



**UFAM**

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

**ANÁLISES MOLECULARES DE LINHAGENS DE *Bacillus e Brevibacillus spp.*,  
ISOLADOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA, ATIVAS CONTRA *Aedes aegypti*,  
LINNAEUS, 1762**

**RICARDO DE MELO KATAK**

**MANAUS/AM**

**2020/02**

**RICARDO DE MELO KATAK**

**ANÁLISES MOLECULARES DE LINHAGENS DE *Bacillus* e *Brevibacillus* spp.,  
ISOLADOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA, ATIVAS CONTRA *Aedes aegypti*,  
LINNAEUS, 1762**

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

**Orientador:** Wanderli Pedro Tadei

**Coorientadora:** Antonia Queiroz Lima de Souza

**Coorientadora:** Rosemary Aparecida Roque

**MANAUS/AM**

**2020/02**

## Ficha Catalográfica

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

K19a Katak, Ricardo de Melo  
Análises moleculares de linhagens de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp., isolados da Amazônia brasileira, ativas contra *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762 / Ricardo de Melo Katak . 2020  
118 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Wanderli Pedro Tadei  
Coorientadora: Rosemary Aparecida Roque  
Coorientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Microbiota Amazônica. 2. Metabólitos . 3. Antagonismo. 4. Controle biológico. I. Tadei, Wanderli Pedro. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Ricardo Melo Katak** concluiu o Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, defendendo e sendo aprovado em **28 de Agosto de 2020** a Tese, sob o título: "Análises Moleculares de Linhagens de *Bacillus* spp., isolados da Amazônia Brasileira, Ativas Contra o *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762".

**Edmar Vaz de Andrade**

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Documento assinado eletronicamente por **Edmar Vaz de Andrade**, Coordenador, em 07/05/2021, às 12:56, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0533592 e o código CRC D1DB623B.

Avenida General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroado I Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Sul, Bloco 1, ICB, 3º andar -  
Telefone: (92) (92) 3305-1181 / Ramal 2380  
CEP 69080-900 Manaus/AM - [ppgbiotec@ufam.edu.br](mailto:ppgbiotec@ufam.edu.br)

### Termo de Aprovação

**Tese defendida e aprovada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia em 28 de Agosto de 2020 pela banca examinadora**

**Dra. Rosemary Aparecida Roque-INPA (Presidente)**

**Dr. Jayme Augusto Souza Neto-UNESP (Membro)**

**Dr. Luiz Antonio de Oliveira -INPA (Membro)**

**Dra. Nelia Soares Picanço- UFAM (Membro)**

**Dr. Hugo Valério Corrêa Oliveira -UEA (Membro)**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela graça da vida.

Aos meus pais, Maria Lúcia e José Raimundo (*In memoriam*).

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

À CAPES pelo auxílio financeiro, que sem dúvida foi mais que importante ao longo dos quatro anos de trabalho.

Ao meu Orientador, Dr. Wanderli Pedro Tadei pelo total apoio na realização deste trabalho.

Aos meus Coorientadores: Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza e a Dra. Rosemary Aparecida Roque pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao meu colaborador: Dr. Afonso Leão Duarte que abriu os horizontes da Química.

Ao Dr. Edson Carmo Junior pela colaboração científica e parceria.

Ao Dr. Marcos César Fernandes Pessoa pela doação dos reagentes de Biologia molecular.

Aos meus amigos do Laboratório Malária e Dengue do INPA: Eunice Medeiros, Joelma Soares, Adriano Nobre, Joaquim, Grafe Pontes, Deidre Machado, Laura Viana, William Ribeiro, Juan Campos de Oliveira, Veranilce Alves Muniz, especialmente ao Elerson Matos.

Aos meus amigos do laboratório LABMICRA-UFAM, Sarah Raquel, Ketlen, Rafael, Luiz Paulo, Kamila Rangel, Elisson, Fager, especialmente a Marta Rodrigues Oliveira.

Ao Dr. Felipe pelo apoio técnico no Laboratório de Espectrometria de Massas.

Ao MSc. Lucas pelo apoio no Laboratório de Microscopia eletrônica de varredura

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular-LTBM pelo suporte técnico para realização dos experimentos.

Ao Doutor Rudi Emerson Procópio pelo apoio nas análises moleculares.

Ao Doutor Edmar Vaz de Andrade, coordenador do Curso do PPGBIOTEC-UFAM por ter me inspirado na Biologia Molecular e incentivado durante esse percurso.

Ao Doutor Osvaldo Marinotti pela colaboração na escrita dos artigos científicos.

Ao Mestre Juracy do INPA que sempre foi um grande suporte nas etapas do experimento.

*Esta tese é dedicada à memória do meu pai **José Raimundo** e também de todas as vítimas da Covid-19, em especial ao meu tio **Francelino Melo** e a mãe do meu amigo Elerson, a querida Dona **Maria Matos**.*

## RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é considerado o vetor primário de muitos arbovírus causadores de doenças como a dengue, chikungunya e zika. Os problemas ocasionados por este vetor são imensuráveis, sendo necessárias novas estratégias de controle para amenizar os impactos na saúde pública. As bactérias do gênero *Bacillus* e *Brevibacillus*, constituem-se como principais microrganismos entomopatogênicos utilizados no controle destes mosquitos. Considerando a diversidade metabólica e genética destas bactérias, o presente estudo, objetivou avaliar o potencial químico e biológico das bactérias do gênero *Bacillus* e *Brevibacillus*, isolados de diferentes ambientes amazônicos, com toxicidade para as larvas de *A. aegypti*. Foram isoladas 143 linhagens de bacilos nos meios de cultivo (NA, LB e ISP2) por meio do choque térmico, no qual foi caracterizado por coloração de Gram, sendo encontrados 136 bacilos gram positivos e sete gram negativos. Por meio dos clusters do perfil fenotípico foram selecionadas 77 linhagens como representantes e identificadas pela sequência do gene *16S rRNA*, sendo encontrado seis gêneros bacterianos como, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Brevundimonas*. As 77 linhagens caracterizadas foram testadas em bioensaios seletivos contra larvas de *A. aegypti*, das quais 21 (27.2%) apresentaram atividade larvicida. As linhagens que apresentaram toxicidade acima de 50% foram utilizadas para os bioensaios das frações do sobrenadante e do pellet das culturas bacterianas por meio de bioensaios seletivos e quantitativos. Em relação aos valores da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  das linhagens ativas (SPa07NA-*Br. halotolerans* e SX15LB-*B. safensis*) na fração do sobrenadante (SUP), não foi observado diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ) quando comparadas com a cepa padrão Bti BR101NA, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados do pellet não autoclavado (PEL) em 48h mostraram que a linhagem SBC13LB-*B. thuringiensis* obteve valor de  $CL_{50}$  (0.004 mg/l) menor que o da cepa padrão Bti BR101NA (0.008 mg/l), sendo verificado diferença estatística significativa ( $p = 0.05$ ), mostrando maior toxicidade. Considerando os resultados do pellet autoclavado + sobrenadante (APEL+SUP), as linhagens SP06LB-*B. thuringiensis* e SPa22LB-*B. safensis* não apresentaram diferenças estatísticas significativa ( $p > 0.05$ ) quando comparado com a cepa padrão Bti BR101NA nos intervalos de 24, 48 e 72h. Os resultados do pellet autoclavado (APEL), mostraram que a linhagem SPa22LB-*B. safensis* não apresentou diferença estatística significativa entre os valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  nos intervalos de 24, 48 e 72h. As linhagens ativas nas frações do sobrenadante (SUP) e do pellet (PEL) foram utilizadas para o estudo de metabólitos secundários, no qual duas linhagens (SPa07NA-*Br. halotolerans* e SX15LB-*B. safensis*) apresentaram toxicidade nos extratos obtido do sobrenadante (SUP). A linhagem SPa07NA apresentou maior toxicidade na  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  sendo verificado diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) nos intervalos de 24, 48 e 72h. O estudo dos metabólitos da linhagem SPa07NA-*Br. halotolerans*, permitiu o rastrear os metabólitos ativos nos extratos. Os resultados obtidos pela inserção direta em espectrometria de massas por ionização em electrospray mostraram que durante os 10 dias de cultivo das linhagens não foram observadas mudanças nos íons, mas sim a prevalência de íons majoritários. Além disso, a atividade biológica contra as larvas de *A. aegypti* não apresentaram diferenças significativas. A técnica de padronização de isolamento por HPLC semipreparativo aliados com os ensaios biológicos e fracionamento permitiram obter três frações e 12 subfrações ativas para as larvas. O perfil químico dos extratos de metabólitos das linhagens promissoras necessita de estudos complementares que podem ser realizados em trabalhos futuros a fim de caracterizar e elucidar as moléculas ativas. Além dos estudos dos metabólitos, foi avaliado o comportamento antagonico de duas cepas ativas que apresentaram atividade larvicida somente no pellet (PEL). Os estudos do potencial das linhagens GD02.13NA-*B. toyonensis* e SBC13NA-*B. thuringiensis* mostraram resultados semelhantes a cepa padrão Bti BR 101, no qual foi evidenciado colonização bacteriana nas partes da cabeça e tronco das larvas, e amplificação positiva para os genes *Cry4* e *Chi* com potencial para produção de enzimas quitinases. Dessa forma, considera-se que as linhagens isoladas apresentam potencial para produção de metabólitos primários e secundários para diversas estratégias de controle para esses mosquitos.

**Palavras-chave:** Microbiota Amazônica, metabólitos, antagonismo, controle biológico.

## SUMMARY

The *Aedes aegypti* mosquito is considered the primary vector of many arboviruses that cause diseases such as dengue, chikungunya and Zika. The problems caused by this vector are immeasurable, and new control strategies are needed to mitigate the impacts on public health. *Bacillus* and *Brevibacillus* genus bacteria are the main entomopathogenic microorganisms used to control these mosquitoes. Considering the metabolic and genetic diversity of these bacteria, this study aimed to evaluate the chemical and biological potential of bacteria of the genus *Bacillus* and *Brevibacillus*, isolated from different Amazonian environments, with toxicity to *A. aegypti*. One hundred and forty three strains of bacilli were isolated in the culture media (NA, LB and ISP2) by means of heat shock, which was characterized by Gram stain, with 136 gram positive and seven gram negative bacilli found. Through the clusters of the phenotypic profile, 77 strains were selected as representatives and identified by the *16S rRNA* gene sequence, being found six bacterial genera such as *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Brevundimonas*. The 77 characterized lines were tested in selective bioassays against *A. aegypti*, of which 21 (27.2%) had larvicidal activity. The strains that showed toxicity above 50% were used for bioassays of the supernatant and pellet fractions of bacterial cultures by means of selective and quantitative bioassays. Regarding the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values of the active strains (SPa07NA-*Br. halotolerans* and SX15LB-*B. safensis*) in the supernatant fraction (SUP), no statistically significant difference was observed ( $p > 0.05$ ) when compared to the standard Bti strain BR101NA, at intervals of 24, 48 and 72 hours. The results of the non-autoclaved pellet (PEL) at 48h showed that the SBC13LB-*B. thuringiensis* strain obtained a LC<sub>50</sub> value (0.004 mg/l) lower than that of the standard strain Bti BR101NA (0.008 mg/l), with a statistically significant difference ( $p = 0.05$ ), showing greater toxicity. Considering the results of autoclaved pellet + supernatant (APEL+SUP), the strains SP06LB-*B. thuringiensis* and SPa22LB-*B. safensis* did not show statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) when compared to the standard Bti BR101NA strain at intervals of 24, 48 and 72h. The results of the autoclaved pellet (APEL) showed that the strain SPa22LB-*B. safensis* did not present statistically significant difference between the values of LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> in the intervals of 24, 48 and 72h. The active strains in the supernatant (SUP) and pellet (PEL) fractions were used for the study of secondary metabolites, in which two strains (SPa07NA-*Br. halotolerans* and SX15LB-*B. safensis*) showed toxicity in the extracts obtained from the supernatant (SUP). The SPa07NA strain showed greater toxicity in LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, with a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) at intervals of 24, 48 and 72h. The study of metabolites of the SPa07NA-*Br. halotolerans* strain, allowed the tracking of active metabolites in the extracts. The results obtained by direct insertion in electrospray ionization mass spectrometry showed that during the 10 days of culture of the strains, no changes in the ions were observed, but the prevalence of major ions was observed. Furthermore, the biological activity against *A. aegypti* did not show significant differences. The isolation standardization technique by semi-preparative HPLC combined with biological assays and fractionation allowed obtaining three fractions and 12 active subfractions for the larvae. The chemical profile of metabolite extracts from promising strains needs further studies that can be carried out in future work in order to characterize and elucidate the active molecules. In addition to metabolite studies, the antagonistic behavior of two active strains that showed larvicidal activity only in the pellet (PEL) was evaluated. Studies of the potential of GD02.13NA-*B. toyonensis* strains and SBC13NA-*B. thuringiensis* showed similar results to the standard Bti BR 101 strain, in which bacterial colonization in the larvae's head and trunk was evidenced, and positive amplification for *Cry4* and *Chi* genes with potential for production of chitinase enzymes. Thus, it is considered that the isolated strains have the potential to produce primary and secondary metabolites for different control strategies for these mosquitoes.

**Keywords:** Amazon microbiota, metabolites, antagonism, biological control.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Geographic location, date and characteristics of the sites where water and soil were collected. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Tabela 2:</b> Isolated strains with larvicidal activity against <i>A. aegypti</i> larvae. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Tabela 3.</b> LC50 and LC90 values of microbial culture fractions against <i>A. aegypti</i> larvae. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Tabela S1.</b> <i>Bacillus</i> strains isolated from soil and water samples from the municipalities of Parintins, Manaus and Coari, Amazonas state, Brazil. ....	<b>41</b>
<b>Tabela S2-A.</b> Supernatant (SUP) fractions. ....	<b>43</b>
<b>Tabela S2-B.</b> Non-autoclaved Pellet (PEL) fractions ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Tabela S2-C.</b> Autoclaved pellet (APEL) fractions ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Tabela S2-D.</b> Mixed autoclaved pellet plus supernatant (APEL+SUP) fractions ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Tabela 4:</b> Linhagens selecionadas para o estudo da produção de extratos metabólicos. ....	<b>47</b>
<b>Tabela 5:</b> Dados dos parâmetros observados na produção dos extratos das linhagens bacterianas. ....	<b>51</b>
<b>Tabela 6:</b> Concentração letal LC <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> em mg/L, dos extratos dos bacilos para as larvas de <i>A. aegypti</i> . ....	<b>62</b>
<b>Tabela 7:</b> Dados de pH, rendimento, glicose e atividade larvicida da cepa SPa07NA- <i>Br. halotolerans</i> em diferentes intervalos de cultivo. ....	<b>72</b>
<b>Tabela 8:</b> Atividade larvicida das frações obtidas durante no 3º e 5º dia de cultivo da cepa SPa07NA. ....	<b>75</b>
<b>Tabela 9:</b> Atividade larvicida das frações dos extratos do 5d da linhagem SPa07NA ....	<b>76</b>
<b>Tabela 10:</b> Atividade larvicida das subfrações da fração Fr5D100 em duas subfrações I e II da cepa <i>Br. halotolerans</i> ....	<b>78</b>
<b>Tabela 11:</b> Sequências dos primers utilizados e os tamanhos dos fragmentos esperado na PCR, bem como a temperatura de anelamento. ....	<b>83</b>
<b>Tabela 12:</b> Concentração letal LC <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> em mg/l do PEL dos bacilos para as larvas de <i>A. aegypti</i> . ....	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .....	16
<b>Figura 2:</b> Proteínas inseticidas produzidas por <i>B. thuringiensis</i> .....	23
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de ação de <i>B. thuringiensis</i> no epitélio intestinal das larvas .....	24
<b>Figura 4:</b> Locais de coleta de amostras.....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 5:</b> Atividade larvicida de frações de culturas microbianas a 5 mg / ml. ....	Erro! Indicador não definido.
<b>Figura 6:</b> Fluxograma da metodologia do experimento .....	46
<b>Figura 7:</b> Rendimentos dos extratos brutos das linhagens.....	52
<b>Figura 8:</b> Dendograma obtido por AAH do perfil de (SUP), ionização positiva (+). ....	53
<b>Figura 9:</b> Gráfico de Score de ACP do perfil de SUP, ionizados de modo positivo (-).....	54
<b>Figura 10:</b> Dendograma obtido por AAH do perfil de (SUP), ionização negativa (-).....	55
<b>Figura 11:</b> Gráfico de Score de ACP do perfil de (SUP), ionizados de modo negativo (-). ....	55
<b>Figura 12:</b> Dendograma obtido por AAH do perfil de (PEL), ionização positiva (+).....	56
<b>Figura 13:</b> Gráfico de Score de ACP do perfil de (PEL), ionizados de modo positivo (+). ....	56
<b>Figura 14:</b> Dendograma obtido por AAH do perfil (PEL), ionização negativa (-).....	57
<b>Figura 15:</b> Gráfico de Score de ACP do perfil de (PEL), ionizados de modo negativo (-). ....	57
<b>Figura 16:</b> Atividade larvicida dos extratos do sobrenadante dos bacilos em <i>A. aegypti</i> ....	59
<b>Figura 17:</b> Fluxograma da metodologia do estudo dos metabólitos da linhagem SPa07NA. .	66
<b>Figura 18:</b> Caracterização fenotípica da cepa SPa07NA- <i>Br. halotolerans</i> .....	70
<b>Figura 19:</b> Perfil químico dos extratos metabólicos da linhagem SPa07NA. ....	74
<b>Figura 20:</b> Ação larvicida dos extratos.. ..	77
<b>Figura 21:</b> Ilustração da metodologia das frações obtidas por meio do cultivo dos bacilos e ensaios biológicos.....	80
<b>Figura 22:</b> Ilustração da metodologia dos ensaios biológicos das larvas de <i>A. aegypti</i> expostas ao pellet PEL.....	83
<b>Figura 23:</b> Coloração de Gram das linhagens SBC13NA- <i>B. thuringiensis</i> , GD02.13NA- <i>B. toyonensis</i> e Bti BR101NA- <i>B. thuringiensis israelenses</i> .....	86
<b>Figura 24:</b> Atividade larvicida das frações do SUP, PEL e APEL em 24, 48 e 72 horas. ....	87
<b>Figura 25:</b> Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de <i>A. aegypti</i> expostas a fração do pellet não autoclavado (PEL) da cepa Bti BR101.....	90
<b>Figura 26:</b> Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de <i>A. aegypti</i> expostas a fração do pellet não autoclavado (PEL) da cepa GD02.13NA- <i>B. toyonensis</i> .....	91
<b>Figura 27:</b> Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de <i>A. aegypti</i> expostas a fração do pellet não autoclavado (PEL) da cepa SBC13NA- <i>B. thuringiensis</i> ....	91
<b>Figura 28:</b> Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de <i>A. aegypti</i> expostas ao controle negativo (CN). ....	92
<b>Figura 29:</b> Características morfológicas das cepas de <i>Bacillus</i> spp., Em A e B: Morfologia das colônias e coloração de Gram da cepa padrão Bti BR101NA. ....	93

<b>Figura 30:</b> Perfil eletroforético de amplificação do DNA genômico dos genes Cry4Ba e Chi de cepas de <i>Bacillus</i> spp. ....	<b>97</b>
<b>Figura 31:</b> Atividade quitinolítica de <i>Bacillus</i> spp., isolados de ambientes amazônicos tóxicos para larvas de <i>A. aegypti</i> . ....	<b>98</b>

### LISTA DE SIMBOLOS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µM	Micromolar
mg/L	Miligrama por litro
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
NCBI	National Center Biotechnology Information
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPM	Rotação por minuto
ESI-EM	Espectrometria de Massas por Ionização de Electrospray
SPE	Extração em Fase Sólida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 <i>Aedes aegypti</i> : aspectos gerais .....	15
2.2 Principais arboviroses associadas ao <i>A. aegypti</i> .....	17
2.3 Controle vetorial e estratégias de controle .....	18
2.4 <i>Bacillus</i> spp. ....	20
2.5 Diversidade Genética de <i>Bacillus</i> spp. ....	21
2.6 Bioprospecção de metabólitos secretados por <i>Bacillus</i> spp. e potencial biotecnológico	22
2.7 <i>Brevibacillus</i> spp. ....	27
2.8 Abordagens para o estudo de metabólitos secundários .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
Objetivo geral .....	29
Específicos.....	29
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>79</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos hematófagos podem transmitir uma grande diversidade de microrganismos, responsáveis por várias doenças que acometem os seres humanos, como a dengue, zika e chikungunya, ambas ocasionadas por arbovírus. Estas doenças ocasionam diversos problemas para a saúde pública em todo mundo, afetando principalmente as pessoas mais carentes que vivem nos trópicos e subtropicais, como amazônia brasileira. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é considerado o vetor primário de arbovírus causadores dessas doenças (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; ARAGÃO et al., 2018).

A adaptabilidade desses mosquitos em áreas urbanas, o comportamento altamente antropofílico e os recentes surtos das doenças mencionadas acima, tornam este vetor um importante problema de saúde pública a ser resolvido (KILPATRICK & RANDOLPH, 2012; PAIXÃO et al., 2018; NÓBREGA et al., 2018).

Em todo o mundo, os surtos de dengue, zika e chikungunya variam em localização geográfica, magnitude e duração. Estima-se que entre 95 e 114 milhões de infecções de dengue ocorram globalmente por ano, com 32 a 66 milhões de casos de doenças febris e 4 milhões de infecções sintomáticas, que podem exigir hospitalização (CATTARINO et al., 2020). Em 2015, um surto de zika no Brasil foi responsável por 440 mil a 1,3 milhões de casos de infecção, espalhando-se rapidamente por toda a América Latina e Caribe. A doença denominada Zika foi declarada uma emergência de saúde pública de interesse internacional pela Organização Mundial da Saúde em fevereiro de 2016 (SIKKA et al., 2016).

No início dos anos 2000, foram registrados surtos de chikungunya em países da África, Ásia e Europa. Em 2013, surgiu nas Américas e, no primeiro ano, foram relatados mais de um milhão de novos casos (JONES et al., 2020).

Atualmente, não há vacina ou medicamento terapêutico específico disponível para dengue, zika, chikungunya, portanto, o controle vetorial é o principal método disponível para o combate dessas doenças (WILSON et al., 2020).

O controle vetorial, utilizando compostos de substâncias orgânicas e inorgânicas, vem sendo a estratégia mais utilizada para o controle de mosquitos vetores e insetos considerados pragas na agricultura. Os principais produtos químicos estão relacionados às classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides que agem no sistema nervoso central, assim como os reguladores de crescimento de insetos (IGRs) (BRAGA & VALLE, 2007a; BOYER et al., 2012; BELINATO & VALLE, 2015; ROIZ et al., 2018). Entretanto, a utilização prolongada e intensiva dos inseticidas químicos, podem ocasionar diversos problemas para o meio ambiente, danos à entomofauna associada e desencadear resistência

nas espécies de mosquitos (MOYES et al., 2017). Neste contexto, surge como alternativa aos produtos químicos, o controle biológico, principalmente utilizando microrganismos como fungos e bactérias.

Os microrganismos entomopatogênicos são ferramentas promissoras para o controle de mosquitos transmissores de doenças (LERECLUS et al., 2000; EVANS et al., 2018; LAZARTE et al., 2018; DAHMANA et al., 2020).

Bactérias do gênero *Bacillus* e correlatos, principalmente *Bacillus thuringiensis* (Bti), *Lysinibacillus sphaericus* e *Brevibacillus laterosporus*, são utilizados há décadas como produtos biológicos para o controle de mosquitos, causando mortalidade nas larvas (ARANTES et al., 2002; GALARDO et al., 2013; RUIU et al., 2013).

A diversidade de metabólitos que essas bactérias produzem como, por exemplo, proteínas inseticidas (CRY, VIP e SIP), enzimas hidrolíticas (quitinases e beta-glucanases) e lipopeptídeos, apresentam diversos mecanismos de patogenicidade contra insetos vetores de doenças e pragas de importância agrícola (BRAVO et al., 2007; RUIU et al., 2013; GUO et al., 2015; AMBRICO & TRUPO, 2017).

Embora já se conheça bastante sobre *B. thuringiensis* (Bti), *L. sphaericus* e *Br. laterosporus* no controle de *A. aegypti*, novas abordagens e biomoléculas sempre são de interesse para a somatória de medidas que possam agir em conjunto ou complementares no controle deste vetor. Em se tratando do bioma amazônico, é de se esperar que nos ambientes que compõem essa região, podemos encontrar microrganismos para este fim. Metabólitos derivados de bactérias isoladas podem conter novas moléculas com propriedades inseticidas que podem ser utilizadas como ferramentas biológicas para o controle de doenças transmitidas por mosquitos.

Neste sentido, tendo em vista a necessidade atual de identificar microrganismos amazônicos promissores no fornecimento de novos princípios ativos, e ainda visando o conhecimento sobre as linhagens, seja pelo perfil genético, químico e entomotóxico, este trabalho buscou contribuir com dados relevantes sobre a potencial de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp., tóxicos para larvas de *A. aegypti*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Aedes aegypti*: aspectos gerais

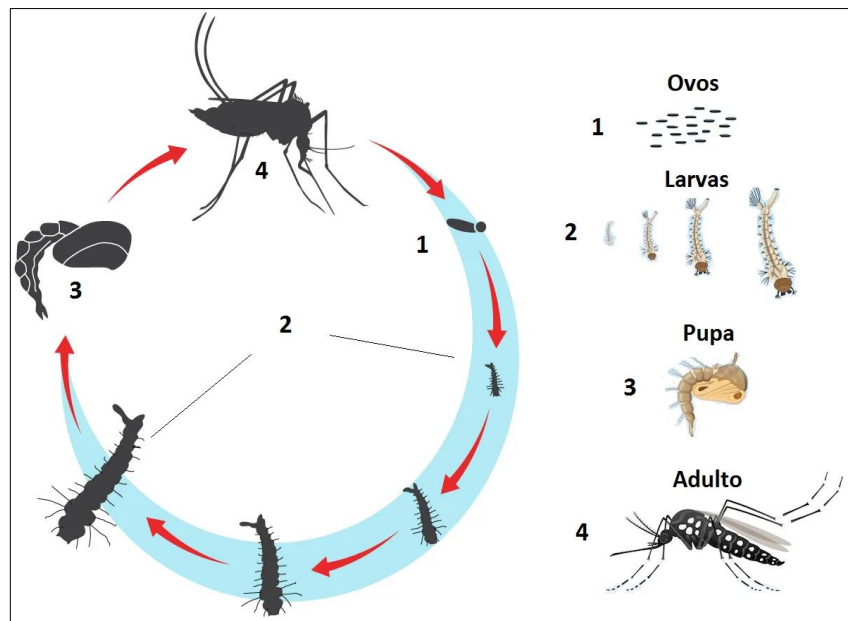
Mosquitos do gênero *Aedes* Meigen, 1818, estão entre os principais transmissores de agentes etiológicos de doenças ao homem, sendo as espécies *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762 e *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, consideradas as mais importantes do grupo, devido às implicações na transmissão de muitos arbovírus (VEGA-RUA et al., 2013; LETA et al., 2018; POWELL, 2018).

Dentre as várias doenças que *A. aegypti* pode transmitir, destacamos a dengue, chikungunya e zika (OTERO & SOLARI, 2010; NUNES et al., 2015; GOULD et al., 2017). Recentemente, a atenção das autoridades em saúde se concentrou no vírus Zika devido à sua associação com distúrbios neurológicos congênitos, como microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (GATHERER & KOHL, 2016, WIKAN & SMITH, 2016).

O mosquito *A. aegypti* é nativo da África, mas se propagou para os demais continentes, e atualmente pode ser encontrado em diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta (LOUNIBOS, 1981; KAMAL et al., 2018). No Brasil, este mosquito foi detectado possivelmente entre os séculos XVI até meados XIX e, atualmente, pode ser encontrado em todos os Estados e no Distrito Federal (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BRAGA & VALLE, 2007b; CARVALHO & MOREIRA, 2017).

Alguns fatores ambientais e antropogênicos foram determinantes para a propagação e permanência desta espécie. Além disso, os ovos podem resistir às condições adversas por um longo período, em virtude de um processo denominado quiescência, o que ajuda muito no sucesso da reprodução desses mosquitos (DICKENS et al., 2018).

O vetor possui o desenvolvimento do tipo holometábolo, ou seja, passa pelos estágios de ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (Figura 1). Este ciclo ocorre em um período de 7 a 14 dias, dependendo das condições climáticas, da disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas presentes no mesmo criadouro (CLEMENTS, 1992; FORATTINI, 2002; CARVALHO & MOREIRA, 2017).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Aedes aegypti*  
**Fonte:** <http://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/>

Após a emergência, os adultos realizam a cópula e se alimenta de substâncias açucaradas, como o néctar e seiva de plantas, o que constitui parte essencial da dieta destes mosquitos. As fêmeas realizam ainda o repasto sanguíneo, o que proporciona o desenvolvimento e maturação dos ovos. Este comportamento hematófago é considerado altamente antropofílico e ocorre ao amanhecer, pouco antes do anoitecer, mas pode ser realizado a qualquer hora do dia, caso o hospedeiro venha se aproximar de domicílios (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Morfologicamente, os adultos podem ser identificados por apresentarem um clipeo com dois tufos de escamas branco-prateadas e o escudo ornamentado com escamas branco-prateadas formando um desenho de lira. Além disso, para a diferenciação do sexo, utiliza-se a morfologia de antena e a estrutura do aparelho bucal, ou seja, os machos podem ser diferenciados pela presença de antenas do tipo plumosas e palpos longos e as fêmeas por possuírem antenas do tipo filiforme e palpos curtos (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

*A. aegypti* é considerado um mosquito de comportamento doméstico, podendo viver dentro ou ao redor de domicílios. Pelo fato de ser um mosquito antropofílico, sua presença é mais comum em áreas urbanas e a infecção é mais intensa em regiões com alta densidade populacional, principalmente em espaços com ocupação desordenada. Esses locais proporcionam melhores condições de reprodução, alimentação, devido à disponibilidade de criadouros, principalmente no verão (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



Além disso, as mudanças climáticas constituem fatores ambientais que afetam o processo saúde/doença, ocasionando a reemergência e dispersão de doenças para os seres humanos, o qual intervém diretamente neste processo, provocando intensa poluição ambiental, gerando excesso de resíduos. Neste contexto, a diversidade e as diferentes frequências de mosquitos, com seus respectivos grupos genéticos, presentes nos ecossistemas, contribuem para as interações ecológicas na natureza em nível global (FORATTINI, 2002; WRBU, 2020).

## **2.2 Principais arboviroses associadas ao *Aedes aegypti***

Dengue, chikungunya e zika têm se tornado preocupação constante para a saúde pública mundial, devido aos crescentes números de casos a cada ano. Os vírus que ocasionam essas doenças são de fácil dispersão e mutação, podendo parasitar novos hospedeiros por diferentes meios, e conseqüentemente apresentam constantes riscos de causarem epidemias. Neste aspecto, essas doenças precisam cada vez mais de estudos e investimentos para aprimoramento dos setores de vigilância (DONALISIO et al., 2017).

A dengue é a arbovirose urbana mais dominante nas Américas, tendo o Brasil como destaque nos mais elevados índices de casos da doença, nesta região. O primeiro caso documentado no Brasil data de 1981-1982, em Boa Vista/RR, causada pelos sorotipos DENV1 e DENV4. A “doença se configura em “doença febril aguda”, sistêmica e dinâmica” e pode apresentar um amplo quadro clínico, que varia de assintomáticos a de maior gravidade, podendo levar à morte (BRASIL, 2019).

Casos da febre zika têm sido reportados no país desde o final de 2014, principalmente na região Nordeste. Assim como a dengue, é uma arbovirose que decorre a partir da picada do mosquito fêmea *A. aegypti* infectada, que transmite o vírus zika. Apresenta ainda outras formas de transmissibilidade, como a sexual, pós-transfusional e transplacentária, causando sintomas semelhantes aos da dengue, em formas mais leves. A febre zika tem sido associada a formas graves de malformação congênita e aumento das manifestações neurológicas graves, devido ao tropismo do vírus pelo sistema nervoso (BRASIL, 2019).

A febre chikungunya é uma doença que começa com uma fase aguda, semelhante a dengue, podendo evoluir para outras duas fases: sub-aguda e crônica, e em casos excepcionais, levar a óbito. A chikungunya se mostra uma doença de caráter epidêmico e com alta taxa de morbidade, sendo associado à artralgia persistente, o que acarreta a redução da qualidade de vida e da produtividade (BRASIL, 2017).

São imensuráveis os danos causados ao homem por estes patógenos veiculados por este vetor. Considerando os grandes problemas que esta espécie ocasiona para a saúde

pública, novas medidas para amenizar os impactos ocasionados são necessárias. Como não existe vacina que confira 100% de proteção para toda faixa etária da população, e para todos os sorotipos do vírus dengue, assim como aos demais arbovírus zika e chikungunya, torna-se necessário também o uso de medidas e estratégias voltadas para o controle vetorial (LUTINSKI et al., 2017).

Devido à suscetibilidade de transmissão dos agentes patogênicos, associado aos aspectos biológicos desse artrópode e a grande quantidade de criadouros artificiais disponíveis, que favorece o desenvolvimento deste vetor, diversos métodos de manejo foram desenvolvidos para o controle das formas imaturas e dos adultos desta espécie (BRAGA & VALLE, 2007a; ZARA et al., 2016; CARVALHO & MOREIRA, 2017).

As condições urbanas têm sido favorecidas as menores taxas de sobrevivência, dispersão e fecundidade de mosquitos adultos e a viabilidade de ovos, mas ao reduzir o tempo de desenvolvimento de imaturos (larvas e pupas), resultam na produção de mais descendentes e mais gerações por ano (HONÓRIO et al., 2003, 2009; DELATTE et al., 2009).

Entretanto, a interação do ser humano com o meio ambiente, de forma inadequada, afeta o equilíbrio do ecossistema e conseqüentemente, torna-o vulnerável aos diversos microrganismos transmitidos por diferentes gêneros de mosquitos, os quais ocasionam diferentes doenças, como a malária, febre amarela urbana, dengue, filariose, dentre outras, cuja gravidade é variável. Milhares de pessoas pelo mundo são infectadas e desenvolvem essas doenças, que causam grandes impactos negativos à saúde pública e a economia, em suas áreas de ocorrência (WILKERSON et al., 2015).

### **2.3 Controle vetorial e estratégias de controle**

Historicamente, no Brasil o combate aos mosquitos transmissores de patógenos ao homem é feito com aplicações de inseticidas químicos. Essas medidas têm sido a principal técnica utilizada, desde o início das primeiras campanhas de combate a mosquitos vetores no país (CARVALHO & SILVA, 1999). Várias medidas para o controle dos mosquitos vetores podem ser desenvolvidas, como por exemplo, controle mecânico ou ambiental e o controle químico. Estes produtos são utilizados para o controle dependendo da fase e dos hábitos do vetor.

O controle vetorial usando inseticidas sintéticos continua sendo a principal estratégia para mitigar a disseminação de doenças infecciosas. Contudo, pesticidas químicos causam sérios riscos à saúde humana, poluição do meio ambiente e aumento da resistência a inseticidas em populações de mosquitos. Nos anos 40, o surgimento do diclorodifeniltricloroetano (DDT) iniciou o controle químico do vetor como larvicida e

adulcificada. O seu uso contínuo ocasionou muitos prejuízos ao ambiente, à fauna associada e aos seres humanos. Com isso, o DDT foi excluído do programa de controle de vetores pelo Ministério da Saúde do Brasil (MARQUES et al., 2017).

Em relação aos inseticidas químicos que causam menor dano ambiental, destacam-se os piretróides, por ser de fácil degradação pela ação de agentes biológicos, além de não se concentrarem nos tecidos dos vertebrados. Contudo, por serem quimicamente instáveis, suas aplicações precisam ser realizadas com frequência. Além disso, são tóxicos para os vertebrados, mesmo aplicados em concentrações consideradas baixas. O grupo mais conhecido desta classe é o temefós, o qual foi utilizado durante alguns anos no controle de *A. aegypti* em áreas urbanas (BRAGA & VALLE, 2007a; VALLE et al., 2015).

Diante da toxicidade dos compostos organoclorados ao meio ambiente, surgiu como alternativa, os piretróides, uma substância natural produzida pelas plantas do gênero *Chrysanthemum*. Este inseticida apresenta toxicidade aos mosquitos adultos, porém, devido o seu potencial tóxico à fauna aquática, estes produtos ficaram inviabilizados de ser aplicados no meio ambiente (DEVINE et al., 2008; NKYA et al., 2013; ZARA et al., 2016).

A classe dos *Insects Growth Regulators* - IGRs são alternativas de controle, cuja função é interferir na substituição do exoesqueleto dos artrópodes. Estes produtos atuam na fase imatura, prolongando o tempo de permanência neste estágio, impedindo desta forma a emergência dos adultos (RESENDE & GAMA, 2006; BRAGA & VALLE, 2007a; COSTA & TADEI, 2012). Considerando os estudos sobre a resistência de mosquitos a essa classe de compostos, são citados alguns exemplos, como a resistência de *Aedes nigromaculis* (CORNEL et al., 2000), *Aedes taeniorhynchus* (DAME et al., 1998), *Culex quinquefasciatus* (SU & CHENG, 2014) ao metopreno e *Culex pipiens* ao Diflubenzuron (GRIGORAKI et al., 2017). No entanto, o risco geral de resistência do mosquito ao metopreno e ao diflubenzuron é considerado baixo (BELLINATO et al., 2016).

Embora muitos estudos tenham sido realizados sobre o efeito de IGRs, na tentativa de analisar a resistência de *A. aegypti* frente a estes compostos, associado com alguns parâmetros biológicos das populações utilizadas, esta classe ainda é utilizada como potenciais alternativos para o controle desse mosquito (BELINATO et al., 2009; BELINATO & VALLE, 2015).

Devido às consequências dos efeitos negativos ocasionados pelo uso contínuo e errôneo dos inseticidas químicos, buscou-se utilizar alternativas consideradas ecologicamente mais seguras e eficientes, para controlar insetos de importância médica e agrícola. Em geral, ressaltam-se os agentes bióticos, como por exemplo, bactérias, fungos e crustáceos, (LOPES, 1999; FORATTINI, 2002; CAVALCANTI et al., 2007; DARBRO et al., 2011; HUANG et al., 2017; THOMAS, 2018).

O alto custo, baixa sustentabilidade dos inseticidas convencionais e a falta de vacinas licenciadas para a proteção da população contra muitos desses arbovírus, são fatores que estimularam o interesse crescente no controle biológico (LACEY & LACEY, 1990, MANNING et al., 2018).

“Os pesticidas biológicos, também conhecidos como ‘biopesticidas’ são derivados de produtos naturais, incluindo animais, plantas, micróbios e alguns minerais (GLARE et al., 2012). Os pesticidas microbianos são provenientes de bactérias, fungos, leveduras, alguns protozoários e vírus que compõem uma maior parte dos produtos importantes para a indústria de biopesticidas. De fato, os produtos microbianos são o segmento de produtos que mais cresce na indústria de biocontrole (DUNHAM, 2015). O controle efetivo do estágio de populações de mosquitos é crucial para prevenir e gerenciar vetores de doenças (BENELLI, 2015, BENELLI & MEHLHORN, 2016; MURUGAN et al., 2018).

Na Europa, substâncias ativas de biopesticidas foram legisladas pela Diretiva 91/414/CEE (comissão Europeia, 1991), sendo posteriormente substituído pelo atual Regulamento (CE) N° 1107/2009 (comissão Europeia, 2009), implementado por Regulamento de Execução (UE) n.o 540/2011 da comissão. Nos Estados Unidos, os biopesticidas são regulados pela Divisão de Biopesticidas e Prevenção da Poluição (BPPD) de Agência de Proteção Ambiental (EPA) (ARTHURS & DARA, 2018). Por outro lado, em países em desenvolvimento como o Brasil, onde os biopesticidas são um mercado em crescimento, os produtos de biocontrole ainda estão sob o mesmo regulamento que os pesticidas químicos (MASCARIN et al., 2019).

## **2.4 *Bacillus* spp.**

A diversidade de bactérias do gênero *Bacillus*, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Bacillales e Família Bacillaceae, constituem um extenso grupo taxonômico que apresentam características fenotípicas e genotípicas diversificadas. O gênero *Bacillus* foi relatado, pela primeira vez, por Cohn (1872) que descreveu como resistente ao calor, cujas bactérias são produtoras de endósporos. Este gênero é composto por bactérias gram-positivas ou negativas, resistentes às condições ambientais adversas, tais como calor e dessecação, sendo tipicamente representados por células aeróbicas móveis, por flagelos, mas podem também crescer em ambientes anaeróbios. O potencial para produção de endósporos e sua diversidade fisiológica das formas vegetativas (células jovens), são fatores que fazem com que estes microrganismos sejam considerados ubíquos (BRAVO et al., 2011; SOARES-DA-SILVA et al., 2017).

Membros deste gênero são considerados candidatos para o uso agrícola, devido a sua capacidade de formar endósporos, no qual podem sobreviver à exposição ao calor e

dessecação, além disso, seus esporos podem ser usados como formulados para controle de pragas agrícolas. Os efeitos adversos desses microrganismos são pequenos nos vegetais, pois os mesmos compõem as comunidades bacterianas de muitas plantas (WU et al., 2015). Uma das classes de metabólito secundário bastante comum sintetizado por esse gênero são os lipopeptídeos (bacilomicinas, iturinas, surfactinas e micosubtilina), com atividades específicas contra patógenos vegetais (GONG et al., 2015).

Devido aos seus diferentes processos fisiológicos e metabólicos, estas linhagens podem ocupar diferentes nichos ecológicos, podendo ser isoladas de diversos substratos e habitats, tanto em ecossistemas aquáticos como em terrestres. Apesar de serem encontradas em diversos ambientes, estas linhagens são mais frequentes nos solos, uma vez que são saprófitas, pois utilizam diversas matérias orgânicas e inorgânicas (BRAVO et al., 2011; SOARES-DA-SILVA et al., 2015, GALZER & AZEVEDO-FILHO, 2016).

Dependendo dos habitats destes microrganismos, eles podem apresentar diversos fatores de sobrevivência, resultando assim espécies mais resistentes que outras. Nos ambientes aquáticos, por exemplo, as bactérias degradam e mineralizam compostos orgânicos, passando as reservas de matéria orgânica dissolvida a níveis tróficos superiores (HUANG et al., 2011; CASTELO-BRANCO et al., 2016).

Neste contexto, importantes fatores e funções metabólicas, incluindo a degradação da matéria orgânica e assimilação de carbono, nitrogênio e fósforo, são catalisados por enzimas produzidas por microrganismos (YUAN et al., 2015, FABIAN et al., 2017). Segundo Bueche et al (2013), as bactérias formadoras de endósporos têm vantagens sobre outras bactérias, uma vez que em condições desfavoráveis, os mecanismos de expressão gênica são acionados para sua sobrevivência. Além disso, as condições do ambiente também influenciam na produção de determinadas biomoléculas, ou seja, o ambiente pode determinar a produção de moléculas específicas.

## **2.5 Diversidade Genética de *Bacillus* spp.**

O grupo *Bacillus cereus* Lato sensu S.l. compreende 11 espécies intimamente relacionadas, incluindo a primeira espécie descrita *Bacillus antracis*, juntamente com *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *Bacillus citotoxicus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus pseudomycoides* e as recentemente identificadas: *Bacillus gaemokensis*, *Bacillus manliponensis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus toyonensis* e *Bacillus bingmayoensis* (NAKAMURA, 1998; JUNG et al., 2010, 2011; JIMÉNEZA et al., 2013; LIU et al., 2014; MILLER et al., 2016).

Ao longo dos anos, a filogenia de *B. cereus* s.l. foi extensivamente analisada. De fato, a classificação das espécies dentro deste grupo é fundamental, devido ao uso intensivo de *B. thuringiensis* nas aplicações no controle biológico. Contudo, o delineamento das espécies entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* no grupo *B. cereus* s.l tem sido problemático. Várias abordagens e técnicas são utilizadas para distinguir essas duas espécies, tais como, caracterização fenotípicas, análise do gene 16S *rRNA* e caracterização genômica das espécies. Além disso, estudos de pan-genoma, verificaram que o grupo *B. cereus* s.l. contém cerca de 60.000 genes, dos quais 600 genes são principais desse grupo. Neste sentido vem se utilizando estudos de pan-genoma e outras abordagens filogenéticas, seguidas de métodos bayesiano para tentar solucionar os problemas com a filogenia dessas espécies. Segundo Bazinet (2017), por meio do estudo da análise genética das populações, o grupo *B. cereus* s.l. é dividido em três clados.

As bactérias do grupo *B. cereus* ocupam uma grande variedade de habitats, tais como; solo, água, plantas e animais, provavelmente devido à diversidade metabólica. As adaptações ecológicas nos diferentes ambientes proporcionam a capacidade de sobrevivência de seus esporos, o que lhes permite suportar melhores as condições adversas (JENSEN et al., 2003).

Dessa forma, o gênero *Bacillus* é considerado um grupo de bactérias que têm grande importância econômica, industrial, médica, dentre outras aplicações. As principais vantagens destes microrganismos para sua exploração química e biológica resultam do grande potencial de secretar diversos metabólitos com propriedades conhecidas e muitas delas ainda não conhecidas. Neste sentido, vale ressaltar a importância de se buscar nessas linhagens, novas alternativas de controle biológico para diversos patógenos.

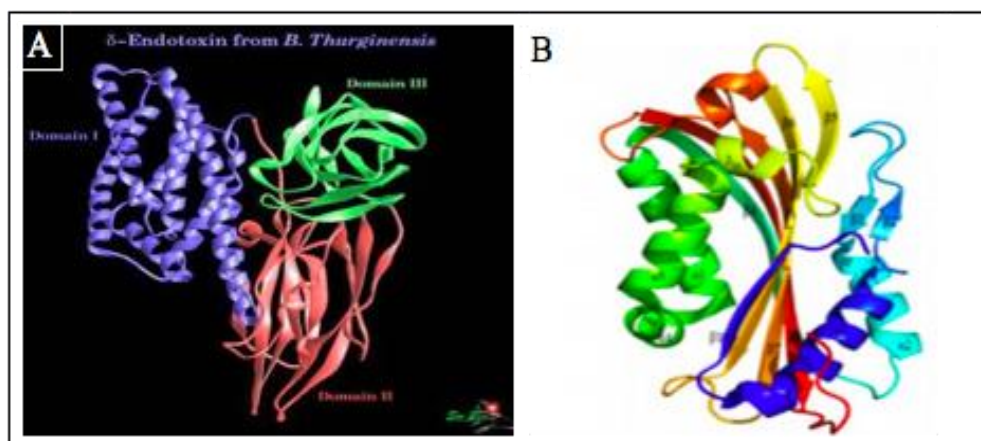
## **2.6 Bioprospecção de metabólitos secretados por *Bacillus* spp. e potencial biotecnológico**

Estudos sobre a prospecção química e biológica de produtos naturais oriundos de microrganismos como fungos e bactérias revelaram que estes organismos são considerados um grande reservatório para a produção de metabólitos biologicamente ativos. As espécies do gênero *Bacillus* são bem conhecidas por sua capacidade de controlar patógenos de doenças em animais e plantas, por meio de diversos mecanismos de ação, incluindo a produção de metabólitos secundários. Dentre as bactérias Gram-positivas, as linhagens de *Bacillus* são conhecidas por produzirem diversos compostos que exibem um amplo espectro de atividades biológicas. Além disso, essas bactérias têm efeitos benéficos para a saúde humana, que são diretamente ligados à produção de substâncias antimicrobianas, probióticos para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas e distúrbios gastrointestinais (SOROKULOVA et al., 1997; FALARDEAU et al., 2013).

A atividade inseticida de *B. thuringiensis* é geralmente atribuída às toxinas proteicas produzidas em vários estágios do ciclo de vida bacteriano. As células vegetativas secretam toxinas solúveis que compreende a Vip (proteínas vegetativas) e famílias de proteínas Sip (proteínas inseticidas secretadas). Essas toxinas se associam a proteínas auxiliares para formar agregados de cristais conhecidos como corpos parasporais, que são então liberados do exosporium. Delta-endotoxinas incluem duas famílias de proteínas Cry (cristal) e Cyt (citotóxico), que demonstram uma ampla gama de hospedeiros, incluindo insetos de diversas ordens como Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera e Orthoptera, bem como nematóides fitopatogênicos e gastrópodes terrestres (Figura 2) (PALMA et al., 2014).

A maioria dos estudos sobre *B. thuringiensis* concentrou-se na caracterização molecular de proteínas Cry e Cyt (Figura 2), mecanismos de toxicidade, estrutura cristalina e identificação de novas cepas com potencial comercial. Por outro lado, uma atenção significativamente menor foi dada a outras biomoléculas.

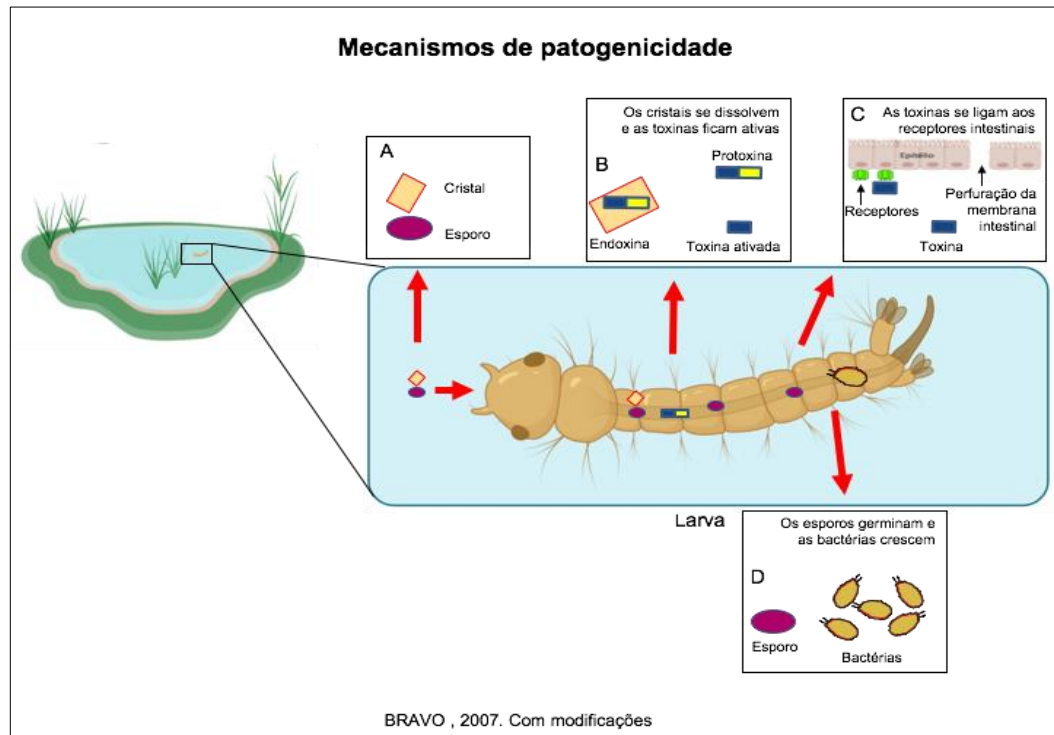
No entanto, existe um interesse crescente em metabólitos menos conhecidos sintetizados por *B. thuringiensis*, incluindo quitinases (Chi), bacteriocinas e sideróforos. Estas moléculas também apresentam o amplo potencial para diversas aplicações como, por exemplo, antibacteriana, fungicida, agentes nematicidas e acaricidas. Além disso, possui capacidade para promover indiretamente o crescimento das plantas (LEE et al., 2009; CASADOS-VAZQUEZ et al., 2015; AZIZOGLU, 2019).



**Figura 2:** Proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis*. A: proteína Cry, B: proteína Cyt  
**Fonte:** Thies e Medha, 2007, com adaptações.

As proteínas Cry, quando ingeridas pelo inseto, são solubilizadas pelo pH alcalino no intestino da larva e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por serino-proteases, formando toxinas ativas que se ligam a receptores das microvilosidades intestinais. Após a ligação, as toxinas se inserem na membrana formando poros e desestabilizando o gradiente

osmótico levando à morte do inseto (Figura 3). Embora o cristal protéico seja o principal determinante de patogenicidade da bactéria, preparações comerciais baseadas em *B. thuringiensis* são na maioria das vezes, compostas de esporos e cristais (BRAVO et al., 2007).



**Figura 3:** Mecanismo de ação de *B. thuringiensis* no epitélio intestinal das larvas

*B. thuringiensis* produz quitinases que, quando usadas em combinação com outros componentes, incluindo proteínas Cry, ocasiona distúrbios nas larvas de mosquitos (REGEV et al., 1996; GUTTMANN & ELLAR, 2000; THAMTHIANKUL et al., 2004).

As quitinases produzidas por *B. thuringiensis* podem desempenhar diferentes funções que contribuem para a sobrevivência desta bactéria em diferentes condições. Por exemplo, essas enzimas podem ser usadas (i) para sequestrar e assimilar a quitina e usá-la como única fonte de carbono, e (ii) para atuar como um fator de virulência que promove o estabelecimento de uma infecção bem sucedida por *B. thuringiensis* pelo comprometimento estrutural componentes, como a membrana peritrófica, através da qual as proteínas Cry ativadas transitam no hospedeiro alvo, (iii) *B. thuringiensis* se propaga em larvas mortas após a infecção e que várias enzimas, incluindo proteases, lipases, esterases e quitinases, amplificam esse processo. As quitinases, em particular, podem participar na destruição da cutícula, facilitando assim a liberação e disseminação de toxinas e esporos da bactéria em outros ninchos ecológicos (por exemplo, solo, filoplancto) (ARGÔLA-FILHO & LOGUERCIO, 2014; MALOVICHKO et al., 2019).



A busca de novos agentes microbianos para o controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas possibilitou a descoberta de novas bactérias entomopatogênicas para o controle biológico. Com isso, ampliaram-se novas abordagens e ferramentas para o controle desses vetores. Corroborando com esse contexto, Lazarte et al (2018), encontraram um novo entomopatógeno *B. wiedmanni* que apresenta atividade tóxica para *A. aegypti*, *Ae. albifasciatus*, *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*, demonstrando maior atividade contra *A. aegypti* do que o *B. thuringiensis israelensis*. Além disso, são portadores de genes *cry* que codificam as toxinas mosquitocidas. Uma das espécies recentemente identificada desse grupo bacteriano, *B. wiedmanni*, produz hemolisina BL e enterotoxinas não hemolíticas. Em relação à entomopatogenicidade da cepa *B. amyloliquefaciens*, de acordo com Geetha et al (2011), os metabólitos secretados no meio extracelular apresentaram toxicidade para larvas de *A. aegypti*, *An. stephensis* e *C. quinquefasciatus*, nas fases de larva e pupa desses vetores.

Revathi et al (2013), demonstraram que as larvas de *A. aegypti* são suscetíveis aos metabólitos secundários de *B. subtilis* e que a mortalidade é dependente da dose aplicada. As estirpes de *B. subtilis* produzem uma ampla diversidade de peptídeos bioativos com potencial para uso nos programas de controle de mosquitos. O composto bioativo produzido pelas cepas de *B. subtilis* inclui lipopeptídeos e compostos de iturina. Estas biomoléculas são biosurfactantes anfífilos ativos na membrana e antibióticos peptídicos com potente atividade larvicida (CHEN et al., 2008; GEETHA et al., 2011).

Estudos relatam que isolados de *B. megaterium* tem a capacidade de controlar eficazmente as larvas de *A. aegypti*, demonstrando valores de mortalidade de 87%. De acordo com o estudo de Dacre et al (1997), o tipo mutante de cepas de *B. megaterium*, produziu proteínas tóxicas mais eficazes que as espécies selvagens.

*B. amyloliquefaciens* é uma bactéria conhecida devido à produção de pesticida microbiano, com uma variedade de compostos bioativos com efeito fungicida (ALVAREZ et al., 2012; ZOUARI et al., 2016; TORRES et al., 2017). Além disso, apresenta atividade larvicida contra *Spodoptera littoralis* e *Tuta absoluta* (BEN-KHEDHER et al., 2015; 2017).

O potencial da cepa *B. amyloliquefaciens* foi verificado na atividade apicida contra *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). O mecanismo de ação deste entomopatógeno pode funcionar como biocontrolador de três maneiras: i) como uma suspensão celular bacteriana, contendo células bacterianas viáveis, esporos e seus metabólitos. ii) como suspensão de células mortas pelo calor; e iii) como sobrenadante livre de células apenas com metabólito (LÓPEZ-ISASMENDI et al., 2019).

*B. velezensis* foi originalmente descrita por Ruiz-Garcia et al (2005), e várias cepas desta espécie foram investigadas quanto ao seu potencial como biopesticidas (PALAZZINI et

al., 2016; GAO et al., 2017). Cepas de *B. velezensis* produzem compostos como lipopeptídeos cíclicos [Leu7] surfacina C14 e [Leu7] surfactina C15 que possuem atividade de biocontrole contra uma ampla gama de patógenos bacterianos e fúngicos (GRADY et al., 2019).

*B. toyonensis* tem importância econômica prodigiosa em algumas partes do mundo, devido à utilização de seus esporos como probióticos, principalmente adotada na nutrição animal. As cepas *B. toyonensis* (to.yo.nen'sis. N.L.masc. Adj.toyonensis, epíteto arbitrário formado a partir do nome de uma empresa chamada Toyo Jozo) possuem Hastes Gram-positivos, móveis e facultativamente anaeróbias. São formadores de esporos elipsoidais, centrais a subterminais e apresentam esporângios não estendidos (JIMÉNEZA et al., 2013).

Reza et al (2014), relataram que cepas de *B. safensis* são fontes de enzimas com importância industrial, tais como, amilase, lipase, protease, celulase, quitinase, queratinase e  $\beta$ -galactosidase. Esta espécie de bactéria gram-positiva é formadora de esporos móveis, aeróbica, mesofílica e quimio-heterotrófica. Suas células têm formato de bastão com 1,0 - 1,2  $\mu$ m e 0,5 - 0,7  $\mu$ m de comprimento e 0,5 - 0,7 $\mu$ m de diâmetro (SATOMI et al., 2006).

Diante da investigação da diversidade genética e estrutura populacional de bactérias do grupo *B. cereus* de diversos ambientes marinhos, nove novos táxons foram identificados e provavelmente representam novas espécies putativas (LIU et al., 2017). Embora algumas espécies tenham sido relatadas recentemente, já existem diversas aplicações biotecnológicas do seu potencial. Por outro lado, algumas só possuem descrições morfológicas e bioquímicas.

Estudos sobre o potencial biológico da espécie *B. paramycoides*, detectaram que estas espécies, secretam metabólitos com o potencial para promoção de crescimento vegetal, biorremediação de efluentes tóxicos contendo cianeto, alquifenóis e hidrocarbonetos (KOSTKA et al., 2011; WU et al., 2014; OSMAN & YIN, 2018; CHANG et al., 2020). A cepa *B. paramycoides* (pa.ra.my.co.e c. Prep. para ao lado, ao lado, perto, como; N.L. masc. adj. paramycoides perto de *Bacillus mycoides*), têm coloração Gram-positiva, facultativamente anaeróbias, não-móvel, em forma de bastonete, 0,8-1,2  $\mu$ m em comprimento e os endósporos não são observados. As colônias são cerosas, circulares, não translúcidas e apresentam tamanho de 2-3 mm de diâmetro após incubação a 32°C por 48 h em Luria Bertani. Os testes relacionados à catalase e oxidase são positivos. O crescimento ocorre entre 15 e 39 °C (ótimo 30 °C), em pH 5-9 (pH ótimo 7) e com 0-5% (p / v)NaCl (ótimo 0,5%) (LIU et al., 2017).

A espécie *B. albus* (all bus.L.masc.Adj. Albus white), possui células Gram-positivas, facultativamente anaeróbias, não móveis, em forma de bastonete, com 1,3 a 1,5  $\mu$ m de largura e 2,8 a 3,2  $\mu$ m em comprimento. Um endósporo elíptico central é observado. As colônias são brancas, circulares, não translúcidas de 2 a 3 mm de diâmetro, após incubação a 32 °C por

48h em Luria Bertani. Em relação aos testes de catalase e oxidase apresentam resultados positivos. O crescimento ocorre entre 15 e 40 °C (ideal 30° C), em pH 5-10 (pH ideal 7) e com 0-9% (p/v) de NaCl (ideal 0,5-1%) (LIU et al., 2017).

## 2.7 *Brevibacillus* spp.

Membros do gênero *Brevibacillus* (Filo Firmicutes) são aeróbios, possuem forma de bastonete, podendo ser Gram-positivos e negativos, formadores de esporos, principalmente estritos, com distribuição ubíqua nos solos, incluindo os da Antártida (LOGAN et al., 2009; DE-VOS, 2009; BENDIA et al., 2018). A maioria das espécies deste gênero cresce em ágar nutriente e apresentam colônias amarelas e lisas.

*Br. laterosporus* é morfológicamente caracterizada pela produção de um corpo parasporal típico em forma de canoa (CSPB) firmemente preso a um lado do esporo, que determina sua posição lateral no esporângio. É uma espécie onipresente que pode ser isolada de uma ampla gama de materiais, incluindo solo (OLIVEIRA et al., 2004), pedras preciosas (KHAN et al., 2001) e alimentos ricos em amido (FANGIO et al., 2010).

A patogenicidade de várias cepas de *Br. laterosporus* foi confirmada em diferentes invertebrados como insetos, nematódeos e moluscos (RUIU et al., 2013). Dependendo do alvo, os efeitos tóxicos têm sido observados após o contato ou ingestão de frações produzidas em diferentes estágios do ciclo de crescimento bacteriano, da fase vegetativa à esporulação.

Neste gênero foi descrito uma nova bactéria com potencial biológico ainda desconhecido para o controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas. Suas características morfológicas e bioquímicas já foram bem caracterizadas. *Br. halotolerans* (halos, referindo-se à capacidade do organismo de tolerar altas concentrações de sal), possui colônias lisas, brilhantes, marrons claras e planas com diâmetro de 0,5 a 3,5mm. São Gram positivas, formadoras de esporos e possui forma de bastonete, com uma largura de 0,2 - 0,8µm e comprimento de 1,5 - 4,0 µm, tem flagelos móveis e peritríquios. A temperatura e o pH ideal para o crescimento é de 30°C e pH 7,0-8,0. As cepas são capazes de crescer sem NaCl e pode tolerar até 12% (p/V) de NaCl. Em relação aos testes de Catalase-positiva e oxidase-positiva, reduz nitrato a nitrito. As células são positivas para o teste do vermelho de Voges\_Proskauer, mas negativas para o teste do vermelho de metila, reação da gema de ovo e produção de H<sub>2</sub>S. A hidrólise de caseína e amido é positiva (LIU et al., 2017).

Poucos estudos ainda foram feitos com a espécie *Br. halotolerans*, uma vez que elas foram isoladas recentemente, e os estudos de suas aplicações na biotecnologia, industrial e agricultura ainda são escassos na literatura.

## 2.8 Abordagens para o estudo de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas pelas células em resposta a uma determinada condição. Por meio do metabolismo são formados diferentes metabólitos, que estão relacionados com a defesa da célula frente a uma situação adversa. Dessa forma, são usualmente separados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos policetídeo-peptídeos (KEMKEN & ROHFS, 2010).

A análise de metabólitos secundários de microrganismos é uma matriz complexa, fazendo necessário utilizar técnicas com elevada sensibilidade de detecção (SOUZA, 2006). Diversos estudos têm utilizado a espectrometria de massas com ionização por fonte de electrospray, utilizando sistemas do tipo íon trap (ESI-IT-MS) como ferramentas para a análise de compostos polares de baixo peso molecular como metabólitos secundários de origem vegetal, animal ou de microrganismos (FRISVAD, 2014; VISAGIE et al., 2016).

Estudos demonstram que análises por inserção direta utilizando a fonte de electrospray (ESI) são muito eficientes para a determinação de perfis de microrganismos, além de apresentar vantagens como técnica rápida e podendo ser obtida em curto período de tempo. Além disso, é possível, pela realização da fragmentação, predizer as estruturas químicas das moléculas presentes e os resultados pode ser armazenado em bancos de dados (SMEDSGAARD, 1997; FRISVAD, 2014).

Outra abordagem importante no estudo de metabólitos secundários são as análises quimiotaxonômicas dos microrganismos. A quimiotaxonomia é definida como caracterização completa, pois são analisadas as semelhanças e diferenças das propriedades bioquímicas das bactérias. Neste sentido, é examinada a distribuição de substâncias biológicas e químicas das macromoléculas contendo; aminoácidos, peptídeos, lipídeos, polissacarídeos, proteínas e as enzimas. Além disso, outras moléculas poliméricas complexas, como quinona isoprenóide e estéril, entre membros de diferentes táxons. Depois de todas as informações obtidas dos microrganismos, essas informações são relevantes para a classificação e identificação (WANG & JIANG, 2016).

Neste sentido, é necessário o conhecimento mais detalhado desse gênero para estudar e identificar os fatores de patogenicidade por meio das técnicas de análises de perfis químicos, visando identificar e caracterizar novas moléculas bioinseticidas.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral

- ✓ Avaliar o potencial químico e biológico de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp., isolados de diferentes ambientes amazônicos, contra larvas de *Aedes aegypti*.

#### Específicos

##### Capítulo I

- ✓ Isolar e identificar *Bacillus* spp. de diferentes ambientes amazônicos (solo e água) por meio de métodos fenotípicos e moleculares;
- ✓ Avaliar o potencial larvicida de *Bacillus* spp. por meios de bioensaios seletivos e quantitativos;
- ✓ Determinar o potencial larvicida das frações obtidas dos *Bacillus* ativos, com a obtenção da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) e (CL<sub>90</sub>) para larvas de *A. aegypti*.

##### Capítulo II

- ✓ Avaliar a atividade larvicida dos extratos metabólicos de *Bacillus* e *Brevibacillus* sp. contra as larvas de *A. aegypti*;
- ✓ Analisar o perfil químico dos extratos metabólicos das linhagens

##### Capítulo III

- ✓ Padronizar um método de obtenção de metabólitos secundários;
- ✓ Realizar um estudo químico dirigido dos extratos que apresentarem atividade larvicida.

##### Capítulo IV

- ✓ Investigar a ação antagônica (microparasitismo) das linhagens de *Bacillus* spp. por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Detectar genes *cry4* e *chi* em linhagens de *Bacillus* spp. que apresentarem toxicidade para as larvas de *A. aegypti*;
- ✓ Determinar a atividade enzimática para quitinases nas linhagens com potencial entomotóxico.

## Capítulo I

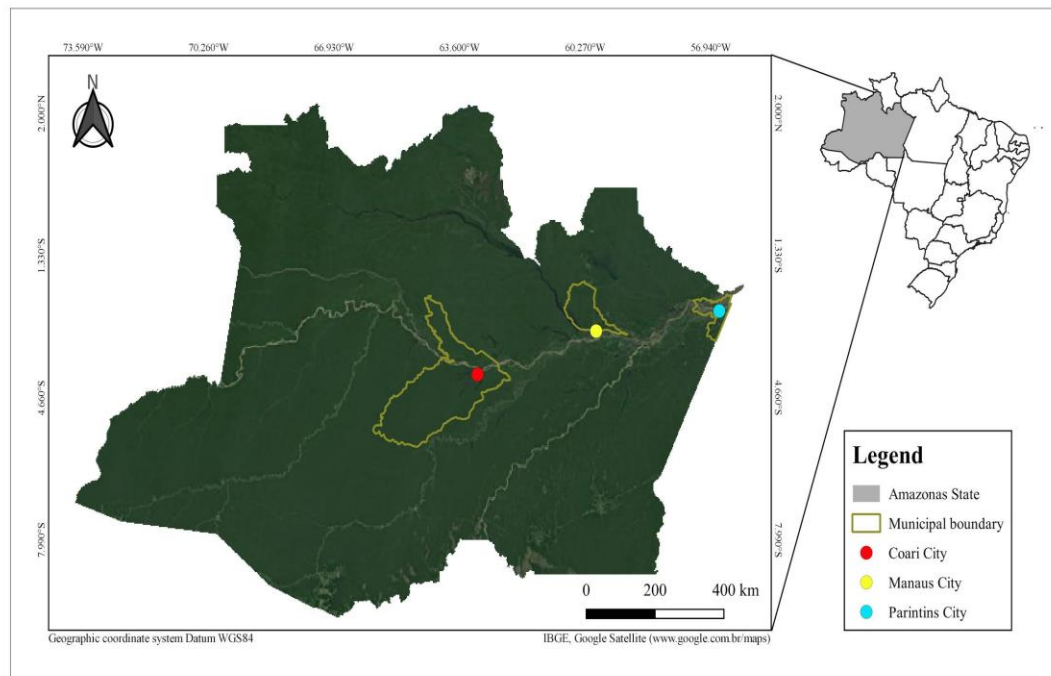
### Larvicidal Activities against *Aedes aegypti* of Supernatant and Pellet Fractions from Cultured *Bacillus* spp. Isolated from Amazonian Microenvironments

Ricardo M. Katak<sup>1\*</sup>, Elerson M. Rocha<sup>1</sup>, Juan C. Oliveira<sup>1</sup>, Veranilce A. Muniz<sup>2</sup>, Marta R. Oliveira<sup>3</sup>, Francisco A. S. Ferreira<sup>4</sup>, William R. Silva<sup>4</sup>, Rosemary A. Roque<sup>5</sup>, Antonia Q.L. de Souza<sup>6</sup>, Jayme A. Souza-Neto<sup>7</sup>, Olle Terenius<sup>8</sup>, Osvaldo Marinotti<sup>9\*</sup> and Wanderli P. Tadei<sup>5</sup> †

#### Materials and methods

##### Sample collection and bacteria isolation

Water and soil samples were collected in the municipalities of Coari, Manaus and Parintins, Amazonas State, Brazil (Figure 1, Table 1). All the biological material collected and analyzed during the present study was collected with official permission (21263-1) given by ‘Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade’ (SISBIO) of the Brazilian Ministry of Environment (MMA).



**Figure 4.** Sample collection locations. GPS coordinates, dates of collections and descriptions of collection sites are available in Table 1.

**Table 1.** Geographic location, date and characteristics of the 15 sites where water and soil were collected.

Municipality		Collection site	GPS Coordinates	Description	Sample type	Date
Coari	1	Sítio do Gordo	4°06'45.5"S 63°07'44.0"W	artificial lake	water	02/2017
	2	Ramal do 7 (Brasileirinho)	3°01'42.2"S 59°52'15.6"W	primary forest	soil	03/2017
	3	Campus-UFAM	3°05'48.8"S 59°58'23.6"W	residual forest	soil	04/2017
	4	Bosque da Ciência-INPA	3°06'01.3"S 59°59'06.6"W	residual forest	soil	02/2017
Manaus	5	Casa 15-INPA	3°05'47.2"S 59°59'09.5"W	residual forest	soil	05/2017
	6	Sítio Portela 1	3°02'47.0"S 59°52'54.4"W	fish tank	water	02/2017
	7	Sítio Dona Chagas	3°02'33.5"S 59°53'15.6"W	fish tank	water	06/2017
	8	Sítio Portela 2	3°02'47.5"S 59°52'56.8"W	fish tank	water	02/2017
	9	Parananema	2°40'30.9"S 56°45'59.2"W	primary forest	soil	03/2017
	10	Aninga	2°39'07.6"S 56°46'50.3"W	natural pond	water	03/2017
	11	Lagoa Francesa	2°37'34.7"S 56°43'37.3"W	natural pond	water	04/2017
Parintins	12	Areial	2°39'39.2"S 56°46'07.6"W	creek	water	03/2017
	13	Macurany	2°40'33.6"S 56°45'30.2"W	primary forest	soil	04/2017
	14	Parananema	2°40'30.9"S 56°45'59.2"W	creek	water	02/2017
	15	Macurany (Sítio Fanuel)	2°39'06.7"S 56°43'29.0"W	natural pond	water	04/2017

Soil samples (10 g) were taken from the field with a 10 cm long by 5 cm diameter cylindrical tube. Surface water samples (10 mL) were collected in 50 mL sterile Falcon tubes. Three soil samples and/or three water samples, approximately 5 m apart from each other were collected from each site. All water and soil samples were stored on ice, transported to the Malaria and Dengue Laboratory (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA) and processed within 24 h.

Soil samples (1 g) were suspended in 10 mL sterile water and vortexed for 10 min. Three 10-fold serial dilutions were prepared by diluting the vortexed material with sterile water. Water samples were used without any dilution. Soil and water samples were incubated at 80 °C for 12 min, for selection of sporulated *Bacillus* spp. (WHO, 1985; POLANCZYK, 2004). Then, 50 µL aliquots were spread on Petri dishes containing nutrient agar (NA), Luria-Bertani agar (LB), or the ISP2 medium. Fluconazole (20 mg/mL) was added to the media to prevent fungal growth. All Petri dishes were incubated at 30 °C for 24 or 48 h. Negative control plates with only sterile water resulted in no colonies. The streak plate technique was applied for isolating specific bacteria from the original colonies potentially containing a mixture of microorganisms.

### Morphological and Molecular Characterization

Colony morphology was inspected for size, shape, texture, elevation, color and Gram staining using standard microbiological techniques and a 100x magnification microscope. DNA was extracted from each colony for 16S rRNA gene amplification and sequencing as

follows. DNA extraction, from isolated bacterial colonies, was performed with InstaGene™ Matrix (BioRad-Hercules, Califórnia, EUA) following the manufacturer's instructions. DNA was spectrophotometrically quantified and adjusted to 150 ng/μL. Bacterial 16S rRNA genes were amplified by PCR using Taq Pol—Master Mix 2X (Cellco Biotec-Jardim Bandeirantes, São Carlos-SP, Brazil), and the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (FUKATSU & NIKOH, 1998) and 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3') modified from (SAWADA et al., 1993) used in a previous study (TERENIUS et al., 2008). Each reaction consisted of 12.5 μL Master Mix; 1 μL DNA (150 ng/μL); 10.5 μL H2O milli-Q and 0.5 μL (10 pMol) of each primer. The PCR program had an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of (94 °C for 1 min, 54 °C for 40 s, 72 °C for 90 s), followed by a final extension at 72 °C for 5 min. Amplicon production and size were verified by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide. Amplicons were purified with PCR Purification Kit (Cellco Biotec-Jardim Bandeirantes, São Carlos-SP, Brazil), following the manufacturer's instructions and 200 ng of purified DNA was used for each sequencing reaction (BigDye Terminator V 3.1, Life Technologies-Carlsbad, Califórnia, EUA and 10 pMol of primer). The 27F and 1100R primers were used in separate sequencing reactions, generating data from both DNA strands.

All 16S rRNA gene sequences were assembled at <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> (accessed 30 May 2019) using the CAP3 program with the capability to clip 5' and 3' low-quality regions of reads, apply quality values in overlaps between reads, and generate consensus sequences (HUANG & MADAN, 1999). Consensus sequences were compared with 16S sequences in GenBank applying BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed 30 May 2019) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Ribosomal Database Project (RDP-II <http://rdp.cme.msu.edu/comparison/comp.jsp>, accessed 30 May 2019). All sequences were registered in the SisGen database (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, A9C8D56) and are available in GenBank with accession numbers MT052595-MT052669 and MT163315-MT163316.

### **Fractionation of Bacterial Cultures**

Each bacterial strain was inoculated in 2 mL of the culture medium from which it was isolated (Table S1) and this starting culture was kept in a shaker incubator at 30 °C and 180 rpm for 24 h. Fifty μL of the initial culture was transferred to 500 mL of medium followed by incubation at 30 °C and 180 rpm for 120 h. After 120 h incubation, each culture was centrifuged at 4 °C and 2800× g for 40 min. The supernatant was treated as described by



(DAHMANA et al., 2020), with modifications. Following centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.22  $\mu$ M Millipore membrane and lyophilized (Terroni-Jardim Jockey Club A, São Carlos-SP) for 72 h, 150 mmHg. An aliquot of the supernatant was plated on agar-medium to certify the absence of viable cells, after centrifugation, the pellet was divided in two identical parts. One of them was stored frozen at  $-20$  °C. The second portion was autoclaved at  $127$  °C for 30 min and then frozen at  $-20$  °C. Both pellet fractions were then lyophilized as described above.

### **Mosquito Rearing**

The *A. aegypti* MAO strain was maintained at  $26 \pm 2$  °C, 80% relative humidity and 12 L: 12 D light cycle. Larvae were fed Tetramin fish food. Adults (males and females kept together) were given access to 10% sucrose solution ad libitum and were blood-fed on Hamster *Mesocricetus auratus* (W). All experiments were conducted in accordance with relevant regulations following the guidelines of the “Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal”—CONCEA and was approved by the “Comissão de Ética no Uso de Animais”—CEUA (053/2018-SEI 01280.001770/2018-71) of the “Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia”—INPA, at a meeting on 29 October 2018.

### **Screening for Larvicidal Activity**

Bioassays were performed according to WHO, 2005 guidelines, as described by Soares-da-Silva et al., 2017. Each bacterial strain was inoculated in 150 mL of the same culture medium from which it was isolated (Table S1) and incubated at  $30$  °C and 180 rpm for 120 h to achieve an optical density of 8 units in the McFarland scale ( $\sim 24 \times 10^8$  cells/mL). Larval mortality due to exposure to bacterial culture was assessed on three consecutive days. Each day, five cups were prepared for each tested strain, each cup containing 10 third instar *A. aegypti* larvae, 9 mL of distilled water, food (Tetramin), and 1 mL of bacteria culture (bacteria plus medium). Dead larvae were counted in each cup at 24, 48 and 72 h after exposure. No mortality was observed at any time in negative controls without bacteria. *Bacillus thuringiensis israelensis* Bti-BR101 was used as positive control to validate our protocol and to comparatively assess larvicidal activity.

### **Bioassays with Fractionated Metabolites**

Larvicidal activities of lyophilized supernatants and pellets were evaluated separately. Initially, the lyophilized products were prepared as follows; (i) SUP = 50 mg of supernatant + 10 mL of water; (ii) PEL = 50 mg of pellet + 10 mL of water; (iii) APEL = 50 mg of

autoclaved pellet + 10 mL of water e; (iv) APEL + SUP = 25 mg of autoclaved pellet + 25 mg of supernatant + 10 mL of water. All the samples were homogenized with a vortex for 40 min. *A. aegypti* larval mortality was assessed as described above at 24, 48 and 72 h.

### **Determination of Lethal Concentrations (LC<sub>50</sub>) and (LC<sub>90</sub>)**

Strains eliciting at least 50% larval mortality in previous assays were further analyzed by standardized WHO, (2005) protocols and lethal concentrations (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) were determined separately for SUP, PEL, APEL and APEL+SUP fractions. These assays were conducted in five replicates, each containing 150 mL of water, 20 third instar larvae and 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008, 0.005, 0.001, 0.0008 or 0.0003 mg/L of fractionated cultures. Dead larvae were counted at 24, 48 and 72 h after exposure. Negative and positive controls were included as described above using Bti BR101 as active strain. Data from concentrations causing between 10% and about 95% mortality of mosquito larvae were used for statistical analyses.

LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were assessed by Probit, with  $p \leq 0.05$  (FINNEY, 1971), using the statistical software Polo Plus 1.0 (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) (ROBERTSON et al., 2007). Lethal concentrations and confidence interval (CI 95%) were analyzed by the Lilliefors normality test (K samples), analysis of variance (ANOVA), multiple comparison Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) and Student's t test with the software BioEstat 5.3 for Windows (AYRES et al., 2007).

## **Results**

### **Bacteria Strain Isolation and Characterization**

Seventy-seven bacterial strains were isolated from soil and water samples from 15 different geographical locations (Table S1). Among them, 38 originated from soil and 39 from water samples. Amplification and sequencing of 16S rRNA genes, and comparison of the sequences with the NCBI database, revealed that the assembled collection contains representatives of six genera: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Brevundimonas*. Among them are representatives of the genus *Bacillus* and one species of each *Brevibacillus*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Brevundimonas* (Table S1). Species assignment of every queried sequence would be the desired outcome, but in many cases the limited resolution of the 16S rRNA locus precluded an accurate classification at the species level. Taxonomic classification at the genus level was then assigned to the isolated strains.

## Larvicidal Activity of Isolated Bacterial Strains

Exposure of *A. aegypti* larvae to cultured bacteria from all isolated strains ( $\sim 24 \times 10^8$  cells/mL) revealed that 21 resulted in a mortality equal to or greater than 50% within 72 h and these were further studied (Table 2). Twenty of them are from the genus *Bacillus*. One *Brevibacillus halotolerans* strain, SPa07, isolated from the soil killed 100% of the *A. aegypti* larvae in 48 h. Eleven of the *Bacillus* strains killed 100% of the larvae within 24 h, as did the positive control strain Bti BR101.

**Table 2.** Isolated strains with larvicidal activity against *A. aegypti* larvae.

Strain	Isolated from	GenBank acc. N°.; species	Cumulative mortality		
			24 h	48 h	72 h
BR101	Positive control	<i>Bacillus thuringiensis var.israelensis</i>	100%	-	-
SPa09	Soil	MT052636; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
SBC13	Soil	MT052634; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
SP06	Soil	MT052669; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
SPO2	Water	MT052609; <i>Bacillus safensis</i>	100%	-	-
SPO5	Water	MT052624; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
SX02	Water	MT052611; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
APR6I	Water	MT052596; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
APR10I	Water	MT052598; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
GD02.13	Water	MT163315; <i>Bacillus</i> sp	100%	-	-
SX06	Water	MT052643; <i>Bacillus megaterium</i>	100%	-	-
SX08	Water	MT052649; <i>Bacillus velezensis</i>	100%	-	-
SPa07	Soil	MT052647; <i>Brevibacillus halotolerans</i>	60%	100%	-
SPa03	Soil	MT052618; <i>Bacillus</i> sp	90%	97%	100%
LFP2	Water	MT052629; <i>Bacillus subtilis</i>	10%	80%	90%
SPa22	Soil	MT052639; <i>Bacillus safensis</i>	47%	80%	83%
SPa04	Soil	MT052633; <i>Brevibacillus halotolerans</i>	70%	70%	80%
SMP1.2	Soil	MT052614; <i>Bacillus</i> sp	56%	63%	67%
SBC2	Soil	MT052620; <i>Bacillus subtilis</i>	27%	57%	67%
SBC1	Soil	MT052667; <i>Bacillus</i> sp	33%	53%	63%
SPa14	Soil	MT052651; <i>Bacillus</i> sp	37%	57%	57%
SX15	Water	MT163316; <i>Bacillus safensis</i>	-	67%	67%

Mortality was assessed at 24, 48 and 72 h after exposure to bacterial cultures diluted 10-fold in water. No mortality was observed in negative controls without bacteria and the strain BR101 was used as positive control, inducing 100% mortality within 24 hours. Values are the average of three biological replicates, each challenging 10 third instar larvae in 9 ml of distilled water and 1 ml ( $\sim 24 \times 10^8$  cells/ml) of bacterial culture (bacteria plus medium).

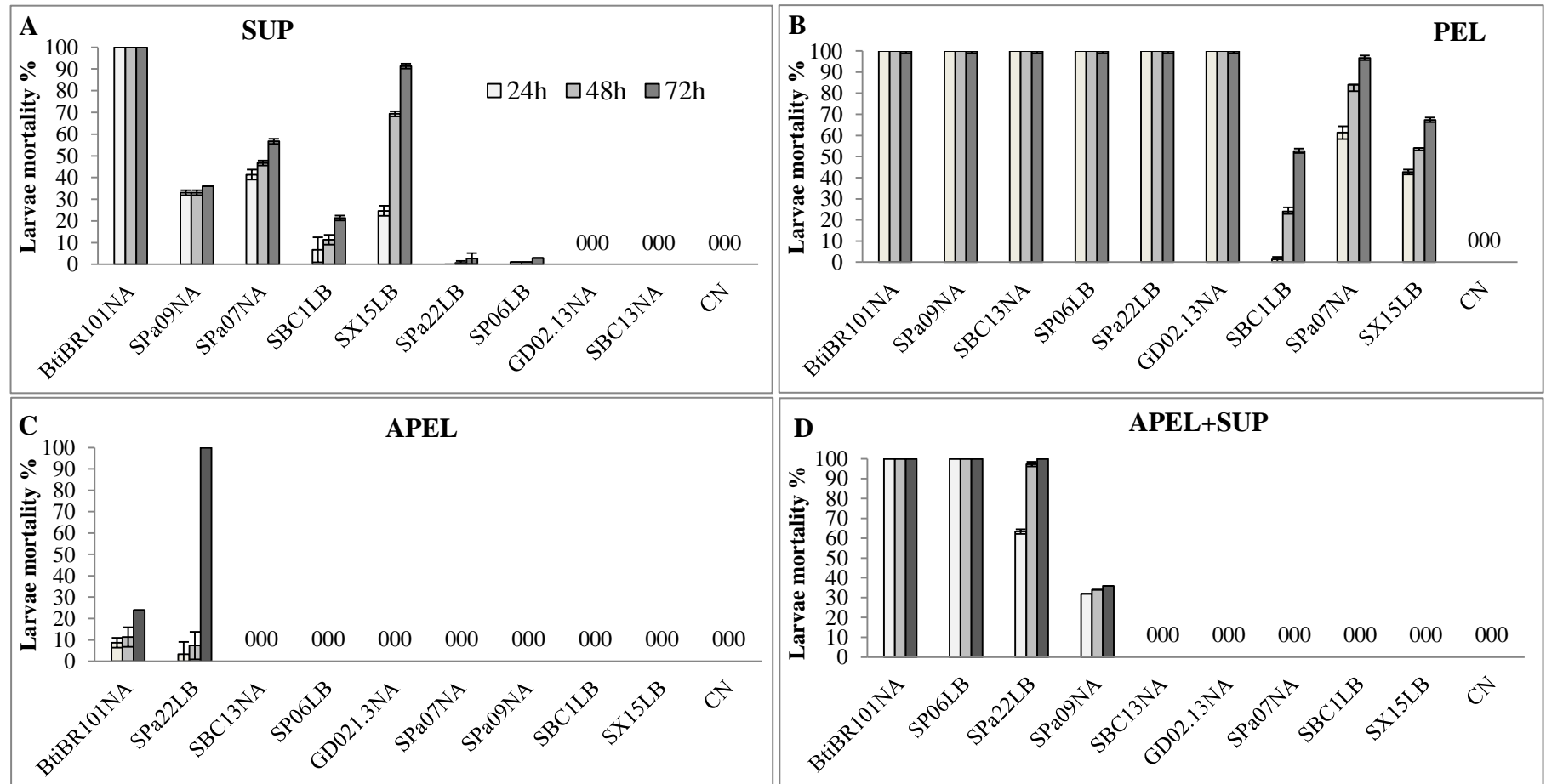
## Larvicidal Activity of Fractionated Bacterial Cultures

All the 21 strains identified above were tested in another series of assays to identify larvicidal activities in cellular and secreted components separately. Bacterial cultures were submitted to centrifugation generating pellets containing bacteria and supernatant (SUP = medium/secreted molecules). Furthermore, the larvicidal activity of autoclaved pellets (APEL = unviable bacteria) was compared with the activity of untreated pellets (PEL = viable bacteria). The bacterial biomass and supernatant fractions were lyophilized before evaluating their biological activity of mosquito larvicide and determining lethal concentrations of the larvicide for 50% and 90% mortality, LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>.

Eight out of the 21 tested strains contained one or more fractions resulting in at least 50% mortality when assayed at a concentration of 5 mg/mL (Figure 2). Larvicidal activity was observed mainly in the PEL fractions of the isolated bacteria. The PEL fractions of five strains killed 100% of the larvae in less than 24 h, as did the PEL fraction of BtiBR101 (Figure 2B). LCs determined for these five newly isolated strains were statistically indistinguishable from LCs determined for BtiBR101 (i.e., 72 h LC<sub>90</sub> 0.012-0.018 mg/mL, detailed values and statistical analysis available in Table 3 and Table S2B). Autoclaved pellets lost their larvicidal activity, except for *B. safensis* SPa22, which killed 100% of *A. aegypti* larvae in 72 h (Figure 2C). APEL from SPa22 demonstrated a delayed activity with LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> ten-fold lower than the autoclaved pellet from the control strain BtiBR101.

SUP fractions had distinct levels of larvicidal activities, varying from *Bacillus* sp. strains SBC13 and GD02.13 with no activity at all up to 93% of mortality of *A. aegypti* larvae within 72 h in the presence of *B. safensis* SX15 SUP (Figure 2A). LCs determined for SUP fractions of SX15 and Spa07 were statistically indistinguishable from LCs determined for the positive control *B. thuringiensis* BR101 SUP (i.e., 72 h LC<sub>90</sub> 0.004 mg/mL, Table 3 and Table S2A).

The mixture of SUP and APEL fractions were also tested. Noticeable results were obtained for the *Bacillus* sp. SP06 and *B. safensis* SPa22 strains. While these strains demonstrated very low larvicidal activities when SUP and APEL were tested separately, the mixture of the two fractions resulted in 100% mortality within 24 h for SP06 and 72 h for *B. safensis* SPa22. For *B. safensis* SPa22, a strain for which no larvicidal activity was detected in the SUP fraction, the APEL+SUP yielded LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values lower than APEL only (Table 3). Furthermore, assays with *B. safensis* SPa22 APEL+SUP resulted in earlier lethality, 65% mortality at 24 h and 100% at 72 h (Figure 2D).



**Figure 2.** Larvicidal activity of microbial cultures fractions at 5 mg/mL. (A) SUP = 50 mg of lyophilized supernatant + 10 mL of water; (B) PEL = 50 mg of lyophilized pellet + 10 mL of water; (C) APEL = 50 mg of autoclaved and lyophilized pellet + 10 mL of water and; (D) APEL+SUP = 25 mg of autoclaved and lyophilized pellet + 25 mg of lyophilized supernatant + 10 mL of water. *A. aegypti* larvae mortality was evaluated at 24, 48 and 72 h and the results are expressed as averages  $\pm$  standard deviations. CN –negative control with water in place of microbial culture fractions.

**Table 3.** LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values of microbial culture fractions against *A. aegypti* larvae

Strain	PEL						Strain	APEL					
	24h		48h		72h			24h		48h		72h	
	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>		CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
Bti	(0.008)bc	(0.058)a	(0.008)a	(0.023)a	(0.003)a	(0.012)a	Bti						
SPa09	(0.006)c	(0.089)a	(0.006)a	(0.026)a	(0.005)a	(0.015)a	SPa09						
SPa22	(0.013)ab	(0.113)a	(0.004)ab	(0.023)a	(0.005)a	(0.015)a	SPa22	(0.009)a	(0.073)a	(0.006)a	(0.025)a	(0.007)a	(0.018)a
GD02.13	(0.006)c	(0.148)a	(0.005)ab	(0.017)a	(0.003)a	(0.012)a	GD02.13						
SP06	(0.009)bc	(0.083)a	(0.007)ab	(0.029)a	(0.007)a	(0.018)a	SP06						
SBC13	(0.007)c	(0.009)a	(0.004)b	(0.019)a	(0.005)a	(0.012)a	SBC13						
SPa07	(0.009)bc	(0.124)a	(0.005)ab	(0.021)a	-	-	SPa07						
SX15	(0.010)bc	(0.088)a	(0.005)ab	(0.022)a	-	-	SX15						
BC1	-	-	-	-	(0.023)a	(0.256)a	BC1						

Strain	SUP						Strain	APEL+SUP					
	24h		48h		72h			24h		48h		72h	
	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>		CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
Bti	(0.009)a	(0.048)a	(0.008)a	(0.029)a	(0.004)a	(0.004)a	Bti	(0.005)a	(0.037)a	(0.005)a	(0.018)a	(0.004)a	(0.011)a
SPa09	-	-	-	-	-	-	SPa09						
SPa22	-	-	-	-	-	-	SPa22	(0.007)a	(0.031)a	(0.007)a	(0.018)a	(0.003)a	(0.012)a
GD02.13	-	-	-	-	-	-	GD02.13						
SP06	-	-	-	-	-	-	SP06	(0.008)a	(0.046)a	(0.006)a	(0.023)a	(0.003)a	(0.016)a
SBC13	-	-	-	-	-	-	SBC13						
SPa07	(0.007)a	(0.056)a	(0.006)a	(0.020)a	(0.004)a	(0.004)a	SPa07						
SX15	(0.006)a	(0.068)a	(0.006)a	(0.068)a	(0.005)a	(0.005)a	SX15						
BC1	-	-	-	-	-	-	BC1						

Assays were conducted in five replicates, each containing 150 mL of water, 20 third instar larvae and 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, or 0.005 mg/L of fractionated cultures. Dead larvae were counted at 24, 48 and 72 h after exposure to the samples. LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were assessed by Probit, with  $p \leq 0.05$ . Statistical comparisons and confidence inter-val (CI 95%) were analyzed by the Lilliefors normality test (K samples), analysis of variance (ANOVA), multiple comparison Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) and Student's t test and the results are presented in the Supplemental Materials, Table S2A–D. For all variables in each column (a.b.c) with the same letter, the difference between the values is not statistically significant.

## Discussion

The control of *A. aegypti* mosquitoes, vectors of diseases such as dengue, yellow fever, Zika and chikungunya, is an effective way for containing pathogen transmission to humans. However, current evidence suggests that the development of insecticide resistance is constantly challenging our ability to introduce new chemical and biological insecticides. For example, two years ago clothianidin, representing a new class of chemicals, was added by the World Health Organization to the list of insecticides indicated for indoor mosquito control. The recent report of mosquito resistance to clothianidin coming from Cameroon indicates its effectiveness for the proposed public health application may be already compromised (MAKONI, 2020).

Aiming to explore the biodiversity of the Amazon rainforest (MALHI et al., 2008) and to identify novel entomopathogenic bacterial strains with larvicidal activity against *A. aegypti*, water and soil samples from 15 locations in the Amazonas state were collected and analyzed. Non-sporulated microbes were selectively eliminated by heat treatment and the surviving strains were isolated on Petri dishes containing nutritionally rich medium and agar. Seventy-seven isolated bacterial strains assembled a collection containing representatives of six genera: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Brevundimonas* (Table S1). Among them, 19 *Bacillus* sp. strains and two *Brevibacillus halotolerans* strains had larvicidal activity defined as the killing of at least 50% of the larvae within 72 h.

For the first time, strains of *Brevibacillus halotolerans* with larvicidal activity against *A. aegypti* were identified. Other bacteria of the genus *Brevibacillus*, such as *Brevibacillus laterosporus* have been characterized as having insecticidal activities against insects (RUIU, 2013). *Br. laterosporus* canoe-shaped spores (CSPB) contain four major proteins, CpBA, CpbB, CHRD and ExsC, that function as insect virulence factors (MARCHE et al., 2017). Further studies are necessary to verify if the insecticidal activities from the *Br. halotolerans* strains isolated in this study are associated with similar proteins.

*Bacillus thuringiensis* produces, during sporulation, cellular proteinaceous crystalline toxins (Cry and Cyt proteins or d-endotoxins) with insecticidal activity against certain insect species. Additionally, vegetative *B. thuringiensis* cells secrete into the environment Vip (vegetative insecticidal proteins) and Sip (secreted insecticidal proteins), which also have insecticidal activity (PALMA et al., 2014). Commonly, the cytotoxic effect and host specificity of *B. thuringiensis*, are attributed to cellular components (Cry and Cyt) or the secreted proteins of the Vip and Sip families. However, numerous other virulence factors of *B. thuringiensis* have been discovered, including lipopeptides (surfactin, iturin, fengicin),

metalloproteases, chitinases, aminopolyol antibiotics and nucleotide-mimicking moieties. These agents contribute to the insecticidal properties of *B. thuringiensis* enhancing toxin activity, avoiding host immune response evasion and participating in extracellular matrix degeneration (CHAABOUNI et al., 2012; MALOVICHKO et al., 2019). Additional studies are necessary to verify if the insecticidal activities from the *Bacillus* sp. strains isolated in this study are associated with similar proteins.

Dahmana et al, (2020), with the goal of evidencing and identifying multiple insecticidal components of 14 entomopathogenic bacteria against *A. albopictus* larvae, tested bacteria-free supernatant and disrupted bacterial pellet separately. Following a similar protocol, we exposed *A. aegypti* larvae to fractionated bacterial cultures; intact viable cells, autoclaved unviable cells, and bacterial culture medium depleted of cells. Larvicidal activities present in the culture medium and supernatant represent secreted molecules while cellular components are represented in the pellets. Eight out of the 21 tested strains contained one or more fractions resulting in at least 50% mortality when fractionated cultures were assayed at a concentration of 5 mg/mL. The PEL fractions of all eight strains submitted to fractionation resulted in mortality of at least 50% within 72 h, five of them killing 100% of the *A. aegypti* larvae in less than 24 h. LC50 and LC90 determined for these strains are similar to those of the reference *B. thuringiensis* strain BR101, suggesting they could be developed commercially as *A. aegypti* control agents. Autoclaved pellets lost most of their larvicidal activity, likely due to denaturation of the active components and/or the destruction of mechanisms requiring cell metabolism and replication. Notably, the autoclaved pellet from *B. safensis* SPa22 demonstrated consistently a delayed effect, killing *A. aegypti* larvae only after 48 h of exposure (Figure 2C). The mechanism involved in this late action deserves investigation.

Mortality of *A. aegypti* larvae was detected after exposure to SUP fractions of four strains, indicative that these bacteria secrete molecules with larvicidal activities. Possibly, *B. safensis* found in our study is similar to that described by (FALQUETO et al., 2021), with culture supernatant effective against *A. aegypti*. Further investigation is necessary to uncover their molecular composition and how these agents contribute to the observed insecticidal properties.

We also tested mixing APEL and SUP fractions to evaluate the possibility of synergistic interactions between secreted compounds and cellular constituents. Synergism between *B. thuringiensis* cellular and secreted factors of selected strains have already been described (MALOVICHKO et al., 2019; VALTIERRA-DE-LUIS et al., 2020). The mixture APEL+SUP from *Bacillus* sp. SP06 and *B. safensis* SPa22 strains resulted in larvicidal



activity superior to the sum of those of each fraction separately indicative of synergism between the components of APEL and SUP fractions.

### Supplementary Materials

**Table S1:** *Bacillus* strains isolated from soil and water samples from the municipalities of Parintins, Manaus and Coari, Amazonas state, Brazil. Species assignment of every queried sequence would be the desired outcome, but in many cases the limited resolution of the 16S rRNA locus precluded an exact classification at the species level. Taxonomic classification at the genus level was then assigned to the isolated strains.

Strain	Culture medium / Substrat	Geographic origen	% Identity	Species GenBank acc. number
SX17	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> MT052620
SPa05	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> MT052658
Apr10	ISP2/ Water	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052598
SUF02	NA/ Soil	UFAM. C – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052654
SX07	LB/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052650
SPO7	LB/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052638.1
SP1	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052642
SP6	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052653
SBC1	LB/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052667
SX05	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052644
SX01	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052646
SX02	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052611
SP8	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052659
SBC11	ISP2/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052660
SPO9	NA/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MT052630
SPa03	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052618
SX16	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MT052665.1
SUF06	ISP2/ Soil	UFAM. C – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052628
SBC3	LB/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052613
SPa12	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052612
AMc01	NA/ Water	M. River – Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052656
AP01	NA/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus megaterium</i> MT052622
SX06	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus megaterium</i> MT052643
APO3	NA/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052623
SPa08	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052610
SMP1.1	ISP2/ Soil	Macurany - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052614
LFP1	NA/ Water	Fr. Pond – Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052619
SPO10	LB/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052600
SMP1.2	ISP2/ Soil	Macurany - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052635
SX13	LB/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052640
SPa01	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052617
SUF.04	LB/ Soil	UFAM. C – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052616
SUF05.1	LB/ Soil	UFAM. C – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052664
SUF01	NA/ Soil	UFAM. C – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052657
LFP3	ISP2/ Water	Fr. Pond – Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052655
SX10	ISP2/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052663
SPa14	ISP2/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052651

SBC9	ISP2/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052662
SBC10	ISP2/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052628
SBC12	NA/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus pumilus</i> MT052606
SPO2	LB/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus safensis</i> MT052609
SX15	LB/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus safensis</i> MT163316
SPO11	LB/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus safensis</i> MT052625
SPa22	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus safensis</i> MT052639
SPa02	LB/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052621
SBC2	LB/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus subtilis</i> MT052632
LFP2	LB/ Water	Fr. Pond – Pin	100%	<i>Bacillus subtilis</i> MT052629
SPa10	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052631
SC15.10	ISP2/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus subtilis</i> MT052615
SP12	ISP2/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052603
SP06	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052669
SBC13	NA/ Soil	Science Grove – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052634
SC15.7	NA/ Soil	H15. INPA – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052605
SX04	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052645
GD02.13	NA/ Water	Gordo Farm - Coa	100%	<i>Bacillus</i> sp MT163315
SPa09	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052636
SMP1.3	ISP2/ Soil	Macurany - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052648.1
SX08	LB/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus velezensis</i> MT052649
SUF05	LB/ Soil	UFAM. C – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052624
APR1.2	NA/ Soil	Pa. Stream – Pin	100%	<i>Bacillus velezensis</i> MT052627
APR1.1	NA/ Soil	Pa. Stream – Pin	100%	<i>Bacillus velezensis</i> MT052626
SPO5	LB/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052608
SX13.1	LB/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052668
Ara5	NA/ Water	Aerial Stream - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052601
SPa06	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052607
SPO13	ISP2/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052652
Apr14	ISP2/ Water	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052595
Apr6	ISP2/ Water	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052596
SP1	ISP2/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Bacillus</i> sp MT052602
AMc06	ISP2/ Water	M. River – Pin	100%	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MT052666
SX17.1	NA/ Water	Dona Chagas – Mao	100%	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MT052641
SPO	ISP2/ Water	Portela farm – Mao	100%	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MT052661
SPa07	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Brevibacillus halotolerans</i> MT052647
SPa04	NA/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Brevibacillus halotolerans</i> MT052633
SPa13	LB/ Soil	Parananema - Pin	100%	<i>Brevundimonas olei</i> MT052637
Apr8	ISP2/ Water	Pa. Stream – Pin	100%	<i>Klebsiella</i> sp MT052599
Apr9	ISP2/ Water	Pa. Stream – Pin	100%	<i>Serratia</i> sp MT052597

---

77 Bacterian strains

The sequence identities were 100% similar to the NCBI Genbank sequences and Ribosomal Database Project (RDP-II). Pin=Parintins, Mao=Manaus and Coa=Coari; UFAM. C – Mao=UFAM Campus I – Mao; M. River – Pin=Macurany River – Pin; Fr. Pond – Pin=Francesa Pond – Pin; H15. INPA – Mao=House 15 INPA – Mao; Pa. Stream – Pin=Parananema. Stream – Pin.

**Table S2 (A-D)** - LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values of microbial cultures larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were assessed by Probit, with  $p \leq 0,05$  [31], using the statistical software Polo Plus 1.0 (LeOra Software, CA. USA) [32]. Lethal concentrations and confidence interval (CI 95%) were analyzed by the Lilliefors normality test (K samples), analysis of variance (ANOVA), multiple comparison Tukey test ( $p \leq 0,05$ ) and Student's t test with the software BioEstat 5.3 for Windows [33].

### A- Supernatant (SUP) fractions

Strain	LC <sub>50</sub> (CI 95%)	LC <sub>90</sub> (CI 95%)	$\chi^2$	DF	Slope ( $\pm$ SE)
24 h					
Bti BR101	0.009 (0.002 – 0.013) a	0.048 (0.027 – 0.813) a	5.4296	2	1.719 ( $\pm$ 0.171)
SX15	0.006 (0.001 – 0.010) a	0.068 (0.037 – 0.855) a	9.0326	3	1.252 ( $\pm$ 0.146)
SPa07	0.007 (0.002 – 0.010) a	0.056 (0.031 – 0.901) a	10.497	3	1.418 ( $\pm$ 0.157)
48 h					
Bti BR101	0.008 (0.006 – 0.010) a	0.029 (0.022 – 0.053) a	6.7637	3	2.347 ( $\pm$ 0.200)
SX15	0.006 (0.001 – 0.010) a	0.068 (0.037 – 0.855) a	9.0326	3	1.252 ( $\pm$ 0.146)
SPa07	0.006 (0.002 – 0.009) a	0.020 (0.015 – 0.059) a	18.495	3	2.599 ( $\pm$ 0.216)
72 h					
Bti BR101	0.004 (0.001 – 0.007) a	0.004 (0.001 – 0.007) a	7.4621	3	2.748 ( $\pm$ 0.365)
SX15	0.005 (0.001 – 0.007) a	0.005 (0.001 – 0.007) a	6.7782	3	2.864 ( $\pm$ 0.389)
SPa07	0.004 (0.001 – 0.007) a	0.004 (0.001 – 0.007) a	8.0917	3	2.687 ( $\pm$ 0.355)

LC Lethal Concentration; CI = Confidence Interval;  $\chi^2$  = chi-square; DF = Degrees of freedom; SE = Standard Error. Same letters, a, b, c, etc do not differ at the 5% probability level ( $p > 0.05$ ).

### B- Non-autoclaved Pellet (PEL) fractions

Strain	LC <sub>50</sub> (CI 95%)	LC <sub>90</sub> (CI 95%)	$\chi^2$	DF	Slope ( $\pm$ SE)
24 h					
Bti BR101	0.008 (0.004 – 0.011) bc	0.058 (0.033 – 0.391) a	6.5449	3	1.500 ( $\pm$ 0.180)
SPa09	0.006 (0.001 – 0.009) c	0.089 (0.089 – 3.192) a	6.4172	3	1.072 ( $\pm$ 0.152)
SPa22	0.013 (0.010 – 0.016) ab	0.113 (0.064 – 0.405) a	9.2917	4	1.369 ( $\pm$ 0.127)
GD02.13	0.006 (0.002 – 0.009) c	0.148 (0.068 – 1.428) a	6.2864	4	2.391 ( $\pm$ 0.340)
SP06	0.009 (0.006 – 0.012) bc	0.083 (0.050 – 0.266) a	9.3171	4	1.358 ( $\pm$ 0.130)
SBC13	0.007 (0.004 – 0.009) c	0.009 (0.044 – 0.192) a	11.998	5	1.289 ( $\pm$ 0.125)
SPa07	0.009 (0.004 – 0.013) bc	0.124 (0.0060 – 1.097) a	10.931	4	1.130 ( $\pm$ 0.126)
SX15	0.010 (0.006 – 0.013) bc	0.088 (0.056 – 0.231) a	3.7187	3	1.348 ( $\pm$ 0.125)

BC1	-	-	-	-	-
48 h					
Bti BR101	0.008 (0.007 – 0.009) a	0.023 (0.021 – 0.027) a	1.988	2	2.716 (±0.225)
SPa09	0.006 (0.002 – 0.009) ab	0.026 (0.019 – 0.055) a	3.5529	2	2.049 (±0.185)
SPa22	0.004 (0.001 – 0.007) ab	0.023 (0.018 – 0.042) a	7.2396	3	1.762 (±0.185)
GD02.13	0.005 (0.001 – 0.008) ab	0.017 (0.012 – 0.03) a	12.748	3	2.260 (±0.225)
SP06	0.007 (0.002 – 0.010) ab	0.029 (0.029 – 0.091) a	5.3146	2	2.052 (±0.175)
SBC13	0.004 (0.001 – 0.006) b	0.019 (0.015 – 0.026) a	4.8732	3	1.871 (±0.201)
SPa07	0.005 (0.001 – 0.008) ab	0.021 (0.016 – 0.0875) a	12.227	3	2.122 (±0.227)
SX15	0.005 (0.001 – 0.008) ab	0.022 (0.016 – 0.084) a	12.227	3	2.061 (±0.225)
BC1	-	-	-	-	-
72 h					
Bti BR101	0.003 (0.000 – 0.006) a	0.012 (0.009 – 0.016) a	30.173	6	2.337 (±0.284)
SPa09	0.005 (0.001 – 0.007) a	0.015 (0.012 – 0.021) a	8.4219	3	2.595 9±0.260
SPa22	0.005 (0.001 – 0.007) a	0.015 (0.012 – 0.021) a	8.4219	3	2.595 (±0.260)
GD02.13	0.003 (0.000 – 0.005) a	0.012 (0.009 – 0.016) a	16.803	5	1.916 (±0.235)
SP06	0.007 (0.002 – 0.009) a	0.018 (0.014 – 0.046) a	6.0876	2	3.099 (±0.288)
SBC13	0.005 (0.003 – 0.006) a	0.012 (0.010 – 0.013) a	0.557	1	3.234 (±0.529)
SPa07	-	-	-	-	-
SX15	-	-	-	-	-
BC1	0.023 (0.021 – 0.027) a	0.256 (0.159 – 0.535) a	2.458	3	1.234 (±0.137)

LC Lethal Concentration; CI = Confidence Interval;  $\chi^2$  = chi-square; DF = Degrees of freedom; SE = Standard Error. Same letters, a,b,c, etc do not differ at the 5% probability level ( $p > 0.05$ ).

### C- Autoclaved pellet (APEL) fractions

Strain	LC <sub>50</sub> (CI 95%)	LC <sub>90</sub> (CI 95%)	$X^2$	DF	Slope (±SE)
24h					
SPa22	0.009 (0.003 – 0.013) a	0.073 (0.040 – 0.670) a	9.8656	3	1.389 (±0.145)
48h					
SPa22	0.006 (0.001 – 0.010) a	0.025 (0.017 – 0.106) a	6.7376	2	2.130 (±0.187)
72h					
SPa22	0.007 (0.004 – 0.009) a	0.018 (0.014 – 0.034) a	63.089	6	3.313 (±0.232)

LC Lethal Concentration; CI = Confidence Interval;  $\chi^2$  = chi-square; DF = Degrees of freedom; SE = Standard Error. Different letters differ at the 5% probability level ( $p > 0.05$ ).

**D-Mixed autoclaved pellet plus supernatant (APEL+SUP) fractions**

Strain	LC <sub>50</sub> (CI 95%)	LC <sub>90</sub> (CI 95%)	$\chi^2$	DF	Slope ( $\pm$ SE)
24h					
Bti BR101	0.005 (0.002 – 0.008) a	0.037 (0.027 – 0.078) a	5.3019	3	1.495 ( $\pm$ 0.160)
SPa22	0.007 (0.002 – 0.010) a	0.031 (0.021 – 0.115) a	33.418	3	2.030 ( $\pm$ 0.155)
SP06	0.008 (0.004 – 0.011) a	0.046 (0.030 – 0.122) a	8.1382	3	1.680 ( $\pm$ 0.143)
48h					
Bti BR101	0.005 (0.001 – 0.008) a	0.018 (0.013 – 0.039) a	28.230	4	2.252 ( $\pm$ 0.204)
SPa22	0.007 (0.004 – 0.009) a	0.018 (0.014 – 0.032) a	59.140	6	3.337 ( $\pm$ 0.234)
SP06	0.006 (0.002 – 0.009) a	0.023 (0.017 – 0.074) a	12.453	3	2.252 ( $\pm$ 0.204)
72h					
Bti BR101	0.004 (0.000 – 0.006) a	0.011 (0.010 – 0.015) a	16.042	5	2.607 ( $\pm$ 0.367)
SPa22	0.003 (0.000 – 0.006) a	0.012 (0.009 – 0.016) a	17.313	5	2.607 ( $\pm$ 0.367)
SP06	0.003 (0.000 – 0.005) a	0.016 (0.013 – 0.040) a	26.194	6	1.776 ( $\pm$ 0.239)

LC Lethal Concentration; CI = Confidence Interval;  $\chi^2$  = chi-square; DF = Degrees of freedom; SE = Standard Error. Different letters differ at the 5% probability level ( $p > 0.05$ ).

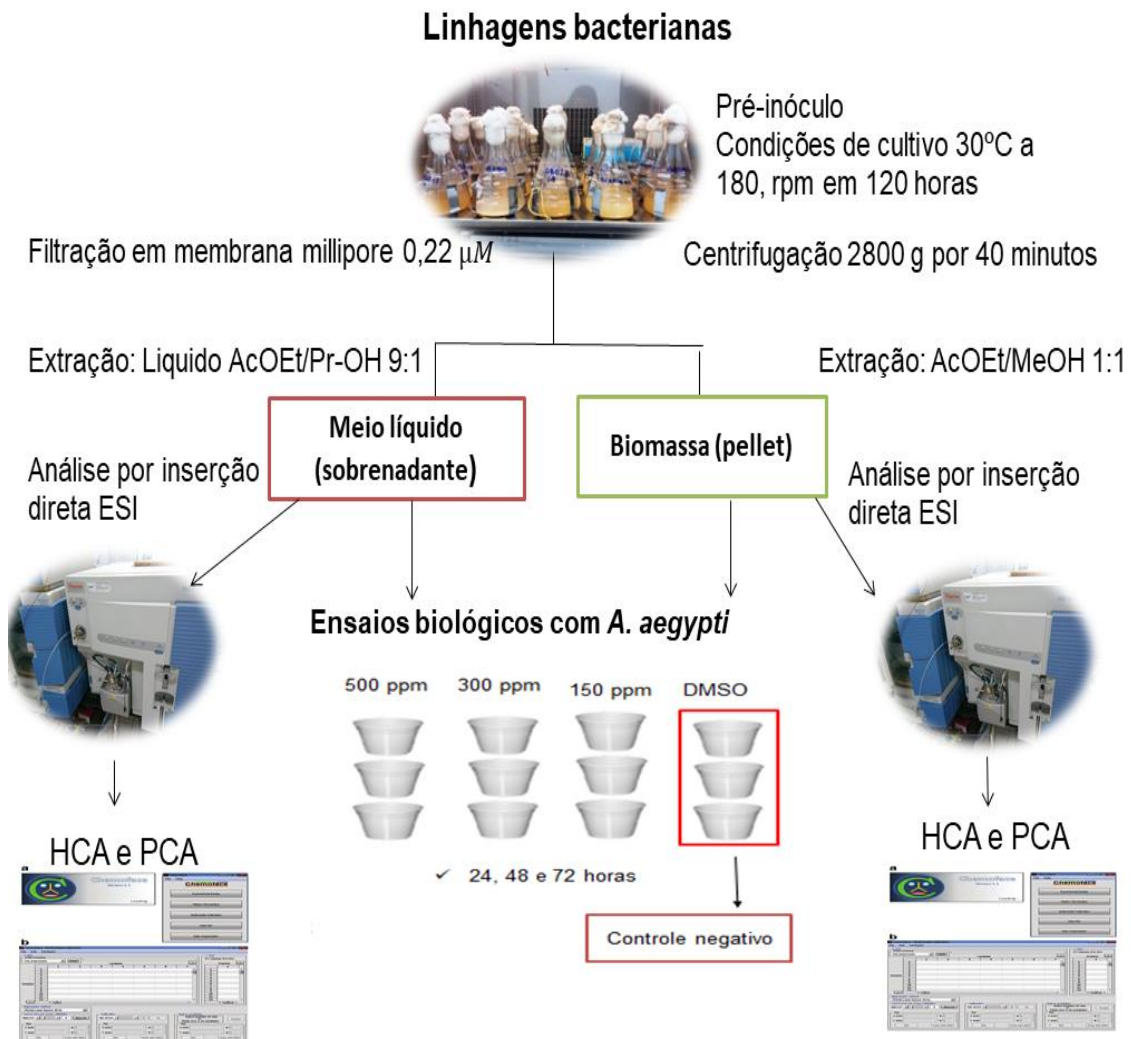
## CAPÍTULO II

### Atividade larvicida e perfil químico dos extratos brutos de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp., provenientes de ambientes Amazônicos contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

Ricardo de Melo Katak, Marta Rodrigues Oliveira, Elerson Matos Rocha, Juan Campos de Oliveira, Veranilce Alves Muniz, Afonso Leão Duarte, Antonia Queiroz Lima de Souza, Rosemary Aparecida Roque, Wanderli Pedro Tadei.

#### Material e métodos

Fluxograma da metodologia do experimento.



**Figura 6:** Fluxograma da metodologia do experimento

### Reativação e condições de cultivo dos bacilos

Neste estudo, foram utilizadas cinco linhagens de *Bacillus* sp. e uma linhagem de *Brevibacillus*. A cepa padrão BtiBR101NA- *B. thuringiensis israelensis* que apresentou atividade larvicida nas seguintes condições testadas (Tabela 4) também foi usada neste experimento para comparar com as linhagens isoladas.

**Tabela 4:** Linhagens selecionadas para o estudo da produção de extratos metabólicos.

Cepa	Identificação molecular	Origem	Extratos metabólicos
Padrão Bti BR101	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	UEL-Paraná	Sobrenadante (SUP); Pellet +Sobrenadante (APEL+SUP); Pellet não autoclavado (PEL).
SPa07NA	<i>Brevibacillus halotolerans</i> MT052647	Solo Parintins	Sobrenadante (SUP); Pellet não autoclavado (PEL).
SPa09NA	<i>Bacillus toyonensis</i> MT052636	Solo Parintins	Pellet não autoclavado (PEL);
SX15LB	<i>Bacillus safensis</i> MT163316	Água manaus	Sobrenadante (SUP); Pellet não autoclavado (PEL).
SP06LB	<i>Bacillus thuringiensis</i> MT052669	Solo Parintins	Pellet não autoclavado (PEL); Pellet autoclavado (APEL) + sobrenadante (SUP).
SPa22LB	<i>Bacillus safensis</i> MT052639	Solo Parintins	Pellet não autoclavado (PEL); Sobrenadante + Pellet autoclavado (SUP+APEL); Pellet autoclavado (APEL).
SBC1LB	<i>Bacillus albus</i> MT052660	Solo Manaus	Sobrenadante (SUP); Pellet não autoclavado (PEL).

Primeiramente, as linhagens foram cultivadas nos respectivos meios que foram preservados contendo 5 ml de Ágar Nutriente (NA) e Luria Bertani (LB) a 30°C durante 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 100 µl foi retirada e adicionada em frascos de 250 ml contendo 100 ml dos respectivos meios. Os cultivos em escala preparativa foram feitos em quintuplicata, incluindo a amostra controle, mantidas em agitação na estufa rotativa a 180 rpm e 30 °C durante 120 horas. Durante o período de cultivo das linhagens foi mensurado a glicose, pH e nitrito periodicamente das amostra e do controle por meio de uma fita de reagente para urinálise da marca Uriclin® 10 (SOUZA, 2006).

### Produção de extratos de bacilos.

Após o período de cultivo de cada linhagem, 40 ml das amostras foram distribuídas em tubos falcons (50 ml) e centrifugadas a 4 °C e 2800 g por 40 min. O sobrenadante das linhagens foi filtrado à vácuo em câmara asséptica usando uma membrana Millipore 0,22

$\mu\text{M}$ . O pellet obtido após a centrifugação foi congelado por 10 minutos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em seguida liofilizado em aparelho (Enterprise I, TERRONI) durante 48 horas. Após isso, os pellets das linhagens foram recobertos com Metanol (MeOH) e Acetato (AcOEt) na proporção 1:1. O sobrenadante obtido das cepas foi recoberto com 20% da mistura de Acetato de etila (AcOEt) e Isopropanol (iPr-OH) 9:1 volume/volume (v/v).

### **Análises quimiométricas dos extratos produzidos pelos bacilos**

Posteriormente, os frascos de vidro foram agitados vigorosamente para misturar as fases, deixados durante 24 h em repouso e em seguida foi retirado uma alíquota de  $40\ \mu\text{l}$  da fase orgânica e colocados em tubos vials de vidro contendo  $160\ \mu\text{l}$  de MeOH grau HPCL. Após isso, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas (EM) utilizando uma fonte de Electrospray ionization (ESI) por inserção direta em um espectrômetro de massas (Thermo Fisher Scientific), onde a faixa de massa observada foi de 100 a 1000 m/z tanto no modo positivo quanto no modo negativo (KOOLEN, 2011).

Em seguida, o líquido cultivado foi reunido e submetido à partição com AcOEt/Pr-OH 9:1 e extraído três vezes. O pellet das réplicas das mesmas linhagens foi reunido e macerado com a mistura de metanol MeOH e AcOEt 1:1 por 48 h, depois foi filtrado para a obtenção do extrato e a preparação das amostras para estudo do perfil químico. Posteriormente, as amostras dos extratos do Pellet foram retiradas em 48 h, após a maceração, da qual utilizou  $40\ \mu\text{l}$  do extrato adicionado em tubos Vials contendo  $160\ \mu\text{l}$  de MeOH. Todos os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida com bomba de vácuo e mantidos em dessecador com sílica ativada. Após secos, os extratos foram pesados e armazenados.

### **Bioensaios seletivos dos extratos das linhagens para as larvas de *Aedes aegypti***

Na realização dos bioensaios foram utilizados 14 extratos das linhagens, sendo sete oriundos do sobrenadante (SUP) e sete provenientes do Pellet (PEL), incluindo a cepa padrão Bti BR101NA. Os outros dois extratos foram do controle contendo o meio LB e NA, no qual as linhagens foram cultivadas. Os experimentos foram realizados de acordo com Dimalge et al (1900) e WHO (2005) com algumas modificações.



### **Obtenção e manutenção das larvas de *Aedes aegypti***

Na obtenção das larvas foram utilizados ovos da colônia do Insetário do Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Para a eclosão das larvas, os ovos foram colocados em bandejas de plásticos (45x30x7,5 cm) contendo 200 ml de água. Após a eclosão das larvas, foi adicionada a alimentação que consistiu na mistura da ração (Teklab global) e da ração Wiska®, na proporção de 1:1 (LIMA et al., 2009). As larvas foram mantidas em temperaturas de  $27 \pm 1$  °C, umidade relativa em torno de 70 a 80% e fotofase (12L/12D). Foram selecionadas para os bioensaios, larvas de 3º estágio (L3), e as demais permaneceram na bacia até a fase de pupa. Em seguida, as pupas foram transferidas para copos de plásticos de 100 ml e inseridas em gaiolas padronizadas (18 cm de diâmetro x 17 cm de altura) para a emergência dos adultos e manutenção da colônia. Para estes, foi adicionada em Erlenmeyers solução de sacarose 10% embebido em algodão. No repasto sanguíneo utilizou-se hamsters (*Mesocricetus auratus*) devidamente anestesiado, conforme o procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA: 053/2018 – “Criação de mosquitos vetores, em condições de laboratório”).

### **Ensaio larvicida com os extratos brutos**

Os ensaios biológicos seletivos foram realizados em triplicata, foi montada uma réplica de três copos plásticos contendo 10 ml de água destilada, 10 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*, 1 g de ração para as larvas, mais aplicação dos extratos dos bacilos, estabelecendo a concentração de 500, 300 e 150 µl/ml e como controle negativo foi usado DMSO (Dimetilsulfóxido), nas mesmas condições. Após a aplicação dos extratos, as leituras de mortalidade ocorreram nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, em condições controladas, com temperatura de  $26 \pm 2$  °C e umidade relativa de 70 a 80%, fotofase de (12L/12D). Os extratos que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50% foram considerados tóxicos para a realização dos bioensaios.

### **Bioensaios quantitativos com larvas de *Aedes aegypti***

Os bioensaios quantitativos foram realizados de acordo com os resultados obtidos nos bioensaios seletivos e de acordo com Dimalge et al (1990) e WHO (2005). Foram testadas oito concentrações (0,5; 0,3 ;0,15; 0,1; 0,075; 0,05; 0,025 e 0,015 g/L). Os ensaios foram realizados em triplicata sendo aplicados três repetições em dias alternados. Nos

experimentos foram utilizadas 10 larvas de terceiro instar, 10 ml de água destilada, 1g de ração para as larvas e quantidade correspondente de cada concentração de extratos. As condições de avaliação da mortalidade foram às mesmas descritas nos bioensaios seletivos.

### **Obtenção das concentrações letais (LC<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) e Análises dos dados**

Os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios quantitativos foram submetidos à análise de Probit  $p < 0,05$  (FINNEY, 1971). Os cálculos das concentrações letais foram realizados com a utilização do programa estatístico POLO-PLUS (Leora Software, 2003) por meio da regressão linear dose-resposta para estimativa das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>. A toxicidade dos extratos foram comparados pela análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey com nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ), com a utilização do programa estatístico BioEstat versão 5.3 for Windows (AYRES et al., 2007).

## **Resultados e discussão**

### **Produção e rendimento dos extratos das linhagens**

A partir da extração dos metabólitos das linhagens foram obtidos 16 extratos brutos, provenientes de sete cepas de bacilos, incluindo a cepa padrão Bti BR101NA e o controle do meio de cultivo (NA e LB). A extração dos metabólitos do cultivo das linhagens, promoveu a produção de sete extratos da fração do pellet oriundos da extração por maceração em metanol e acetato (MeOH/AcOEt) e sete provenientes da extração por partição com AcOEt/iPro-OH da fração do sobrenadante. Além disso, o controle negativo do meio NA e LB denominados (CT) foram obtidos para comparar os efeitos negativos dos extratos.

Considerando os resultados do pH aferido diariamente durante o período de cultivo das linhagens (24-120 horas), foi observado que existem diferenças estatísticas quando comparados ao valor de  $p < 0,05$ . As médias dos intervalos, os desvios padrão e as diferentes letras mostradas na tabela 9 mostraram as diferenças estatísticas entre as linhagens e cepa padrão. Os dados preliminares neste experimento podem ser utilizado como princípio de uma padronização de cultivos bacterianos, assim como a otimização para produção de metabólitos secundários. A influência na produção de moléculas pode ser ocasionada parâmetros físicos e químicos, como por exemplo, o pH que é imprescindível avaliar em estudos posteriores.

Segundo Hu et al (2006) e Costa e Badino (2012), o estresse provocado por diversas alterações externas podem ocasionar mudanças na expressão de genes, como a síntese de conjuntos específicos de proteínas, afetando diretamente o metabolismo celular. Diante disso, podem ocorrer alterações no crescimento e viabilidade das células bem como na produção de metabólitos primários e secundários.

Os resultados referentes às análises do nitrito presente no cultivo das linhagens foram mensurados até 120 horas, no qual foi observado o nitrito positivo em todos os cultivos das linhagens (Tabela 5). Os achados referentes no cultivo das linhagens demonstraram que existe a possibilidade de não ter ocorrido o catabolismo dos metabólitos presentes no cultivo. Estudos indicam o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* de promover a catabólise de moléculas complexas reduzindo a moléculas mais simples. Welker e Campbell (1967), determinaram o potencial da cepa *B. amyloliquefaciens* de fazer hidrólise do amido, fermentado sacarose, glicose e lactose para produzir acetilcarbinol e reduzir nitrito a nitrato. Neste sentido, os resultados positivos nos experimentos indicam a presença de bactérias e metabólitos nos meios de cultivo. Todavia, não foi possível mensurar a glicose no cultivo dos bacilos devido aos meios utilizados, pois os mesmos são ausentes de glicose. Os mesmos resultados de glicose das cepas foram comparados com o controle dos meios de cultivo NA e LB até 120 h.

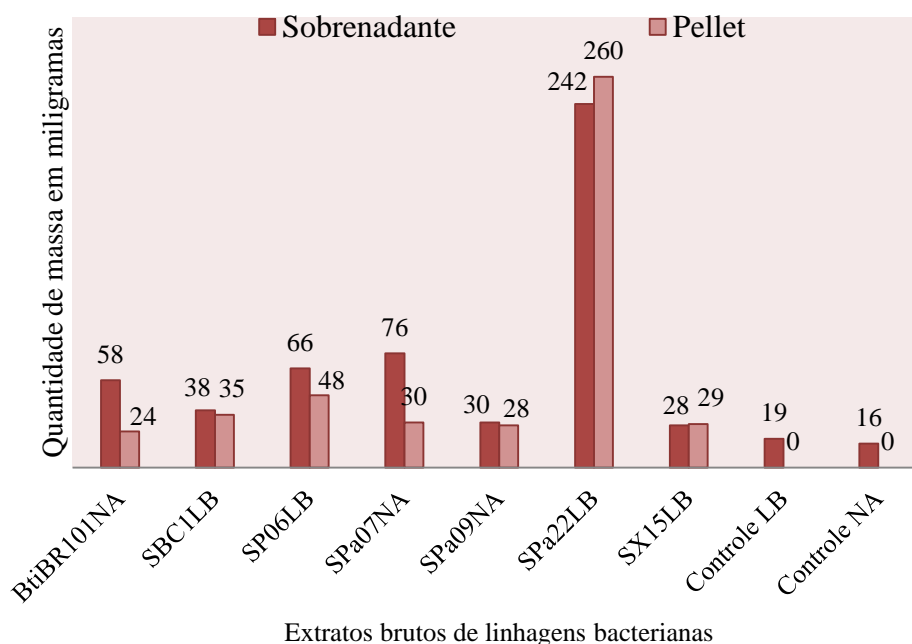
Diante desses resultados, torna-se necessário avaliar detalhadamente as fases de vida desses microrganismos (fase vegetativa, estacionária e lise celular) e os parâmetros que influenciam a produção dos metabólitos.

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

Linhagens	Diferenças dos intervalos do pH	Glicose	Nitrito
<b>BtiBR101NA</b>	(7.5 ± 0 ) a	Negativa	Positivo
<b>SBC1LB</b>	(7.5 ± 0.2) ad	Negativa	Positivo
<b>SP06LB</b>	(7.5 ± 0.2) a	Negativa	Positivo
<b>SPa07NA</b>	(7.5 ± 0) b	Negativa	Positivo
<b>SPa09NA</b>	(7.5 ± 0.2 ) c	Negativa	Positivo
<b>SX15LB</b>	(6.5 ± 0.244949) bc	Negativa	Positivo
<b>Controle LB</b>	(6.5 ± 0) b	Negativa	Positivo
<b>Controle NA</b>	(7 ± 0) c	Negativa	Positivo

Avaliação dos parâmetros do cultivo das linhagens nos intervalos de 24 a 120 horas. As Letras iguais significam que não existem diferenças estatísticas quando é comparada pelo teste Mann-whitney em relação ao  $p < 0.005$ . Os dados de glicose e nitrito não foram possíveis de avaliar estatisticamente. Médias/Desvio padrão.

Quanto aos valores do rendimento dos extratos obtidos do meio líquido (sobrenadante) foi observado que a linhagem SPa22LB-*B. safensis* apresentou o maior rendimento, e os extratos das linhagens SPa09NA-*B. toyonensis* e SX15LB-*B. safensis* foram o que apresentaram o menor rendimento, conforme os dados apresentados na figura 7.



**Figura 7:** Rendimentos dos extratos brutos das linhagens

Os extratos obtidos da biomassa bacteriana (Pellet) apresentaram valores de 24 a 260 miligramas (mg) (Figura 12). O extrato com maior rendimento foi da linhagem SPa22LB-*B. safensis*, apresentando 260 mg. Os menores rendimentos dos extratos foi observado na cepa SPa09NA-*B. toyonensis* e a cepa padrão Bti BR101NA, apresentando 24 e 28 mg, respectivamente (Figura 12).

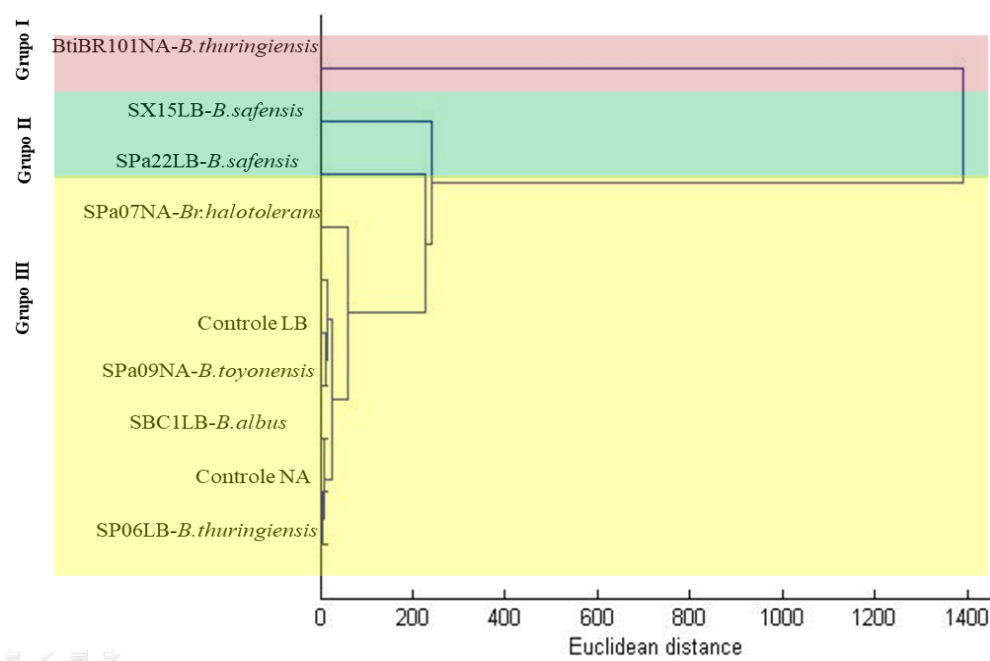
A Produção e a obtenção dos extratos metabólicos dependem de vários parâmetros otimizados que envolvem o cultivo bacteriano, como por exemplo, pH, glicose, nitrito, aeração e oxigenação. Estes fatores são de grande importância para a obtenção de metabólitos secundários. Dessa forma, a padronização dos meios de produção é de fundamental importância para os estudos dos metabólitos secundários.

**Análise do perfil químico dos extratos brutos do sobrenadante (extracelulares) e do Pellet (intracelulares) das linhagens bacterianas**

As análises dos metabólitos secundários intracelulares (pellet) e extracelulares (sobrenadante) foram realizadas neste experimento, com ionização positiva e negativa em fonte ESI-EM de massas de 100 a 1000 m/z, nos dois experimentos. Segundo Madsen et al (2010), esse método de ionização é eficiente para adquirir informações sobre os metabólitos que compõem os grupos polares a apolares.

O exemplo da identificação molecular e o perfil químico de metabólitos secundários configuram-se como uma ferramenta robusta para a identificação, pois, utiliza-se um grande número de variáveis para a confirmação.

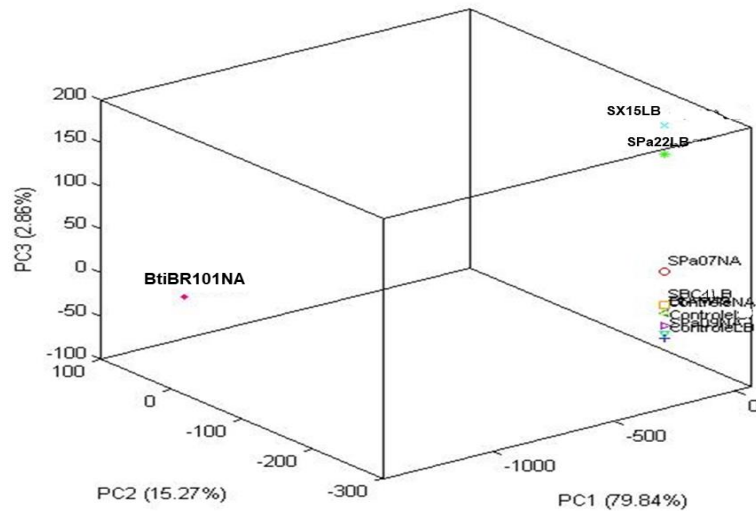
Considerando os resultados das análises do agrupamento hierárquico (AAH) observados no sobrenadante ionizado de modo positivo (+), foi observada a formação de três grupos. Sendo o primeiro (Grupo I) formado pela cepa padrão Bti BR101NA-*B. thuringiensis israelensis* cultivada em meio NA, separada das demais linhagens. O grupo II formado pelas linhagens SX15LB e SPa22LB, ambas *B. safensis* cultivadas em meio LB. No Grupo III, a linhagem SPa07-*Br. halotolerans* cultivada em meio NA, os controles (NA e LB) e as linhagens SBC1-*B. albus* e SP06-*B. thuringiensis*, ambas cultivadas no meio LB (Figura 8).



**Figura 8:** Dendrograma obtido com análise por AAH do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas no sobrenadante (SUP), ionizada de modo positivo (+).

Em relação à análise dos componentes principais (ACP) obtido das substâncias do sobrenadante ionizado de modo positivo, foi observada a formação de três grupos principais (Figura 9). A formação dos três grupos nesta análise coincide com os dados de

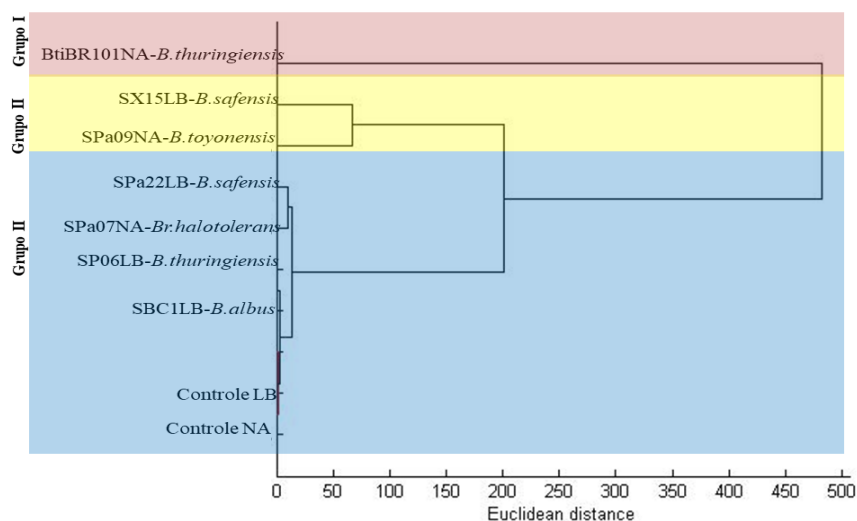
AAH (Figura 8) ionizado de modo positivo, no qual as linhagens BtiBR101NA-*B. thuringiensis israelensis*, SX15LB-*B. safensis* e SPa22LB-*B. safensis* apresentaram componentes que separaram das outras linhagens. As linhagens SPa07NA-*Br. halotolerans*,



SPa09NA-*B. toyonensis*, SBC1LB-*B. albus* e SP06LB-*B. thuringiensis* não apresentaram íons para segregação do controle de seus meios (Figura 9).

**Figura 9:** Gráfico de Score de ACP do perfil de substâncias produzidas por bacilos no sobrenadante SUP, ionizadas de modo positivo.

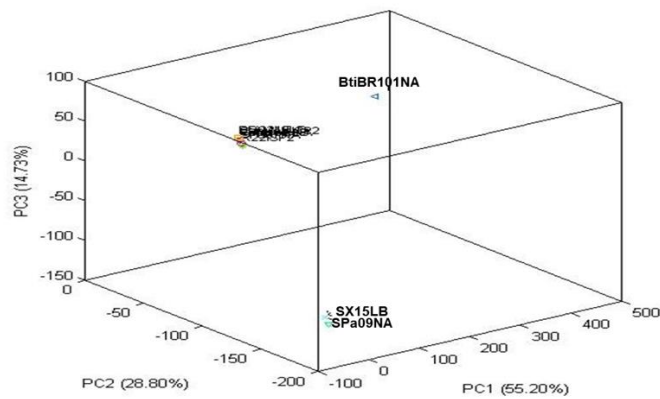
Em relação aos resultados da análise do agrupamento hierárquico (AAH) do sobrenadante ionizado de modo negativo (-), foi observada a formação de três grupos. No grupo I, foi composto pela cepa padrão BtiBR101NA. No grupo II, as linhagens SX15LB-*B. albus* e SPa09NA-*B. toyonensis*. E no grupo III, as linhagens SPa22LB-*B. safensis*, SPa07NA-*Br. halotolerans*, SP06LB-*B. thuringiensis*, SBC1LB-*B. albus* não produziram substâncias para segregarem dos controles do meio de cultivo NA e LB (Figura 10).



**Figura 10:** Dendrograma obtido com análise por AAH do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas no sobrenadante (SUP), ionizada de modo negativo (-).

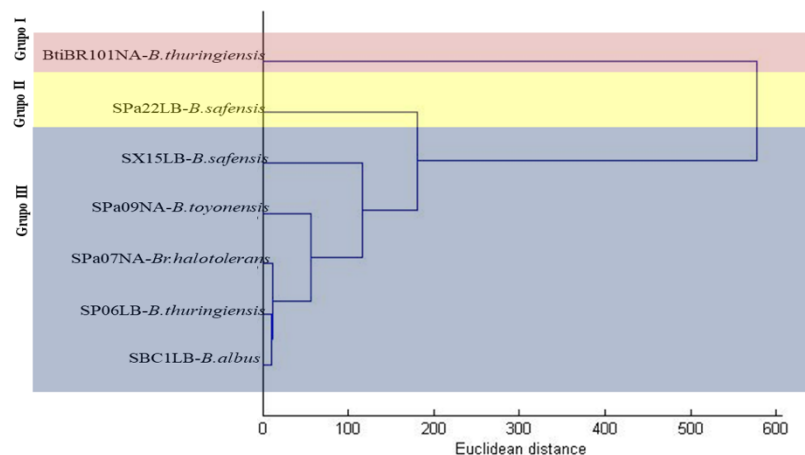
A análise dos componentes principais (ACP) ionizado de modo negativo (-) mostrou também a formação de três grupos. As análises de AAH e ACP do sobrenadante ionizado de modo negativo destas linhagens, coincidem para ambas as linhagens.

Nas linhagens SX15LB e SPa09NA, tanto na análise de ACP como na AAH, se agruparam, mesmo sendo de espécies e cultivos diferentes (Figura 10 e 11). Por exemplo, a linhagem SX15LB compreende uma espécie de *B. safensis* e a SPa09NA - *B. toyonensis*. Neste sentido, alguns ions possibilitaram o agrupamento destas linhagens nesta condição e, estes devem ser investigados. Uma vez que estes íons podem ser semelhantes.



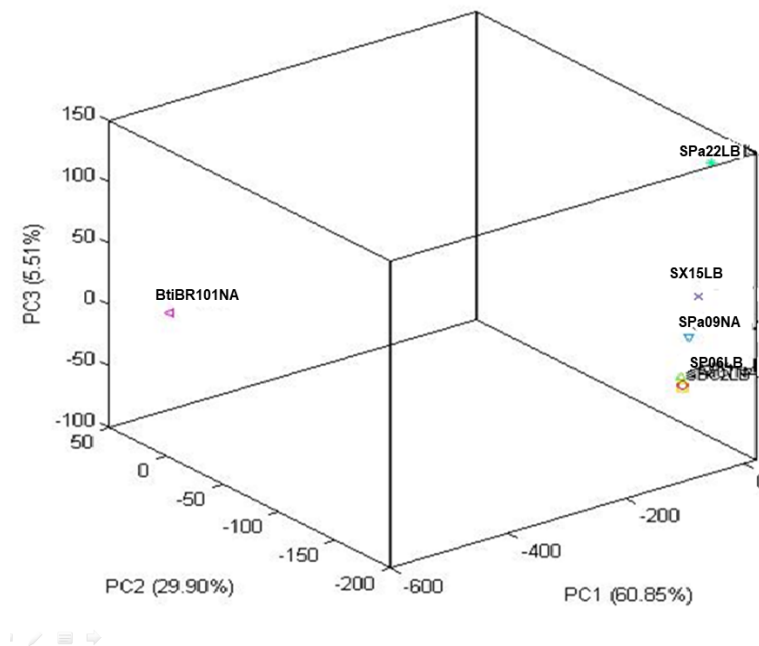
**Figura 11:** Gráfico de Score de ACP do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas no sobrenadante (SUP), ionizadas de modo negativo (-).

Considerando os resultados da análise de agrupamento hierárquico (AAH) do pellet ionizado de modo positivo foi observada a formação de três grupos, sendo o grupo I composto pela linhagem BtiBR101NA-*B. thuringiensis israelensis*, o grupo II por a22LB-*B. safensis* e o grupo III pelas linhagens SX15LB-*B. safensis*, SPa09NA-*B. toyonensis*, SPa07NA-*Br. halotolerans*, SP06LB-*B. thuringiensis* e SBC1LB-*B. albus* (Figura 12).



**Figura 12:** Dendrograma obtido com análise por AAH do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas do pellet (PEL), ionizada de modo positivo (+).

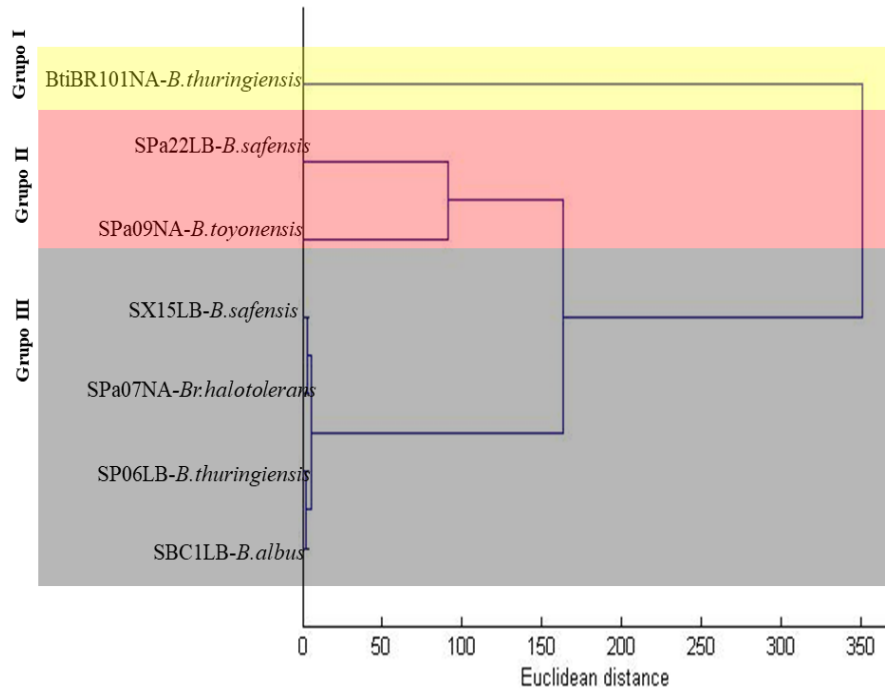
Em relação à análise dos componentes principais (ACP) do pellet ionizado de modo positivo foi observada também a formação de três grupos. O pellet dessas linhagens possuem substâncias que ajudaram na segregação de *BtiBR101NA-B. thuringiensis*, *isralensis* e *SPa22LB-B. safensis* (Figura 13).



**Figura 13:** Gráfico de Score de ACP do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas do pellet (PEL), ionizadas de modo positivo (+).

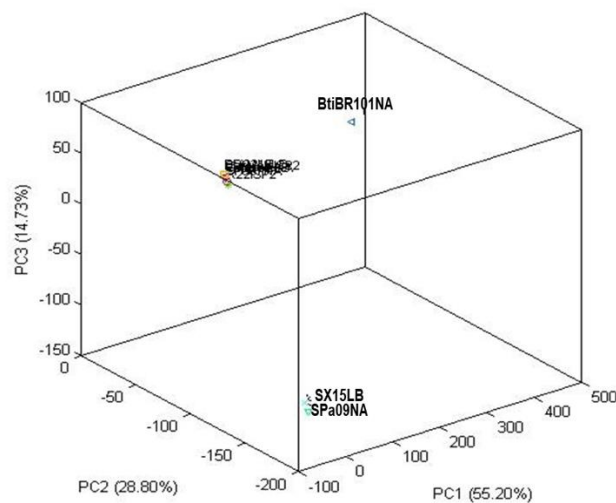
No perfil observado pela análise de agrupamento hierárquico (AAH) do pellet ionizado de modo negativo foi observada a formação de três grupos. O grupo I formado pela linhagem padrão *BtiBR101NA-B. thuringiensis*, o grupo II pelas linhagens *SPa22LB-B. safensis* e *SPa09NA-B. toyoensis*. O grupo III formado pelas linhagens *SX15LB-B. safensis*, *SPa07NA-Br. halotolerans*, *SP06LB-B. thuringiensis*, *SBC1LB-B. albus*. Outro fato considerado importante neste experimento é que linhagem de espécies distintas e cultivadas em meios diferentes apresentarem ions que se agruparam entre elas. Por exemplo, a linhagem *SPa22LB-B. toyonensis* que compreende uma espécie de *B. safensis* e *SPa09NA- B. toyonensis* foram agrupadas nas análises de AAH e ACP (figura 13 e 14).





**Figura 14:** Dendrograma obtido com análise por AAH do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas do pellet (PEL), ionizada de modo negativo (-).

Em relação as análise dos componentes principais (ACP) do pellet ionizado de modo negativo, foi observada a formação também de três grupos coincidindo com os dados de AAH das linhagens (Figura 16 e 17). As linhagens SX15-*B. safensis* e SPa09NA-*B. toyonensis* são espécies distintas e cultivadas em meio diferente. Por outro lado, apresentaram substâncias que se agruparam, pois impedindo a separação destas linhagens distintas (Figura 15 e 16).



**Figura 15:** Gráfico de Score de ACP do perfil de substâncias produzidas pelas linhagens bacterianas no pellet (PEL), ionizadas de modo negativo (-).

Em todas as análises observadas neste experimento, a cepa padrão BtiBR101NA-*B. thuringiensis israelensis* apresentou íons que segregaram das demais linhagens (Figuras 8-15). Não foi possível fazer uma correlação das linhagens com a cepa padrão BtiBR101NA-*B. thuringiensis israelensis* para comparar a proximidade de seus metabólitos ativos, uma vez que esta cepa não apresentou atividade larvicida. Embora esta cepa apresente resultados promissores em ensaios biológicos anteriores contra larvas de *A. aegypti*, neste experimento, não foi observado nenhuma eficiência de seus extratos. Portanto, a correlação dos metabólitos da cepa padrão com as linhagens bacterianas não devem ser consideradas neste estudo.

As linhagens SX15LB-*B. safensis* e SPa22LB-*B. safensis* foram as únicas que conseguiram se agrupar por meio destas análises, uma vez que são das mesmas espécies e cultivadas nos mesmos meios semelhantes (figuras 8 e 9). Por outro lado, estas mesmas linhagens se agruparam com a linhagem SPa22NA-*B. toyonensis* compreendendo uma espécie distinta e cultivada em meio diferente (Figuras 10-11 e 12 -13). Os íons responsáveis por esta segregação devem ser investigados para melhores explicações. As diferenças metabólicas somam-se pontuais e nas intensidades dos picos dos íons. Essas diferenças metabólicas formam pequenos conjuntos de moléculas que atribuem pouca variância a esse gênero no metabolismo secundário intracelular e extracelular.

Nestas análises, devido às linhagens serem de origens, espécies e meios distintos, não ficam totalmente comprovadas que ambas compartilham alguns metabólitos comuns, sendo necessários mais estudos de padronização destas técnicas analíticas. Apesar da necessidade de melhorar a abordagem para o estudo dos perfis químicos de espécies de *Bacillus* e *Brevibacillus*, cujas variáveis de cultivo são difíceis de padronizar, é interessante a viabilidade da técnica para fins taxonômicos desse gênero. Além das variáveis de cultivo, os diferentes parâmetros de ionização e análise devem ser otimizados para a obtenção de espectros reprodutíveis e que levem ao maior número de íons detectados. Um custo benéfico é levando em conta em relação a estas análises. Essas técnicas apresentam menores custos em relação às técnicas de biologia molecular (PIERCE & MOHLER, 2012).

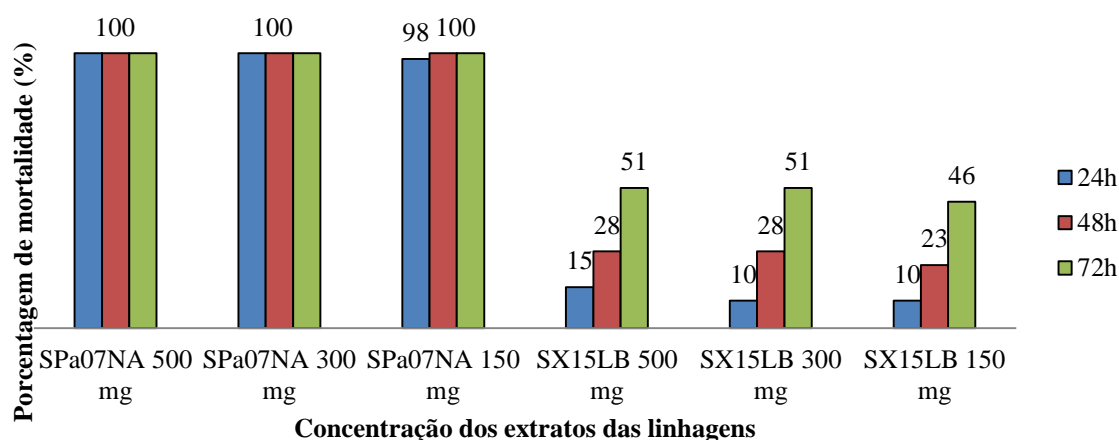
Devido à falta de estudos dos dados espectrais desse gênero de bactérias (*Bacillus* e *Brevibacillus*), torna-se totalmente difícil realizar uma análise comparativa. Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos quimiométricos desses gêneros bacterianos e construção de novas bibliotecas de dados espectrais.

### Avaliação da atividade larvicida dos extratos brutos das linhagens

Após a exposição das larvas aos extratos brutos das linhagens, foram observados que os extratos provenientes do meio líquido metabólico (sobrenadante) foram os mais eficientes para as larvas. Por outro lado, nenhuma atividade larvicida foi observada nos extratos obtidos da biomassa bacteriana (pellet) das linhagens.

Considerando os resultados de mortalidade nas primeiras 24 horas, foi observado que o extrato da cepa SPa07NA-*Br. halotolerans*, apresentou 100% de toxicidade nas concentrações (500 e 300 ppm) e 98% em 150 ppm. A cepa SX15LB-*B. safensis* apresentou 15,10, 10% nas concentrações 500, 300 e 150 ppm, respectivamente (Figura 16).

Em relação à mortalidade do intervalo de 48 horas, foi observado que a concentração 150 ppm do extrato da cepa SPa07NA apresentou 100% de toxicidade. As concentrações 500, 300 e 150 ppm da cepa SX15LB apresentaram 28, 24 e 23% de toxicidade, respectivamente (Figura 16). No intervalo de 72 horas, foi observado que as concentrações 500, 300 e 150 ppm ocasionaram 51, 48 e 46% de toxicidade para esta cepa, respectivamente (Figura 16).



**Figura 16:** Atividade larvicida dos extratos do sobrenadante dos bacilos para larvas de *A. aegypti*.

A toxicidade dos extratos provenientes do meio líquido metabólico das duas linhagens (SPa07NA e SX15LB) foram as mais efetiva. Nos extratos oriundos do pellet das linhagens bacterianas não foi observado nenhuma toxicidade (Figura 16).

Um ponto importante neste estudo é relacionado à cepa padrão *Bti* BR101-*B. thuringiensis israelensis* que apresentou toxicidade em estudos anteriores de 100% tanto no sobrenadante (SUP) quanto no pellet (PEL). Segundo Elleuch et al (2015) e Bravo et al (2011), *B. thuringiensis* secretam metabólitos como proteínas Cry, Cyt, Vip, Sip e enzimas

hidrolíticas com amplo espectro de ação contra diversas ordens de insetos de importância médica e agrícola. Contudo, os extratos provenientes do sobrenadante e do pellet dessa mesma cepa não demonstraram atividade larvicida. As linhagens SPa07NA, SX15LB, SPa09NA, SP06LB, SBC1LB e SPa22LB quando o pellet (PEL) não haviam sido submetido a extração pelos solventes acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) apresentaram efetividade contra as larvas de *A. aegypti*. Por algum motivo desconhecido, essas linhagens perderam totalmente a sua efetividade, podendo ter sido degradados pela ação dos solventes ou não foram extraídos adequadamente.

Nos ensaios biológicos com larvas de *A. aegypti* foi observado a eficiência do extrato da linhagem SPa07NA-*Br. halotolerans* nas primeiras 24 horas, sendo o extrato do meio líquido metabólico eficiente em três concentrações (500, 300 e 150 ppm). O extrato oriundo do pellet (PEL) desta linhagem não apresentou atividade contra as larvas de *A. aegypti*.

A toxicidade da linhagem SPa07NA-*Br. halotolerans* apresentou os melhores resultados nos ensaios larvicidas, sendo que ainda não foram descritos estudos com potencial biológico desta cepa para insetos vetores de doenças e pragas agrícolas. O estado da arte dessa espécie na literatura ainda é bem limitado, uma vez que esta espécie foi recentemente descrita por Song et al (2017), e caracterizada como uma nova espécie.

Os resultados da atividade larvicida dos extratos da cepa SX15LB-*B. safensis*, mostraram que ocorreu uma evolução da toxicidade em relação aos intervalos de 24, 48 e 72 horas, no qual apresentaram resultados semelhantes nas concentrações de 500, 300 e 150 ppm (Figura 16). Este aspecto também é muito importante nos ensaios biológicos, principalmente quando existem outros fatores relacionados, como por exemplo, respostas imunológicas dos insetos, formação de moléculas ativas, sinergismo e diferentes mecanismos de ação.

O conhecimento das bactérias do gênero *Brevibacillus*, como por exemplo, *Br. laterosporus* apresentam amplo espectro de ação contra diversas ordens de insetos da ordem diptera, coleoptera e lepidoptera (RIVERS et al., 1991), assim como também apresentaram toxicidade contra nematódeos e moluscos (RUIU et al., 2006).

Yang e Yousef et al (2018) e Sumi et al (2015), analisaram o genoma de bactérias desse gênero e verificaram que grande parte delas possui genes responsáveis pela biossíntese de antibióticos aplicado no biocontrole. Além disso, este gênero é uma fonte

rica de peptídeos antimicrobianos (AMPs), incluindo gramicidina A e gramicidina S, o primeiro peptídeo linear e cíclico.

Por outro lado, *B. safensis* uma espécie bastante conhecida por ser uma bactéria onipresente em diversos ambientes como solos, campos de petróleo, alimentos e plantas (ABRIL et al., 2019; ISHAG et al., 2016; REKIK et al., 2019; WAHLA et al., 2019). O estudo do controle biológico de *A. aegypti* com a utilização de metabólitos secundários oriundos de *B. safensis* ainda não foram descritos na literatura. Por isso, esses achados são inéditos e promissores nesse campo de pesquisa. O potencial biotecnológico da espécie *B. safensis* possui amplo espectro, como por exemplo, apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas, antiaderente, citotóxicas e são produtores de antibióticos e biossurfactantes (ABDELLI et al., 2019; MAYER & KRONSTAD, 2017). Além disso, *B. safensis* é considerado um grande agente de biocontrole contra patógenos de importância agrícola (fitopatógenos).

A biodiversidade das florestas tropicais como a Amazônia constitui-se em um enorme potencial para descoberta de novos produtos biologicamente ativos. Neste sentido, as linhagens (SPa07NA-*Br. halotolerans* e SX15LB-*B. safensis*) isoladas de diferentes ambientes amazônicos (solo e água) com potencial tóxico para larvas de *A. aegypti* apresentaram grande potencial para o controle biológico deste vetor na região Amazônica.

### **Bioensaios da estimativa da concentração letal (CL<sub>50</sub>) e CL<sub>90</sub> dos extratos de bacilos**

Considerando os resultados deste estudo, não foram observados diferenças estatísticas significativas entre os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, referentes aos extratos dos bacilos SPa07NA-*Br. halotolerans* e SX15LB-*B. safensis* nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Embora não tenham sido encontradas diferenças estatísticas entre os tempos de avaliação, a linhagem SPa07NA-*Br. halotolerans* foi a mais promissora contra as larvas de *A. aegypti*, por apresentar os menores valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (Tabela 6). Por outro lado, os valores da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> da linhagem SX15LB-*B. safensis* não se adequaram nos ajustes do programa estatístico, sendo necessárias mais padronização das análises estatísticas.

Até o presente momento ainda não foram encontrados estudos da espécie *Br. halotolerans* com extratos metabólicos ativos contra insetos vetores de doenças tropicais e pragas agrícolas. Dessa forma, torna-se necessário rastrear as substâncias presentes nos extratos e elucidar os mecanismos de patogenicidade desta linhagem.

**Tabela 6:** Concentração letal LC<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em mg/L, dos extratos dos bacilos para as larvas de *A. aegypti*.

Linhasgens	CL50% (IC95)	CL90% (IC95)	Slope±	X <sup>2</sup>
24h				
<b>SPa07NA</b>	0.048 (0.029-0.067)a	0.279 (0.182- 0.643)a	1.681(±0.159)	5
<b>SX15LB</b>	6.692 (2.027-141.091)a	205.60 (22.115-67708)a	0.862 (±0.197)	5
48h				
<b>SPa07NA</b>	0.030 (0.017-0.043)a	0.181 (0.128-0.330)a	1.656 (±0.176)	5
<b>SX15LB</b>	2.971 (1.012- 53.660)a	505.37 (34.428-0.88390E+06)a	0.575 (±0.139)	5
72h				
<b>SPa07NA</b>	0.019 (0.010- 0.027)a	0.101 (0.079- 0.144)a	1.778 (±-0.215)	5
<b>SX15LB</b>	0.159 (0.091-0.385)a	179.68 (11.929-0.32331E+07)a	420 (±0.122)	5

\*Legenda: CL = Concentração letal; IC = Intervalo de confiança;  $\chi^2$  = qui-quadrado; GL = Grau de liberdade; SE = Erro padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem de acordo com o teste t de Student ( $p > 0,05$ )

## CAPÍTULO III

### **Estudo Químico e Biológico da linhagem *Brevibacillus halotolerans* isolada da Amazônia para o controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**

Ricardo de Melo Katak, Marta Rodrigues de Oliveira, Elerson Matos Rocha; Rosemary Aparecida Roque; Afonso Leão Duarte, Antonia Queiroz Lima de Souza, Wanderli Pedro Tadei.

#### **Material e Métodos**

##### **Reativação e purificação da linhagem bacteriana**

A linhagem utilizada neste experimento foi obtida do isolamento de amostras de solo da Amazônia, caracterizada pelo sequenciamento do gene *16S rRNA* como *Brevibacillus halotolerans* MT052647 e depositadas no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue-INPA.

Primeiramente, em tubos de ensaios com capacidade de 10 ml, contendo 2 ml do meio Nutrient Broth (5 g de tecido animal, 5g de cloreto de sódio, 1.5 g extrato de carne, 1.5 g de extrato de levedura), foram adicionados 20 µl do cultivo bacteriano. Em seguida, foi incubado em estufa rotativa a 30 °C em 180 rpm por 24 horas. Posteriormente, 20 µl deste cultivo foram transferidos para placas de Petri, contendo o respectivo meio. Com uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada em bico de busen foi feito o espalhamento. As placas foram incubadas na câmara B.O.D a 28 °C, por 24 horas para o crescimento das colônias. Posteriormente, com auxílio de uma alça de Drigalsky, foi feita a purificação das colônias pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas.

##### **Produção e padronização dos extratos em pequena escala**

Com uma alça de platina, uma colônia bacteriana da linhagem SPAa07NA-Br: *halotolerans* foi transferida para os respectivos meios contendo 5 ml e incubados a 30 °C em 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente, 1000 µl foram retirados e adicionados em frascos de 250 ml contendo 100 ml dos respectivos meios. Os cultivos em escala preparativa foram feitos em quintuplicata, incluindo a amostra controle e incubadas em agitação em estufa rotativa a 180 rpm a 30 °C durante, 24, 48, 72, 120, 168 e 240 horas.

Neste experimento, foi realizado a medição de glicose e pH das amostras periodicamente pelas tiras de fita de Urinálise da marca Uroclin<sup>®</sup>.

O meio líquido cultivado de cada intervalo foi centrifugado a 2800 g por 40 minutos para obtenção do sobrenadante. Posteriormente, o meio líquido metabólico (sobrenadante) dos intervalos cultivados foram recobertos com 20% da mistura de acetato de etila (AcOEt) e Isopropanol (iPr-OH) 9:1 volume/volume (v/v). Após isso, 20 µl das amostras foram plaqueadas em placas de petri contendo o meio Nutriente Broth e incubadas a 30°C durante 96 horas para verificar se existe a presença do crescimento de células bacterianas.

Os frascos de vidro foram agitados vigorosamente para misturar as fases, deixados durante 24 h em repouso e em seguida foi retirado uma alíquota de 40 µl da fase orgânica e colocados em vials de vidro contendo 160 µl de metanol (MeOH) grau HPLC. Após isso, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas (EM) utilizando uma fonte de Electrospray ionization (ESI) por inserção direta em um espectrômetro de massas (Thermo Fisher), onde a faixa de massa observada foi de 100 a 1000 m/z tanto no modo positivo quanto no modo negativo (KOOLEN, 2011). Em seguida, o líquido cultivado foi reunido e submetido à partição com AcOEt/iPr-OH 9:1 e extraído três vezes.

Todos os extratos obtidos foram concentrados em rotoevaporador, sob pressão reduzida com bomba de vácuo e mantidos em dessecador com sílica ativada. Após secos, os extratos foram pesados e armazenados.

### **Bioensaios seletivos dos extratos brutos contra larvas de *Aedes aegypti***

Os extratos brutos dos diferentes intervalos produzidos pela cepa *Br. Halotolerans* foram testadas seletivamente, objetivando selecionar o melhor tempo de cultivo e a produção de metabólitos bioativos.

### **Obtenção das larvas de *Aedes aegypti***

As larvas foram obtidas a partir de insetário do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LCBBMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Os ovos foram colocados em bacias de plástico retangulares (12 x 22 x 4 cm) contendo 200 ml de água. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas a partir de uma mistura de ração de peixe (Teklab global) e de gato ração Wiskas<sup>®</sup>, na proporção de 1:1 (LIMA et al., 2009). As larvas foram mantidas em temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade



relativa de 80-90% e fotofase de 12h, posteriormente, larvas de 3º instar foram selecionadas para os bioensaios.

### **Ensaio biológicos a partir dos extratos**

Na realização dos bioensaios seletivos foram utilizados seis extratos da cepa, do qual foram extraídos de diferentes intervalos de cultivo (24, 48, 72, 120, 168 e 240 horas) e testados contra larvas de *A. aegypti*. Os experimentos foram realizados de acordo com Dimalge et al (1990) e WHO (2005), com modificações.

Os bioensaios foram realizados em triplicatas, onde foi montada uma réplica de três copos plásticos contendo 10 ml de água destilada, alimento e 10 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Após aplicação dos extratos, as leituras de mortalidade ocorreram nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, em condições controladas, com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 70 a 80%, fotofase de 12 h (12L: 12D).

### **Análise do perfil dos extratos obtidos em diferentes tempos de cultivo**

Os extratos obtidos em diferentes tempos de cultivo foram analisados por espectrometria de massas. As amostras foram solubilizadas em MeOH grau HPCL, na qual utilizou 40 µl de amostra diluído em 160 µl de MeOH. O equipamento utilizado foi espectrômetro da Thermo Fisher, com a fonte Ionization Electrospray ESI-MS, na faixa de 100 a 1000 m/z em modo positivo (KOOLEN, 2011).

### **Fracionamento dos extratos brutos e ensaios larvicidas**

O extratos obtidos do cultivo de 72 horas (3D) e 120 (5D) foram selecionados por ocasionarem maior toxicidade nas larvas de *A. aegypti*.

Os extratos denominados 3D e 5D da linhagem SPa07NA-*Br. halotolerans*, foi solubilizada em 100% de MeOH grau HPLC e submetida a extração em fase sólida (SPE), utilizando 7 mg de resina de fase estacionária C8, em cartucho da *Applied Separations*. A fase foi acondicionada com MeOH 30% e em seguida a pastilha contendo a amostra misturada na mesma fase foi inserida na coluna.

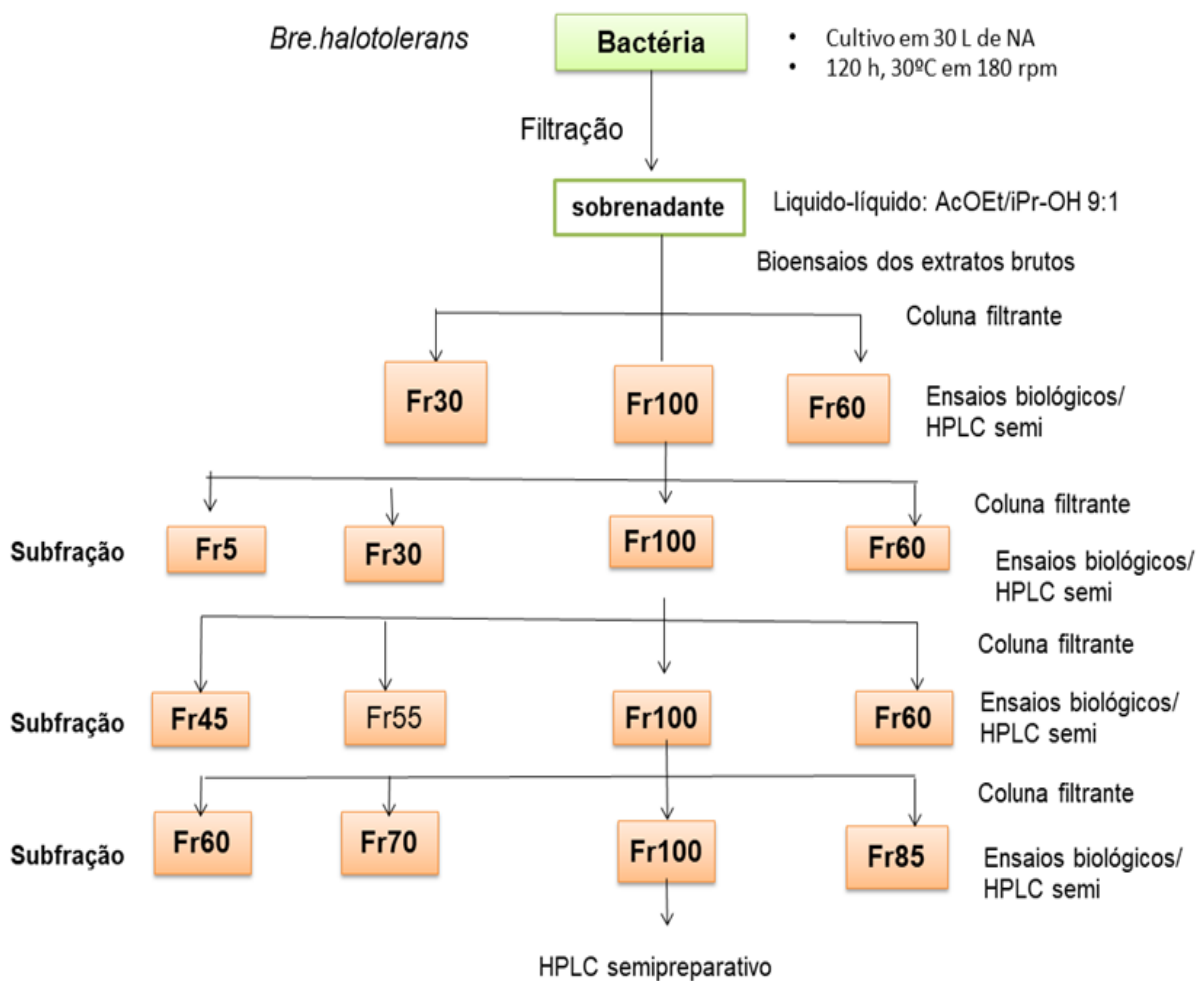
Na extração dos arrastes dos compostos, utilizou-se 48 ml de MeOH aquoso em ordem crescente de força, nas concentrações de: MeOH 30%, MeOH 60% e MeOH 100% (3 x 48 ml). Cada fração foi coletada e posteriormente concentrada a  $45^\circ\text{C}$  em

rotaevaporador para retirar o máximo de metanol possível. As frações obtidas dos intervalos de cultivo foram pesadas e utilizadas para os ensaios larvicidas.

A fração ativa (Fr5D100%) nos testes larvicidas foram subfracionadas em quatro. Primeiramente, iniciou-se por coluna filtrante em sílica gel, sob pressão reduzida, eluída com MeOH, em gradiente de polaridade crescente, na qual foi obtido três frações de cada extrato: Fr5D5%, Fr5D60% e Fr5D100%. Posteriormente, essas frações foram testadas com as larvas de *A. aegypti*. Os experimentos foram realizados de acordo com Dumalge et al (1990) e WHO (2005).

### Estudos dos metabólitos da cepa *Br. halotolerans*

Ilustração do cronograma da produção, ensaios biológicos, fracionando e purificação dos metabólitos.



**Figura 17:** Fluxograma da metodologia do estudo dos metabólitos da linhagem SPa07NA.

### **Preparo dos extratos de *Br. halotolerans* - escala preparativa.**

Depois de selecionado o melhor tempo de cultivo, referente à toxicidade, tempo de cultivo e rendimento dos extratos, foi realizado um estudo bioguiado dos extratos para rastrear o princípio ativo tóxico para as larvas de *A. aegypti*.

Primeiramente, com uma alça de platina, uma colônia bacteriana da cepa SPAa07NA-*Br. halotolerans* foi transferida para os respectivos meios contendo 5 ml e incubados a 30 °C, em 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente, 1000 µL foram retirados e adicionados em frascos de 500 ml contendo 300 ml de Nutrient Ágar. Os cultivos em escala preparativa foram feitos em quintuplicata, incluindo a amostra controle e incubadas em agitação em estufa rotativa a 180 rpm a 30 °C durante 120 horas. Os experimentos foram realizados em seis bateladas, totalizando 35 litros de meio de cultivo. Neste experimento, foi realizado a medição de glicose e pH das amostras periodicamente. O líquido cultivado foi reunido e submetido à partição com AcOEt/iPr-OH 9:1 e extraído três vezes. Todos os extratos obtidos foram concentrados em rotoevaporador rotativo, sob pressão reduzida com bomba vácuca e mantidos em dessecador com sílica ativada. Após secos, os extratos foram pesados e armazenados.

Os extratos foram testados seletivamente contra as larvas de *A. aegypti* para confirmar a toxicidade descrita anteriormente.

### **Fracionamento em coluna cromatográfica de vidro (fase reversa) e extração em fase sólida (SPE)**

Após a confirmação da toxicidade dos extratos para as larvas de *A. aegypti*, foi realizado o fracionamento e a purificação dos extratos. Neste caso, utilizou-se uma coluna de vidro de 30 cm, com fase reversa (C8) de 12 cm. A fase foi acondicionada com MeOH 30% e em seguida a pastilha contendo a amostra misturada na mesma fase foi inserida na coluna.

Para a extração e arraste dos compostos, utilizou-se 48 ml de MeOH aquoso em ordem crescente de força, nas concentrações de: MeOH 30%, MeOH 60% e MeOH 100% (3 x 48 ml). Cada fração foi coletada e posteriormente concentrada (45°C) em rotoevaporador para retirar o máximo de metanol possível. Em seguida realizou-se a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction-SPE*) para remover da solução de metanol no composto residual. Para a extração em SPE foi utilizada uma minicoluna contendo 100 mg de sílica de gel C8. Cada coluna de sílica foi ativada com metanol 100% e condicionada

com 3 ml de MeOH 5%. Em seguida, cada amostra foi adicionada e filtrada a vácuo, em cuba de SPE para retenção pela fase, realizando-se por fim a extração do material retido com 5 ml de MeOH. Após a obtenção das frações dos extratos foram realizados os ensaios larvicidas.

#### **Subfracionamento em cartucho SPE (extração em fase sólida)**

A fração Fr100 ativa em todos os ensaios foi solubilizada em MeOH grau HPLC e submetida a extração em fase sólida (SPE), utilizando 7 mg de resina de fase estacionária C8, em cartucho da *Applied Separations*. Para a extração e arraste dos compostos, utilizou-se 48 ml de MeOH aquoso em ordem crescente de força, nas concentrações de: MeOH 45%, MeOH 55%, MeOH 65% e MeOH 100% (3 x 48 ml).

Após a obtenção das frações e os ensaios larvicida foram realizados um novo subfracionamento da fração Fr100. Os arrastes dos compostos foram feitos nas concentrações de: MeOH 60%, MeOH 70%, MeOH 85% e MeOH 100%. Após a obtenção dos extratos foi realizado a atividade larvicida.

#### **Fracionamento da fração (Fr100) em HPLC semi preparativo**

Cerca de 1 mg foi solubilizado com 1000 µl de MeOH, submetida ao fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo modelo UFLC (Shimadzu) equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, modelo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µl). Nesta etapa utilizou-se coluna C18 (Luna) (5 µm, 250x15 mm) (Phenomenex). Com fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa de acetato de amônio (0,2%) (B), modo isocrático de eluição 70% em 40 minutos. O detector de ultravioleta operou nas faixas 220 e 280 nm. O método semipreparativo se encontra em fase de padronização para o isolamento e caracterização das moléculas ou substâncias.

### **Resultados e discussão**

#### **Cultivo e caracterização microscópica da linhagem *Brevibacillus halotolerans***

A linhagem SPa07NA-*Br. halotolerans* que apresentou os melhores resultados de toxicidade contra larvas de *A. aegypti* no extrato bruto obtido do meio líquido extracelular (sobrenadante) foi submetido ao estudo do perfil e estudo químico.

As análises micromorfológica da parede celular e da morfologia mostraram que esta linhagem teve um bom crescimento e sem contaminação, confirmando a pureza das colônias bacteriana durante o crescimento em 24 horas (Figuras 18-A e B).

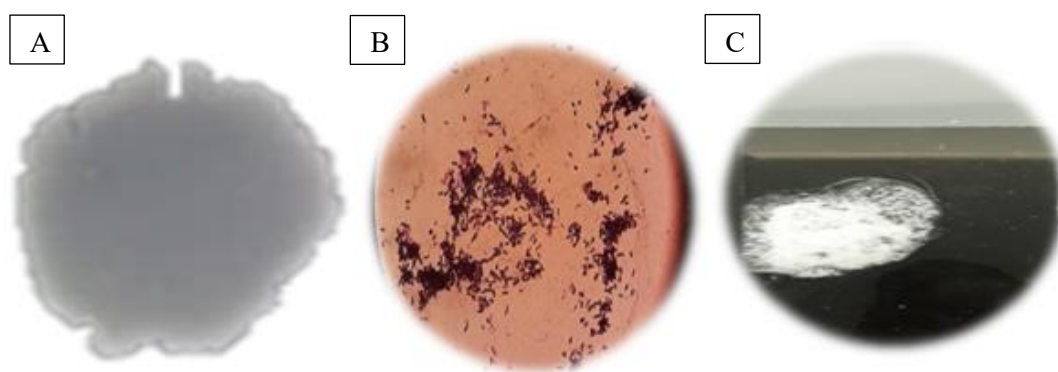
A presente bactéria utilizada no estudo testou positiva no teste de catalase, apontando a presença dessa enzima no microrganismo, corroborando com dados encontrados na literatura. Nota-se que a catalase acelera a degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio ( $2H_2O_2 + \text{catalase} \rightarrow 2H_2O + O_2$ ). Essa reação é evidente pela rápida formação de bolhas (Figura 18-C).

Testes enzimáticos são cruciais para a identificação da bactéria, além disso, alguns microrganismos contam com mecanismos de defesa que permitem que eles reparem ou escapem do dano oxidativo do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Para tanto, algumas bactérias produzem a enzima catalase que facilita a desintoxicação celular. A catalase neutraliza o efeito bactericida do peróxido de hidrogênio e a sua concentração presente na bactéria tem sido relacionada com a patogenicidade (REINER, 2010).

Segundo Reiner (2010), o teste de catalase também é valioso na diferenciação de bactérias aeróbias e anaeróbias, visto que, bactérias anaeróbias geralmente não produzem essa enzima. Comumente, o gênero *Brevibacillus* apresenta organismos aeróbios ou anaeróbios facultativos (RAY et al., 2020).

Testes enzimáticos são cruciais para a identificação da bactéria, além disso, alguns microrganismos contam com mecanismos de defesa que permitem que eles reparem ou escapem do dano oxidativo do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Para tanto, algumas bactérias produzem a enzima catalase que facilita a desintoxicação celular. A catalase neutraliza o efeito bactericida do peróxido de hidrogênio e a sua concentração presente na bactéria tem sido relacionada com a patogenicidade (REINER, 2010).

Segundo Reiner (2010), o teste de catalase também é valioso na diferenciação de bactérias aeróbias e anaeróbias, visto que, bactérias anaeróbias geralmente não produzem essa enzima.



**Figura 18:** Caracterização fenotípica da cepa SPa07NA- *Br. halotolerans*.

**Legenda:** **A:** morfologia macroscópica, com bordas irregulares e cores opacas. **B:** coloração morfotintorial (coloração de Gram), células em formatos de bacilos, gram positivos. **C:** teste de catalase em lâminas.

### **Produção, otimização e atividade larvicida dos extratos**

Os resultados do pH mostraram que ao longo do tempo, as substâncias produzidas a partir da cepa, tornaram o pH do meio mais ácido, com o valor de 6.5 durante 24 a 120 horas, porém cai gradativamente para 6.0 no intervalo de 168 a 216, tornando-se mais ácido o pH do meio (Tabela 7). O controle do meio permanece constante durante todas as fases do experimento. As condições de cultivos relacionados ao pH e o tempo de cultivo são cruciais para otimizar os processos na produção de metabólitos.

A produção de metabólitos secundários de origem microbiana depende dos estágios de crescimento, como por exemplo, a fase vegetativa e estacionária. Assim como também processos vitais das células microbianas, tais como a duplicação de cromossomos ou níveis intermitentes de atividades metabólicas primárias (SCHAREK-TEDIN et al., 2013).

Diante disso, conhecer esses parâmetros é importantíssimo, uma vez que esta cepa possui potencial para um novo entomopatógeno para o controle biológico, além disso, é caracterizada recentemente como uma nova espécie do gênero *Brevibacillus*. Song et al (2017), relataram que *Br. halotolerans* é capaz de tolerar até 12% de NaCl, mantendo suas condições de crescimento em pH de 7,0 a 8,0 e temperatura de cultivo até 30 °C.

Em relação a essas informações obtidas, mais estudos relacionados ao pH, rendimentos, glicose ou outras fontes de carbono são necessários para o conhecimento desta linhagem, isolada de solo da Amazônia.

Em relação aos rendimentos dos extratos foi observado o maior rendimento dos extratos quando cultivados em 48 horas, seguido das ordens decrescentes, tais como; 24, 216, 120, 72 e 168 horas (Tabela 7).

Analisando a leitura da glicose nos intervalos de 24 a 216 horas dos experimentos, foi observado que tanto nos cultivos e no controle, a glicose permaneceu positiva (Tabela 7). Os parâmetros de glicose avaliados indicam o consumo de carbono e a produção de metabólitos secundários. Este relato foi observado no estudo de Banhos (2016), no qual observou por meio do perfil metabólico e proteômico de fungos do gênero *Pestalotiopsis*, o consumo de glicose como fonte de carbono e, possivelmente indicando a fase estacionária como potencial para produção de metabólitos secundários. Contudo, o meio de cultivo observado não apresenta glicose em sua composição, tornando o meio de cultivo Nutrient Broth inviável de avaliar nesta metodologia. Por outro lado, faz-se necessário estudar outros meios de cultivo para avaliar esses parâmetros.

Considerando os resultados da atividade larvicida nas primeiras 24 horas, os extratos obtidos do 3d (72 h) e 5d (120 h) dia de cultivo apresentaram 100% de toxicidade para as larvas de *A. aegypti*. Os demais extratos de outros intervalos apresentaram toxicidade entre 60-93.3% (Tabela 7).

Em relação ao intervalo de 48 horas de exposição, os extratos 7d (168 h) e 10d (216 h) dia apresentaram 100% de toxicidade para as larvas. Os extratos do 1d (24 h) e 2d (48 h) dia apresentaram 93.3% e 70%, respectivamente. No intervalo de 72 horas, todos os extratos apresentaram 100% de toxicidade (Tabela 7).

O potencial tóxico da cepa SPa07NA-*Br. halotolerans* chama atenção neste estudo, devido ser um dos primeiros trabalhos onde foi observado toxicidade para larvas de *A. aegypti*. Além disso, os metabólitos secretados durante os 10 dias de cultivos, apresentaram atividade larvicida, sem alteração entre os dias.

Embora os extratos mais tóxicos do 3d e 5d dia não tivesse o maior rendimento, optou-se por selecionar estes para os estudos bioguiado devido à alta toxicidade nas primeiras 24 horas para as larvas de *A. aegypti* (Tabela 7).

**Tabela 7:** Dados de pH, rendimento, glicose e atividade larvicida da cepa SPa07NA- *Br. halotolerans* em diferentes intervalos de cultivo.

Tempo de crescimento	pH	Rendimento (mg)	Glicose	Atividade larvicida		
				24h	48h	72h
1 dia (1D)	6.5	33.4 mg	Negativa	93.3%	93.3%	100%
2 dia (2D)	6.5	39.3 mg	Negativa	60%	70%	100%
3 dia (3D)	6.5	22.6 mg	Negativa	100%	-	-
5 dia (5D)	6.5	26.3 mg	Negativa	100%	-	-
7 dia (6D)	6.0	18.3 mg	Negativa	90%	100%	-
10 dia (7D)	6.0	29 mg	Negativa	76%	100%	-
Controle	7.0	10 mg	Negativa	0%	0%	0%

### **Análise do perfil químico dos extratos obtidos em diferente intervalo de tempo**

Considerando os resultados do perfil químico ionizado de modo positivo, foi observado que o cultivo de 24 a 240 horas não alterou significativamente o perfil do meio de cultivo. Por outro lado, foi observada a intensidade dos picos majoritários, como observado no cultivo de 72 h, o íon 294 m/z apareceu menos intenso. Todavia, o íon 689 m/z foi o mais intenso durante este intervalo de cultivo. Os íons majoritários 199 e 408 m/z estão presentes em todos os intervalos observados nos espectros (Figura 19). Além disso, foi observado no intervalo de 120 horas um íon de 946 m/z mais intenso que os demais intervalos.

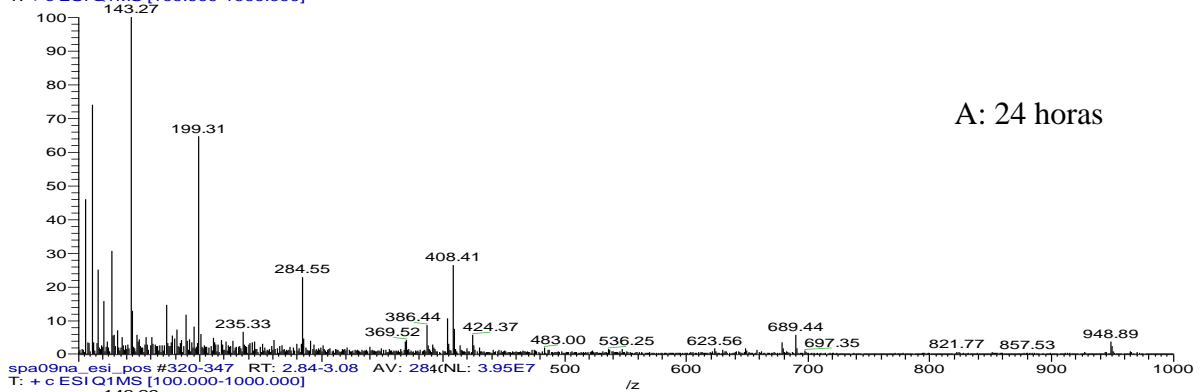
Diante disso, estes resultados podem inferir que o acompanhamento por espectrometria de massa pode ser utilizado como abordagens para o acompanhamento das fases de crescimento desses microrganismos, com a vantagem de ser útil na observação dos sinais dos metabólitos microbianos, tornando o processo mais eficiente e possibilitando o aumento no rendimento de compostos bioativos pelo aperfeiçoamento da etapa de caracterização e produção de biomoléculas.

Em relação ao perfil químico obtido, não é possível afirmar que estes íons observados são os responsáveis pela atividade biológica contra as larvas de *A. aegypti*, mas torna-se evidente a presença do íons majoritários 408 e 946 m/z no cultivo de 120 horas, e por apresentar a maior toxicidade contra as larvas deste mosquito nas primeiras 24 horas, podemos relacionar essa atividade à presença de substâncias ativas (Figura 19). Devido à

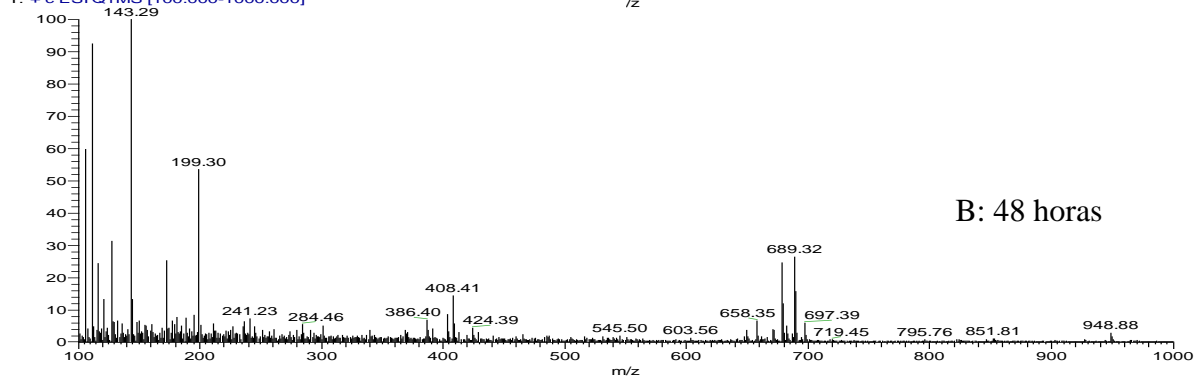


falta de dados espectrais de *Brevibacillus* spp. na literatura, fica difícil comparar os íons presentes nos diferentes intervalos de cultivos. Dessa forma, estudos adicionais serão necessários para investigar os íons responsáveis pela atividade biológica desta linhagem.

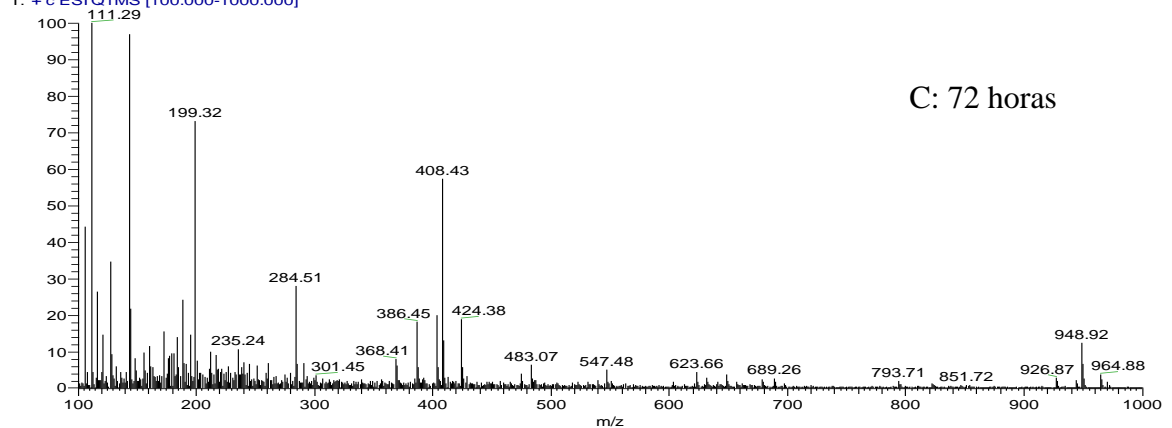
spa09na\_esi\_pos #397-419 RT: 3.53-3.72 AV: 23 NL: 5.21E7  
T: + c ESI Q1MS [100.000-1000.000]

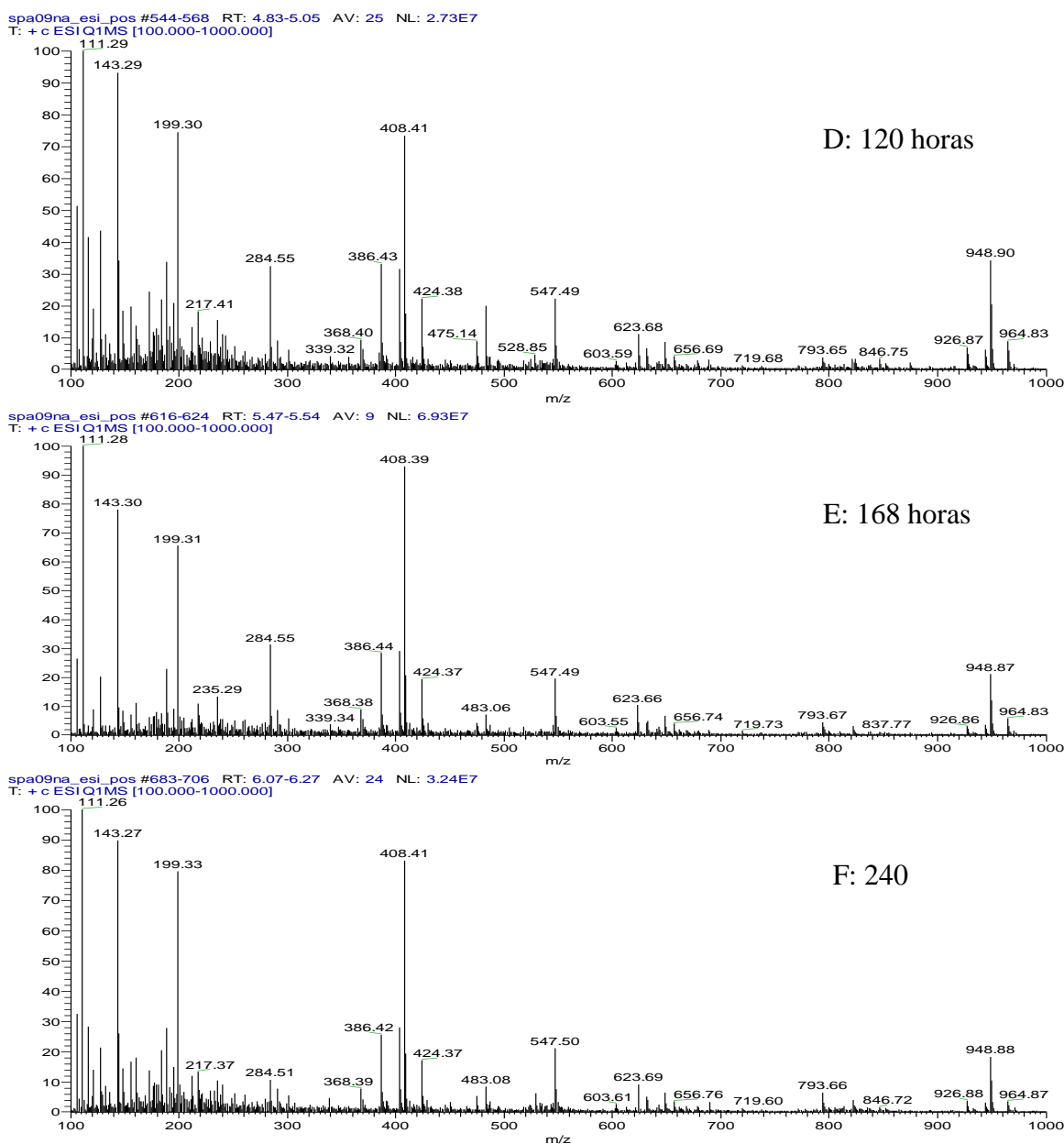


spa09na\_esi\_pos #320-347 RT: 2.84-3.08 AV: 284(NL: 3.95E7  
T: + c ESI Q1MS [100.000-1000.000]



spa09na\_esi\_pos #473-490 RT: 4.20-4.35 AV: 18 NL: 4.32E7  
T: + c ESI Q1MS [100.000-1000.000]





**Figura 19:** Perfil químico dos extratos metabólicos da linhagem SPa07NA. A: cultivo de 24 horas, B: cultivo em 48 horas; C: cultivo em 72 horas; D: cultivo em 120 horas e E: cultivo em 168 horas e F: cultivo em 240 horas.

### Rendimento e atividade das frações dos extratos 3d e 5d

Os resultados das frações dos extratos de 72 h (3d) e 120 h (5d) mostraram que a fração de ambos foram mais eficiente na fração (FR100%) de 5d apresentando 100% de toxicidade nas primeiras 24 horas. Por outro lado, a fração 3d100% apresentou toxicidade de 40, 50% e 60% no intervalo de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela 8).

Diante dos resultados observados, tornou-se necessário selecionar as frações que apresentaram maior toxicidade, no caso a fração de 100% obtida no 5º dia denominada Fr100%. Devido o baixo rendimento para o isolamento das substâncias, foi necessário produzir mais extratos nas mesmas condições que foram otimizadas anteriormente (Tabela 8).

**Tabela 8:** Atividade larvicida das frações obtidas durante no 3º e 5º dia de cultivo da cepa SPa07NA.

Fração	Rendimento (mg)	Atividade larvicida		
		24h	48h	72h
3d 5%	2.5 mg	0%	0%	0%
3d 30%	4 mg	20%	25%	30%
3d 60%	7 mg	0%	0%	0%
3d 100%	9.1 mg	40%	50%	60%
5d 5%	2 mg	0%	0%	0%
5d 30%	5 mg	10%	12%	15%
5d 60%	8 mg	20%	20%	30%
5d 100%	11.3 mg	100%	-	-

### **Produção de extratos em larga escala do 5d e atividade larvicida das frações *Brevibacillus halotolerans***

Considerando os resultados dos extratos obtidos no 5º dia (5d) da linhagem *Br. halotolerans*, no qual apresentou 100% de toxicidade nas primeiras 24 horas para larvas, é possível prever que essa linhagem SPa07NA possui metabólitos secundários com potencial antagônico para as larvas. Neste sentido, rastrear esses princípios ativos para tentar elucidar as moléculas ativas e sua patogenicidade contra as larvas, foi às etapas mais desafiadoras da tese.

O extrato bruto ativo foi subdividido em quatro frações nas concentrações de Fr5, Fr30, Fr60 e Fr100. Os resultados de mortalidade nas primeiras 24 horas, mostraram que as frações Fr100 e Fr30, apresentaram 90% e 20% de toxicidade, respectivamente. No intervalo de 48 horas, as frações Fr100 e Fr30 apresentaram 100% e 30% de toxicidade, respectivamente. Em relação ao intervalo de 72 horas, a Fr30 apresentou 50% de toxicidade. Por outro lado, as demais frações não apresentaram toxicidade nos intervalos de

24 a 72 horas. Devido à falta de massa na Fr5% para o experimento, não foi possível realizar o teste larvicida (Tabela 9).

**Tabela 9:** Atividade larvicida das frações dos extratos do 5d da linhagem SPa07NA

Fração	Atividade larvicida		
	24h	48h	72h
FR100%	90%	100%	-
FR60%	0%	0%	0%
FR30%	20%	30%	50%
Controle DMSO	0%	0%	0%
Controle H <sub>2</sub> O	0%	0%	0%

De acordo com o perfil de toxicidade e a complexidade das substâncias presentes nas frações, foi necessário adotar estratégias de padronização para a purificação e isolamento das substâncias. Os resultados do HPLC-semi preparativo mostraram a complexidade das substâncias presentes nas frações, dificultando o isolamento das moléculas (dados não mostrados).

Diante da complexidade das substâncias não puras da fração ativa Fr100% observados no método semipreparativo por meio do HPLC, foi necessário subfracionar em quatro subfrações, tais como SFr45, SFr55, SFr60 e SFr100 (Tabela 10, subfração I) . Os resultados de mortalidade observados nas primeiras 24 horas, evidenciaram que as frações SFr100 e SFr60, apresentaram 90% e 20% de mortalidade, respectivamente.

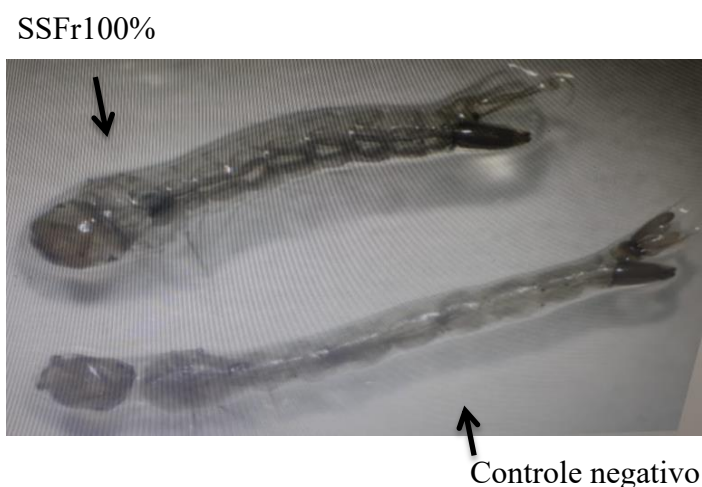
No intervalo de 48 horas, as subfrações SFr100 e SFr60, apresentaram 100% e 30% de toxicidade para as larvas, respectivamente. Já no intervalo de 72 horas, a SFr60 apresentou 51% de toxicidade (Tabela 10, subfração I)

Um fator importante analisado neste experimento, é que os resultados dos fracionamentos e subfracionamentos, demonstraram que as maiores efetividades larvicidas das frações encontram-se quando são eluídos com MeOH na concentração de 100%. Porém, as substâncias presentes nas subfrações apresentam muita complexidade, dificultando o isolamento das moléculas ou substâncias. Neste sentido, a abordagem necessitou de mais um fracionamento da subfração SFr100 para purificação das amostras, no qual rendeu mais quatro subfrações; SSFr60, SSFr70, SFr85 e SSFr100 (Tabela 10,

subfração II). Os resultados da atividade larvicida observados nas primeiras 24 horas, mostraram a toxicidade das subfrações SSFr100 e SSFr85 com 50 e 20% de toxicidade para as larvas, respectivamente. Os resultados de mortalidade de 48 horas, mostraram 90% e 30% de toxicidade para as subfrações SFr100 e SSFr85, respectivamente. No intervalo de 72 horas, a toxicidade das subfrações SSFr100 e SSFr85 foram de 100 e 51%, respectivamente (Tabela 10, subfração II).

Diante dos resultados observados, nota-se que à medida que as frações são subfracionadas e purificadas é possível observar que os princípios ativos vão diminuindo a sua toxicidade. Os resultados da atividade larvicida (Tabela 10), mostraram a evolução larvicida nos intervalos de 24 a 72h, ou seja, quanto maior o tempo de exposição das larvas aos metabólitos, pois maior será sua efetividade.

Os resultados encontrados no presente estudo tem mostrado a eficácia dos metabólitos extraídos da linhagem *Br. halotolerans* no 5º dia de cultivo para as larvas de *A. aegypti* (Figura 20).



**Figura 20:** Ação larvicida dos extratos. SSFr100%: fração ativa contra as larvas mostrando a morte das larva expostas aos extratos; Controle negativo: larva saudável exposta a H<sub>2</sub>O e DMSO.

Em relação ao potencial biotecnológico da cepa *Br. halotolerans* há pouco conhecimento sobre o potencial desta espécie, uma vez que foi recentemente caracterizada como uma nova espécie (SONG et al., 2017). Por outro lado, sabe-se que o gênero dessa espécie possui atividades antimicrobianas, antifúngicas e entomopatogênicas (PANDA et al., 2014; RUIU et al., 2013). A espécie *Br. laterosporus*, como por exemplo, foi isolado um

antibiótico lipopeptídeos denominado tauramamida (DESJARDINE et al., 2007). Esta categoria de lipopeptídeos possuem atividades antimicrobianas, antifúngicos e antivirais (HUANG et al., 2006).

O estudo direcionado para elucidar o princípio ativo, encontra-se em andamento devido à complexidade das substâncias presentes nas frações ativas. A linhagem isolada do solo amazônico encontra-se em processo de elucidação do seu princípio ativo, uma vez que esta cepa foi caracterizada como uma nova espécie. Portanto, elucidar seu princípio ativo contra as larvas de *A. aegypti* aumenta o potencial desta linhagem se tornar uma nova ferramenta para o controle biológico do vetor na Região.

**Tabela 10:** Atividade larvicida das subfrações da fração Fr5D100 em duas subfrações I e II da cepa *Br. halotolerans*

SubFração I	Atividade larvicida			SubfraçãoII	Atividade larvicida		
	24h	48h	72h		24h	48h	72h
SFr45%	0%	0%	0%	SSFr100%	50%	90%	100%
SFr55%	0%	0%	0%	SSFr85%	20%	30%	50%
SF65	20%	30%	45%	SSFr75%	0%	0%	0%
SF100%	90%	100%	-	Controle DMSO	0%	0%	0%

## CAPÍTULO IV

### **Avaliação Antagônica de *Bacillus* spp., isolados de Ambientes Amazônicos com potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**

Ricardo de Melo Katak, Juan Campos de Oliveira; Elerson Matos Rocha, Marta Rodrigues Oliveira, Veranilce Alves Muniz, Antonia Queiroz Lima de Souza, Rosemary Aparecida Roque, Wanderli Pedro Tadei.

#### **Material e Métodos**

##### **Reativação das cepas bacterianas e condições de cultivo**

Foram reativadas duas linhagens de bacilos, identificadas como SBC13NA-*B. thuringiensis* MT052634 oriunda do solo e GD02.13NA-*B. toyonensis* MT163315 proveniente da água de ambientes amazônicos. A cepa padrão Bti BR101-*B. thuringiensis* var. *israelensis* cedida gentilmente pelo Laboratório de Genética e Taxonomia bacteriana (LGTB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL-PR), também foi utilizada neste estudo para comparar com a toxicidade das linhagens isoladas. Em tubos de ensaio com capacidade de 10 ml, contendo 2 ml do meio Nutriente Agar (NA) (5 g de tecido animal, 5 g de cloreto de sódio, 1.5 g extrato de carne, 1.5 g de extrato de levedura), foram adicionados 20 µl do cultivo bacteriano de cada cepa. Após isso, foram incubadas na estufa a 30 °C sob agitação de 180 rpm, durante 24h.

##### **Obtenção das frações do cultivo dos bacilos**

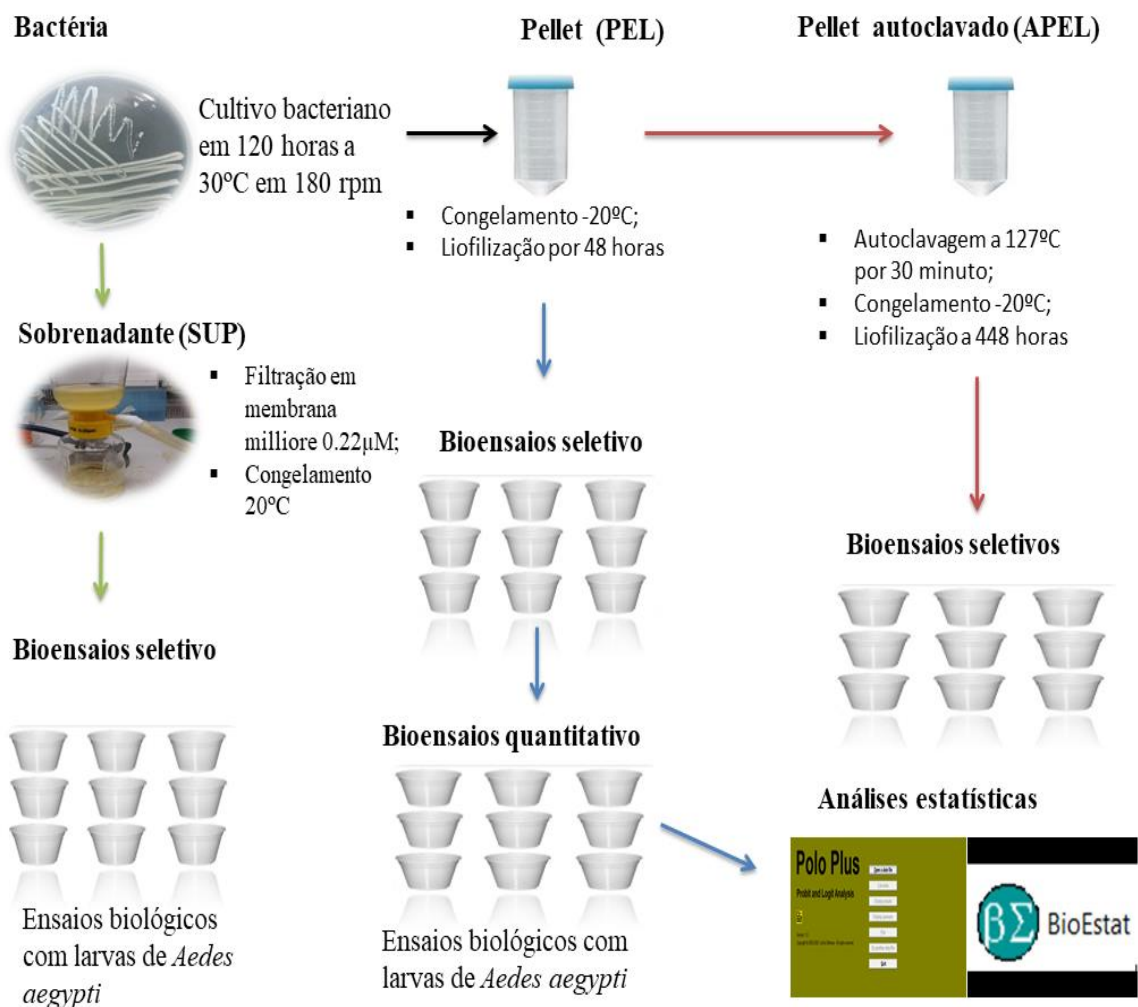
Após a reativação e crescimento das colônias em 24 horas, 100 µl do cultivo bacteriano foram transferidos para Erlenmeyer com capacidade de 250 ml, contendo 100 ml do meio de cultivo NA. Após isso foram incubados na estufa a 30°C sob agitação de 180 rpm durante 120 horas. Estes procedimentos foram realizados em triplicata, com base na metodologia de Marche et al (2017), com adaptações.

Em seguida, as amostras de cada cepa foram distribuídas em quantidade de 40 ml nos tubos falcon com capacidade de 50 ml e centrifugadas a 4 °C e 2800 Xg, por 40 min para a separação do sobrenadante e pellet. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore 0, 22 µM com auxílio de bomba a vácuo, visando à isenção de células

bacterianas. Posteriormente, foi congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e deixado em overnight. O Pellet foi dividido de forma igualitária, sendo que 50% deste material foi submetido à autoclavagem em  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min e o restante permaneceu sem este tratamento térmico. Após isso, os pellets foram congelados em congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e deixados em overnight. Em seguida, submetidos à liofilização no liofilizador (Enterprise I, TERRONI) durante 48 horas.

Posteriormente, as amostras do pellet autoclavado e do pellet sem tratamento térmico foram pesadas, e 50 mg foi diluído em 10 ml de água destilada e homogeneizadas em vórtex até a diluição das amostras.

Ilustração da metodologia das frações obtidas por meio do cultivo dos bacilos.



**Figura 21:** Ilustração da metodologia das frações obtidas por meio do cultivo dos bacilos e ensaios biológicos.



### **Teste de crescimento celular das amostras das frações do sobrenadante (SUP), pellet autoclavado (APEL) e pellet não autoclavado (PEL)**

Neste experimento, 20 µl do sobrenadante (SUP), do pellet autoclavado (APEL) e do pellet não autoclavado (PEL) foram adicionados em placas de Petri contendo o meio Nutriente ágar (NA). Em seguida foi feito o plaqueamento e incubação na estufa em 30 °C durante 96 h para a observação do crescimento de colônias bacterianas.

Após este período de tempo, as colônias bacterianas que cresceram, foram submetidas à coloração de Gram para verificar a pureza das colônias.

### **Obtenção de larvas de *A. aegypti***

As larvas foram obtidas do insetário do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LCBMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Para a eclosão das larvas, os ovos foram colocadas em bacias de plásticos (45X30Xcm) contendo 200 ml de água. Após a eclosão das larvas, foi adicionada a alimentação que consistiu na mistura da ração (Teklab global) e da ração Wiskas®, na proporção 1:1.

As larvas foram mantidas em temperatura média controlada ( $27 \pm 2$  °C, 80-90% UR e 12D:12L). As larvas de terceiro instar foram separadas para a realização dos ensaios biológicos (LIMA et al., 2009).

### **Bioensaios seletivos das frações de *Bacillus spp.***

O bioensaio seletivo foi realizado em três réplicas, que consistiu em utilizar: três copos plásticos de 50 ml, contendo 10 ml de água destilada, 1 mg de ração e 10 larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio. As larvas foram expostas a 5 mg/l de pellet autoclavado (APEL), pellet não autoclavado (PEL) e 4000 µl da fração do sobrenadante (SUP).

### **Bioensaios quantitativos das frações ativas de *Bacillus spp.***

Os ensaios biológicos foram realizados em cinco réplicas que consistiu em cinco copos plásticos contendo 150 ml de água destilada, 20 larvas de terceiro instar, 1 mg de ração para as larvas e o pellet não autoclavado (PEL). Seis concentrações (0.04; 0.02; 0.08; 0.001 e 0.0008 mg/l) foram utilizadas e repetidas por três vezes (triplicata) com contagem de larvas mortas após 24, 48 e 72 horas de exposição aos produtos.

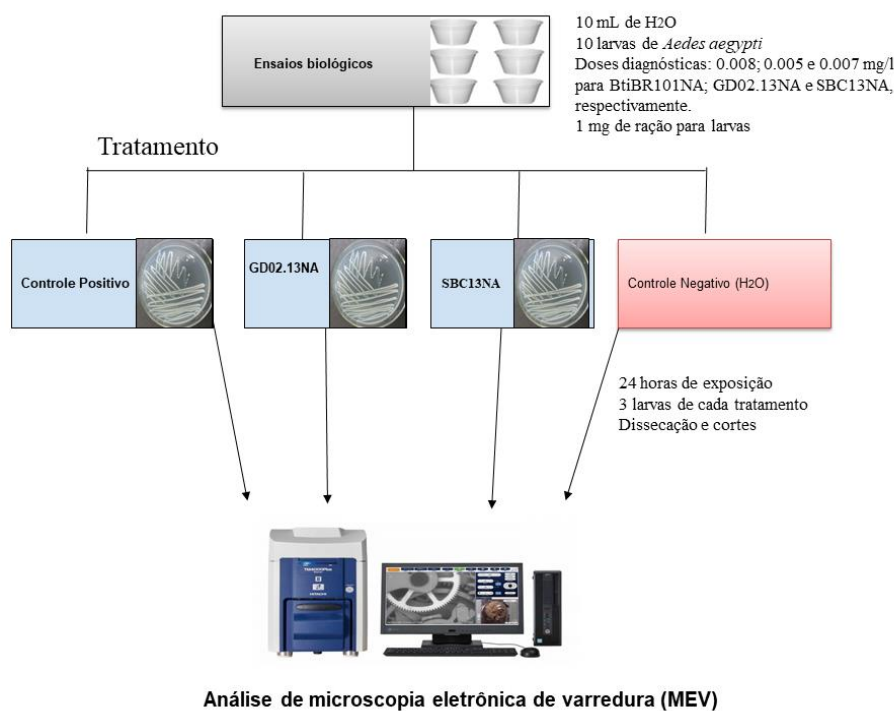
### **Ensaio biológico para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As concentrações das  $CL_{50}$  obtidas no intervalo de 24 horas das linhagens foram utilizados neste experimento.

Os experimentos foram realizados em uma réplica que consistiu em três copos plásticos contendo 50 ml de água destilada, 10 larvas de terceiro estágio, 1 mg de ração para as larvas e as concentrações obtidas da  $CL_{50}$  das linhagens. O controle negativo da concentração de cada cepa, consistiu de um copo contendo 50 ml de água destilada, 10 larvas e 1 mg de ração para as larvas. A cepa padrão Bti BR101NA foi utilizada como controle positivo para comparar a atividade larvicida.

### **Preparação e dissecação das larvas para as análises de microscopia**

Após o período de 24 horas de exposição das larvas ao pellet não autoclavado (PEL) dos bacilos, três larvas de cada tratamento, incluindo as amostras do controle positivo e negativo foram levadas ao microscópio estereoscópico ZEISS Stemi 2000 50X que possibilitou melhor visualização e corte das larvas. Com auxílio de alfinetes entomológicos, as partes da cabeça e do sifão respiratório foram cortadas para facilitar a permeação dos produtos químicos. Após isso, as larvas foram colocados em solução de Glutaraldeído de 2,5% tamponada com Cacodilato de Sódio (0,1 M, pH 7,2 ) por 24 horas e mantidos a -20 °C em overnight. Posteriormente, foi fixado em tetróxido de ósmio (1%) por 1 hora e logo em seguida adicionado por 10 minutos no tampão Cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). Após isso, foi feita a desidratação em uma série crescente de etanol a 50, 70,80, 90, 95 e 100% por 10 minutos cada. Em seguida, as larvas foram submetidas à secagem de ponto crítico usando  $CO_2$  seco em equipamento Bal-tec (CPD-030). Posteriormente, as larvas foram montadas individualmente em suportes metálicos, revestidos com ouro (Au) e observados sob um Microscópio eletrônico de varredura Tescan (Vega 3, TESCAN, tcheco República) no Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica (LTMOE) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).



**Figura 22:** Ilustração da metodologia dos ensaios biológicos das larvas de *A. aegypti* expostas ao pellet PEL.

### Caracterização gênica dos genes *Cry4Ba* e *Chi*

A extração do DNA genômico foi realizada por meio de um Kit da matriz InstaGene (Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA foi determinada pelo NanoDrop™ 2000 / Espectrofotômetros de Thermo Fisher Scientific.

Na caracterização dos genes *Cry4Ba* e *Chi* (quitinase), o DNA genômico das linhagens foi diluído e submetido à técnica de PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores. As sequências dos primers foram obtidas por Costa et al (2014) para os genes *Cry4Ba* e *Chi* (Tabela 11).

**Tabela 11:** Sequências dos primers utilizados e os tamanhos dos fragmentos esperado na PCR, bem como a temperatura de anelamento.

Gene	Sequências dos primers (5'-3')	TF ou pb	TM
<i>Cry4Ba</i>	GCGAGGTTTCCCATGTCTAC	347	52
	GTTGTAGGGTGGGAATTGTTATC		
<i>Chi</i>	ATGGTCATGAGGTCTC	2027	45
	CTATTCGCTAATGACG		

Legend (f) = forward; (r)=reverse; Pb= pares de bases. TF= tamanho do fragmento e TM= temperatura de desnaturação.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). As reações de amplificação dos genes *Cry4Ba* e *Chi* consistiram em um volume final de 25µl utilizando o kit Taq Pol - Master mix 2X (Cellco Biotec) seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados para cada reação 12,5µl de Mix; 1µl DNA (150 ng/µl); 10,5µl de H<sub>2</sub>O milli-Q e 0,5µl (10 pMol) de cada primer descritos na Tabela 15 (COSTA et al., 2014).

Após a reação de amplificação foi retirado 3 µl de cada produto de PCR e adicionado a 3 µl de tampão de carregamento Loading Dye (Promega) contendo o corante Gel Red *Nucleid Acid Gel Stain* (Biotium). A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose na concentração de 1,5% que foi submetido a um campo elétrico de 90V, conduzido em tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA). Como padrão de peso molecular em cada reação de eletroforese foi incluindo 3 µL de DNA Ladder 1Kb (promega) misturado a 1 µL de água deionizada. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em transiluminador e fotografados no aparelho L-PIX (Loccus Biotecnologia). Os primers descritos por Costa et al (2014), utilizados nas reações, foram obtidas a partir do alinhamento das sequências gênicas disponíveis no GenBank do NCBI.

### **Ensaio enzimáticos para produção de enzimas quitinases**

A produção de quitinase foi realizada pelo cultivo dos *Bacillus* spp. em 200 ml de meio M9 suplementado com pó de casca de camarão como uma única fonte de carbono. O meio inoculado por 5% de uma pré-cultura, foi incubado a 35°C em uma incubadora agitadora (120 rpm). Após a incubação, o meio de cultura foi centrifugado a 800 g durante 20 min e filtrado.

A atividade de quitinasee foi testada empregando ensaio espectrofotométrico utilizando o substrato 4-Methylumberilliferyl-  $\beta$ -D-N,N',N''-tricetylchitotrioside (4-MUF-triNAG). Na presença de quitinase o substrato é hidrolisado liberando umbeliferona, um produto fluorescente facilmente mensurado. A reação foi realizada em placa de 96 poços com 20 µl substrato em tampão citrato fosfato ph 7,0 em 50mM e 80 µl do sobrenadante de cultura. A reação foi incubada durante 20 minutos a 37 °C e finalizada pela adição de uma solução stop (00 mM de carbonato de sódio). A fluorescência foi mensurada no comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão 450 mm (Thimoteo et al., 2017) com modificações. Um unidade de atividade de quitinase foi definida como a liberação de 1 mmol de 4-MUF por minuto nas condições do ensaio.

## Resultados e discussão

### Ensaio biológico das frações do sobrenadante (SUP), Pellet (PEL) e pellet autoclavado (APEL)

Considerando os resultados de mortalidade das larvas na fração do sobrenadante (SUP), da cultura dos bacilos, não foi observado toxicidade dos isolados GD02.13NA-*B. toyonensis* e SBC13NA-*B. thuringiensis* nos intervalos de 24 a 48 horas (Figura 24). Estas cepas ocasionaram mortalidade somente no intervalo de 72 horas, porém, apresentaram baixa toxicidade de 3-4%, respectivamente. Por outro lado, a cepa padrão Bti BR101 ocasionou 70 e 100 % de toxicidade nos intervalos de 24 a 48 horas, respectivamente (Figura 24).

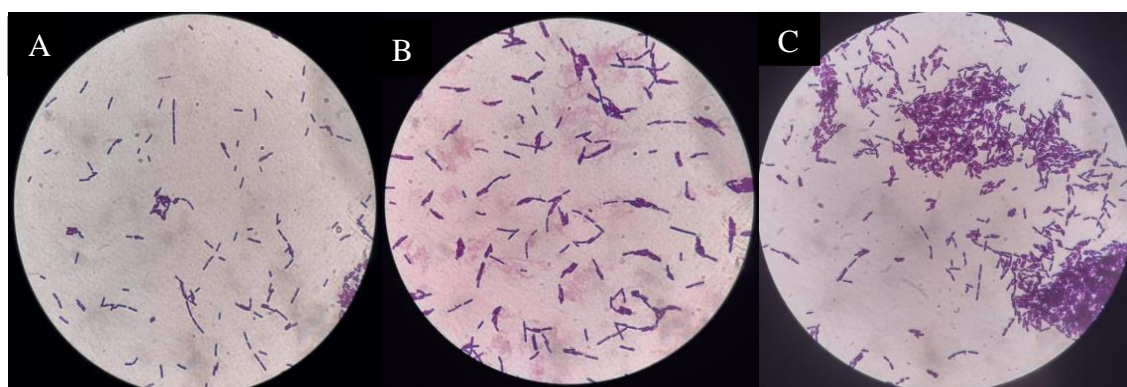
Os resultados obtidos neste estudo, demonstraram que as cepas GD02.13NA-*B. toyonensis* e SBC13NA-*B. thuringiensis*, não apresentaram propriedades antagônicas no meio SUP contra as larvas do *A. aegypti*. A atividade antagônica encontrada na cepa padrão Bti BR101 na concentração de 4000 µl, demonstra que esta cepa secreta metabólitos ativos no meio SUP tóxicos para as larvas.

Em relação aos testes do plaqueamento em meio Nutriente ágar da fração do sobrenadante (SUP), não foi observado nenhum crescimento bacteriano durante o período de 24 a 72 horas. Dessa forma, os resultados obtidos, reforçam a hipótese de que a toxicidade presente no sobrenadante da cepa padrão pode ser ocasionada por metabólitos primários ou secundários. Segundo Palma et al (2014), enfatizaram que durante a fase vegetativa de *B. thuringiensis*, diversos metabólitos são secretados, como por exemplo, as proteínas inseticidas vegetativas (VIP), exotoxinas e enzimas hidrolíticas com potencial tóxico para diversas ordens de insetos.

Embora a cepa SBC13NA-*B. thuringiensis* pertencer à mesma espécie da cepa padrão Bti BR101 e serem cultivadas nas mesmas condições, não apresentaram resultados semelhantes. Um dos fatores que podem explicar esses achados é a questão da diversidade genética das espécies e os diferentes habitats que foram coletados. Vilas-Bôas e Lemos (2004), observaram em seus estudos que existem uma alta diversidade genética de isolados de *B. thuringiensis* no Brasil com perfil entomotóxico diferenciado. Segundo Machado et al (2020), cepas de *B. thuringiensis* podem sofrer influência de fatores ecológicos e distribuição ecológica. De forma bem clara, os fatores abióticos e bióticos de todos os

habitat podem influenciar no processo de adaptação desses microrganismos, podendo apresentar perfis diferenciados quanto aos seus conteúdos genéticos e metabólicos.

Considerando os resultados de mortalidade da fração do Pellet não autoclavado (PEL) nas primeiras 24 horas, foi observado 100% de toxicidade na concentração de 5 mg/l em todas as linhagens testadas. A cepa padrão Bti BR101 apresentou atividade larvicida tanto na fração do sobrenadante quanto no Pellet não autoclavado, mostrando que seus princípios ativos estão presentes nestas duas frações (sobrenadante e pellet). Os testes contra prova do Pellet não autoclavado mostraram o crescimento de 24 horas de colônias bacterianas. A coloração de Gram e a visualização em microscopia eletrônica de varredura mostraram a pureza das linhagens nos testes biológicos (Figura 23).



**Figura 23:** Coloração de Gram das linhagens (A) SBC13NA-*B. thuringiensis*, (B) GD02.13NA-*B. toyonensis* e (C) Bti BR101NA-*B. thuringiensis israelenses*.

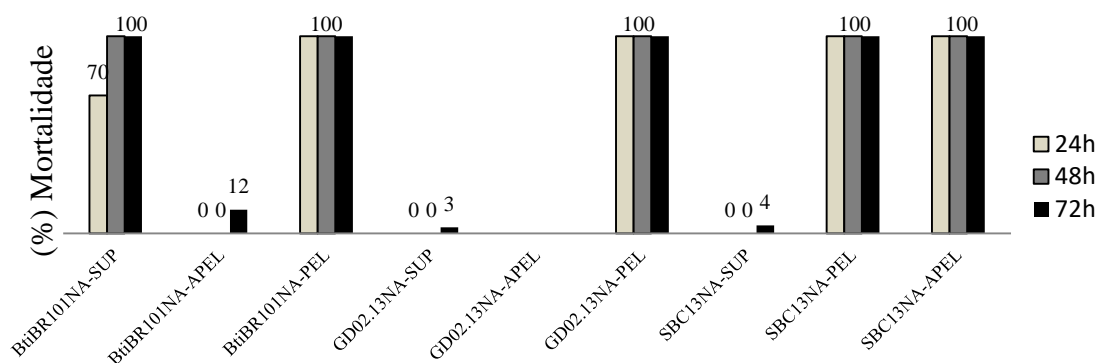
Os resultados da atividade larvicida da fração do Pellet autoclavado (APEL) das linhagens testadas, mostraram que nas primeiras 48 horas, não apresentaram mortalidade. Por outro lado, em 72 horas foi observado uma baixa toxicidade das cepas SBC13NA-*B. thuringiensis*, GD02.13NA-*B. toyonensis* e cepa padrão Bti BR101 com 7, 10 e 12%, respectivamente. Em relação ao teste de contraprovas da fração do Pellet autoclavado (APEL), não foi observado crescimento de colônias das cepas durante 72 horas de incubação.

Os achados neste estudo demonstraram o potencial de microparasitismo das linhagens SBC13NA-*B. thuringiensis* e GD02.13-*B. toyonensis*, pelo fato de apresentarem toxicidade apenas no pellet não autoclavado (PEL). Embora os achados deste estudo sejam confirmados por testes preliminares, novas abordagens deverão ser realizadas para melhor compreensão, pois os mecanismos de interação entre patógeno e vetor é um sistema

complexo que necessitam de mais estudos detalhados. Alguns mecanismos de patogenicidade já foram elucidados para cepas de *Bacillus*, como por exemplo, os esporos presentes na biomassa bacteriana quando ingeridos pelos insetos, são germinados devido a sua carência de nutrientes nesses microambientes desfavoráveis. Além disso, as células vegetativas proliferam, contribuindo para o dano tecidual e a morte do hospedeiro (SALAMITOU et al., 2000; MILUTINOVIC et al., 2013; FEDHILA et al., 2002). Os efeitos das cepas de *B. thuringiensis* em larvas de *A. aegypti* foram relatados por Viana et al (2020), no qual observaram que a toxicidade de 24 horas nas larvas provocam efeitos histopatológicos e deformações nas células epiteliais das larvas.

Segundo Muniaraj et al (2012), larvas de *A. aegypti* se alimentam por infiltração, ingerindo diversos sedimentos presentes em seu habitat, assim como diversos microrganismos ativos como bactérias e fungos. Dessa forma, ao ingerir esporos ou células bacterianas, estes secretam enzimas e toxinas ao nível da membrana peritrófica e do epitélio intestinal, tornando-se permeáveis à passagem de diversas substâncias e até mesmo outros microrganismos para a hemolinfa, o que conseqüentemente pode causar a septicemia. Além disso, quando nutrientes dentro do cadáver são exauridas, as bactérias são esporuladas, garantindo assim a sobrevivência a condições de crescimento desfavoráveis e permitindo uma maior transmissão após a ingestão por um novo hospedeiro.

Embora já existam vários estudos elucidados de mecanismos de patogenicidade de *B. thuringiensis* contra as larvas de *A. aegypti*, os efeitos antagônicos da fração do pellet (PEL) das cepas SBC13NA-*B. thuringiensis* e GD02.13NA-*B. toyonensis* chamaram bastante atenção neste experimento. De certo modo, o perfil de toxicidade dessas cepas foi observado somente no pellet não autoclavado (PEL) (Tabela 17).



Condições testadas das frações do sobrenadante, pellet autoclavado e não autoclavado das culturas bacterianas.

**Figura 24:** Atividade larvicida das frações do SUP, PEL e APEL em 24, 48 e 72 horas.



### Bioensaios quantitativos da fração do pellet não autoclavado (PEL)

Considerando os resultados dos bioensaios quantitativos de exposição das larvas à fração do pellet não autoclavado (PEL) no intervalo de 24 horas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas de  $p < 0.005$  em relação aos valores das concentrações da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ . Neste intervalo foi observado que as linhagens SBC13NA e GD02.13NA apresentam semelhanças no perfil de toxicidade que a cepa padrão (Tabela 12).

Em relação ao intervalo de leitura de 48 horas, as linhagens GD02.13NA e SBC13NA não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos valores das concentrações da  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  (Tabela 12). Esses valores na cepa padrão não puderam se ajustar nas análises do probit. Dessa forma, não foi possível comparar com o perfil de toxicidade da cepa padrão com as linhagens isoladas neste intervalo.

Os dados de 72 horas de mortalidade foram observados diferenças estatísticas significativas entre a linhagem GD02.13NA e a cepa padrão BtiBR101NA. Os valores das concentrações da  $CL_{50}$  (0.003 mg/l) e  $CL_{90}$  (0.012 mg/l) da linhagem GD02.13NA mostraram ser mais tóxica para as larvas de *A. aegypti* que a cepa padrão BtiBR101NA, apresentando 0.008 mg/l para  $CL_{50}$  e 0.023 mg/l para  $CL_{90}$  (Tabela 12). Em relação à linhagem SBC13NA, não foi possível comparar a toxicidade com as outras linhagens, por conta da falta de ajustes que não se adequaram na análise do probit.

**Tabela 12:** Concentração letal  $LC_{50}$  e  $CL_{90}$  em mg/l do PEL dos bacilos para as larvas de *A. aegypti*.

Linhagens	$CL_{50}$ (IC95%)	$CL_{90}$ (IC95%)	Slope $\pm$ SE	$X^2$ (GL)
<b>24h</b>				
BtiBR101NA	0.008 (0.003-0.011) a	0.045(0.027-0.382) a	1.686 (0.185)	9.8236 (3)
GD02.13NA	0.005 (0.002-0.008) a	0.121(0.062-0.666) a	0.950 (0.131)	5.6250 (4)
SBC13NA	0.007 (0.004-0.009) a	0.055(0.036-0.137) a	1.439 (0.128)	14.885 (5)
<b>48h</b>				
BtiBR101NA	-	-	-	-
GD02.13NA	0.005 (0.001-0.008) a	0.017(0.012-0.031) a	2.260 (0.225)	12.748 (3)
SBC13NA	0.004 (0.001-0.006) a	0.019(0.015- 0.026) a	1.871 (0.201)	4.8732 (3)
<b>72h</b>				
BtiBR101NA	0.008(0.007-0.009) a	0.023(0.021-0.026) a	2.716 (0.225)	1.988 (2)
GD02.13NA	0.003 (0.000-0.005) b	0.012 (0.009-0.016) b	1.916 (0.235)	16.803 (5)
SBC13NA	-	-	-	-



### **Análise da infecção da fração do pellet nas larvas de *A. aegypti***

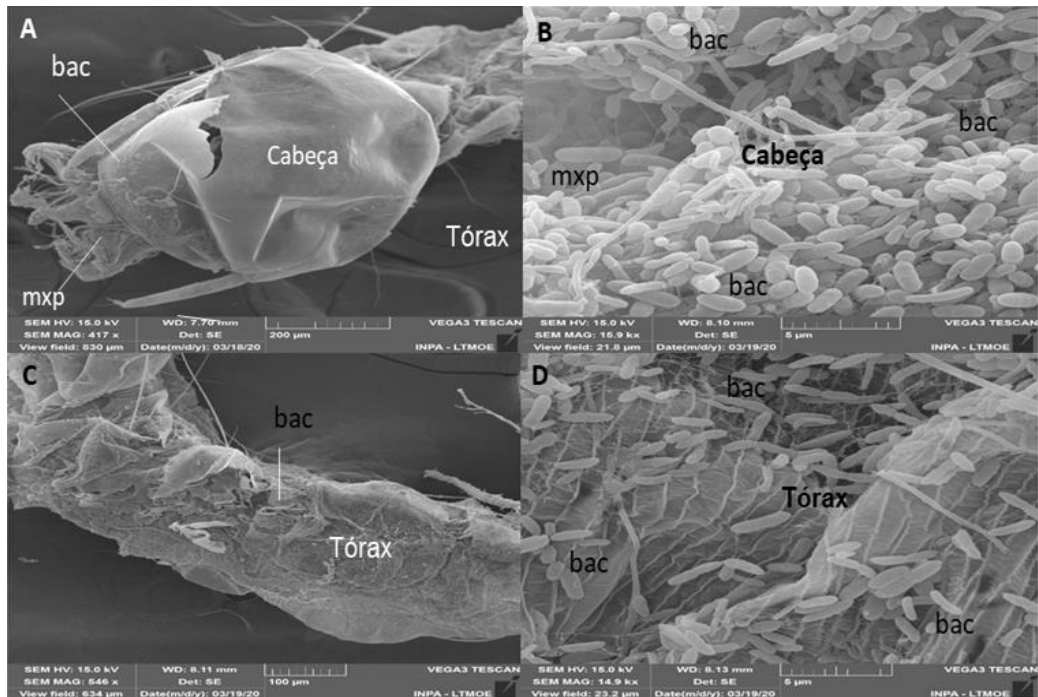
O presente estudo confirma o potencial da fração do pellet (PEL) de cepas de *B. thuringiensis* e *B. toyonensis* contra larvas de *A. aegypti*, mostrando uma relação concentração-mortalidade. As doses utilizadas nestes ensaios foram provenientes da concentração da CL<sub>50</sub> obtida nas 24 horas, e usadas para o teste de infecção dos bacilos nas larvas.

Nos ensaios quantitativos anteriores, o melhor intervalo que se adequou para as estas análises foi o intervalo de 24 horas. Dessa forma, as concentrações das linhagens GD0213NA, SBC13NA e a cepa padrão BtiBR101NA foram 0.005; 0.007 e 0.008 mg/L, respectivamente.

As análises da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que estas linhagens utilizadas neste estudo apresentaram colonização na superfície das larvas, principalmente na parte da cabeça e do tronco. Devido à ausência da efetividade da fração do sobrenadante destas cepas, exceto a cepa padrão, este fato possibilitou a hipótese de microparasitismo destas cepas.

Os conteúdos visualizados por meio da microscopia eletrônica (MEV) tais como: cabeça e tronco foram as mais acessíveis de visualizar e observar a presença de esporos nessas partes anatômicas das larvas. Todavia, os conteúdos estomacais como a membrana peritrófica não foi possível analisar neste experimento.

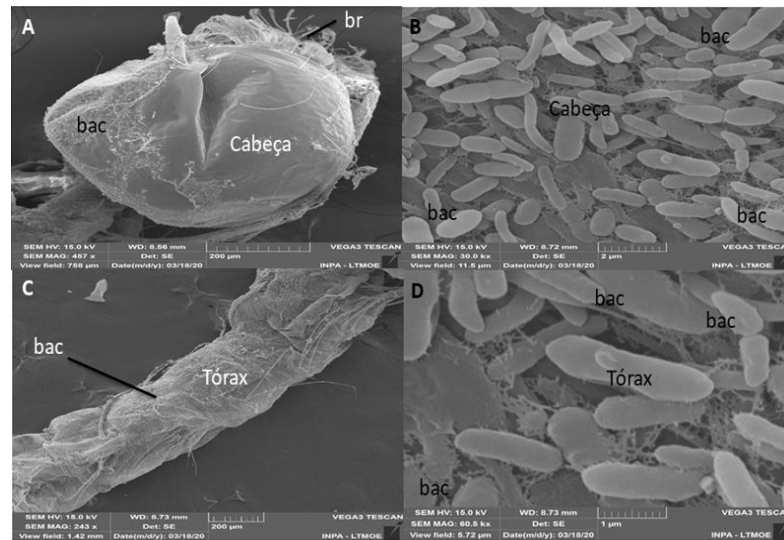
Os resultados observados da análise da microscopia nas larvas expostas ao pellet da cepa padrão Bti BR101, mostraram uma grande quantidade de esporos aderidos na parte da cabeça, palpos maxilares e tórax das larvas (Figura 25). As colonizações visíveis nas imagens de microscopia mostraram a total competência dos esporos bacterianos das cepas em causar a infecção em 24 horas de exposição. Embora a cepa padrão apresente efeitos antagônicos no sobrenadante, os efeitos tóxicos do pellet nas larvas também são semelhantes. Um fato observado neste estudo foi à presença de esporos colonizando os palpos maxilares, de certa forma não se sabe se esses esporos se aderem na superfície dos palpos maxilares ou se vieram dos conteúdos estomacais. De acordo com os estudos de Miranpuri e Khachatourians (1991), larvas de *A. aegypti* expostas com esporos de *Beauveria bassiana* revelaram que esporos aderidos à cutícula externa (particularmente as partes da boca e a região anal) levaram a morte das larvas.



**Figura 25:** Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de *A. aegypti* expostas a fração do pellet não autoclavado (PEL) da cepa Bti BR101.

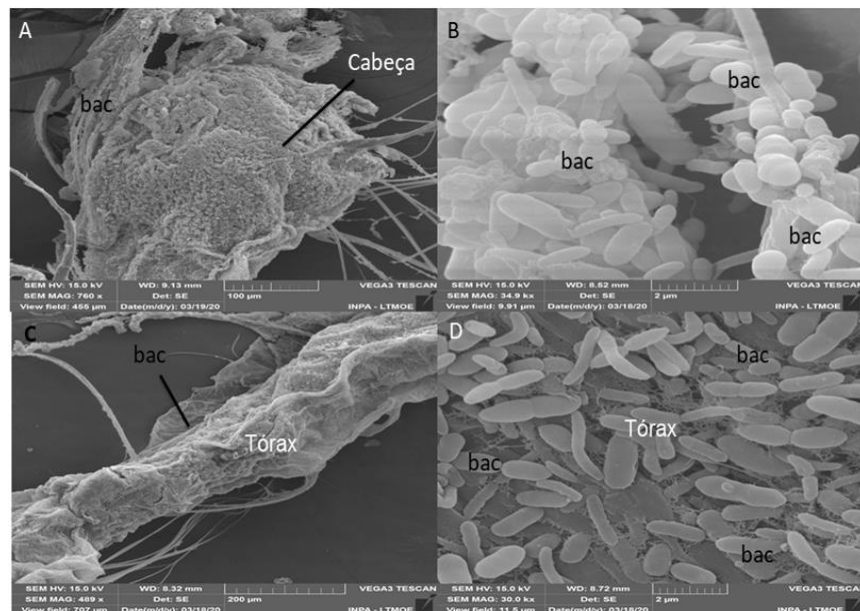
**Legenda:** Em A: Cabeça; tórax; palpos maxilares (mxp); esporos bacterianos (bac). Em 6B: Cabeça colonizada por esporos bacterianos (bac). Em C: Tórax. Em D: Tórax colonizado por esporos bacterianos (bac).

Em relação à análise de microscopia da cepa GD02.13NA-B. *toyonensis* mostrou que a colonização de esporos na cabeça (escovas laterais) e no tórax (Figura 26). A presente linhagem demonstrou toxicidade apenas no pellet não autoclavado (PEL), significando que estes microrganismos podem agir de forma direta com o organismo alvo.



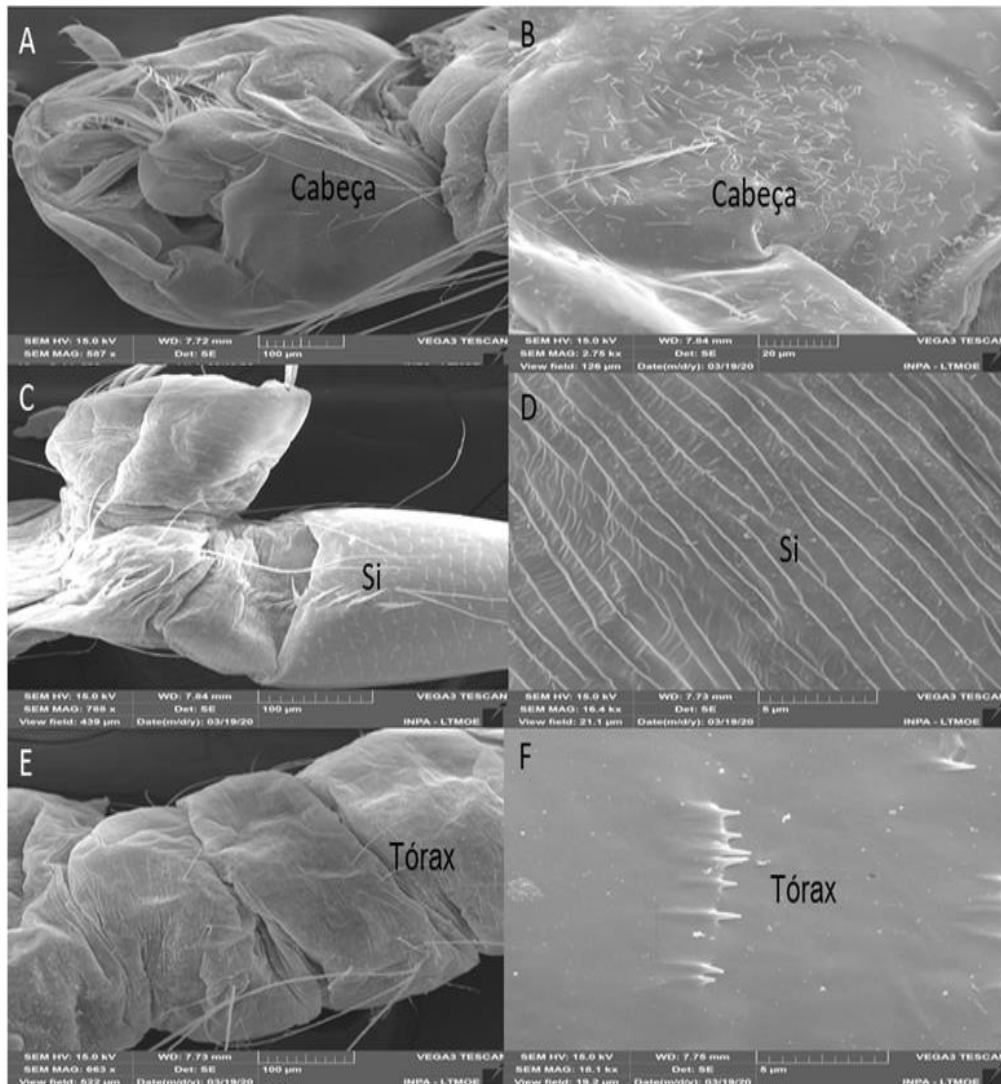
**Figura 26:** Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de *A. aegypti* expostas a fração do pellet não autoclavado (PEL) da cepa GD02.13NA-*B. toyonensis*. **Legenda:** Em A: Cabeça; escovas laterais (br); esporos bacterianos (bac). Em B: Cabeça colonizada por esporos bacterianos (bac). Em C: Tórax; esporos bacterianos (bac). Em D: Tórax colonizado por esporos bacterianos (bac).

Considerando o resultado observado da análise de microscopia, a linhagem SBC13NA-*B. thuringiensis* mostrou a colonização na parte da cabeça e do tórax. A quantidade de esporos bacterianos é observada na parte da cabeça e do tórax (Figura 27).



**Figura 27:** Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de *A. aegypti* expostas a fração do pellet não autoclavado (PEL) da cepa SBC13NA-*B. thuringiensis*. **Legenda:** Em A: Cabeça; esporos bacterianos (bac). Em B: cabeça colonizada por esporos bacterianos (bac). Em C: Tórax; esporos bacterianos (bac). Em D: Tórax colonizado por esporos bacterianos (bac).

Em relação à análise da microscopia do controle negativo não foi observado a colonização de nenhum esporo bacteriano e nem vestígios de outras contaminações nos ensaios biológicos. Neste tratamento foi possível observar as partes da cabeça, tórax e sifão respiratório, sem evidências de contaminação ou presença de células bacterianas (Figura 28).

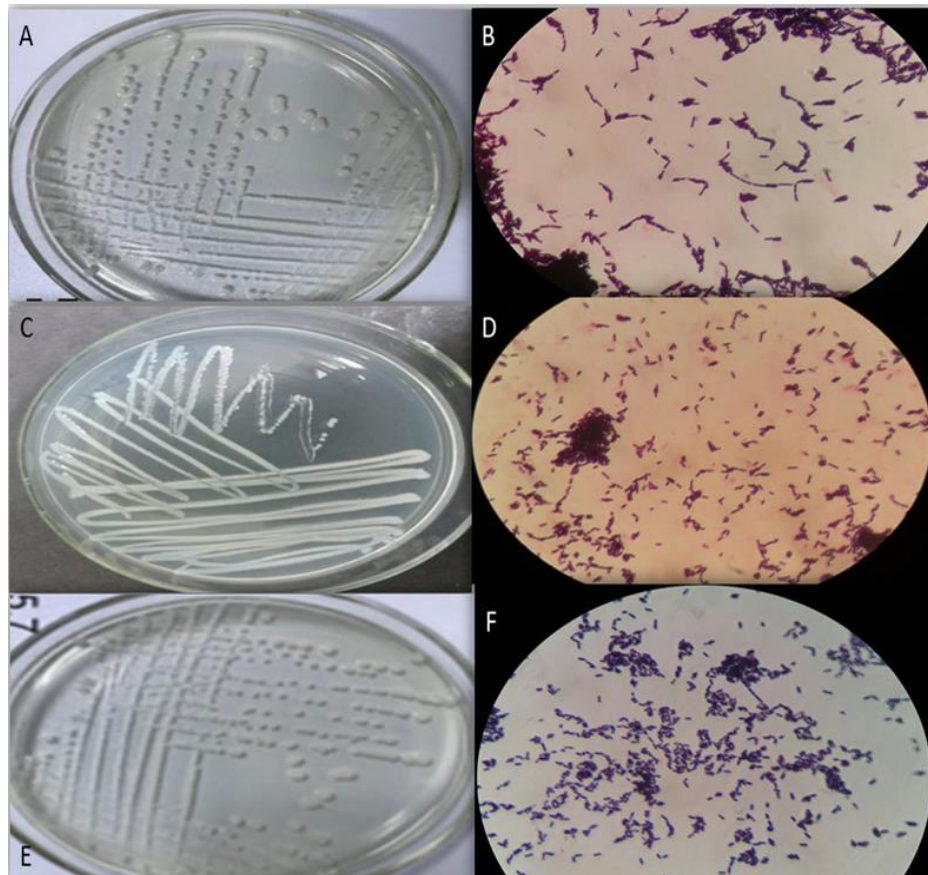


**Figura 28:** Análise de microscopia eletrônica de varredura com larvas de *A. aegypti* expostas ao controle negativo (CN).

**Legenda:** Em A: cabeça; em B: cabeça com ausência de colonização; Em C: parte inferior da larva, sifão respiratório (Si); Em D: ausência de colonização de esporos na parte do sifão respiratório; Em E: Tórax; Em F: Ausência de colonização de esporos bacterianos no tórax

As concentrações aplicadas nos ensaios biológicos foram consideradas moderadas na questão da toxicidade das linhagens. Os resultados dos bioensaios quantitativos mostraram as linhagens não apresentaram diferenças significativas nas concentrações da

CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> no intervalo de 24 horas. Diante disso, a relação entre concentração e patogenicidade das cepas é considerada homogênea, mas que necessitam de mais estudos para avaliar com mais detalhes. As dosagens das amostras plaqueadas em placas de petri mostraram a pureza das colônias bacterianas por meio das observações macroscópicas e microscópicas (Figura 29).



**Figura 29:** Características morfológicas das cepas de *Bacillus* spp., Em A e B: Morfologia das colônias e coloração de Gram da cepa padrão Bti BR101NA.

**Legenda:** Em C e D: Morfologia das colônias e coloração de Gram da cepa GD02.13NA-*B.toyoensis*. Em E e F: Morfologia da colônia e coloração de Gram da cepa SBC13NA-*B.thuringiensis*.

Os efeitos antagônicos das frações do Pellet (PEL) das linhagens SBC13NA-*B.thuringiensis* e GD02.13NA-*B. toyonensis*, mostraram possivelmente a ação de microparasitismo por colonização das larvas, principalmente devido a ausência de patogenicidade nos metabólitos que foram secretados no sobrenadante por estas cepas. Este estudo sobre microparasitismo é pioneiro, e apresenta escassez na literatura para comparar com esses achados. Segundo Khachatourians e Qazi (2008), os esporos dos bacilos apresentam o potencial para se ligar à cutícula dos insetos por meio de forças hidrofóbicas

passivas e subsequente secreção de moléculas que interagem com outros receptores de membranas.

A elucidação dos mecanismos de patogenicidade, principalmente os efeitos que estas bactérias ocasionam nas larvas são de fundamental importância para o controle biológico. Silva et al (2008), observaram que cepas de *B. thuringiensis. var. israelensis* ocasionam danos aos tecidos dos insetos, tais como, perda de microvilosidades, vacuolização de células digestivas e ruptura do epitélio e rejeição de material citoplasmático na região peritrófica.

Neste estudo foi observado a presença de esporos bacterianos de todas as linhagens aderidos à cutícula externa (palpos maxilares, antenas e escovas laterais) e troncos traqueais visível à microscopia eletrônica de varredura. Os resultados observados nas frações do Pellet (PEL) em relação à mortalidade das larvas são consistentes com a hipótese de esporos secretando moléculas tóxicas para as larvas. Segundo Argôla-Filho e Loguercio (2014), os esporos bacterianos podem germinar devido ao estresses e as condições desfavoráveis e instantaneamente colonizar o intestino do hospedeiro.

Em relação o controle negativo, não foi observado esporos bacterianos nas larvas saudáveis, comprovando que os bioensaios realizados foram isentos de contaminação por outros microrganismos oportunistas.

Embora alguns estudos não abordasse o contexto de microparasitismo de bactérias no mecanismo de interação entre patógeno vetor. Por outro lado, alguns estudos sobre a interação de fungos patogênicos contra insetos levaram a considerar que a produção de proteínas proteolíticas, lipolíticas, enzimas quitinolíticas e metabólitos secundários são os principais responsáveis pela virulência destes microrganismos (HAJEK & LEGER, 1994; KHACHATOURIANS & QAZI, 2008).

A estratégia de controle biológico resulta de múltiplas interações que ocorrem em diferentes condições experimentais (BAR-SHIMON et al., 2004). Contudo, este estudo tem como estratégia tentar elucidar alguns fatores de patogenicidade de bacilos contra larvas de *A. aegypti*.

### **Caracterização gênica dos genes *cry4Ba* e *chi* em linhagens de *Bacillus* spp.**

Utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi possível detectar o gene *cry4Ba* em linhagens patogênicas para as larvas de *A. aegypti*. Análise da detecção molecular do gene *cry4Ba* das três linhagens, incluindo a cepa padrão padrão. Os

resultados mostraram que as linhagens GD02.13NA-*B. toyonensis* e SBC13NA-*B. thuringiensis* apresentaram amplificação para o referido gene com fragmentos de 370 pares de bases. A cepa padrão Bti BR101 também apresentou o mesmo perfil de amplificação com o mesmo tamanho de pares de base, visualizados em gel de agarose 1,5% (Figura 30a). Considerando os resultados da toxicidade e o perfil de amplificação dos genes *cry4*, existe a possibilidade desses microrganismos produzirem as proteínas Cry4. A presença de genes codificadores de proteínas Cry nos genomas dos bacilos pode prever seu potencial tóxico para as larvas de insetos. Ammouneh et al (2011), consideram que a presença desses genes nos isolados estão correlacionados com sua patogenicidade e virulência. A especificidade, quantidade e sinergia entre os genes tóxicos em cada isolado, com a suscetibilidade das larvas e o pH altamente alcalino do intestino, que favorece a solubilização e liberação de proteínas cristalinas, são fatores importantes que determinam a eficácia da toxicidade bacteriana contra larvas (HABIB, 1983; BOONSERM et al., 2005; LACEY, 2007). A presença de outras proteínas nesta fração deve ser considerada. De acordo com (Tetreau et al., 2013), *B. thuringiensis* sv. *israelensis* é um exemplo de combinação altamente eficaz de toxinas. Seu cristal é composto por Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba. Dessa forma, esses grupos de proteínas podem ajudar nos efeitos sinérgicos desses microrganismos (BERRY et al., 2002).

Os dados observados neste estudo, corroboram com os achados de Lobo et al (2018), os quais correlacionaram a toxicidade de isolados de Bti com a presença de genes *cry4* nos genomas das bactérias. Além disso, novas possibilidades de interações com outras moléculas ocasionando efeitos sinérgicos devem ser consideradas.

Vilas-Bôas et al (2012), relataram que, embora as delta-endotoxinas sejam os fatores de virulência inseto mais conhecidos, *B. thuringiensis* apresenta também uma ampla gama de fatores de virulência capazes de ampliar a toxicidade contra insetos alvos.

Diante disso, as cepas SBC13NA-*B. thuringiensis* e GD02.13NA-*B. toyonensis* foram positivas para a amplificação para o gene *Chi* que codifica uma enzima quitinase de 2700 pb. O mesmo perfil de amplificação foi observado na cepa padrão Bti BR101NA, visualizados em gel de agarose (Figura 30b). Os resultados encontrados com as combinações dos genes *Cry* e *Chi* estão correlacionados com o seu alto potencial larvicida. Os achados neste estudo, demonstraram que as cepas SBC13NA-*B. thuringiensis* e GD02.13NA-*B. toyonensis* apresentam potencial para secretar proteínas Cry e enzimas quitinolíticas.

As espécies de *B. thuringiensis* apresentam potencial para produzir quitinasases que, quando usadas em combinação com outros componentes, incluindo proteínas CRY, contribuem para sua virulência (REGEV et al., 1996; PROMDONKOY & ELLAR, 2000). Os dados se correlacionam com os achados de Costa et al (2010), no qual selecionaram isolados de *B. thuringiensis* de diversas regiões do território brasileiro, com alta toxicidade a larvas de *A. aegypti* e com diferentes combinações de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) e também *chi*, este último, atuando conjuntamente com os demais, pode ter aumentado a toxicidade dos isolados. Argôla-Filho e Loquercio (2014), evidenciaram que o gene da quitinase pode aumentar o efeito mosquitocida, devido a sua perfuração da membrana peritrófica, permitindo maior acessibilidade de outras toxinas Cry e Cyt aos receptores da membrana epitelial.

Durante o processo infeccioso, *B. thuringiensis* precisa atravessar a matriz peritrófica, que é rica em quitina. Com isso, as quitinasases produzidas por estas bactérias facilitam esse processo, permitindo alcançar o hemocélio (Sampson e Gooday et al., 1998). Dessa forma, as enzimas degradantes da parede celulares extracelulares excretadas por cepas de *Bacillus* apresentam interações físicas diretas (ABDULLAH et al., 2008).

A correlação entre a toxicidade das cepas contras as larvas de *A. aegypti* e o potencial para produção de proteínas Cry e enzimas quitinasases mostraram que estas cepas podem representar uma grande ferramenta para o controle biológico, sendo necessários mais estudos para melhores abordagens.

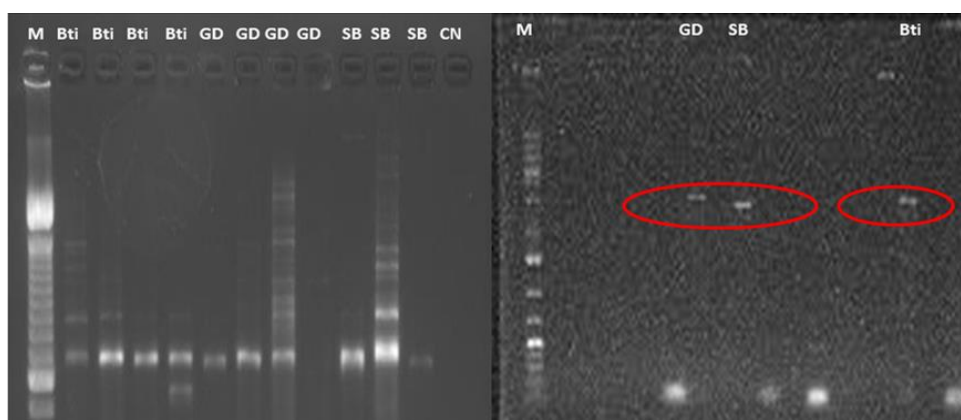
Os achados referentes à linhagem GD02.13NA caracterizada como *B. toyonensis* com potencial de toxicidade, colonização nas larvas, produção de proteínas CRY e enzimas quitinasases, mostraram uma correlação para um novo candidato entomopatógeno. Uma vez que ainda não existem relatos na literatura de espécies de *B. toyonensis* com toxicidade para larvas de *A. aegypti* e portadoras do gene *Cry4Ba*. A caracterização genômica desta espécie revelaram as diferenças existentes entre a espécie de *B. cereus*, sendo dessa forma reclassificada como uma nova espécie (JIMENEZ et al., 2013). A princípio o que sabe sobre o potencial desta espécie, e que elas são utilizadas como probióticos na alimentação animal (KANTAS et al., 2015). Além disso, estudos mostraram que elas exercem funções imunomoduladoras, no qual foram realizados testes em camundongos e porcos, e os resultados positivos mostraram que elas podem melhorar a respostas das vacinas convencionais (SANTOS et al., 2018; SCHAREK-TEDIN et al., 2013).



Devido a pouca informação sobre essa espécie, principalmente relacionada ao controle biológico de *A. aegypti* torna-se necessária investigação mais detalhada sobre a caracterização genômica dessa linhagem.

Os resultados observados neste experimento mostraram que as linhagens isoladas de solo e água de ambientes amazônicos podem ser novos candidatos para o controle de *A. aegypti*. Estudos sobre a transcrição dos genes *cry4* e enzimas quitinases faz-se necessário para investigar se esses genes estão envolvidos nos fatores de patogenicidade desses bacilos.

Diante disso, a busca de novas bactérias entomopatogênicas com potencial desconhecido é um dos objetivos deste estudo, assim como conhecer as novas estratégias de controle biológico. Dessa forma, além das cepas de Bti, bastante conhecidas, existe a possibilidade de prospectar novos agentes entomopatogênicos na família Bacillaceae e Paenibacillaceae oriundos da microbiota Amazônica.



**Figura 10:** Perfil eletroforético de amplificação do DNA genômico dos genes Cry4Ba e Chi de cepas de *Bacillus* spp.

**Legenda:** **A** gene *Cry4Ba*: Coluna 01: Marcador molecular 1Kb; Coluna 02: Bti BR101; Coluna 03: Bti BR101NA; Coluna 04: Bti BR101; Coluna 05: Bti BR101; Coluna 06: GD02.13NA, coluna 07: GD02.13NA; Coluna 08: GD02.13NA; Coluna 08: GD02.13NA; Coluna 09: SBC13NA; Coluna 10: SBC13NA; Coluna 11: SBC13NA; Coluna 12: SBC13NA; Coluna 13: Controle negativo. **B** gene *Chi*: Coluna 01: Marcador molecular 1kb; coluna 04: GD02.13NA; Coluna 05: SBC13NA; Coluna 12: Bti BR101NA; Coluna 13: Controle negativo.

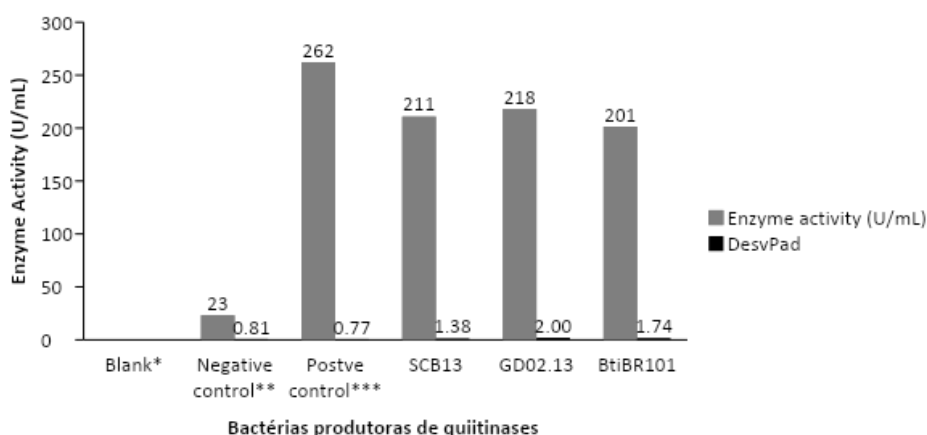
#### Atividade quitinolítica dos *Bacillus* spp.

Em relação à atividade quitinolítica dos *Bacillus* spp., foi observado que as linhagens apresentaram potencial para produção de enzimas quitinolíticas. Considerando os valores do desvio padrão da linhagem GD02.13NA, cuja apresentou maior atividade

quitinolítica (218 U/ml), quando comparada com o controle positivo da levedura recombinante *Pichia pastoris* que expressa enzimas quitinases (262 U/ml). A cepa padrão foi a que menos expressou atividade enzimática (201 U/ml). Os dados referentes ao desvio padrão mostraram que as médias estão de acordo com os valores esperados (Figura 31).

Os resultados preliminares da atividade enzimática corroboram com os dados obtidos do rastreio dos genes *chi* (Figura 30B), no qual potencializam as linhagens produtoras de enzimas quitinases. As quitinases apresentam funções de romper a membrana peritrófica e permite que microrganismos e patógenos invadam a hemocele dos insetos (SHAPIRO et al., 1987). As bactérias produzem quitinases para o uso de quitina como fontes de nitrogênio e carbono (WOO et al., 1996). *B. thuringiensis* também produz várias quitinases com diferentes massas moleculares: 66, 60, 47 e 32 kDA (THAMTHIANKUL et al., 2004). Este tipo de enzima quitinolítica é usado como um antagonista e, além disso, usada como mecanismo de defesa contra insetos contendo quitina (SAHAI & MANOCHA, 1993).

Em relação à padronização e a otimização para a produção de enzimas quitinolicas, outras abordagens deverão ser realizadas para fins características gerais dessas enzimas, uma vez que estudo objetivou apenas observar o potencial dessas linhagens em produzir essas enzimas. Dessa forma, a continuidade desse estudo possibilitará obter enzimas e testar seus efeitos *in vitro* nas larvas de *A. aegypti*, com ou sem a presença de outros fatores de virulência.



**Figura 31:** Atividade quitinolítica de *Bacillus* spp., isolados de ambientes amazônicos tóxicos para larvas de *A. aegypti*. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento e estão expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1  $\mu$ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinasequitina coloidal.

## CONCLUSÕES

Neste estudo avançamos no conhecimento do gênero *Bacillus* e *Brevibacillus* isolados de ambientes amazônicos, utilizando diferentes abordagens para analisar sua diversidade, verificando como essa diversidade pode aplicada no controle biológico de *Aedes aegypti* ou outros patógenos. A partir das análises das considerações finais obtidas, conclui-se que:

Os ambientes amazônicos abrigam uma rica diversidade de bactérias do gênero *Bacillus*.

Os isolados dos ambientes amazônicos apresentam potencial para secretar metabólitos primários e secundários.

O potencial dos isolados de ambientes amazônicos apresenta-se efetivos semelhantes e superiores a cepa padrão.

Extratos metabólitos de bacilos apresentam eficácia para larvas de *A. aegypti*, e perfis químico semelhantes e diferenciados.

Os metabólitos da linhagem *Brevibacillus halotolerans* apresentaram potencial para produção de metabólitos ativos contra larvas de *A. aegypti*.

As células viáveis dos bacilos apresentam potencial para causar infecção em larvas de *A. aegypti*.

## REFERÊNCIAS

- ABDELLI, F; JARDAK, M; ELLOUMI, J; STIEN, D; CHERIF, S; MNIF, S; AIFA, S. (2019). **Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4.** Biodegradation. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-09865-4>
- ABDULLAH, M.T; ALI, N.Y; SULEMAN, P. (2008). **Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*.** Crop Protection, 27, 1354-1359.
- ABRIL, A.G; RAMA, J.L.R; FEIJOO-SIOTA, L; CALO-MATA, P; SALAZAR, S; PEIX, A; VELÁZQUEZ,E; VILLA, T.G. (2019). ***Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. nov.** Int. J.Syst. Evol. Microbiol. 69, 189–195.<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003126>.
- ALVAREZ, F; CASTRO, M; PRÍNCIPE, A; BORIOLI, G; FISCHER, S; MORI, G; JOFRÉ, E. (2012). **The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease.** J. Appl. Microbiol. 112, 159–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>
- AMBRICO, A; & TRUPO, M. (2017). **Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold.** PostHarvest Biol Technol 134,5–10
- AMMOUNEH, H; HARBA, M; IDRIS, E; MAKEE, H. (2011). **Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests.** Turk J Agric For 35 421-431 © TÜBİTAK [doi:10.3906/tar-1007-1117](https://doi.org/10.3906/tar-1007-1117).
- ARAGÃO, C.F; CRUZ, A.C.R; NUNES-NETO, J.P; MONTEIRO, H.A.O; DA SILVA, E.V.P; DA SILVA, S.P; PINHEIRO, V.C.S. (2018). **Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil.** Acta Tropica, 186, 1–4. [doi:10.1016/j.actatropica.2018.06.022](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.022)
- ARANTES, O.M.N; VILAS-BÔAS, L.A; VILASBÔAS, G.F.L.T. (2002). ***Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico.** In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: Agropecuária. 2002, P. 269-293.
- ARGÔLA-FILHO, R.C; LOGUERCIO, L.L. (2014). ***Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human generated ecological niches.** Insects. 5:62–91.
- ARTHURS, S; DARA, S.K. (2018). **Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States.** J Invertebr Pathol. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>

AZIZOGLU, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Curr. Microbiol.* 76, 1379–1385. doi: 10.1007/s00284-019-01705-9

AYRES, M; AYRES J.R; AYRES, D.L; SANTOS, A.S. (2007). **BioEstat versão 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, Belém, Pará, Brasil.

BANHOS, E.F. (2016). **Análises moleculares de linhagens selvagens e mutantes de *Pestalotiopsis* spp. Associadas a plantas e basidiomicetos da Amazônia Brasileira.** Universidade Federal do Amazonas.

BAR-SHIMON, M; YEHUDA, H; COHEN, L; WEISS, B; KOBESHNIKOV, A; DAUS, A; et al. (2004). **Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*.** *Current Genetics*, 45(3), 140–148. doi:10.1007/s00294-003-0471-7

BAZINET, A.L. (2017). **Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato.** *BMC Evol Biol*; 17:1–16.

BELINATO, T.A; & VALLE, D. (2015). **The impact of selection with diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations.** *PloS One* 10: e0130719.

BELINATO, T.A; MARTINS, A.J; LIMA, J.B.P; LIMA-CAMARA, T.N.D; PEIXOTO, A.A; VALLE, D. (2009). **Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 43-47.

BELLINATO, D.F; VIANA-MADEIROS, P.F; COSTA-ARAÚJO, S; MARTINS, A.J; PEREIRA-LIMA, J.B; VALLE, D. (2016). **Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltametrin and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations.** *BioMed Res. Int*; 8603263

BEN-KHEDHER, S; BOUKEDI, H; DAMMAK, M; KILANI-FEKI, O; SELLAMI-BOUDAWARA, T; ABDELKEFI-MESRATI, L; TOUNSI, S. (2017). **Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae.** *J. Invertebr. Pathol.* 144, 11–17.

BEN-KHEDHER, S; BOUKEDI, H; KILANI-FEKI, O; CHAIB, I; LAARIF, A; ABDELKEFI-MESRATI, L; TOUNSI, S. (2015). ***Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut.** *J. Invertebr. Pathol.* 132, 42–47.

BENDIA, A.G; ARAUJO, G.G; PULSCHEN, A.A; CONTRO, B; DUARTE, R.T.D; RODRIGUES, F; GALANTE, D; PELLIZARI, V.H. (2018). **Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica.** *Extremophiles* 22:917–929.

BENELLI, G; MEHLHORN, H. (2016). **Declining malaria, rising dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control.** Parasitol Res 115(5): 1747–1754. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4971-z>

BENELLI, G. (2015). **Research in mosquito control: current challenges for a brighter future.** Parasitol Res 114:2801–2805

BERRY, C; O'NEIL, S; BEN-DOV, E; JONES, A.F; MURPHY, L; QUAIL, M.A; HOLDEN, M.T.G; HARRIS, D; ZARITSKY, A; PARKHILL, J. (2002). **Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis.** Appl Environ Microbiol 68:5082–5095.

BOONSERM, P; DAVIS, P; ELLAR, D.J; LI, J. (2005). **Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and Its biological implications.** Journal of Molecular Biology, vol. 348, no. 2, pp. 363-382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.013>. PMID:15811374

BOYER, S; ZHANG, H; LEMPÉRIÈRE, G. (2012). **A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects.** Bulletin of entomological research 102: 213-229.

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

BRAGA, I.A; & VALLE, D. (2007b). ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil.** Epidemiologia e serviços de saúde, 16(2), 113-118.

BRASIL. (2017). **Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde.** Volume 48. ISSN 2358-9450.

BRASIL. (2019). **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA). Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, Nº 50. ISSN 9352-7864 [online].**

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

BRAVO, A; LIKITVIVATANAVONG, S; GILL, S.S; SOBERÓN, M. (2011). ***Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41: 423-431.

BUECHE, M; SAUVAIN, L; WUNDERLIN, T; JUNIER, T; TERCIER, M; LOIZEAU, J.L; et al. (2013). **Endospore-forming bacteria as an indicator of pollution in sediments of Lake Geneva.** In E3S Web of Conferences (Vol. 1, p. 33011). EDP Sciences.

CARVALHO, F.D; MOREIRA, L.A. (2017). **Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species?.** Neotropical entomology, 46(3), 243-255.

CARVALHO, L.A.F; SILVA, I.G. (1999). **Atividade larvicida do Temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762), em diferentes criadouros artificiais.** Revista Patologia Tropical, 28: 211-232

CASADOS-VAZQUEZ, L.E; AVILA-CABRERA, S; BIDESHI, D.K; BARBOZA-CORONA, J.E. (2015). **Heterologous expression, purification and biochemical characterization of endochitinase ChiA74 from *Bacillus thuringiensis*.** Protein Expr. Purif. 109, 99–105. doi: 10.1016/j.pep.2014.11.01

CASTELO-BRANCO, R; BARREIRO, A; SILVA, F.S; CARVALHAL-GOMES, S.B.V; FONTANA, L.F; MENDONÇA-FILHO, J.G; VASCONCELOS, V. (2016). **Bacterial community characterization and biogeochemistry of sediments from a tropical upwelling system (Cabo Frio, Southeastern Brazil).** Continental Shelf Research, 130, 1-13.

CATTARINO, L; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I; IMAI, N; CUMMINGS, D.A; FERGUSON, N.M. (2020). **Mapping global variation in dengue transmission intensity.** *Science translational medicine*, 12(528).

CHAABOUNI, I; GUESMI, A; CHERIF, A (2012). **Secondary Metabolites of *Bacillus*: Potentials in Biotechnology.** In: Sansinenea E, editor. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 347–66. doi:10.1007/978-94-007-3021-2\_18.

CAVALCANTI, L.P.G; PONTES, R.J.S; REGAZZI, A.C.F; JÚNIOR, F.J.P; FRUTUOSO, R.L; SOUSA, E.P; LIMA, J.W.O. (2007). **Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório.** Revista de Saúde Pública 41: 638-644.

CHANG, Y.C; REDDY, M.V; UMEMOTO, H; KONDO, S; CHOI, D. (2020). **Biodegradation of alkylphenols by rhizosphere microorganisms isolated from the roots of *Hosta undulata*.** Journal of Environmental Chemical Engineering 8 (3), 103771.

CHEN, H; WANG, L; SU, C.X; GONG, G.H; WANG, P; YU, Z.L. (2008). **Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*.** Letters in applied microbiology, 47(3), 180-186.

CLEMENTS, A.N. (1992). **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction** (Vol. 1, pp. 333-335). London: Chapman & Hall.

CONSOLI, R.A; OLIVEIRA, R.L.D. (1994). **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Editora Fiocruz.

CORNEL, A.J; STANICH, M.A; FARLEY, D; MULLIGAN III, F.S; BYDE, G. (2000). **Methoprene tolerance in *Aedes nigromaculis* in Fresno county, California.** Journal of the American Mosquito Control Association, 16(3), 223-228.

COSTA, C.L.L; BADINO, A.C. (2012). **Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures and with glycerol pulses under different temperature conditions.** Biochem. Eng. J., v.69, p.1-7.

COSTA, F.M; TADEI, W.P. (2012). **Morphological alterations caused by Diflubenzuron in *Anopheles darlingi* root (Diptera, Culicidae).** Journal Research in Biology 3: 215-221.

COSTA, J.R.V; ROSSI, J.R; MARUCCI, S.C; ALVES, E.C.C; VOLPE, H.X.L; FERRAUDO, A.S; LEMOS, V.F.M; DESIDÉRIO, J.A. (2010). **Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L) (Diptera: culicidae).** Neotropical Entomology, 39: 757-766

COSTA, M.L.M; LANA, U.G.P; BARROS, E.C; PAIVA, L.V; VALICENTE, F.H. (2014). **Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* cyt Genes and Their Effect Against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*.** Journal of Agricultural Science, 6: 128-137.

DACRE, F.E; ROBERT, J.P; STEPHEN, F.D; et al. (1997). **Isolation of *Bacillus megaterium* mutants that produce high levels of heterologous protein, and their use to construct a highly mosquitocidal strain.** Journal of Current Microbiology, 35(2): 71-76.

DAHMANA, H; RAOULT, D; FENOLLAR, F; MEDIANNIKOV, O. (2020). **Insecticidal Activity of Bacteria from Larvae Breeding Site with Natural Larvae Mortality: Screening of Separated Supernatant and Pellet Fractions.** Pathogens, 9(6), 486.

DAME, D.A; WICHTERMAN, G.J; HORNBY, J.A. (1998). **Mosquito (*Aedes taeniorhynchus*) resistance to methoprene in an isolated habitat.** Journal of the American Mosquito Control Association, 14(2), 200.

DARBRO, J.M; GRAHAM, R.I; KAY, B.H; RYAN, P.A; THOMAS, M.B. (2011). **Evaluation of Entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Biocontrol Science Technology 21: 1027-1047.

DE-VOS, P. (2009). **Genus IV. *Brevibacillus* Shida, Takagi, Kadowaki and Komagata 1996a**, 942VP. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd edn.). Springer, New York, 305–316.

DELATTE, H; GIMONNEAU, G; TRIBOIRE, A; FONTENILLE, D. (2009). **Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean.** J Med Entomol 46:33–41. <https://doi.org/10.1603/033.046.0105>

DESJARDINE, K; PEREIRA, A; WRIGHT, H; MATAINAHO, T; KELLY, M; ANDERSEN, R.J. (2007). **Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis.** J Nat Prod 70:1850–1853.

DEVINE, G.J; EZA, D; OGUSUKU, E; FURLONG, M.J. (2008). **Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas.** Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública 25: 74-100.



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

DONALISIO, M.R; FREITAS, A.R.R; ZUBEN, A.P.B.V. (2017). **Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a Clínica e implicações para a saúde pública**. *Revista de Saúde Pública*, [S. L.], 51(30), p.1-6.

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

DUNHAM, W.C. (2015). **Evolution and future of biocontrol**. Paper presented at the 10<sup>th</sup> Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM), Basel, Switzerland, October 20th, 2015.

ELLEUCH, J; TOUNSI, S; HASSEN, N.B.B; LACOIX, M.N; CHANDRE, F; JAOUA, S; ZGHAL, R.Z. (2015). **Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae)**. *J. of Invert. Pathol*, v. 124, p. 90–97.

EVANS, H.C; ELLIOT, S.L; BARRETO, R.W. (2018). **Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas**. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(3), 206–214. doi:10.1590/0074-02760170369

FABIAN, J; ZLATANOVIC, S; MUTZ, M; PREMKE, K. (2017). **Fungal–bacterial dynamics and their contribution to terrigenous carbon turnover in relation to organic matter quality**. *ISME J* 11:415–425.

FALARDEAU, J; WISE, C; NOVITSKY, L. (2013). **Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens**. *J Chem Ecol*. 39(7), 869-878.

FALQUETO, S.A.; PITALUGA, B.F.; DE SOUSA, J.R.; TARGANSKI, S.K.; CAMPOS, M.G.; MENDES, T.A.D.O.; DA SILVA, G.F.; SILVA, D.H.S.; SOARES, M.A. (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.

FANGIO, M.F; ROURA, S.I; FRITZ, R. (2010). **Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods**. *J. Food Sci*; 75, M218-M221.

FEDHILA, S; NEL, P; LERECLUS, D. (2002). **The *InhA2* metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route**. *J Bacteriol* 184:3296-3304.

FERREIRA-DE-BRITO, A; RIBEIRO, I.P; MIRANDA, R.M; FERNANDES, R.S; CAMPOS, S.S; SILVA, K.A.B; CASTRO, M.G; BONALDO, M.C; BRASIL, P; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, C. (2016). **First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America**. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 111, 655-658.

FINNEY, D.J. (1971). **Probit Analysis**. London, Cambridge University, 333p.

FORATTINI, O.P. (2002). **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: v. 2**. In *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: v. 2* (pp. 860-860).

FRISVAD, J.C. (2014). **Taxonomy, chemodiversity and chemoconsistency of *aspergillus*, *penicillium* and *talaromyces* species**. *Frontiers in Microbiology*,c.5,n.DEC,p.1-1.

FUKATSU, T; NIKOH, N. (1998). **Two Intracellular Symbiotic Bacteria from the Mulberry Psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera)**. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:3599–606. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106470/>. Accessed 22 Nov 2020.

GALARDO, A.K; ZIMMERMAN, R; GALARDO, C.D. (2013). **Larval control of *Anopheles (Nyssorhinchus) darlingi* using granular formulation of *Bacillus sphaericus* in abandoned gold-miners excavation pools in the Brazilian Amazon rainforest**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46: 172–177.

GALZER, E.C.W; AZEVEDO-FILHO, W.S. (2016). **Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas**. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*, 1: 13-16.

GAO, Z; ZHANG, B; LIU, H; HAN, J; ZHANG, Y. (2017). **Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea***. *Biol Control*; 105:27–39.

GATHERER, D; KOHL, A. (2016). **Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas**. *Journal of General Virology*, 97(2), 269-273.

GEETHA, I; MANONMANI, A.M; PRABAKARAN, G. (2011). ***Bacillus amyloliquefaciens*: A mosquitocidal bacterium from mangrove forests of Andaman & Nicobar islands, India**. *Acta Tropica*, 120(3), 155–159. doi:10.1016/j.actatropica.2011.07.006

GLARE, T; CARADUS, J; GELERNTER, W; JACKSON, T; KEYHANI, N; KÖHL, J; et al. (2012). **Have biopesticides come of age?** *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250–258. doi:10.1016/j.tibtech.2012.01.003

GONG, A.D; LI, H.P; YUAN, Q.S; SONG, X.S; YAO, W; HE, W.J; et al. (2015). **Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum***. *PloS one*, 10(2), e0116871.

GOULD, E; PETTERSSON, J; HIGGS, S; CHARREL, R; DE LAMBALLERIE, X. (2017). **Emerging arboviruses: why today?** *One Heal*;4(June); 1-13.

GRADY, E.N; MACDONALD, J; HO, M.T; WESELOWSKI, B; MCDOWELL, T; SOLOMON, O; et al. (2019). **Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6**. *BMC Microbiology*, 19(1). doi:10.1186/s12866-018-1380-8

GRIGORAKI, L; PUGGIOLI, A; MAVRIDIS, K; DOURIS, V; MONTANARI, M; BELLINI, R; VONTAS, J. (2017). **Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus.** Scientific reports, 7(1), 1-8.

GUO, D.L; WAN, B; XIAO, S.J; ALLEN, S; GU, Y.C; DING, L.S; ZHOU, Y. (2015). **Cyclic Lipopeptides with Herbicidal and Insecticidal Activities Produced by *Bacillus clausii* DTM1.** Nat. Prod. Commun. 2015, 10, 2151–2153.

GUTTMANN, D.M; ELLAR, D. J. (2000). **Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors.** FEMS Microbiol. Lett. 188, 7–13. doi: 10.1016/s0378-1097(00)00200-7.

HABIB, M.E.M. (1983). **Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H14) against some aquatic dipterous insects.** Zeitschrift für Angewandte Entomologie, vol. 95, no. 1-5, pp. 368-376. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.1983.tb02656.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.1983.tb02656.x).

HAJEK, A.E; LEGER, R.J. (1994). **Interactions between fungal pathogens and insect hosts.** Annual Review of Entomology.39:293-322.

HONÓRIO, N.A; SILVA, W.D.C; LEITE, P.J; GONÇALVES, J.M; LOUNIBOS, L.P; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (2003). **Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 98:191–198. <https://doi.org/10.1590/s0074-0276200300 0200005>

HU, Z.C; ZHENG, Y.G; WANG, Z; SHEN, Y.C. (2006). **pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*.** Enzyme Microb Technol, v.39, p.586-590.

HUANG, X; MADAN, A. (1999). **CAP3: A DNA Sequence Assembly Program.** Genome Res. 1999;9:868–77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310812/>. Accessed 21 Sep 2020.

HUANG, S; CHEN, C; WU, Y; WU, Q; ZHANG, R. (2011). **Characterization of depth-related bacterial communities and their relationships with the environmental factors in the river sediments.** World J Microbiol Biotechnol 27:2655–2664

HUANG, X.Q; LU, Z.X; ZHAO, H.Z; BIE, X.M; LU, F.X; YANG, S.J. (2006). **Antiviral activity of antimicrobial lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj against pseudorabies virus, porcine parvovirus, Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus in vitro.** Int J Pept Res Ther 12:373–377.

HUANG, Y.J; HIGGS, S; VANLANDINGHAM, D. (2017). **Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses.** Insects 8: 21.

ISHAG, A.E.S.A; ABDELBAGI, A.O; HAMMAD, A.M.A; ELSHEIKH, E.A.E; ELSAID, O.E; HUR, J.H; LAING, M.D. (2016). **Biodegradation of chlorpyrifos, malathion, and dimethoate by three strains of Bacteria isolated from pesticide-polluted soils in Sudan.** J. Agric. FoodChem. 64, 8491–8498.<https://doi.org/10.1007/s13765-017-0281-0>

JENSEN, G.B; HANSEN, B.M; EILENBERG, J; MAHILLON, J. (2003). **The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives.** Environ Microbiol 5, 631–640.

JIMENEZ, G; URDIAIN, M; CIFUENTES, A; LÓPEZ-LÓPEZ, A; BLANCH, A.R; TAMAMES, J; et al. (2013). **Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations.** Syst Appl Microbiol; 36:383–91.

JIMÉNEZA, M.U; ANA, C; ARÁNZAZU, L; ANICET, R.B; JAVIER, T; PETER, K; ANNE-BRIT, K; DANIEL, R; JUAN, F; MARTÍNEZG, F; et al. (2013). **Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations Guillermo.** Syst. Appl. Microbiol; 36, 383–391.

JONES, R; KULKARNI, M.A; DAVIDSON, T.M.V; TALBOT, B. (2020). **Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors.** PLOS ONE, 15(2), e0220753. doi:10.1371/journal.pone.0220753

JUNG, M.Y; PAEK, W.K; PARK, I-S; HAN, J-R; SIN, Y; et al. (2010). ***Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea.** J Microbiol; 48:867–71

KAMAL, M; KENAWY, M.A; RADY, M.H; KHALED, A.S; SAMY, A.M. (2018). **Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate.** PLoS ONE 13(12): e0210122.

KANTAS, D; PAPATSIROS, V.G; TASSIS, P.D; GIAVASIS, I; BOUKI, P; TZIKA, E.D. (2015). **A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin((R))) protects against enteric pathogens in postweaning piglets.** J Appl Microbiol; 118:727–738. doi:10.1111/jam.12729

KEMKEN, F; ROHFS, M. (2010). **Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemicaldefence strategy against antagonistic animals?.** fungal ecology; 3, 107–114.

KHACHATOURIANS, G.G; QAZI, S.S. (2008). **Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology.** In: Brakhage, A.A., Zipfel, P.F. (eds), The Mycota VI, Human and Animal Relationships. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 33e61.

KHAN, M.R; SAHA, M.L; AFROZ, H. (2001). **Microorganisms associated with gemstones.** Bangladesh J. Bot; 30, 93-96.

KILPATRICK A.M; RANDOLPH S.E. (2012). **Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases.** Lancet. 380: 1946–1955.

KOOLEN, H.H.F. (2011). **Metabolismo secundário de fungos endofíticos associado às plantas *Strychnos cf.toxifera* (Loganiaceae) e *Mauritia flexuosa* (Arecaceae).** Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 246 f.

KOSTKA, J.E; PRAKASH, O; OVERHOLT, W.A; GREEN, S.J; FREYER, G; CANION, A; DELGARDIO, J; NORTON, N; HAZEN, T.C; HUETTEL, M. (2011). **Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial 706 community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill.** 707 Appl. Environ. Microbiol. 77 (22), 7962-7974.

LACEY, L.A; LACEY, C.M. (1990). **The Medical Importance of Riceland Mosquitoes and Their Control Using Alternatives to Chemical Insecticides.** J. Am. Mosq. Control Assoc. Suppl. 1990, 2, 1–93

LACEY, L.A. (2007). *Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control.* Journal of the American Mosquito Control Association, vol. 23, no. 2, suppl., pp. 133-163.

LAZARTE, J.N; LOPEZ, R.P; GHIRINGHELLI, P.D; BERÓN, C.M. (2018). *Bacillus wiedmannii biovar thuringiensis: a specialized mosquitocidal pathogen with plasmids from diverse origins.* Genome Biology and Evolution. doi:10.1093/gbe/evy211

LEE, H; CHUREY, J.J; WOROBO, R.W. (2009). **Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361.** FEMS Microbiol. Lett. 299, 205–213. doi: 10. 1111/j.1574-6968.2009.01749.x

LERECLUS, D; AGAISSE, H; GRANDVALET, C; SALAMITOU, S; GOMINET, M. (2000). **Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*.** International Journal of Medical Microbiology, 290(4-5), 295–299. doi:10.1016/s1438-4221(00)80024-7

LETA, S; BEYENE, T.J; CLERCQ, E.M; AMENU, K; KRAEMER, M.U.G; REVIE, C.W. (2018). **Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.** Int J Infect Dis. 2018;67:25-35.

LIMA, W.P; NETO, F.C; MACORIS, M.L.G; ZUCCARI, D.A.D.A; DIBO, M.R. (2009). **Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(6):638-641.

LIU, S.S; RAO, A; VINSON, S.B. (2014). **Biological control in China: past, present and future—An introduction to this special issue.** Biol Control 68:1–5.

LIU, Y; LAI, Q; DU, J; SHAO, Z. (2017). **Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments.** Sci Rep; 7:689.

LOBO, K.S; SOARES-DA-SILVA, J; SILVA, M.C; TADEI, W.P; POLANCZYK, R.A; PINHEIRO, V.C.S. (2018). **Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae.** Revista Brasileira de Entomologia, vol. 62, no. 1, pp. 5-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>.

LOGAN, N.A; BERGE, O; BISHOP, A.H; BUSSE, H.J; DE-VOS, P; FRITZE, D; HEYNDRICKX, M; KÄMPFER, P; RABINOVITCH, L; SALKINOJA-SALONEN, M.S; SELDIN, L; 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/ij.s.0.013649-0>

LOPES, J. (1999). **Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do Paraná, Brasil. VIII. Influência das larvas predadoras (*Toxorhynchites* sp., *Limatus durhamii* e *Culex bigoti*) sobre a população de larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Culex eduardoi***. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 821-6.

LÓPEZ-ISASMENDI, G; ALVAREZ, A.E; PETROSELLI, G; ERRA-BALSELLS, R; AUDISIO, M.C. (2019). **Aphicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strains in the peach-potato aphid (*Myzus persicae*)**. *Microbiological Research*, 226, 41–47.

LOUNIBOS, L.P. (1981). **Habitat segregation among African treehole mosquitoes**. *Ecological Entomology*, 6(2), 129-154.

LUTINSKI, J.A; KUCZMAINSKI, A.G; SUIANE OLIVEIRA, D.Q; BUSATO, M.A; CLEIDENARA MARIA, M.W; MALGUEIRO, A; MELLO GARCIA, F.R. (2017). ***Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* como alternativa para o controle populacional de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. *Ciência e Natura*, v. 39, n. 2, p. 211.

MACHADO, P.H.B; LIVRAMENTO, K.G; MÁXIMO, W.P.F; NEGRIL, B.F; PAIVA, L.V; VALICENTE, F.H. (2020). **Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains to control *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) population**. *Rev. Bras. entomol.* vol.64 no.1 São Paulo 2020 Epub Jan 17.

MADSEN, R; LUNDSTEDT, T; TRYGG, J. (2010). **Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis**. *Analytica chimica acta*, 659(1-2), 23-33.

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

MAKONI, M. (2020). **Malaria fighters' latest chemical weapon may not last long**. *Science*. 369:1153–1153.

MALHI, Y; ROBERTS, J.T; BETTS, R.A; KILLEEN, T.J; LI, W; NOBRE, C.A. (2008). **Climate change, deforestation, and the fate of the Amazon**. *Science*. 319:169–72.

MANNING, J.E; MORENS, D.M; KAMHAWI, S; VALENZUELA, J.G; MEMOLI, M. (2018). **Mosquito saliva: the hope for a universal arbovirus vaccine?**. *The Journal of infectious diseases*, 218(1), 7-15.

MARCHE, M.G; MURA, M.E; FALCHI, G; RUIU, L. (2017). **Spore surface proteins of *Brevibacillus laterosporus* are involved in insect pathogenesis**. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/srep43805

MARQUES, A.M; VELOZO, L.S; CARVALHO, M.A; SERDEIRO, M.T; HONÓRIO, N.A; KAPLAN, M.A.C; MALECK, M. (2017). **Larvicidal Activity of *Ottonia anisum* Metabolites against *Aedes aegypti*: A Potential Natural Alternative Source for Mosquito Vector Control in Brazil.** J. Vector Borne Dis; 8, 61–68, PMID:28352047.

MASCARIN, G.M; LOPES, R.B; DELALIBERA-JR, Í; FERNANDES, É.K.K; LUZ, C; FARIA, M. (2019). **Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil.** Journal of invertebrate pathology, 165, 46-53.

MAYER, F.L; KRONSTAD, J.W. (2017). **Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*.** mBio 8, e01537.

MILLER, R.A; BENO. S.M; KENT, D.J; CARROLL, L.M; MARTIN, N.H; BOOR, K.J; et al. (2016). ***Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments.** Int J Syst Evol Microbiol; 66:4744–53.

MILUTINOVIC, A.B; STOLPE, C; ARMITAGE, S.A; KURTZ, J. (2013). **The red flour beetle as a model for bacterial oral infections.** Plos One.8:e64638.

MIRANPURI, G.S; KHACHATOURIANS, G.G. (1991). **Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*.** Entomologia Experimentalis et Applicata 59: 19e27.

MOYES, C.L; VONTAS, J; MARTINS, A.J; NG, L.C; KOOU, S.Y; DUSFOUR, I; RAGHAVENDRA, K; PINTO, J; CORBEL, V; DAVID, J.P. et al. (2017). **Contemporary Status of Insecticide Resistance in the Major *Aedes* Vectors of Arboviruses Infecting Humans.** PLoS Negl. Trop. Dis; 11, 1–20.

MUNIARAJ, M; ARUNACHALAM, N; PARAMASIVAN, R; MARIAPPAN, T; PHILIP-SAMUEL, P; RAJAMANNAR, V; BDELLOID, R. (2012). **Philodina species in the breeding containers of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.** Trop. biomed, v. 29, p. 646–649.

MURUGAN, K; PRIYANKA, V; DINESH, D; MADHIYAZHAGAN, P; PANNEERSELVAM, C; SUBRAMANIAM, J; SURESH, U; CHANDRAMOHAN, B; RONI, M; NICOLETTI, M; et al. (2018). **Predation by Asian bullfrog tadpoles, *Hoplobatrachus tigerinus*, against the dengue vector, *Aedes aegypti*, in an aquatic environment treated with mosquitoicidal nanoparticles.** Parasitol Res 114:3601–3610

NAKAMURA, L.K. (1998). ***Bacillus pseudomycoides* sp. nov.** Int J Syst Bacteriol; 48: 1031–5

NKYA, T.E; AKHOUAYRI, I; KISINZA, W; DAVID, J.P. (2013). **Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects.** Insect biochemistry and molecular biology 43: 407-416.

NÓBREGA, M.E.B.D; ARAÚJO, E.L.D.L; WADA, M.Y; LEITE, P.L; DIMECH, G.S; PÉRCIO, J. (2018). **Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015.** Epidemiologia e Serviços de Saúde 27: e2017039.

NUNES, M.R.T; FARIA, N.R; DE VASCONCELOS, J.M; GOLDING, N; KRAEMER, M.U; DE OLIVEIRA, L.F; et al. (2015). **Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.** BMC medicine, 13(1), 1-11.

OLIVEIRA, E.J; RABINOVITCH, L; MONNERAT, R.G; PASSOS, L.K; ZAHNER, V. (2004). **Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control.** Appl. Environ. Microbiol; 70, 6657-6664.

OSMAN, N.I; YIN, S. (2018). **Isolation and characterization of pea plant (*Pisum sativum* L.) growth-promoting Rhizobacteria.** African Journal of Microbiology Research 12 (34), 820-828.

OTERO, M; & SOLARI, H.G. (2010). **Stochastic eco-epidemiological model of dengue disease transmission by *Aedes aegypti* mosquito.** Mathematical biosciences, 223(1), 32-46.

PAIXÃO, E.S; TEIXEIRA, M.G; RODRIGUES, L.C. (2018). **Zika, Chikungunya and dengue: The causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases.** BMJ Glob. Health, 3 (Suppl. 1), e000530.

PALAZZINI, J.M; DUNLAP, C.A; BOWMAN, M.J; CHULZE, S.N. (2016). ***Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles.** Microbiol Res; 192:30–6.

PALMA, L; MUÑOZ, D; BERRY, C; MURILLO, J; CABALLERO, P; CABALLERO, P. (2014). ***Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity.** Toxins; 6, 3296–3325.

PANDA, A.K; BISHT, S.S; DEMONDAL, S; SENTHIL-KUMAR, N; GURUSUBRAMANIAN, G; PANIGRAHI, A.K. (2014). ***Brevibacillus* as a biological tool: a short review.** Antonie van Leeuwenhoek 105:623–639.

PIERCE, K.M; MOHLER, R.E. (2012). **A review of chemometrics applied to comprehensive two-dimensional separations from 2008–2010.** Separation & Purification Reviews, 41(2), 143-168.

POLANCZYK, R.A. (2004). **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith).** Universidade de São Paulo.

POWELL, J.R. (2018). **Mosquito-borne human viral diseases: why *Aedes aegypti*?.** The American journal of tropical medicine and hygiene, 98(6), 1563-1565.

PROMDONKOY, B; ELLAR, D.J. (2000). **Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*.** Biochem J 350: 275-282.



RAY, S; NAFISA, P; DHRUTI, A. (2020). “Chapter 9 - *Brevibacillus*”. In **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, organizado por N. Amaran, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, e A. Sankaranarayanan, 149–67. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00009-5>.

REGEV, A., KELLER, M., STRIZHOV, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E., CHET, I., et al. (1996). **Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae.** *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3581–3586.

REINER, K. (2010). **Catalase Test Protocol.** *American Society for Microbiology MicrobeLibrary*, 1-9.

REKIK, H; JAOUADI, N.Z; GARGOURI, F; BEJAR, W; FRIKHA, F; JMAL, N; BEJAR, S; JAOUADI, B. (2019). **Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12.** *Int. J. Biol.Macromol.* 121, 1227–1239.

RESENDE, M.C.D; GAMA, R.A. (2006). **Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 72-5.

REVATHI, K; CHANDRASEKARAN, R; THANIGAIVEL, A; KIRUBAKARAN, S.A; SATHISH-NARAYANAN, S; SENTHIL-NATHAN, S. (2013). **Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(3), 369–376.

REZA, K.M; ASHRAFALSADAT, N; REZA, R.M; TAHER, N; ALI, N. (2014). **Isolation and molecular identification of extracellular lipase-producing *Bacillus* species from soil.** *Annals Biol. Res.* 5: 132–139.

RIVERS, D.B; VANN, C.N; ZIMMACK, H.L; DEAN, D.H. (1991). **Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*.** *Journal of invertebrate pathology*, 58(3), 444-447.

ROBERTSON, J.L; SAVIN, N.E; SAVIN NE, PREISLER HK, SAVIN NE, SAVIN NE, et al. (2007). **Bioassays with Arthropods.** CRC Press. doi:10.1201/9781420004045.

ROIZ, D; WILSON, A.L; SCOTT, T.W; FONSECA, D.M; JOURDAIN, F; MÜLLER, P; CORBEL, V. (2018). **Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases.** *PLoS neglected tropical diseases* 12: e0006845.

RUIU, L; DELRIO, G; ELLAR, D.J; FLORIS, I; PAGLIETTI, B; RUBINO, S; SATTÀ, A. (2006). **Lethal and sub-lethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*)** *Entomol. Exp. Appl.* 2006;118:137–144. doi: 10.1111/j.1570-7458.2006.00370.x.

RUIU, L; SATTÀ, A; FLORIS, I. (2013). **Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management.** *Bull. Insectology* 2013, 66, 181-186.

RUIU, L. (2013). *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. *Insects* 2013; 4(3):476–492.

RUIZ-GARCIA, C; BÉJAR, V; MARTÍNEZ-CHECA, F; LLAMAS, I; QUESADA, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Micr*; 55:191–5.

SAHAI, A.S; MANOCHA, M.S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction, *FEMS Microbiol. Rev.* 11 (1993) 317–338.

SALAMITOU, S; RAMISSE, F; BREHELIN, M; BOURGUET, D; GILOIS, N; GOMINET, M; HERNANDEZ, E. LERECLUS, D. (2000). The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*.146:2825-2832.

SAMPSON, M.N; GOODAY, G.W. (1998). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, v. 144, n. 8, p. 2189-2194.

SANTOS, F.D.S; MENEGON, Y.A; PIRAINÉ, R.E.A; RODRIGUES, P.R.C; CUNHA, R.C; LEITE, F.P.L. (2018). *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. *Benef Microbes*; 9(1):133–142. doi:10.3920/BM2017.0021

SATOMI, M; MYRON, T; DUC, L; VENKATESWARAN, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly facility surfaces. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 56: 1735–1740

SCHAREK-TEDIN, L; PIEPER, R; VAHJEN, W; TEDIN, K; NEUMANN, K; ZENTEK, J. (2013). *Bacillus cereus* var. *Toyoi* modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhea in piglets challenged with *Salmonella Typhimurium* DT104. *J Anim Sci*; 91 (12):5696–5704. doi:10.2527/jas.2013-6382.

SAWADA, H; IEKI, H; OYAIZU, H; MATSUMOTO, S. (1993). Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int J Syst Bacteriol.* 43:694–702

SHAPIRO, M; PREISLER, H.K; ROBERTSON, J.I. (1987). Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (*Lepidoptera*; *Lymantriidae*) by chitinase. *J. Econ. Entomol.* 80;1113–1116

SIKKA, V; CHATTU, V.K; POPLI, R.K; GALWANKAR, S.C; KELKAR, D; SAWICKI, S.G; STAWICKI, S.P; PAPANIMOS. (2016). The emergence of Zika virus as a global health security threat: a review and a consensus statement of the INDUSEM joint working group (JWG). *J Glob Infect Dis* 8(1): 3-15.

SILVA, V.C; PINHEIRO, N.L; SCHERER, P.O; FALCÃO, S.S; RIBEIRO, V.R; MENDES, R.M.M; et al. (2008). Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut

**infected with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.** Microscopy Research and Technique, 71(9), 663–668. doi:10.1002/jemt.20605

SMEDSGAARD, J. (1997). **Micro-scale extraction procedure for standardization screening of fungal metabolite production in cultures.** Journal of Chromatography A, v. 760, n. 2, p. 264–270.

SOARES-DA-SILVA, J; PINHEIRO, V.C.S; LITAIFF-ABREU, E; POLANCZYK, R.A; TADEI, W.P. (2015). **Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** Revista Brasileira de Entomologia, vol. 59, no. 1, pp. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.001>

SOARES-DA-SILVA, J; QUEIRÓS, S.G; DE AGUIAR, J.S; VIANA, J.L; DOS RAV NETA, M; DA SILVA, M.C; et al. (2017). **Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance.** Acta tropica, 176, 197-205.

SONG, J; WANG, Y; SONG, Y; ZHAO, B; WANG, H; ZHOU, S; KONG, D; GUO, X; LI, Y; HE, M. et al. (2017). ***Brevibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil of a paddy field.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67, 772–777.

SOROKULOVA, I.B; KIRIK, D.L; PINCHUK, I.V. (1997). **Probiotics against *Campylobacter* pathogens.** J Travel Med 4, 167–170.

SOUZA, A.D.L. (2006). **Potencial Genético e Químico dos endofíticos de *Murraya peniculata* L (Jack).** Universidade Federal de São Carlos, 2006.

SU, T; CHENG, M.L. (2014). **Cross resistances in spinosad-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).** Journal of medical entomology, 51(2), 428-435.

SUMI, C.D; YANG, B.W; YEO, I.C; HAHM, Y.T. (2015). **Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics.** Can. J. Microbiol. 61, 93–109

TERENIUS, O; DE OLIVEIRA, C.D; PINHEIRO, W.D; TADEI, W.P; JAMES, A.A; MARINOTTI, O. (2008). **16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes.** Journal of medical entomology.45:172–5.

TETREAU, G; STALINSKI, R; DAVID, J.P; DESPRÉS, L. (2013). **Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately.** Mem Inst Oswaldo Cruz 108:894–900.

THAMTHIANKUL, S; MOAR, W. J; MILLER, M. E; PANBANGRED, W. (2004). **Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, 183–192.

THOMAS, M.B. (2018). **Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities.** BioControl 63: 61-69.

THIES, J.E; MEDHA H.D. 2007. “**An ecological assessment of transgenic crops**”. The Journal of Development Studies 43 (1): 97–129. <https://doi.org/10.1080/00220380601055593>.

THIMOTEO, S.S; GLOGAUER, A; FAORO, H; SOUZA, E.M; HUERGO, L.F; MOERSCHBACHER, B.M; PEDROSA, F.O (2017) **A broad pH range and processive chitinase from metagenome library**. Braz J Med Biol Res 50(1).

TORRES, M.J; PÉREZ-BRANDAN, C; SABATÉ, D.C; PETROSELLI, G; ERRA-BALSELLS, R; AUDISIO, M.C. (2017). **Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens**. Biol. Control 105, 93–99.

VALTIERRA-DE-LUIS, D; VILLANUEVA, M, L.A.I L; WILLIAMS, T; CABALLERO, P. (2020). **Potential of Cry10Aa and Cyt2Ba, Two Minority  $\delta$ -endotoxins Produced by *Bacillus thuringiensis* ser. israelensis, for the Control of *Aedes aegypti* Larvae**. Toxins. 12:355.

VEGA-RUA, A; ZOUACHE, K; CARO, V; DIANCOURT, L; DELAUNAY, P; GRANDADAM, M; FAILLOUX, A.B. (2013). **High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France**. PLoS One 8:e59716. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>

VIANA, J.L; SOARES-DA-SILVA, J; VIEIRA-NETO, M.R.A; TADEI, W.P; OLIVEIRA, C.D; ABDALLA, F.C; PEIXOTO, C.A; PINHEIRO, V.C.S. (2020). **Isolados de *Bacillus thuringiensis* de biomas maranhenses com potencial ação inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**. Braz. J. Biol., ahead of print Epub Feb 21.

VILAS-BÔAS, G.T; LEMOS, M.V.F; (2004). **Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil**. Can. J. Microbiol. 50, 605-613. <https://doi.org/10.1139/w04-052>.

VILAS-BÔAS, G.T; ALVAREZ, R.C; DOS SANTOS, C.A; VILAS-BOAS, L.A. (2012). **Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry**. EntomoBrasilis, v. 5, n. 1, p. 1–10.

VISAGIE, C.M; RENAUD, J.B; BURGESS, K.M.N; MALLOCH, D.W; CLARK, D; KETCH, L; URB, M; ASSABGUI, R; SUMARAH, M.W; SEIFERT, K.A. (2016). **Fifteen new species of *Penicillium***. Persoonia, v. 36, p. 247–280.

WAHLA, A.Q; IQBAL, S; ANWAR, S; FIRDOUS, S; MUELLER, J.A. (2019). **Optimizing the me-tribuzin degrading potential of a novel bacterial consortium based on Taguchi design of experiment**. J. Hazard. Mater. 366, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.054>

WANG, Y; JIANG, Y. (2016). **Chemotaxonomy of actinobacteria, In Actinobacteria Basics and Biotechnological Applications**, IntechOpen.

WELKER, N.E; CAMPBELL, L.L. (1967). **Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis***. Journal of Bacteriology, Baltimore, v. 94, p. 1124-1130.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1985). **Diseases UBSP for R and T in T. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide.** Geneva, 7-11 October 1985. 1985. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/60326>. Accessed 25 Sep 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2005). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.** WHO/WHOPES/GCDPP/2005.13.

WIKAN, N; SMITH, D.R. (2016). **Zika virus: history of a newly emerging arbovirus.** The Lancet Infectious Diseases, 16(7), e119-e126.

WILKERSON, R.C; LINTON, Y.M; FONSECA, D.M; SCHULTZ, T.R; PRICE, D.C; STRICKMAN, D.A. (2015). **Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships.** PLOS ONE, 10(7), e0133602. doi:10.1371/journal.pone.0133602

WILSON, A.L; COURTENAY, O; KELLY-HOPE, L.A; SCOTT, T.W; TAKKEN, W; TORR, S.J; LINDSAY, S.W. (2020). **The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 14(1), e0007831.

WOO, C.J; YUN, U.J; PARK, H.D. (1996) **Isolation of chitin-utilizing bacterium and production of its extracellular chitinase.** J. Microbiol. Biotech. 6 439-444

WRBU. (2020). **Walter Reed Biosystematics Unit. Mosquito identification resources.** (<http://www.wrbu.org/VeclD MQ.html>).

WU, C.F; XU, X.M; ZHU, Q; DENG, M.C; FENG, L; PENG, J; YUAN, J.P; WANG, J.H; (2014). **An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by *Bacillus* sp. CN-22.** Applied microbiology and biotechnology 98 (8), 3801-3807.

WU, L; WU, H; CHEN, L; YU, X; BORRIS, R; GAO, X. (2015). **Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens.** Scientific Report, 5:12975.

YANG, X; YOUSEF, A.E. (2018). **Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review.** World J. Microbiol. Biotechnol. 34, 57.

YUAN, H; AN, S; LIU, E; PAN, W; ZHU, Z. (2015). **Fractionation and bioavailability of phosphorus in sediments of Huaihe River.** China J Soil Water Conserv 70:313-321

ZARA, A.L.D.S.A; SANTOS, S.M.D; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S; CARVALHO, R.G; COELHO, G.E. (2016). **Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, 25, 391-404.

ZOUARI, I; JLAIEL, L; TOUNSI, S; TRIGUI, M. (2016). **Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds.** Biol. Control 100, 54–62.