolated from Lebanese soil. *Curr Microbiol* 76:1503–1511. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01775-9>
- Fernandes M, Tomé HVV, Miranda FR, Gonçalves WG, Pascini TV, Serrão JE, Martins GF (2019) *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere* 221:464–470. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.068>
- Finney DJ (1952) Probit analysis, 2nd edn. University, Cambridge
- Gangmei K, Padmanaban H, Kunnikuruvan A, Lukose J, Bora B, Sivaprakasam M, Poopathi S (2024) Isolation of mosquitocidal Bacteria from soil samples to control mosquito vectors. *Indian J Entomol* 1–4. <https://doi.org/10.55446/IJ E.2024.1365>
- Gillis A, Mahillon J (2014) Phages preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: past, present and future. *Viruses* 6:2623–2672. <https://doi.org/10.3390/v6072623>
- Heckenberger MJ, Christian Russell J, Toney JR, Schmidt MJ (2007) The legacy of cultural landscapes in the Brazilian Amazon: implications for biodiversity. *Phil Trans R Soc B* 362:197–208. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1979>
- Jeong H, Choi S, Park SH (2017) Genome sequences of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strain BP865 and *B. thuringiensis* serovar *Aizawai* strain HD-133. *Genome Announc* 5:01544. <https://doi.org/10.1128/genomea.01544-16>
- Kurstaki strain BP865 and *B. thuringiensis* serovar *Aizawai* strain HD-133. *Genome Announc* 5:01544. <https://doi.org/10.1128/genomea.01544-16>
- Katak RM, Rocha EM, Oliveira JC, Muniz VA, Oliveira MR, Ferreira FA, Tadei WP (2021) Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of supernatant and pellet fractions from cultured *Bacillus* spp. Isolated from Amazonian microenvironments. *Trop Med Infect Dis* 6:104. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020104>
- Katak RDM, Cintra AM, Burini BC, Marinotti O, Souza-Neto JA, Rocha EM (2023) Biotechnological potential of microorganisms for mosquito population control and reduction in vector competence. *Insects* 14:718. <https://doi.org/10.3390/insects14090718>
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lazarte JN, Lopez RP, Ghiringhelli PD, Beron CM (2018) *Bacillus wiedmannii* biovar *thuringiensis*: a specialized mosquitocidal pathogen with plasmids from diverse origins. *Genome Biol Evol* 10:2823–2833. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy211>

- Lechuga A, Lood C, Salas M, Van Noort C, Lavigne R, Redrejo-Rodríguez M (2020) Completed genomic sequence of *Bacillus thuringiensis* HER1410 reveals a Cry-containing chromosome, two megaplasms, and an integrative plasmidial prophage. *Genes Genomes Genet* 10 G3:2927–2939. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401361>
- Li K, Chen M, Shi J, Mao T (2024) An overview of the production and use of *Bacillus thuringiensis* toxin. *Open Life Sci* 19(1):20220902. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0902>
- Liu H, Zheng J, Bo D, Yu Y, Ye W, Peng D, Sun M (2022) BtToxin\_Digger: A comprehensive and high-throughput pipeline for mining toxin protein genes from *Bacillus thuringiensis*. *Bioinformatics* 38:250–251. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab506>
- Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, De Vos P, Fritze D, Ventosa A (2009) Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2114–2121. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>
- Loutfi H, Fayad N, Pellen F, Le Jeune B, Chakroun M, Benfarhat D, Abboud M (2020) Morphological study of *Bacillus thuringiensis* crystals and spores. *Appl Sci* 11:155. <https://doi.org/10.3390/app11010155>
- Margalith Y, Ben-Dov E (2000) Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Insect pest Manag. Tech Environ Protect* 243–301
- Medema M, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, Bruijn I, Chooi YH, Claesen J, Coates C, Cruz-Morales P, Duddela S, Dusterhus S, Edwards DJ, Fewer DP, Garg N, Geiger C, Gomez-Escribano JP, Greule A, Hadjithomas M, Haines AS, Helfrich EJN, Hillwig ML, Ishida K, Jones AC, Jones CS, Jungmann K, Kegler C, Kim HU, Kötter P (2015) Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nat Chem Biol* 11:625–631. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>
- Meesil W, Muangpat P, Sitthisak S, Rattanarojpong T, Chantratita N, Machado RAR, Shi Y, Bode HB, Vitta A, Thanwisai U (2023) Genome mining reveals novel biosynthetic gene clusters in entomopathogenic bacteria. *Sci Rep* 13:20764. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47121-9>
- Milugo TK, Tchouassi DP, Kavishe RA, Dinglasan RR, Torto B (2021) Naturally occurring compounds with larvicidal activity against malaria mosquitoes. *Front Trop Dis* 2:718804. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.718804>
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, Lanfear R (2020) IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol* 37:1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Mounsef JR, Salameh D, Kallassy AM, Chamy L, Brandam C, Lteif R (2014) A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *J Microbiol Methods* 107:147–149. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.003>
- Panneerselvam S, Mishra R, Berry C, Crickmore N, Bonning BC (2022) BPPRC Database: a web-based tool to access and analyse bacterial pesticidal proteins. *Database* 2022:baac022. <https://doi.org/10.1093/database/baac022>
- Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* 37:3–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>

- Parija SC (2023) *Bacillus*. Textbook of Microbiology and Immunology. Singapore: Springer Nature Singapore 407–418. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-3315-8\\_29](https://doi.org/10.1007/978-981-19-3315-8_29)
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Patel S, Gupta RSA (2020) phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:406–438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A (2020) Using spades de Novo assembler. *Curr Protoc Bioinf* 70:102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Robertson JL, Jones MM, Olguin E, Alberts B (2017) Bioassays with arthropod, 2nd edn. CRC, Boca Raton, FL. <https://doi.org/10.1201/9781315373775>
- Salazar B, Ortiz A, Keswani C, Minkina T, Mandzhieva S, Pratap Singh S, Sansinenea E (2023) *Bacillus* spp. As bio-factories for antifungal secondary metabolites: innovation beyond whole organism formulations. *Microb Ecol* 86:1–24. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02044-2>
- Sánchez-Yáñez JM, Rico JL, Ulíbarri G (2022) *Bacillus thuringiensis* (Bt) is more than a special agent for biological control of pests. *J Appl Biotechnol Bioeng* 9:33–39. <https://doi.org/10.15406/jabb.2022.09.00282>
- Santana-Martinez JC, Silva JJ, Dussan J (2019) Efficacy of *Lysinibacillus sphaericus* against mixed-cultures of field-collected and laboratory larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bull Entomol Res* 109:111–118. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000342>
- Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Sherry ST (2022) Database resources of the National center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* 50:D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Semenza JC, Rocklöv J, Ebi KL (2022) Climate change and cascading risks from infectious disease. *Infect Dis Ther* 11(4):1371–1390. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00647-3>
- Sene NM, Mavridis K, Ndiaye E, Diagne CT, Gaye A, Ngom EM, Ba Y, Diallo D, Vontas J, Dia I, Diallo M (2021) Insecticide resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* populations from Senegal. *PLoS Negl Trop Dis* 15(5):e0009393. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009393>
- Shikov AE, Savina IA, Romanenko MN, Nizhnikov AA, Antonets KS (2024) Draft genome sequencing of the *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Highly Insecticidal Strain Data 9:34. <https://doi.org/10.3390/data9020034>
- Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M (2019) *Aedes aegypti* vector competence studies: a review. *Infect Genet Evol* 67:191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Sujayanand GK, Pandey S, Jagadeeswaran R, Chandra A, Kumar V, Dubey S, Dubey J (2023) Characterization of entomotoxic and nematotoxic genes from Indigenous *Bacillus*

- thuringiensis* strains and their biocontrol potential. Egypt J Biol Pest Control 33:76. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00722-y>
- Teshome A, Erko B, Golassa L, Yohannes G, Irish SR, Zohdy S, Dugassa S (2023) Laboratory-based efficacy evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and temephos larvicides against larvae of *Anopheles stephensi* in Ethiopia. Malar J 22:48. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2091943/v1>
- Vasanthakumari S (2019) Soft skills and its application in work place. World J Adv Res Rev 3:066–072. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2019.3.2.0057>
- Venturini AM, Dias NMS, Gontijo JB, Yoshiura CA, Paula FS, Meyer KM, Nakamura FM, Da França AG, Borges CD, Barlow J, Berenguer E, Nüsslein K, Rodrigues JLM, Bohannan BJM, Tsai SM (2022) Increased soil moisture intensifies the impacts of forest-to-pasture conversion on methane emissions and methane-cycling communities in the Eastern Amazon Environ Res 212:13139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113139>
- Vicari ALB, Rebelatto G, Fernandes HC, Viechnieski S, Monteiro M, Lutinski JA, Busato MA (2023) Larvicidal effect of Spinosad and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Delos 16:4207–4219. <https://doi.org/10.55905/rdelosv16.n50-011>
- Weng SC, Masri RA, Akbari OS (2023) Advances and challenges in synthetic biology for mosquito control. Trends Parasitol 40:75–88. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.11.001>
- WHO (2005) Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Available online at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101> (accessed October 12, 2023)
- World Health Organization (2023) Environmental Protection Agency (EPA) in the United States of America ([www.epa.gov/mosquitocontrol/bti-mosquito-control](http://www.epa.gov/mosquitocontrol/bti-mosquito-control)) (accessed on 12 April 2023)
- Xie J, Peng J, Yi Z, Zhao X, Li S, Zhang T, Ding X (2019) Role of hsp20 in the production of spores and insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*. Front Microbiol 10:2059. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02059>

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### 4. CONCLUSÃO

A linhagem *Bacillus thuringiensis* GD02.13, isolada da região amazônica, demonstrou significativo potencial larvicida contra esse mosquito. A análise genômica revelou a presença de 16 clusters de genes biossintéticos e 14 genes que codificam proteínas inseticidas, corroborando a atividade larvicida observada e indicando que a linhagem é capaz de produzir metabólitos e proteínas bioativas com grande potencial para o controle biológico de mosquitos.

Os extratos metabólicos do sobrenadante da linhagem GD02.13 mostraram eficácia significativa na mortalidade das larvas de *A. aegypti*, principalmente em 120 horas de cultivo. A cromatografia em camada delgada identificou alcalóides, terpenos e compostos fenólicos, que podem estar diretamente relacionados à mortalidade larval, sugerindo o que a linhagem sintetiza metabólitos bioativos com propriedades larvicidas.

A caracterização proteômica confirmou um arsenal diversificado de toxinas Cry e Cyt, além de proteínas acessórias e enzimas associadas à virulência. Notavelmente, a cepa GD02.13 apresentou desempenho larvicida superior à cepa comercial Bti AM65-52, o que reforça seu valor biotecnológico. Esses resultados confirmam o grande potencial da linhagem GD02.13 como agente biológico no controle de *Aedes aegypti*, contribuindo para o combate a esse vetor.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, M. et al. Proteomic diversity in bacteria: Insights and implications for bacterial identification. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. 100917, 2025.

ABRIL, A. G.; CALO-MATA, P.; BÖHME, K; VILLA, T. G.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; SÁNCHEZ-PÉREZ, Á., ... & CARRERA, M. Shotgun proteomic analyses of *Pseudomonas* species isolated from fish products. **Food Chemistry**, 139342, 2024.

ALVES, G. B. et al. Isolation, genomic, and proteomic characterization of a novel Neotropical strain of *Bacillus thuringiensis* with mosquitocidal activities. **Processes**, v. 11, n. 5, p. 1455, 2023.

ALVES, G. B. et al. Comparative genomic analysis and mosquito larvicidal activity of four *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strains. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5518, 2020.

ANAND, S.; PADMANABHAN, P. Role of omics in the microbial characterization. In: Emerging Innovative Trends in the Application of Biological Processes for Industrial Wastewater Treatment. **Elsevier**, p. 91-103, 2024.

ANVISA. Registro de Produtos Biológicos. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/registro-de-produtos-biologicos>. Acesso em: 10 set. 2024.

ARMENGAUD, J. Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! **Environmental microbiology**, v. 15, n. 1, p. 12-23, 2013.

ARTAEGA, M. E. et al. Dermal toxicity, eye and dermal irritation and skin sensitization evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 147-151, 2014.

ASAD, H.; CARPENTER, D. O. Effects of climate change on the spread of zika virus: a public health threat. **Reviews on environmental health**, v. 33, n. 1, p. 31-42, 2018.

ASLAM, B. et al. Proteomics: technologies and their applications. **Journal of chromatographic science**, p. 1-15, 2016.

AZIZOGLU, U. et al. Biotechnological advances in *Bacillus thuringiensis* and its toxins: Recent updates. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 22, n. 2, p. 319-348, 2023.

BAI, M. et al. Secondary metabolites from *Bacillus thuringiensis* HS66. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 58, n. 2, p. 381-383, 2022.

BEHERA, S. P. et al. Co-circulation of all the four Dengue virus serotypes during 2018–2019: first report from Eastern Uttar Pradesh, India. **PeerJ**, v. 11, p. e14504, 2023.

BEL, Y.; FERRÉ, J.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: functional characterization and mechanism of action. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 785, 2020.

BORGES, Magno Augusto Zazá et al. Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parques urbanos de Montes Claros–MG. **Revista Unimontes Científica**, v. 26, n. 2, 2024.

BRASIL. Semanas Epidemiológicas. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 26, 2024. **Boletim Epidemiológico| Secretaria de Vigilância em Saúde| Ministério da Saúde**, v. 51, n. 28, 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2024. *Aedes aegypti*. Secretaria de Vigilância em Saúde| Ministério da Saúde, 2024. Site: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti>. Acesso em 04/08/2024.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Registro da primeira vacina contra a dengue**. Maio. 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2015/dezembro/nota-sobre-o-registro-da-primeira-vacina>. Acesso em 29 de maio de 2024.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Vigilância e Controle do Vetor - Larvicidas**. Maio. 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/vigilancia-entomologica>. Acesso em 27 de junho 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, 2011.

BRAVO, A. et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17-26, 2013.

BRAVO, A. et al. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: **Characterization and Use in the Field of Biocontrol**, p. 53-66, 2017.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins .and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRÜHL, C. A. et al. Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (Bti). **Sci. Total Environ.**, v. 724, p. 137800, 2020.

CABALLERO, J. et al. Unraveling the composition of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*: a proteomics approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 12, p. e00476-20, 2020.

CARVALHO, K. d. S.; CRESPO, M. M.; ARAÚJO, A. P. et al. Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 673, 2018.

CATTEL, J. et al. A genomic amplification affecting a carboxylesterase gene cluster confers organophosphate resistance in the mosquito *Aedes aegypti*: From genomic characterization to high-throughput field detection. **Evolutionary applications**, v. 14, n. 4, p. 1009-1022, 2021.

CERNA, E. A. F., SHERMAN, C., & MARTINEZ, M. M. Dengue Reduction through Vector Control. In: **Dengue Fever in a One Health Perspective-Latest Research and Recent Advances**. IntechOpen, 2023.

CHAABOUNI, I.; GUESMI, A.; CHERIF, A. Secondary metabolites of *Bacillus*: potentials in biotechnology. *Bacillus thuringiensis* **biotechnology**, p. 347-366, 2012.

CHEN, H.; WANG, X.; LI, C.; XU, X.; WANG, G. Characterization of individual spores of two biological insecticides, *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*, in response to glutaraldehyde using single-cell optical approaches. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 5, p. 1-12, 2024.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 1, p. 4-31, 2016.

CONWAY, M. J.; HASLITT, D. P.; SWARTS, B. M. T. *Aedes aegypti* metabolism with next-generation insecticides. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 469, 2023.

COORSSEN, J. R.; PADULA, M. P. Proteomics—The State of the Field: The Definition and Analysis of Proteomes Should Be Based in Reality, Not Convenience. **Proteomes**, v. 12, n. 2, p. 14, 2024.

COSTA, J. R. V. DA; ROSSI, MARUCCI, J. R. S. C.; ALVES, E. C. DA C.; VOLPE H. X. L.; FERRAUDO A. S; LEMOS, M. V F; DESIDÉRIO J. A. Atividade Tóxica de Isolados de *Bacillus thuringiensis* a Larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), September - **Biological Control**, 2010.

CRICKMORE, N. et al. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, p. 107438, 2021.

DAHMANA, H. et al. Insecticidal activity of bacteria from larvae breeding site with Natural Larvae Mortality: Screening of Separated Supernatant and Pellet Fractions. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 486, 2020.

DE ALMEIDA, J. R. et al. *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 6, p. 812-821, 2021.

DE OLIVEIRA, M. R. et al. Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*. **Front. Microbiol.**, v. 12, p. 743246, 2021.

DE OLIVEIRA, S. R.; CALEFFE, R. R. T.; CONTE, H. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 21, n. 3, 2017.

DE SOUSA, C. S. et al. Microbial omics: applications in biotechnology. In: Omics technologies and bioengineering. **Academic Press**, p. 3-2, 2018.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **History of modern biotechnology I**, p. 1-39, 2000.

DERUA, Y. A. et al. 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**, v. 2, p. 100089, 2022.

DERUA, Y. A. et al. Microbial larvicides for mosquito control: Impact of long lasting formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* on non-target organisms in western Kenya highlands. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 15, p. 7563-7573, 2018.

DHAYALAN, A. et al. Extraction and characterization of secondary metabolites from the soil bacterium, *acidovorax* sp. SA5 and evaluation of their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **International Journal of Environmental Research** 13.1: 47-58, 2019.

DIMOPOULOU, A. et al. Direct antibiotic activity of Bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. **mSphere**, v. 6, e0037621, 2021.

DO NASCIMENTO, J. et al. Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control**, v. 165, p. 104792, 2022.

DOHERTY, M. K.; WHITFIELD, P. D. Proteomics moves from expression to turnover: update and future perspective. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, n. 3, p. 325-334, 2011.

DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; ZEIGLER, D. R. Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 1, p. 1-12, 2020.

EPA US (UNITED STATES OF AMERICA—ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Biopesticide Active Ingredients. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/biopesticide-active-ingredients>. Acesso em: 10 set. 2024.

FACCHINELLI, L.; BADOLO, A.; MCCALL, P. J. Biology and Behaviour of *Aedes aegypti* in the Human Environment: Opportunities for Vector Control of Arbovirus Transmission. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 636, 2023.

FALQUETO, S. A. et al. *Bacillus* spp. metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 179, p. 107525, 2021.

FATIMA, R. et al. *Bacillus thuringiensis* CHGP12 uses a multifaceted approach for the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and to enhance the biomass of chickpea plants. **Pest Management Science**, v. 79, n. 1, p. 336-348, 2023.

FAYAD, N. et al. Characterization and whole genome sequencing of AR23, a highly toxic *Bacillus thuringiensis* strain isolated from Lebanese soil. **Current Microbiology**, v. 76, p. 1503-1511, 2019.

FAYAD, N. et al. Complete genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strains isolated from Lebanon and Tunisia, highly toxic against lepidopteran larvae. **Microbiology Resource Announcements**, v. 12, n. 9, p. e00060-23, 2023.

FERNÁNDEZ-CHAPA, D. et al. Viability and reconstitution of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* extracts after forty years of storage against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-7, 2021.

FERONE, M. et al. Microbial detection and identification methods: benchtop assays for omics approaches. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 19, no. 6, p. 3106-3129, 2020.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Dengue: **vírus e vetor**. 2023. Disponível em: < <https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html> >. Acesso em 15dez. 2023.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 676-677, 2003.

FOSTER, W. A.; WALKER, E. D. Mosquitoes (Culicidae). In: **Medical and veterinary entomology**. Academic press, p. 261-325, 2019.

GANGA, G. C. et al. Efficacy of Native *Bacillus thuringiensis* against Mosquito Vector. **Journal of Nepal Health Research Council**, v. 21, n. 3, p. 479-485, 2023.

GANGMEI, K. et al. Whole genome sequencing and evolutionary significance of a novel mosquitocidal bacterium, *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* VCRC-B650 reported from Union Territory of Puducherry, India highly useful for mosquito control. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 300, p. 37, 2025.

GANGMEI, K. et al. A review on vector borne diseases and various strategies to control mosquito vectors. **Indian Journal of Entomology**, p. 329-338, 2024.

GILLIS, A. et al. Role of plasmid plasticity and mobile genetic elements in the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 6, p. 829-856, 2018.

GÓMEZ, A. I. P. et al. Unveiling soil bacterial diversity in the Andes-Amazon transition zone: Impacts of forest conversion to pasture. **Applied Soil Ecology**, v. 201, p. 105486, 2024.

GOMIS-CEBOLLA, J.; SCARAMAL RICIELLO, A. P.; FERRÉ, J. A genomic and proteomic approach to identify and quantify the expressed *Bacillus thuringiensis* proteins in the supernatant and parasporal crystal. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 193, 2018.

GRUBBS, K. J. et al. Large-scale bioinformatics analysis of *Bacillus* genomes uncovers conserved roles of natural products in bacterial physiology. **MSystems**, v. 2, n. 6, p. 10.1128/msystems.00040-17, 2017.

GUPTA, R. S. et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus limiting* it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020.

HARITH FADZILAH, N.; ABDUL-GHANI, I.; HASSAN, M. Proteomics as a tool to explore the potential of entomopathogens as microbial insecticides. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 100, n. 1, p. e21520, 2019.

HETRICK, K. J.; VAN DER DONK, Wilfred A. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural product discovery in the genomic era. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 36-44, 2017.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta tropica**, v. 190, p. 99-111, 2019.

HOLMAN, S. W.; SIMS, P. F. G; EYERS, C. E. The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. **Bioanalysis**, v. 4, n. 14, p. 1763-1786, 2012.

HUANG, S. et al. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* at different growth phases by using an automated online two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry strategy. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5270-5279, 2012.

HURTADO-BAUTISTA, E. et al. Phenotypic plasticity and evolution of thermal tolerance in bacteria from temperate and hot spring environments. **PeerJ**, v. 9, p. e11734, 2021.

IBRAHIM, M. A. et al. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. **Bioengineered bugs**, v. 1, n. 1, p. 31-50, 2010.

INOUE, Y. et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 325–331, 2004.

IQBAL, S. et al. Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: a comprehensive review. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 927, 2023.

JAFFAL, Ali et al. Current evidences of the efficacy of mosquito mass-trapping interventions to reduce *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* populations and Aedes-borne virus transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. e0011153, 2023.

JEONG, H.; CHOI, S. K.; PARK, S. H. Genome sequences of *Bacillus thuringiensis* Serovar kurstaki strain BP865 and *B. thuringiensis*, Serovar aizawai strain HD-133. **Genome Announ** 5: e01544-e1516, 2017.

JIN, L. et al. Dominant point mutation in a tetraspanin gene associated with field-evolved resistance of cotton bollworm to transgenic *Bt* cotton. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 115, 11760–11765, 2018.

JUSTICIA, J. et al. Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by Titanocene (III) – Evaluation of their antifeedant activity. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 712-718, 2005.

KATAK, R. M. et al. Biotechnological potential of microorganisms for mosquito population control and reduction in vector competence. **Insects**, v. 14, n. 9, p. 718, 2023.

KATAK, R. M. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of supernatant and pellet fractions from cultured *Bacillus* spp. isolated from Amazonian microenvironments. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 176, n. 2, p. 2021.

KHURANA, H. et al. Genomic insights into the phylogeny of *Bacillus* strains and elucidation of their secondary metabolic potential. **Genomics**, v. 112, n. 5, p. 3191-3200, 2020.

KRAEMER, M. U. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 854-863, 2019.

KUKRETI, A. et al. Hybrid de novo whole genome assembly of lipopeptide producing novel *Bacillus thuringiensis* strain NBAIR BtAr exhibiting antagonistic activity against *Sclerotium rolfsii*. **Microbial Pathogenesis**, p. 106867, 2024.

KUNNIKURUVAN, A. et al. Enhanced mosquito larvicidal efficacy and dehairing properties of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strain VCRC-B649 isolated from Malabar Coast, India. **Current Microbiology**, v. 82, p. 93, 2025.

LAZARTE, J. N. et al. Molecular characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain from Argentina, toxic against Lepidoptera and Coleoptera, based on its whole-genome and Cry protein analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 183, p. 107563, 2021.

LECHUGA, A. et al. Completed genomic sequence of *Bacillus thuringiensis* HER1410 reveals a Cry-containing chromosome, two megaplasms, and an integrative plasmidial prophage. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 9, p. 2927-2939, 2020.

LI, K. et al. An overview of the production and use of *Bacillus thuringiensis* toxin. **Open Life Sciences**, v. 19, n. 1, p. 20220902, 2024.

LI, Kaixiao; CHEN, Mingzhu; SHI, Jingyi; MAO, Tian. An overview of the production and use of *Bacillus thuringiensis* toxin. **Open Life Sciences**, v. 19, n. 1, p. 20220902, 2024.

LI, Y. et al. Environmental behaviors of *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal proteins and their effects on microbial ecology. **Plants**. 11(9):1212. 2022.

LIANG, D. et al. Effects of different bacteriostats on the dynamic germination of *Clostridium perfringens* spores. **Foods**, v. 12, n. 9, p. 1834, 2023.

LIU, J. et al. Complete genome sequence and bioinformatics analyses of *Bacillus thuringiensis* strain BM-BT15426. **Microbial pathogenesis**, v. 108, p. 55-60, 2017.

LIU, X. et al. Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2229–2238, 2014.

LOGAN, Niall A. *Bacillus*. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Springer Nature, 2009.

LOPES, R. et al. DENGUE NO BRASIL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **Revista Foco (Interdisciplinary Studies Journal)**, v. 17, n. 3, 2024.

LÓPEZ-MOLINA, S. et al. Análise em nanoescala in vivo da interação sinérgica dinâmica das toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* em *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009199, 2021.

LOZOVEI, A. L. Culicidae (mosquitos). **Entomologia médica e veterinária. Brasil: Atheneu**, p. 107-74, 2011.

MACCARRONE, G. et al. Characterization of a protein interactome by co-immunoprecipitation and shotgun mass spectrometry. **Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications**, p. 223-234, 2017.

MAHAJAN, S.; AGASHE, D. Evolutionary jumps in bacterial GC content. **G3**, v. 12, n. 8, p. jkac108, 2022.

MALOVICHKO, Y. V.; NIZHNIKOV, A. A.; ANTONETS, K. S. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 347, 2019.

MANIERO, V. C. et al. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Almanaque multidisciplinar de pesquisa**, v. 3, n. 1, 2016.

MAPPA, C. et al. Assessing the ratio of *Bacillus* spores and vegetative cells by shotgun proteomics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 20, p. 25107-25115, 2021.

MASI, M. et al. A survey of bacterial, fungal and plant metabolites against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of yellow and dengue fevers and Zika virus. **Open Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 156-166, 2017. MEESIL, W. et al. Genome mining reveals novel biosynthetic gene clusters in entomopathogenic bacteria. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 20764, 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Registro da primeira vacina contra a dengue**. Maio. 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2015/dezembro/nota-sobre-o-registro-da-primeira-vacina>. Acesso em 29 de maio de 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Vigilância e Controle do Vetor - Larvicidas**. Maio. 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/vigilancia-entomologica>. Acesso em 27 de junho de 2024.

MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: Challenges and prospects. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 40, n. 1–2, p. 20–32, 2003.

MOHIDDIN, A.; LASIM, A. M.; ZUHARAH, W. F. Susceptibility of *Aedes albopictus* from dengue outbreak areas to temephos and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 4, p. 295-300, 2016.

MONTOYA-MARTÍNEZ, A. C. et al. Microbial metabolites with biological control activity. In: **Bioactive Microbial Metabolites**. Academic Press, p. 31-50, 2024.

MOREIRA, Ryan et al. Bibacillin 1: A two-component lantibiotic from *Bacillus thuringiensis*. **RSC Chemical Biology**, 2024.

MOUSTAFA, A. M.; SALEH, M. A.; ATEYA, I. R.; KANDIL, M. A. Influence of some environmental conditions on stability and activity of *Bacillus thuringiensis* formulations against the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, p. 61, 2018.

MUKHERJEE, S. et al. Methodologies for identification, purification, and characterization of bacterial secondary metabolites. In: **Bacterial Secondary Metabolites**. Elsevier, p. 381-397, 2024.

MUNIZ, V. A. et al. Genomic and morphological features of an Amazonian *Bacillus thuringiensis* with mosquito larvicidal activity. **AMB Express**, v. 15, n. 1, p. 39, 2025.

NOOR, Z. et al. Mass spectrometry-based protein identification in proteomics—a review. **Briefings in bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 1620-1638, 2021.

OLIVEIRA, J. C. et al. Bacteria isolated from *Aedes aegypti* with potential vector control applications. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 204, p. 108094, 2024.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ONGPIPATTANAKUL, C. et al. Mechanism of action of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 18, p. 14722-14814, 2022.

OREN, A. & GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 005056, 2021.

OSMAN, G. E. H. et al. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 25, n. 1, 2015.

OZMA, M. A. et al. Bacterial proteomics and its application in pathogenesis studies. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1245-1256, 2022.

PACHECO, S. et al. Whole genome sequencing analysis of *Bacillus thuringiensis* GR007 reveals multiple pesticidal protein genes. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 758314, 2021.

PAJOR, M. J.; LONG, B.; LIANG, S. Y. Dengue: Uma revisão focada para o clínico de emergência. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 82, p. 82-87, 2024.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PALMA, L. et al. Draft Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* INTA 103-23 Reveals Its Insecticidal Properties: Insights from the Genomic Sequence. **Data**, v. 9, n. 3, p. 40, 2024.

PAN, P. et al. Microbial diversity biased estimation caused by intragenomic heterogeneity and interspecific conservation of 16s rna genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, n. 5, p. e02108-22, 2023.

PANDEY, A. Impact of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (VCRC B17) for mosquito larvae control. **Journal of Health and Social Welfare**, v. 8, n. 1, 2024.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

PARIJA, S. C. Genomics, Proteomics and Molecular Biology in Microbiology. In: **Textbook of Microbiology and Immunology**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 101-115.

PARIS, M. et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest Management Science**, v. 67, n. 1, p. 122-128, 2011.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406-438, 2020.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 309-318, 2017.

PENG, Z. et al. A review on Zika vaccine development. **Pathogens and Disease**, v. 82, p. ftad036, 2024.

PEREIRA, J. O. et al. Overview on biodiversity, chemistry, and biotechnological potential of microorganisms from the Brazilian Amazon. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**, p. 71-103, 2017.

POLANCZYK, R. A.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; PAULI, G. The American *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides market. In: *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol*. p. 173-184. 2017.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD\_ALLAH, E. F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 667, 2017.

RANG, Jie et al. Comparative analysis of genomics and proteomics in *Bacillus thuringiensis*

4.0718. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119065, 2015.

REIS, R. et al. Microbial larvicides: Advances and challenges. **J. Med. Entomol.**, v. 58, p. 303-312, 2021.

REVATHI, K. et al. Efeitos dos metabólitos de *Bacillus subtilis* em larvas de *Aedes aegypti* L. **Bioquímica e fisiologia de pesticidas**, v. 107, n. 3, p. 369-376, 2013.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Zika: the new arbovirus threat for Latin America. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 06, p. 684-685, 2015.

ROSENBLATT, A. A doença negligenciada está na pele: A chamada que buscava apoiar estudos inovadores para eliminar disparidades em saúde. **Inovação & Desenvolvimento: A Revista da FACEPE**, v. 1, n. 3, p. 22-24, 2020.

SALAZAR, B. et al. *Bacillus* spp. as bio-factories for antifungal secondary metabolites: Innovation beyond whole organism formulations. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 1, p. 1-24, 2023.

SANSINENEA, E. Regulatory issues in commercialization of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. In: **Agriculturally Important Microorganisms**. p. 69–80, 2016.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1523-1538, 2011.

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*. **Bull Entomol Res**, 109:111–118, 2019.

SCHUARTZ, Valeria et al. Insecticide resistance of *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) population from Paranaguá a port city in southern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, v. 41, p. e23016, 2024.

SEMANJSKI, M.; MACEK, B. Shotgun proteomics of bacterial pathogens: advances, challenges and clinical implications. **Expert Review of Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 139-156, 2016.

SHAIKH, M. S. et al. Chikungunya Virus Vaccine: **An Update Review**. 2024.

SHAROV, T. N.; VIKTOROV, D. V.; TOPORKOV, A. V. Proteomic Analysis in Microbiology. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2023.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SHIKOV, A. E. et al. Draft Genome Sequencing of the *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Highly Insecticidal Strain 800/15. **Data**, v. 9, n. 2, p. 34, 2024.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. **Toxins**, v. 13, n. 8, p. 523, 2021.

SINGH, G. et al. Biological control of the mosquito: an analysis of the impediments and

possibilities. **International Journal of Mosquito Research**. p. 117-126, 2023.

SLOMKA, S. et al. Experimental evolution of *Bacillus subtilis* reveals the evolutionary dynamics of horizontal gene transfer and suggests adaptive and neutral effects. **Genetics**, v. 216, n. 2, p. 543-558, 2020.

SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 133, p. 1-12, 2016.

SOARES-DA-SILVA, J. et al. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta tropica**, v. 176, p. 197-205, 2017.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, genetics and evolution**, v. 67, p. 191-209, 2019.

STRUBE, M. L. RibDif: can individual species be differentiated by 16S sequencing. **Bioinformatics Advances**, v. 1, n. 1, p. vbab020, 2021.

SU, T. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* and susceptibility to other common pesticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Salt Lake City, UT. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, p. 506–513, 2019.

SUNARTI, Lusiana S. Biolarvicide Potency of *Bacillus thuringiensis* against Mosquito Larvae and other Insects. **Asian Journal of Research in Zoology**, v. 8, n. 1, p. 80-88, 2025.

SURENDRA, A. K. et al. Metabolomic profiling and genome-wide analysis of *Bacillus subtilis* NBAIR-BSWG1 reveals cyclic lipopeptides as key antagonists. **Journal of Basic Microbiology**, p. e70007, 2025.

TASSIOS, P. T.; MORAN-GILAD, J. Bacterial next generation sequencing (NGS) made easy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 332-334, 2018.

TENG, W. et al. Genomic legacies of ancient adaptation illuminate GC-content evolution in bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 1, p. e02145-22, 2023.

UNZUE, A. et al. Multifunctional properties of a *Bacillus thuringiensis* strain (BST-122): Beyond the parasporal crystal. **Toxins**, v. 14, p. 768, 2022.

VALTIERRA-DE-LUIS, D. et al. Potential for *Bacillus thuringiensis* and other bacterial toxins as biological control agents to combat dipteran pests of medical and agronomic importance. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 773, 2020.

VIJAYAKUMAR, A. et al. A New Aqueous Formulation from Indigenously Isolated *Bacillus thuringiensis israelensis* VCRC B646 for Mosquito Control. **Indian Journal of Entomology**, 2024.

WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT. 2024. **Espécie** *Aedes aegypti*. Site da Walter Reed Biosystematics Unit. <http://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/aegypti>, acessado em 29 de maio 2024.

WANG, F. et al. Exploring the evolutionary history of different strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in combating *Phenacoccus solenopsis*. **Bt Research**, v. 15, 2024.

WANG, W. et al. Targets and strategies for vaccine development against dengue viruses. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112304, 2021.

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

YADAV, B. et al. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. **Gene Reports**, v. 23, p. 101040, 2021.

YARDIMCI, G. B. et al. Metabolomic profiling and biological activities of cell-free supernatants of *Bacillus* sp. isolates: antibacterial, antibiofilm, and anti-quorum sensing activities. **Experimed**, v. 14, n. 3, p. 183-193, 2024.

YEOH, C. Y.; CHEAH, Y. K. Bioinformatics in the identification of microorganisms. 2020.

ZARA, A. L. D. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZEIGLER, D. R. & PERKINS, J. B. The genus *Bacillus*. **Practical handbook of microbiology**, 4th edition. Boca Raton: CRC Press, 2021.

ZEQUI, J. A. C.; LOPES, J.; SANTOS, F. P.; & VILAS-BÔAS, G. T. Efficacy and persistence of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) under simulated field conditions. **Int J Mosq Res**, 2(3), 5-9, 2015.

ZETTEL, C., & KAUFMAN, P. (2009). Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae): EENY-434/IN792, 2/2009. **EDIS**, 2009(2).

ZHANG, D. et al. Biocontrol and action mechanism of *Bacillus subtilis* lipopeptides' fengycins against *Alternaria solani* in potato as assessed by a transcriptome analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 861113.

ZOGO, B. et al. Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 18, p. 1-9, 2019.

## Material Suplementar

### Capítulo I

Table S1: Agrupamentos de genes biossintéticos (BGC) preditos no genoma de *B. thuringiensis* GD02.13.

| Contig | Ferramenta | Tipo/Atividade          | Localização (coordenadas relativas, b. p.) | Cluster similar     | Similaridade |
|--------|------------|-------------------------|--------------------------------------------|---------------------|--------------|
| 1      | antiSMASH  | Terpene                 | 177,786-199,639 (21,854)                   | Molybdenum cofactor | 17%          |
| 3.1    | antiSMASH  | NRP-metallofore - NRPS  | 1-43,342 (43,342)                          | bacilicactin        | 85%          |
| 3.2    | antiSMASH  | NI – siderophore        | 330,830–360,370 (29,541)                   | petrobactin         | 100%         |
| 5.1    | antiSMASH  | LAP                     | 2,808 - 26,314 (23,507)                    | -                   | -            |
| 5.2    | antiSMASH  | RRE-containing          | 338,791 - 356,760 (17,970)                 | -                   | -            |
| 7.1    | antiSMASH  | NRPS                    | 179,186 - 226,202 (47,017)                 | -                   | -            |
| 7.2    | antiSMASH  | RiPP-like               | 244,898 - 255,158 (10,261)                 | -                   | -            |
| 14.1   | antiSMASH  | HR – T2PKS              | 3,213 - 46,585 (43,373)                    | -                   | -            |
| 14.2   | antiSMASH  | CDPS, NRPS              | 67,311 - 127,676 (60,366)                  | pulcherriminic acid | 66%          |
| 17.1   | antiSMASH  | NRPS-like               | 77,557 - 121,138 (43,582)                  | -                   | -            |
| 19.1   | antiSMASH  | NRPS                    | 1 - 51,734 (51,734)                        | -                   | -            |
| 20.1   | antiSMASH  | RiPP-like               | 59,796 - 70,125 (10,330)                   | -                   | -            |
| 22.1   | antiSMASH  | ranthipeptide           | 84,574 - 97,838 (13,265)                   | -                   | -            |
| 23.1   | antiSMASH  | lanthipeptide-class-iii | 1,124 - 23,727 (22,604)                    | -                   | -            |
| 32.1   | antiSMASH  | betalactone             | 10,424 - 35,662 (25,239)                   | fengycin            | 40%          |
| 34.1   | antiSMASH  | RiPP-like               | 2,930 - 13,151 (10,222)                    | cerecyclin          | 30%          |

Table S2: Qualidade do genoma com base na completude e contaminação estimadas do genoma

| Genoma       | Id            | Marcadores_lineage | Genomas | Marcadores | Conjunto de marcadores | 0 | 1   | 2  | 3  | 5+ | Completude | Contaminação | Heterogeneidade da cepa |   |
|--------------|---------------|--------------------|---------|------------|------------------------|---|-----|----|----|----|------------|--------------|-------------------------|---|
| contigs5000l | o__Bacillales | (UID828)           | 139     | 508        | 174                    | 1 | 496 | 9  | 2  | 0  | 0          | 99,43        | 2.36                    | 0 |
| contigs2000l | o__Bacillales | (UID828)           | 139     | 508        | 174                    | 1 | 496 | 9  | 2  | 0  | 0          | 99,43        | 2.36                    | 0 |
| contigs500l  | o__Bacillales | (UID828)           | 139     | 508        | 174                    | 1 | 457 | 46 | 4  | 0  | 0          | 99,43        | 6.89                    | 7 |
| contigsALL   | k__Bacteria   | (UID203)           | 5449    | 101        | 56                     | 1 | 47  | 35 | 14 | 3  | 1          | 98,21        | 52,1                    | 7 |

Table S3: Análise de genes que codificam toxinas inseticidas extraídas com BtiToxin\_Digger v1.0.10 usando espécies de insetos-alvo.

| Tipos de proteínas | Proteína ID            | Descrição da proteína                          | Comprimento | Correspondência | Comprimento | Cobertura | Identidade | Inseto-alvo | Espécies-alvo                                                                                                                                         |
|--------------------|------------------------|------------------------------------------------|-------------|-----------------|-------------|-----------|------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6643 | Proteína hipotética 1428.2295                  | 643         | Cry11Aa3        | 643         | 100       | 100        | Diptera     | <i>Culex quinquefasciatus</i> ,<br><i>Anopheles albimanus</i> e<br><i>Aedes aegypti</i><br>ND                                                         |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6764 | Proteína hipotética   1428.2295]               | 319         | Cry60Ba3        | 319         | 100       | 100        |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6765 | Proteína hipotética 1428.2295]                 | 303         | Cry60Aa3        | 303         | 100       | 100        |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6809 | Proteína hipotética 1428.2295]                 | 918         | Cry4Ba          | 1136        | 80.81     | 100        | Diptera     | <i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> ,<br><i>Anopheles gambiae</i> ,<br><i>Anopheles albimanus</i> e<br><i>Anopheles stephensis</i> . |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6882 | Hipotética 1428.2295]                          | 133         | Cry4Ba          | 1136        | 11.71     | 69.92      |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6883 | Proteína hipotética [1428.2295]                | 208         | Cry4Ba2         | 1136        | 18.31     | 100        | Diptera     |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6974 | Proteína hipotética [1428.2295]                | 155         | Cry4Ba4         | 1135        | 13.74     | 65.38      | Diptera     |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6960 | Proteína hipotética 1428.2295]                 | 208         | Cry4Ba2         | 1136        | 18.31     | 100        | Diptera     |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cry       | fig 1428.2295.peg.6974 | Proteína hipotética 1428.2295                  | 155         | Cry4Ba4         | 1135        | 13.74     | 65.38      | Diptera     |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cyt       | fig 1428.2295.peg.5841 | PROTEÍNA DA TOXINA MOSQUITOCIDA 1428.2295      | 515         | ND              | ND          | ND        | ND         |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cyt       | fig 1428.2295.peg.6641 | Proteína hipotética 1428.2295                  | 249         | ND              | ND          | ND        | ND         |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cyt       | fig 1428.2295.peg.6807 | Proteína hipotética 1428.2295                  | 525         | ND              | ND          | ND        | ND         |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cyt       | fig 1428.2295.peg.6810 | Delta-endotoxina citolítica tipo 1Ba 1428.2295 | 263         | ND              | ND          | ND        | ND         |             |                                                                                                                                                       |
| Proteína Cyt       | fig 1428.2295.peg.6912 | proteína hipotética 1428.2295                  | 471         | ND              | ND          | ND        | ND         |             |                                                                                                                                                       |