



UFAM



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

SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DE
GENES *Cry E*/OU *PhaC* VIA SÍNTESE DE POLIHIDROXIACALNOATOS
(PHAs) PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* LINNAEUS 1762

RICARDO DE MELO KATAK

MANAUS/AM

2015

RICARDO DE MELO KATAK

**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DE
GENES *Cry E*/OU *Phac* VIA SÍNTESE POLIHIDROXIACALNOATOS (PHAs)
PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* LINNAEUS 1762**

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

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-orientadora: Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

MANAUS/AM

2015

Ficha Catalográfica

K19s Katak, Ricardo de Melo
Seleção de *Bacillus* spp. da Amazônia Brasileira
portadores de genes Cry e/ou PhaC via síntese
Poli-hidroxiacalcanoatos (PHAs) para o controle de
Aedes aegypti Linnaeus 1762. / Ricardo de Melo Katak. 2015
79 f.: il. Color; 31 cm.

Orientadora: Dr. Wanderli Pedro Tadei
Coorientadora: Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Vetores de doenças. 2. Metabólitos. 3. Proteína CRY. 4.
Poli-hidroxiacalcanoatos. 5. Alternativa de controle. I. Tadei, Dr.
Wanderli Pedro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RICARDO DE MELO KATAK

SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DE GENES *Cry* E/OU *PhaC* VIA SÍNTESE DE POLIHIDROXIACALNOATOS (PHAs) PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti* LINNAEUS 1769.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas – UFAM para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia – Área de Concentração Saúde.

Aprovado em: 27 / Novembro / 2015

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Wanderli Pedro Tadei (Presidente)_____

Dr. Ademir Castro e Silva (UEA)_____

Dr. Iléa Brandão Rodrigues (INPA)_____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por todas as vitórias e conquistas durante esta jornada: O senhor é meu pastor e nada me faltará!

Ao CNPq pelo concessão da bolsa.

A família em especial aos meus pais Jose kataki e Maria Lucia Katak, tudo isso devo a eles.

Aos meus irmãos Luciano, Joelson, Josete, Elias, Josué e Carol pelo voto de confiança depositado por todos.

Agradeço a minha segunda família que me acolheu em Manaus, a Iza Kataki e ao Evandro Marinho, e meus primos Vinicius, Leo e Raissa, e meu príncipe Heitorzin, pois sem eles não teria conseguido chegar aqui.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, pela orientação, confiança e oportunidade, o que tornou possível a realização desse trabalho.

À minha Co-orientadora Dra. Antônia Queiroz, pelo voto de confiança em realizar esse projeto, também pelos ensinamentos, paciência que me prestou para realização desse trabalho.

Agradeço a Dr. Iléa Rodriguês pela contribuição na minha formação científica, pela amizade, confiança, carinho.

Ao Dr. João Zequi pelas orientações científicas, amizade, palavras de confiança e por me aguçar por mais curiosidades científicas.

Agradeço ao professor Edmar Vaz de Andrade pelos ensinamentos no curso de Biotecnologia;

Agradeço aos meus amigos de laboratório Adriano, Eunice, Joelma, Grafe, Janaina, Marta; Leandro França, William, Cláudia, Edineuza.

Agradeço aos amigos do MBT-UEA, Sarah Raquel pela colaboração no projeto.

Agradeço aos meus amigos e colegas de curso da biotecnologia Leissandra Castelo; Andreia Silva, Diego Moreira, Keila pela amizade.

Agradeço a Dona Maria do Disterro e a Miriam pela colaboração, pelo apoio moral e por todos os momentos que matou a minha fome; e também a Dona Alessandra.

Agradeço aos meus amigos do coração Juan oliveira, Jairo, Luiz Carlos e Auricelia Matos e em especial ao meu amigo Elerson Matos Rocha e Veranilce Alves pelo companheirismo e por estar junto nessa jornada acreditando em dias melhores.

RESUMO

Insetos vetores de patógenos tropicais como *Ae. Aegypti*, principal vetor do vírus dengue, chikungunya, zika e vírus do Nilo Ocidental, são um grande problema para saúde pública. Uma das principais medidas de combate é o controle do vetor. Neste sentido, buscou-se investigar o controle biológico de *Ae. aegypti*; com uso de *Bacillus* spp.; isolados de diferentes ambientes Amazônicos. A partir de diferentes amostras, obteve-se o total de 118 linhagens bacterianas, sendo 41 linhagens identificadas por características fenotípicas como bacilos. Destes, 39 foram bacilos gram positivos e 2 gram negativos. A identificação molecular destas linhagens permitiu identificar 29 linhagens, sendo caracterizadas em três gêneros distintos. Quanto a caracterização molecular dos bacilos portadores dos genes *Cry4*, *Cry11* e *PhaC*. Foram observados genes *Cry4* nas linhagens BtAM41, 2R6.2.1LB, com ausência de toxicidade. As linhagens Bio19LB, BSBioLB, Bio01LB e Bio011LB apresentaram os genes *Cry11*, quanto a atividade larvicida foram eficientes nas duas etapas dos bioensaios exceto a linhagem Bio011 que apresentou resultados abaixo de 50 % na segunda etapa dos bioensaios. As linhagens 2WISP2, K5NA, R8ISP2, R15ISP2, Bio16LB, BtAM125LB, BtAM49LB apresentaram apenas o gene *PhaC*. Apenas a linhagem BtAM49LB foi eficiente na atividade larvicida. Considerando os resultados dos bioensaios seletivos de extratos brutos de *Bacillus* spp., os melhores resultados foram quando houve a interação do sobrenadante estéril com células lisadas (SN), apresentando 100 % em 72 h. Neste sentido, recomenda-se estudos da caracterização dos metabolitos destas linhagens. As linhagens K4NA; 103PHAISP2, BtAM220NA; ALP2ISP2, BtAM74LB e PHA50ISP2 portadoras dos genes *Cry11* e *PhaC*, não apresentaram atividade larvicida acima de 50 %, considerando que não foi observado correlação dos genes associados com atividade larvicida. Somente a linhagem Bio19LB apresentou os genes *Cry11* e *Cry4*, apresentando atividade larvicida acima de 50 % na interação de sobrenadante com células lisadas com 70 % de mortalidade em 72 h. Não foi observado correlação dos genes *PhaC* e *Cry* nos isolados, mas os melhores resultados foram no consórcio do sobrenadante + células lisadas, possibilitando a hipótese de interação de moléculas com atividade inseticida. Portanto, diante destes resultados são necessários mais estudos detalhados para compreender e elucidar a interação das linhagens que apresentaram maior atividade larvicida, conclui-se que as linhagens que apresentaram atividade larvicida acima de 50 % e as mesmas portadoras dos genes *Cry11*, *Cry4* e *PhaC* podem estar associados a outros fatores de virulência e patogenicidade, tornando-se futuramente linhagens potenciais para o controle de *Ae. Aegypti* no Estado do Amazonas.

Palavras chaves: Vetor de doenças, Metabolitos, Proteínas inseticidas, Biopolímeros, Alternativas de controle.

ABSTRACT

Insect vectors of tropical diseases such as *Ae. Aegypti*, the main vector of dengue virus, chikungunya, zika and West Nile virus, are a major problem for public health. One of the major control measures is to control the vector. In this regard, we sought to investigate the biological control of *Ae. aegypti*; with the use of *Bacillus* spp .; Amazon isolated from different environments. From the different samples, there was obtained a total of 118 bacterial strains, and 41 strains identified by phenotypic characteristics such as bacilli. Of these, 38 were positive and gram 2 gram negative bacilli. The molecular identification of these strains allowed the identification of 29 strains were characterized in three different genres. The molecular characterization of patients bacilli of Cry4 genes, cry11 and PHAC. Cry4 genes were observed in BtAM41, 2R6.2.1LB lines with no toxicity. The Bio19LB lines, BSBioLB, Bio01LB and Bio011LB presented the cry11 genes, as the larvicidal activity were efficient in both phases of bioassays except Bio011 lineage that any result below 50% in the second stage of bioassays. The 2WISP2, K5NA lines, R8ISP2, R15ISP2, Bio16LB, BtAM125LB, BtAM49LB just presented the *PhaC* gene. Just BtAM49LB strain was effective in larvicidal activity. Considering the results of the first and second stage, the best results when there were interaction sterile lysed cell supernatant (SN), showing 100% in 72 h. In this sense, it is recommended to study the characterization of metabolites of these strains. The K4NA lines; 103PHAISP2, BtAM220NA; ALP2ISP2, BtAM74LB and PHA50ISP2 bear the cry11 and PHAC genes showed no larvicidal activity above 50% considering it was not observed correlation of genes associated with larvicidal activity. Only Bio19LB strain showed the cry11 gene and Cry4, with larvicidal activity above 50% in the supernatant of lysed cells with interaction with 70% mortality within 72 h. There was no correlation of the *phaC* gene and Cry isolated, but the best results were in the supernatant of lysed cells with consortium, possibitando the possibility of interaction of molecules with insecticidal activity. So before these results are needed more detailed studies to understand and elucidate the interaction of strains that showed higher larvicidal activity, it is concluded that the strains that showed larvicidal activity above 50% and the same carriers of cry11 genes, *Cry4* and *PHAC* can be associated with other virulence and pathogenicity factors, becoming future potential lines for the control of *Ae. Aegypti*.

Key words: Disease vectors, molecular interaction, control alternatives

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração de um corpo de inclusão de Polihidroxialcanoatos em <i>Bacillus megaterium</i> , De Bary, 1884.....	26
Figura 2: Em A: Isolamento de bactérias; em B: choque térmico; em C: colônias isoladas.	32
Figura 3: Em A: Coloração de gram; em B: Visualização das lâminas; em C: Células de bacilos gram positivos; em D: Células de bacilos gram negativos.....	34
Figura 4: Manutenção de <i>Ae. aegypti</i> em laboratório para realização dos bioensaios: Em A: bacia com ovos; em B: gaiolas para manutenção de adultos; em C: alimentos para as larvas e em D: larvas de terceiro instar.....	39
Figura 5: Obtenção dos cultivos: Em A: pré-inoculo e B: fermentação das linhagens. ..	40
Figura 6: Preparo dos bioensaios: Em A: separação das larvas; em B: disposição dos copos plásticos contendo larvas de <i>Ae. aegypti</i> durante a realização e um bioensaios seletivo.....	40
Figura 7: Separação dos metabolitos produzidos pelos bacilos durante a fermentação: Em A: centrifugação em membrana Milipore 0,22µM e em B: autoclavagem do pellet.41	
Figura 8: Ilustração dos bioensaios seletivos com diferentes produtos da fermentação de bacilos: Em A: Sobrenante estéril (SNe); em B: Sobrenadante estéril + células lisadas (SNP) e em C: células lisadas + H ₂ O autoclavada (SNa).....	41
Figura 9: Disposição dos copos plásticos contendo larvas de <i>Ae. aegypti</i> durante a realização da segunda etapa dos bioensaios seletivos.	42
Figura 10: Perfil eletroforético de extração de DNA genômico das linhagens em gel de agarose 0,8 %.....	45
Figura 11: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene 16S rDNA de <i>Bacillus</i> spp., isolados da Amazônia.	45
Figura 12: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene 16S rDNA de <i>Bacillus</i> spp., isolados da Amazônia.	45
Figura 13: Representação dos gêneros com base na identificação bacteriana.....	46
Figura 14: Perfil eletroforético do gene <i>Cry4Ba</i> de <i>Bacillus</i> spp., em gel de agarose 1,5 %.....	49
Figura 15: Perfil eletroforético do gene <i>Cry4Ba</i> de <i>Bacillus</i> spp., em gel de agarose 1,5 %.....	49

Figura 16: Perfil eletroforético de amplificação do gene <i>CryIIgal</i> de <i>Bacillus</i> spp., em gel de agarose 1,5 %.....	50
Figura 17: Perfil eletroforético de amplificação do gene <i>CryIIgal</i> de <i>Bacillus</i> spp., em gel de agarose 1,5 %.....	50
Figura 18: Perfil eletroforético de amplificação do gene <i>PhaC</i> de <i>Bacillus</i> spp., em gel de agarose 1,5 %.....	51
Figura 19: Perfil eletroforético do gene <i>PhaC</i> de bacilos em gel de agarose 1,3 %.....	51
Figura 20: Porcentual de mortalidade nos bioensaios das larvas de <i>Ae. aegypti</i> da cepa Rockefeller, expostas ao sobrenadante, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.	56
Figura 21: Porcentual de mortalidade nos bioensaios das larvas de <i>Ae. aegypti</i> da cepa Rockefeller, expostas ao sobrenadante + células lisadas (Pellet), nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.....	58
Figura 22: Mortalidade em porcentagem das larvas de <i>A. aegypti</i> da cepa Rockefeller nos bioensaios com <i>Bacillus</i> spp, expostas no produto da fermentação células lisadas + H ₂ O autoclavado, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR dos genes <i>Cry4</i> , <i>Cry11</i> e <i>PhaC</i> , com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado.	35
Tabela 2: Reagentes, utilizados na amplificação dos genes <i>Cry</i> de <i>Bacillus</i> spp.....	35
Tabela 3: Condições de amplificação dos genes <i>Cry</i> de bacilos durante a reação.....	36
Tabela 4: Reagentes, utilizados na amplificação do gene <i>PhaC</i> que codificam Polihidroxialcanoatos.	36
Tabela 5: Condições de amplificação do gene <i>PhaC</i>	37
Tabela 6: Resultados dos isolados de <i>Bacillus</i> spp., a partir de amostras de diferentes ambientes Amazônicos e de linhagens reativadas de coleções do laboratório (*).	44
Tabela 7: Identificação molecular de bacilos isolados da Amazônia.....	47
Tabela 8: Resultados dos bioensaios seletivos com <i>Bacillus</i> spp., de diferentes ambientes Amazônicos, utilizando larvas de <i>Ae. aegypti</i> da cepa Rockeffler.	53
Tabela 9: Resultados dos bioensaios seletivos com linhagens de bacilos de diferentes ambientes Amazônicos contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> da cepa Rockeffler, exposta em diferentes produtos da fermentação bacteriana.	54
Tabela 10: linhagens de <i>Bacillus</i> spp., isolados da Amazônia, portadores dos genes <i>Cry</i> e <i>PhaC</i>	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Dengue	13
1.4 <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus 1762.....	17
1.5 Principais medidas de controle	18
1.6 Biodiversidade microbiana	19
1.7 <i>Bacillus</i> spp.....	21
1.8 Metabolitos de <i>Bacillus</i> spp.	21
1.9 Proteínas CRY	23
1.9.1 Polihidroxicanoatos (PHAs).....	25
1.9.2 PHA sintase (PhaC).....	27
1.9.3 Perspectivas e aplicações biotecnológicas de Polihidroxicanoatos.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Isolamento de <i>Bacillus</i> spp.....	32
4.1.1 Reativação e Purificação de <i>Bacillus</i> spp.	32
4.1.2 Preservação dos novos isolados	33
4.2 Seleção fenotípica de <i>Bacillus</i> spp.	33
4.2.1 Coloração de Gram	33
4.2.2 Extração do DNA genômico das linhagens	34
4.2.3 Caracterização molecular	35
4.2.4 detecção molecular dos genes <i>Cry4</i> , <i>Cry11</i> e <i>PhaC</i>	35
4.3 identificação molecular das linhagens amplificação do gene rDNA16S.....	37
4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	38
4.5 Purificação das amostras.....	38
4.6 Sequenciamento e análise do gene <i>rDNA 16S</i>	38
4.7 Manutenção de <i>Ae. aegypti</i> em insetário	38

4.8 Bioensaios.....	39
4.9 Etapas dos bioensaios.....	39
4.9.1 Cultivo das linhagens bacterianas	39
4.9.2 Obtenção dos extratos brutos de bacilos.....	40
4.9.3 Esquema da montagem dos bioensaios.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Linhagens de <i>Bacillus</i> spp.....	43
5.1.1 Extração de DNA genômico e Reação da polimerase em cadeia (PCR)	45
5.1.2 Identificação molecular dos bacilos.....	46
5.1.3 Detecção molecular dos genes <i>Cry4</i>, <i>CryII</i>	47
5.2 Bioensaios seletivos	52
5.2.1 Atividade larvicida de extratos brutos de <i>Bacillus</i> spp.....	53
5.2.2 Atividade larvicida com extrato bruto de <i>Bacillus</i> (Sobrenadante).....	54
5.2.3 Atividade larvicida de células lisadas (Pellet) de <i>Bacillus</i> em associação com seu sobrenadante.	56
5.2.4 Atividade larvicida de células lisadas (Pellet) com água estéril (H₂O destilada).	59
5.3 Correlação dos bacilos portadores dos genes <i>Cry</i> e <i>PhaC</i> com atividade larvicida contra <i>Ae. aegypti</i>.	60
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

Mosquitos são insetos conhecidos como pernilongos, muriçocas ou carapanãs, pertencentes à família Culicidae que são de grande importância para a saúde pública, por serem transmissores de patógenos causadores de doenças como malária, filariose, febre amarela, dengue, leishmaniose, febre chikungunya, vírus zika e entre outras arboviroses (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; SEMSA, 2014; MS/SVS, 2015). Estes insetos pertencem ao filo Artropoda, classe Insecta, ordem Diptera, e estão distribuídos em todo globo terrestre, causando danos ao homem por estarem envolvidas na transmissão de múltiplos organismos infectores (LOZOVEI, 2001; FORATTINI, 2002).

A relação hematofágica exercida por fêmeas de algumas espécies de Culicidae sobre o homem e outros animais pode estar diretamente relacionada à transmissão de patógenos, além de provocar reações alérgicas e causar incômodo. Este se faz necessário, pois as fêmeas necessitam de uma fonte de proteínas presente no sangue para o amadurecimento dos ovos. Durante o repasto sanguíneo, os mosquitos transmitem os patógenos ao organismo e estes desencadeiam os sintomas podendo comprometer vários órgãos e, às vezes até levar a óbito (FORATTINI, 2002; SVS/MS, 2015).

De acordo com OMS (2015), anualmente milhões de pessoas adoecem de malária e dengue no mundo e, diante deste fato, nota-se a importância dos estudos em mosquitos para o controle da transmissão destas enfermidades. Dentre os insetos vetores de patógenos de maior importância ao homem, o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) é o principal transmissor do vírus dengue no Brasil, podendo também transmitir os vírus chikungunya, zika e a febre amarela.

1.1 Dengue

Patógenos transmitidos por mosquitos são uma das principais causas de mortalidade e morbidade em seres humanos. Diversos fatores como a globalização, urbanização não planejada, mudanças ambientais têm sido uns dos principais fatores que contribuem para transmissão de doenças nos últimos anos. Alguns arbovírus, como dengue, chikungunya, zika vírus e vírus do Nilo Ocidental desconhecidos (OMS, 2015). A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo a segunda

arbovirose mais importante em relação ao número de pessoas infectadas (GLUBER et al., 2001; OMS, 2015).

Esta doença é causada pelo vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e, entre os sintomas, estão à cefaleia, mialgia, altralgias e outros. Além disso, existem quatro sorotipos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, sendo que já foi detectado o sorotipo DENV-5 na Malásia, que até o momento ocorre apenas em primatas (GOULD; SOLOMON, 2008; ROCHA; TAUIL, 2009; VASILAKIS, 2013). Os principais mosquitos vetores do vírus dengue é o *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Ae. albopictus* (SKUSE, 1894), sendo que no Brasil o *Ae. aegypti* é o principal vetor e no continente asiático o *A. albopictus* predomina (MARZOCHI, 1994; OMS, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que há em torno de 390 milhões de pessoas infectadas anualmente, em mais de 100 países de todos os continentes, exceto. Estima-se que dois quintos da população mundial, ou seja, mais de 2,5 milhões de pessoas estão situados em áreas de risco para contrair a dengue. Destas, cerca de 5 milhões de doentes necessitam de hospitalização e 500 vieram a óbito em consequência desta arbovirose (OMS, 2015). A dengue têm se tornado um sério obstáculo ao desenvolvimento social e econômico, principalmente em países situados em regiões tropicais e subtropicais. Nos programas de controle da Dengue é relevante o mapeamento de recipientes que se tornam criadouros, considerando os inservíveis para descarte e os fixos para tratamento (PINHEIRO; TADEI, 2002a).

No Brasil a dengue apresenta a maior incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais, sendo que devido às alterações climáticas, os casos passaram ocorrer em todo ano em várias localidades (SVS/MS, 2015). De acordo com o SVS/MS (2015), relatou a ocorrência de 1.297.015 casos de dengue no país, levando 401 pessoas a óbitos. Esta situação fez que o Brasil se tornasse um dos países com um índice expressivo de registros de casos de dengue.

1.2 Zika vírus

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família Flaviridae e ao gênero *Flavivirus* sendo, portanto, aparentado do ponto de vista evolutivo com outros arbovirus transmitidos por mosquitos, como o são o vírus dengue, vírus da febre-amarela (YFV) e vírus do Nilo ocidental. Trata-se de um vírus com genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia

simples de polaridade positiva. Apesar de não ser conhecida a estrutura do virião, por comparação aos demais Flavivirus conhecidos, este deve ser limitado por um invólucro lipídico derivado do retículo endoplasmático das células onde estes vírus se replicam, involucro esse que limita externamente uma nucleocápsideo com estrutura e simetria ainda não definidas, composta pela proteína C e pelo genoma viral. O invólucro viral deverá conter as duas proteínas de superfície (designadas M e E), sendo que, adicionalmente, o genoma viral codifica uma série de outras proteínas, destas não-estruturais que, ou possuem atividade enzimática (NS3: helicases de RNA e protease e NS5; polimerase de RNA, dependente de RNA), ou desempenham funções regulatórias (controle da replicação, transcrição, tradução e resposta imune) durante a replicação intracelular (HADDOW et al 2012, KUNO, CHANG et al 2007).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika, no Uganda, a partir de uma amostra de soro de macaco Rhesus que servia de sentinela para estudo vigilância da febre-amarela (FA) (DICK, KITCHEN et al 1952). Após análise filogenética do genoma viral, percebeu-se que provavelmente o vírus surgiu nesta localidade em torno de 1920, e após duas fases de migração para o Oeste Africano deu início as duas linhagens africanas. Do Uganda, o vírus terá migrado na década de 1940 para a Ásia e aí originou e a epidemia na Micronésia (HANDDOW, SCHUN et al 2012, FAYE, FREIRE et al 2014). A linhagem asiática também foi a responsável pelos casos de transmissão autóctone deste vírus, recentemente ocorridos no Brasil (ZANLUCA, MOSIMANN et al 2015).

A primeira evidência da circulação do vírus fora do continente africano deu-se entre os anos de 1977 e 1978, quando casos de doença febril aguda foram internados num hospital na Indonésia, sendo encontrados anticorpos contra o ZIKV no soro de 30 doentes (OLSON, KSIAZEK et al 1981). Na última década foram documentadas duas epidemias causadas pelo ZIKV na Federação dos Estados da Micronésia (na ilha de Yap), constituindo-se o primeiro foco fora de África e da Ásia (LANCIOTTI, KOSOY et al 2007, DUFFY, HANCOCK et al 2009). A doença disseminou-se rapidamente pela ilhas do Oceano Pacífico sendo detectados em outubro de 2013 os primeiros casos na Polinésia Francesa (PF), onde a situação evoluiu para uma epidemia com cerca de 19 000 casos suspeitos e 248 casos confirmados de infecção pelo ZIKV (CAO-LORMEAU, ROCHE et al 2014).

Em fevereiro de 2014, pela primeira vez nas Américas, casos da doença foram reportados na Ilha de Páscoa (território Chinelo no Oceano Pacífico), provavelmente relacionado com o surto na Micronésia e na PF (MUSSO, NILLES, 2014). Em 2015 foi confirmada a circulação do vírus no Nordeste do Brasil a partir de isolamento viral em casos suspeitos de dengue (ZANLUCA, MELO et al 2015). Segundo o Ministério da Saúde publicou uma nota a afirmar que casos da doença já haviam sido confirmados em mais oito estados do país, compreendendo as regiões norte, nordeste e sudeste (PROMED-MAIL, 2015).

A transmissão do ZIKV é consequência da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, tendo sido isolado em 1948 a partir de um macerado de mosquitos da espécie *Ae. africanus* colhidos na floresta de Zika (Dick, 1953). Estudos seroepidemiológicos levados a cabo com base em amostras de sangue coletadas em residentes dessa região do Uganda revelaram uma prevalência de anticorpos anti-ZIKV a rondar os 6% (LANCIOTTI, KOSOY et al 2008). Adicionalmente, este vírus veio a ser repetidamente isolados de mosquitos colhidos quer em África, quer na Ásia, permitindo sugerir que espécies como *Ae. africanus*, *Ae. aegypti* e *Ae. hensilli* participem na sua manutenção enzoótica (em ambiente silvático) (MARCHETTE, GARCIA et al 1969, LEDERMANN, GUILLAUMONT et al 2014).

A competência vetorial para transmissão do ZIKV pelo *Ae. aegypti* pelo *Ae. albopictus* impõe grande preocupação para a saúde pública. Estes artrópodes encontram-se amplamente distribuídos em zonas tropicais, subtropicais (*Ae. aegypti*) e temperadas (*Ae. albopictus*), abrangendo um enorme contingente de indivíduos suscetíveis (BOORMAN, PORTERFIELD, 1956, GRARD, CARON et al 2014). Menos frequentemente, a transmissão do ZikV já foi descrita por via sexual, perinatal e por hemotransfusão (BESNARD, LASTERE et al 2014, MUSSO, NHAN et al 2014). Apesar de possíveis, ainda não se tem a dimensão da importância epidemiológica destes mecanismos.

1.3 Chikungunya

O Chikungunya (CHIKV) é um RNA vírus da família *Togaviridae* do gênero *Alphavirus*, descrito pela primeira vez em 1950 na região que hoje corresponde à Tanzânia durante um surto atribuído inicialmente ao vírus Dengue. Após as primeiras descrições, dois padrões de transmissão distintos foram descritos: um silvestre e

periurbano na África (*Aedes* spp) e outro urbano na Ásia (*A. aegypti*). Além disso, três genótipos diferentes circulando em regiões do planeta (África Central, Sul e Leste – ECSA, África Ocidental –WA e Ásia) foram relatados. Até então, poucos casos graves e nenhum obtido haviam sido associados a infecções por este vírus (WEAVER, 2014).

A partir de 2005, pequenas mutações na proteína E1 do envelope viral na variante ECSA permitiram melhor adaptação viral a um novo vetor cosmopolita (*Ae. albopictus*). Isto contribuiu para uma grande expansão da doença para o Oceano Índico e, posteriormente, Ásia e Europa. Ainda em 2005, o vírus chegou às Ilhas Reunião após um surto ocorrido no Quênia. Nesta epidemia que atingiu cerca de 40% da população, muitos casos graves foram documentados e confirmados laboratorialmente, com letalidade de estimada em 1/1.000 casos (POWERS, 2007).

A Chikungunya se caracteriza por quadros de febre associados à dor articular e debilitante, cefaleia e mialgia. Embora possua sintomas semelhantes ao da dengue, chama a atenção a poliartrite/artralgia simétrica (principalmente punhos, tornozelos e cotovelos), que, em geral, melhora após 10 dias, mas que pode durar meses após o quadro febril. A proporção de casos crônicos variou em diferentes epidemias na França, África Sul e ilhas do oceano Índico, de 4 a 63%. O nome Chikungunya significa “aquele que se curva” na língua Makonde, falada em várias regiões da África Oriental, razão da posição antálgica que os pacientes adquiriam durante o período de doença (POWERS, 2007).

Ao se comparar com a dengue, a Chikungunya apresenta que amplificam a disseminação da doença e aumentam a possibilidade de grandes e explosivas epidemias. Entre estas características estão a maior proporção de casos sintomáticos (>90%), menor tempo de incubação intrínseca (de 2 a 7 dias), maior período de viremia (2 antes de 10 depois da febre) e menor período de incubação extrínseca (no mosquito). A replicação viral no mosquito *Ae. albopictus* além do *Ae. aegypti* a extensão geográfica das regiões com potencial de circulação viral.

1.4 *Aedes aegypti* Linnaeus 1762

Dentre os insetos vetores de doenças de patógenos de maior importância ao homem, o mosquito *Ae. aegypti* Linnaeus, 1762, é o principal transmissor do vírus dengue no Brasil, podendo também transmitir os vírus chikungunya, zika e febre amarela. O Mosquito *Ae. aegypti* é principalmente encontrado em regiões tropicais e

subtropicais das Américas, África e Ásia (SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTEL, 2013). Foi considerado erradicado da maior parte das Américas do Sul e Central por volta da década de 70, mas foi reintroduzido nestas regiões (OMS, 2007). Esta espécie está presente predominantemente em áreas urbanas, geralmente no domicílio ou peridomicílio humano, e seus criadouros preferenciais são recipientes artificiais, com água pobre em matéria orgânica. Essa predileção pelo ambiente domiciliar facilita o contato com o homem, o que é necessário para que as fêmeas realizem a hematofagia, que ocorre preferencialmente no período diurno.

A estratégia de ovosição de *Ae. aegypti* é diferente daquela adotada por *Culex quinquefasciatus*, pois em cada postura as fêmeas depositam os ovos individuais em diversos criadouros o que favorece sua dispersão no ambiente (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Portanto, o hábito hematofágico é uma característica que, assim como para outras espécies de culicídeos, favorece a transmissão de patógenos causadores de doenças. Além disso, *Ae. aegypti* é capaz de realizar o repasto sanguíneo em múltiplas pessoas em um único gonadotrófico, o que amplifica o seu papel.

Em virtude da entrada do vírus chikungunya no país, cuja transmissão também ocorre por meio do mosquito *Ae. Aegypti* torna-se um dos sérios problemas para saúde pública. Além disso, considerando os casos confirmados de febre no Distrito Federal e Amapá, aumenta a necessidade de desenvolver estratégias de controle desses vetores (GI, 2015). Dessa forma, faz-se necessário desenvolver programas e estratégias para combater esses mosquitos, e amenizar os problemas relacionados ao desenvolvimento social e econômico da população.

1.5 Principais medidas de controle

O controle dos mosquitos são ferramentas importantíssimas para prevenção e controle da dengue. A redução de criadouros artificiais e naturais, campanhas de limpeza ambiental, tratamento de recipientes de armazenamento de água. Além disso, atividades com produtos larvicida são medidas importantes para prevenir a incidência dos mosquitos (SUAYA et al., 2007; OMS, 2009; ANDERSON et al., 2012). A existência de vários sorotipos virais e a associação de infecção pelo vírus da dengue tem aumentado para doenças mais graves e obstáculos significativos para o desenvolvimento de vacinas (SIMASATHIEN et al., 2008; WATANAVEERADEJ et al., 2011). Como não existe escala comercial vacina contra a dengue, eficaz contra todos os sorotipos,

torna-se relevantes desenvolver estratégias voltadas para o controle do vetor (WEAVER et al., 2010). De acordo com as orientações dos métodos nacionais brasileiros, o controle vetorial pode ser dividido em mecânica, química e biológica (PCNCD, 2009).

Considerando a importância de ainda não existir vacinas eficazes, é necessário desenvolver estratégias de controle para manter a doença em nível que não cause epidemias. As abordagens de controle genético de mosquitos são também alternativas de combate aos vetores, pois envolvem desde a técnica de liberação de machos estéreis até a liberação de insetos transgênicos. Em alguns casos é realizada a introdução de genes letais dominantes que quando transmitidos para a progênie são expressos, impedindo seu desenvolvimento. Em outros, a modificação genética do mosquito leva a expressão de moléculas efectoras no intestino que inibem o desenvolvimento do parasito (WANG; JACOBS-LORENA, 2013; WILKE; MARRELLI, 2012).

Embora ocorram importantes avanços no desenvolvimento de medidas alternativas, o uso de inseticidas químicos continua sendo essencial nos programas de controle integrado, sendo bastante utilizado devido à eficácia (PRIETO et al., 2002; OMS, 2012). Contudo, os principais problemas do uso destes são o aparecimento de populações resistentes e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo, em várias outras regiões tropicais e subtropicais (LUNA et al., 2004; OMS, 2014). As limitações encontradas com métodos de controle químico motivaram a busca de novos métodos de controle mais seletivos. Os métodos de controle biológico baseiam-se na utilização de organismos vivos, que podem ser parasitas ou predadores. Desta forma, tornam-se relevantes programas de Controle Biológico de Vetores que incentivam o desenvolvimento de novos agentes potenciais e a capacitação de técnicos para atuarem em programas, nos diversos níveis.

1.6 Biodiversidade microbiana

Considerando o conhecimento da diversidade biológica em termos de riqueza de espécies, distribuição local e global, e função do ecossistema, o conhecimento permanece ainda bastante incompleto.

Biodiversidade é uma medida da variação ou variabilidade existente entre as espécies de seres vivos e dentro delas. O termo foi usado pela primeira vez em 1986, resultado da concepção de palavras “diversidade biológica”, e mede, em princípio, toda variação biológica do planeta terra (Azevedo, 2001b).

A Amazônia é uma região que possui uma das maiores e mais ricas biodiversidades do mundo. Apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos, pois é inigualável a quantidade e variedade de produtos naturais, incluindo a notável biodiversidade microbiana disponível para transformação em produtos úteis de maior valor agregado. Entretanto pouco se sabe sobre a composição das suas comunidades bacterianas (JESUS et al., 2012).

Considerando os micro-organismos, por exemplo: os fungos e as bactérias, desempenham importantes transformações metabólicas, além de serem bastante usados como controle biológico de doenças. Participam também da fixação do nitrogênio atmosférico, degradação de resíduos vegetais e outros produtos, inclusive tóxicos. Considerando o potencial dos micro-organismos apresentam-se como mananciais de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos úteis e ainda inexplorados. Além disso, fontes de produtos que contribuem para o bem-estar da população humana, inclusive remediando o mal que a própria espécie humana produz no ambiente. Em outras palavras, a importância dos micro-organismos para ecologia e biotecnologia é inquestionável (STRASTMA et al. 2001; AZEVEDO, 2001b).

Considerando a Biodiversidade aliada à biotecnologia, ambas são consideradas de dependência mútua, ou seja, a Biodiversidade é a base genética da qual a biotecnologia se vale para desenvolver processos e produtos de interesse econômico e/ou social (OLEMBO, 1995).

A busca por microorganismos que apresentem características específicas, inicia-se pela etapa de triagem, que consiste no isolamento e seleção dos micro-organismos com as propriedades desejadas, com potencial aplicação ou produção de produtos. Existem dois principais métodos comumente usados para a triagem microbiana de espécies de interesse econômico: a busca de informação genética por sequenciamento, e a seleção funcional. Na primeira estratégia sequências conservadas homólogas para uma determinada função ou proteína são procuradas nos bancos de dados de sequenciamento genético. Entretanto, esse método depende da existência de novas enzimas com a mesma função, mas com estruturas e sequências não conhecidas (SINGH, 2009). No método de seleção funcional, as bactérias são testadas para a atividade enzimática, com o potencial em obter novas enzimas com sequências totalmente novas e a segurança de selecionar apenas enzimas ativas (THIMOTEO, 2011).

1.7 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* compreende bactérias formadoras de esporos, em forma de bastonete, aeróbicas, gram positivas. Membros deste gênero são fenotipicamente e fenotipicamente heterogêneas (CLAUS; BERKELEY, 1986; PRIEST, 1993). Além disso, representam micro-organismos de grande importância médica e biodefesa econômica, tais como biopesticidas e os biocombustíveis, patógenos (HOFTE et al., 1989; KALIA et al., 1994; SONAKYA et al., 200; DROBNIEWSKI et al., 1993; JACKSON et al., 1995).

O grupo de *B.cereus* compreende três espécies (*B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*), dentre estes o *B. cereus* e *B. anthracis* tem um grande impacto sobre a atividade humana, como agentes patogênicos de mamíferos, incluindo seres humanos, e *B. thuringiensis* é extensivamente utilizada no controle biológico de insetos (VILAS-BOAS et al., 2007). No grupo de *B. cereus* os cromossomos sequenciados são extremamente semelhantes. O número de genes para uma única espécie é bastante limitado e muitas vezes representa adaptações metabólicas (RASKO et al., 2005). Dessa forma, *B. thuringiensis* está intimamente relacionado para *B. cereus*, com base em dados genotípicos (PRIEST, 1993, CARLSON et al., 1994; HELGASON et al., 2000). Estudos demonstraram que o parentesco genético de *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. cereus*, pode a sugestão levou à sugestão de que estes são membros de uma única espécie de *B. cereus* sensu lato (DAFFONCHIO et al., 2000; HELGASON et al., 2000; CHEN; TSEN, 2002).

1.8 Metabolitos de *Bacillus* spp.

Bacillus é um gênero de bactérias Gram-positivas e um membro do filo Firmicutes. As bactérias pertencentes a este filo geralmente têm DNA com baixo teor de guanina-citosina (GC). Espécies de *Bacillus* podem produzir endósporos para a sobrevivência sob condições ambientais estressantes. Um número de espécies de *Bacillus*, mas não todos, pode acumular PHA nas células sob condições de crescimento desequilibrado. As espécies de *Bacillus* relatados como produtores nativos de PHA são como se segue: *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aryabhatai*, *B. badius*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. Flexus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. odisséia*, *B. pasteurii*, *B.*

pumilus, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e alguns isolados em espécies não identificados (YILMAZ et al., 2005; KUMAR et al., 2013).

Produtos derivados do metabolismo secundário microbiano são utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, como antibióticos, antifúngicos, antitumorais, probióticos, biopolímeros, enzimas das mais variadas classes, herbicidas, pesticidas, entre outros, sendo importantes tanto para pesquisas acadêmicas, como para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA et al., 2006). A grande variabilidade estrutural destes compostos tem atraído a curiosidade de químicos e as atividades biológicas, através dos produtos naturais, além disso, tem mostrando o interesse na indústria farmacêutica de pesquisas, principalmente através de culturas microbianas e são produtos economicamente valiosos (KARLOVSKY, 2008).

Espécies de *Bacillus* como: *B. subtilis* possui o potencial de produção de bacteriocinas que são proteínas ou peptídeos ribossômicos com atividade bactericida. *B. licheniformes* também produz uma variedade de antibióticos peptídicos tais como bacitracina (ISHIHARA et al., 2002; 2007), bacteriocina (MARTIRANI et al., 2002) e também são conhecidos por contaminar processos industriais (DE CÇERCK et al., 2002; SUIHKO et al., 2003) e causa intoxicação alimentar (BROWN, 2000; SOROKULOVA et al., 2003). Esporos de *Bacillus* spp. são usados como probióticos humanos e animais (GREEN et al., 1999, HOA et al., 2000). Considerando a bactéria *B. thuringiensis*, isoladas de solo, plantas, água etc. esporo gênico de proteínas denominadas CRY, também conhecido como proteínas inseticidas cristalinas, são altamente específicas para o controle de diversas ordens de insetos (SCHENEPFI et al., 1998). Dessa forma, é considerada uma das mais importantes bactérias usadas nos programas de para o controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças (SUDAKIN, 2003; YE et al., 2012). Além disso, tem o potencial na produção de várias moléculas com atividades inseticidas, como proteínas inseticidas vegetativas (VIP), proteínas inseticidas segredo (SIP), ZWItermicin A (ZWA), TOXINA MT_x-like, turingiensia (Qui) e Bin-come toxina (ESTRUCH et al., 1996; DONOVAN et al., 2006; STABB et al., 1994; CRICKMORE et al., 1998; WIRTH et al., 2010).

Moléculas como poliésteres alifáticos são sintetizados por muitas bactérias e archeas em repostas a diferentes condições ambientais e são considerados como uma reserva de carbono e energia, dentre os quais são conhecidos como Polihidroxicanoatos (PHAs) (ANDERSON; DAWES, 1990; LEE, 1996). Neste

contexto, foi relatado quem *Bacillus* spp. produzem moléculas de PHAs quando suplementados com glicose e biorresíduos. Além disso, alguns membros do gênero *Bacillus* também têm demonstrado o potencial para produzir co-polímeros de PHA quando suplementando com vários substratos apropriados (KUMAR et al., 2009; PATEL et al., 2011, 2012).

Bacillus spp. são capazes de utilizar uma vasta gama de substratos, como açúcares, ácidos graxos voláteis, álcoois e materiais de resíduos biológicos, para produzir homopolímeros como Polihidroxibutirato (PHB), um membro da família dos Polihidroxialcanoatos. Estes rendimentos de PHB são altamente variáveis entre as diferentes espécies de *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *Bacillus* sp, que é grande parte devido a tanto o tipo de estirpe e alimentação utilizado no processo (BORA, 2013; DAVE et al., 1996).

A síntese de PHB por *B. cereus*, inicia-se após o termino da fase logarítmica, atingindo o acúmulo máximo até a formação do esporo, e ocorre degradação durante o processo de esporulação (VALAPPIL et al., 2007b). Já em *B. megaterium*, durante a fase estacionária, os grânulos de polímeros decaem em tamanho e número por célula (MCCOOL et al., 1996).

1.9 Proteínas CRY

Produzidas durante a fase de esporulação, tal como as restantes inclusões de origem proteica de Bt, as proteínas de Bt, as proteínas Cry apresentam toxicidade em diferentes ordens de insetos, nomeadamente Lepidopteros, Dípteros, Coleóptera (IATSENKO et al., 2014, JISHA et al., 2013). São ainda conhecidas, embora em menor número, proteínas Cry com atividade sobre nematodes (HU et al., 2012). Têm despertado interesse de vários grupos de investigação, visto que não apresentam toxicidade para os vertebrados (IATSENKO et al., 2014). Segundo Bravo et al (2011), já foram descritas cerca de 500 sequências de genes cry e as suas proteínas foram organizadas em 67 grupos (Cry1-Cry67) de acordo com a sequência de aminoácidos. Estas apresentam pesos entre 50 e os 140 KDa (ROH et al., 2007). Após a sua ingestão pelos insetos, as protoxinas são solubilizadas e digeridas proteolicamente formando os fragmentos tóxicos (ROH et al., 2007). Com a ativação das clivagens das regiões

terminais N- e C- dá-se a formação da toxina ativa com cerca de 60 e 70 KDa (ROH et al., 2007).

Quando ao seu modo de ação, o modelo geralmente aceita, mostra que a toxina ativa liga-se aos receptores localizados na membrana das microvilosidades apicais de epiteliais células intestinais (ROH et al., 2007). Após essa ligação, pensa-se que há uma alteração na conformação da molécula que permite a inserção da toxina na membrana, que promove a formação do poro na membrana que provoca o desequilíbrio osmótico, culminando na lise da célula (ROH et al., 2007).

Considerando o *B. thuringiensis* são bactérias aeróbicas Gram- positivas encontradas em diferentes ambientes. Quando a ausência de nutrientes ou oxigênio são insuficientes para o crescimento vegetativo, as bactérias esporulam produzindo esporos, formando um corpo parasporal que pode conter uma ou mais proteínas cristalinas inseticidas (FEDERICI et al., 2008). Considerando as principais proteínas inseticidas produzidas por estes microrganismos, como as proteínas CRY, CYT (citotóxicas), VIP e, entre outras, ambas fornecem uma diversidade de atividades contra uma série de insetos (NYSTROM, 2002; CRICKMORE, 2014).

As Proteínas CRY são altamente específicas contra diversas ordens de insetos, são biodegradáveis e consideradas bioinseticidas compatíveis com o meio ambiente. Estas toxinas possuem atividade devido às suas especificidades de ligação com certas proteínas no intestino do inseto. No entanto, induzem a formação de poros na membrana apical das células dos insetos. Além disso, danificam as células do intestino e resultando em morte larval (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

A interação toxina/receptor tem sido extensivamente caracterizada e elucidada para compreender seu mecanismo de ação. Considerando o elevado grau de identidade de sequência de aminoácidos entre toxinas CRY, é dependente do reconhecimento de um receptor, assim como a ativação de protoxinas por proteases de insetos (AROSON et al., 2001, SOBERÓN et al., 2010). Diferentes receptores da superfície de células de insetos, como as aminopeptidases, caderinas (APNs) e fosfatase alcalina (ALP), são moléculas de reconhecimento e ligação entre as toxinas CRY e são responsáveis pela susceptibilidade de várias espécies de insetos (SCHENEPF et al., 1998, ZHANG et al., 2006; BRAVO et al., 2011).

Muitos genes *Cry* foram definidos como dependentes de esporulação, pois sua transcrição é encontrada principalmente pelo fator Sigma específicos para célula mãe e

fatores de SiGe SigK. A transcrição de muitos genes *Cry*, incluindo *Cry4* e *Cry11* são controladas por ambos SiGe e Sigk. A transcrição é iniciada por SiGe na fase precoce da esporulação e continua por SigK na fase tardia de esporulação. A ativação sucessiva desses dois fatores sigma específicos de células mãe assegura a transcrição continua e forte de genes *Cry* nas células mãe. Isto permite a produção de grandes quantidades de proteínas CRY durante a esporulação (PONCET et al., 1997; DERVYN et al., 1995; LERECLUS et al., 2000).

Apesar da aplicação bem sucedida de proteínas de *B. thuringiensis* para o controle de pragas, que corresponde 2% do mercado total de inseticida (BRAVO et al., 2011), a curta persistência de agentes de *B. thuringiensis* após a aplicação tornou-se um importante fator de influência para o seu desenvolvimento. Variável estresse ambiental, tal como a radiação ultravioleta, a chuva e a temperatura, leva à inativação de proteínas cristalinas (IGNOFFO, 1971; MYASNIK et al., 2001). A microencapsulação, um tipo de formulação, é um método potente que confere resistência ao estresse ambiental (WEI et al., 2008; SPONE et al., 2009). Nos últimos anos, as microcápsulas têm um aumento interesse como carregadores de drogas em potencial, especialmente para drogas de proteína. Durante essas abordagens terapêuticas, fármacos de proteína são diretamente entregue no local alvo e isolado a partir da digestão enzimática (WEI et al., 2008).

Embora o potencial dessas proteínas sintetizadas por esses micro-organismos contra diversas ordens, as proteínas CRY são consideradas os mais importantes componentes das formulações comerciais de *B. thuringiensis*.

1.9.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres alifáticos sintetizados por muitas bactérias e archaea em resposta a diferentes condições ambientais e são geralmente considerados como uma reserva de carbono e energia. Além disso, são considerados fortes candidatos para substituição de polímeros de origem petroquímica, como são sintetizados por micro-organismos a partir de substratos de baixo custo, apresentam características físicas semelhantes às de plásticos de petróleo (ANDERSON; DAWES, 1990; LEE, 1996; STEINBUCHER, 1991, SERRANO, 2010; GONZÁLEZ et al., 2013). As bactérias em ambientes naturais estão submetidas a diversos fatores de estresse, tais como estresse oxidativo, alta concentração de íons, alta radiação ultravioleta (UV) e mudanças em seu estado fisiológico.

Por outro lado sua sobrevivência está determinada pela capacidade de adaptação que envolve a busca de fontes de energia e nutrientes, assim como o desenvolvimento de mecanismos que permitam enfrentar condições desfavoráveis. Uma estratégia utilizada pelas bactérias para resistir às diferentes situações de estresse e a utilização de polímeros de reserva tais como os PHAs, que se aglomeram no interior celular e forma grânulos figura 1. (REHM, 2007).

Em 1926, Lemoigne relatou pela primeira vez que a bactéria *B. megaterium* acumulava P(3HB) dentro das células (LENZ; MARCHESSAULT, 2005). Esta descoberta foi o ponto de todos os estudos de partida para produção de PHA. Na década de 1990, com ajuda da engenharia genética, os genes de PHA sintase foram clonados a partir de muitos genomas proteobacterial e caracterizados a nível molecular. Com base na especificidade do substrato e a estrutura de subunidades, PHA sintases foram previamente agrupadas em três categorias: as classes I e III (REHM, 2003).

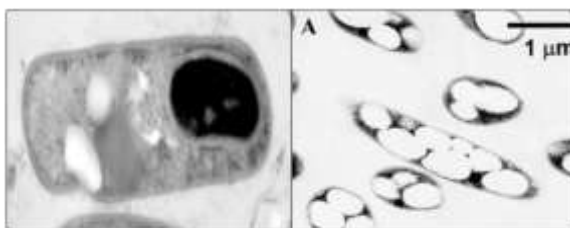


Figura 1: Ilustração de um corpo de inclusão de Polihidroxicanoatos em *Bacillus megaterium*, De Bary, 1884.

Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>

Dentre os micro-organismos produtores de PHA, existem também os *Bacillus*, encontrados comumente no ambiente. *Bacillus* spp. apresentam características desejáveis para produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescem facilmente até alcançar uma alta densidade celular, utilizam fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, são capazes de secretar grandes quantidades de enzimas, e são bons hospedeiros para expressão de genes heterólogos (LAW *et al.*, 2003).

A síntese de PHA depende do fornecimento de uma fonte de carbono adequada que possa ser convertida a um hidroxialcil-coA através das vias metabólicas existentes na célula, bem como da presença de uma PHA sintase na bactéria capaz de incorporar este hidroxialcil-CoA ao poliéster em formação. Ambos os fatores podem impedir a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou restringir a quantidade de um determinado monômero incorporado ao PHA (GOMEZ, 2000).

Dos três genes codificadores (*PhaA*, *PhaB* e *PhaC*) codificadores de enzimas da via metabólica de produção de PHAs, o gene *PhaC* é o mais importante e utilizado devido ser o codificador para enzima chave da última etapa da via metabólica de síntese de PHAs (SHEU *et al.*, 2000).

1.9.2 PHA sintase (PhaC)

Na década de 1990, com ajuda da engenharia genética, os genes da sintase de PHA foram clonados a partir de muitos genomas proteobacterial e estrutura de subunidades, sintases de PHA foram previamente agrupadas em três categorias: as classes I a III (REHM, 2003).

Em 1999, e Cannon McCool (1999) clonaram um novo gene PHA sintase de *B. megaterium* e demonstraram que esta sintase é composta por uma subunidade catalítica *PhaC* (41,5 kDa) é uma segunda subunidade *phaR* (22 kDa). Esta sintase é uma enzima de dois componentes, semelhante a uma sintase de classe III (*PhaEC*). No entanto, o *B. megaterium* sintase é significante diferente do anteriormente conhecido sintases e foi, assim, classificado com uma nova classificação, classe IV (MCCOOL; CANNON, 2001).

Ashby *et al* (2005) sugeriram que as sequências de classe IV *phaC* pode ser dividida em, pelo menos, dois subgrupos com base na extensão da sequência de ácidos nucleicos encontrados: *B. megaterium* subgrupo (incluindo *B. sphaericus*, *B. circulans*, *B. brevis*) e *B. cereus* (incluindo *B. antracis*, *B. thuringiensis* e *Bacillus* sp. INT005).

A técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica rápida caracterização dos lócus *PhaC*, e os conjuntos de iniciadores de PCR para amplificação específica do gene de *Bacillus* spp. *PhaC* foram concebidos (SHAMALA *et al.*, 2003; SOLAIMAN; ASHBY, 2005; NAYAK *et al.*, 2013).

A PHA sintase é considerada a enzima chave para o acúmulo de PHA, pois catalisa o passo decisivo da via: polimerização das unidades. Esta enzima é Esteroespecifica para estereoisômeros R. PHA sintases apresentam um grande espectro de especificidade de substrato, e assim uma grande variedade de monômeros podem ser polimerizados (SUDESH *et al.*, 2000).

1.9.3 Perspectivas e aplicações biotecnológicas de Polihidroxialcanoatos

Na área agrícola, as pesquisas sobre as aplicações de polímeros biodegradáveis estão voltadas principalmente para embalagens, liberação controlada de pesticidas ou inseticidas (WEIMANN *et al.*, 2010). A liberação imediata de ativos pelas formulações comercializadas levou ao desenvolvimento de formulações de liberação controlada dos herbicidas, de forma a favorecer sua eficiência e diminuir seu potencial de contaminação. Um importante tecnologia nesse contexto é a utilização de sistemas não estruturados a partir de polímeros biodegradáveis (SOUZA *et al.*, 2012). Dentre os poliésteres alifáticos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA, LLA), poli-ε-caprolactona (PCL) e os Polihidroxialcanoatos (HA) podem ser usados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturado para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos (DURAN *et al.* 2006).

O grupo de matérias que podem ser adequados para estes fins inclui os poliésteres biodegradáveis de origem microbiana (Polihidroxialcanoatos). Estes polímeros não são propensos a hidrólise química rápida e são degradadas em resultado de degradação biológica verdadeiro. Por este motivo, a sua degradação biológica completa em ação em prolongada concepção (SUDESH *et al.*, 2000; SHISHATSKAYA *et al.*, 2008).

A encapsulações encontra também aplicações no setor de agrotóxicos, visando tornar a eficácia dos pesticidas adequada para o controle de pragas no campo, pragas como, insetos, ácaros, roedores, nematoides e plantas daninhas. A encapsulação obtida nesta área é a combinação do agente pesticida com o agente encapsulante, que o protege e liberta de acordo com a necessidade de controlar a peste. Os pesticidas a serem encapsulados incluem uma vasta gama, podendo ser substâncias inorgânicas, substâncias orgânicas de baixo peso molecular e substâncias de elevado peso moleculares, tais como peptídeos, proteínas microbianas e micropesticidas (GOERTZ, 2000).

A escolha do método de microencapsulação mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física (spray drying, leito fluidizado), química (polimerização) ou físico-química (coacervação, emulsificação)

(SUAVE et al., 2006). As aplicações de técnicas de encapsulamento são frequentes na área farmacêutica, sendo também aplicada para herbicidas, pesticidas (ALSINA *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2010)

Portanto, o referido projeto objetivou em selecionar linhagens de *Bacillus* isolados de diferentes ambientes Amazônicos, com potencial para produção de Proteínas CRY e/ou Polihidroxialcanoatos e, avaliar os extratos metabólicos de produtos excretados de *Bacillus* em ensaios com larvas de *A. aegypti*, principal vetor do vírus dengue e outros. Uma vez que não existem trabalhos sobre a correlação entre proteínas CRY com Polihidroxialcanoatos (PHAs) de linhagens de *Bacillus* spp.

2. JUSTIFICATIVA

Ae. Aegypti é o principal vetor do vírus da dengue, chikungunya, zika e febre amarela. Portanto, é um grande problema para saúde pública e para a população mundial. Com isso, diversos métodos alternativos de controle são utilizados para combater esses vetores. Dentre os quais, os inseticidas químicos, embora eficaz e com respostas imediatas, são prejudiciais ao meio ambiente e ocasionam o aparecimento de populações secundárias resistentes aos inseticidas.

Bactérias do gênero *Bacillus* apresentam um potencial inexplorado de moléculas com diversas aplicações biotecnológicas, como por exemplo: as proteínas CRY, usadas como biopesticida em vários programas de controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças tropicais. Além disso, apresentam vantagens em relação aos inseticidas químicos, são específicos para insetos alvos, biodegradáveis e atóxicos para mamíferos e fauna associada. Contudo, sua durabilidade na natureza é reduzida devido aos fatores ambientais como: radiação solar (UV), temperatura e outros fatores levando à inativação das toxinas.

Considerando o metabolismo dos *Bacillus*, diversas moléculas também são formadas como respostas ao estresse fisiológico dessas espécies, como por exemplo: os Polihidroxialcanoatos (PHAs). Essas moléculas apresentam características favoráveis para diversas aplicações biotecnológicas como na área médica, liberação de fármacos e outros. Por serem biodegradáveis e biocompatíveis são usados para produzir condrogênese de células estaminais mesenquimais (MSCs) e têm a função de preservar fenótipo condrocítico, bem como servem de apoio para matrix extracelular específicas de condrócitos, promover a produção de glicosaminoglicano sulfatado (GAGs) de condrócitos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, são as pressões e fatores ambientais e sendo bastante utilizados como encapsulados e microencapsulados de fertilizantes agrícolas.

Portanto, ainda são escassos estudos sobre a correlação de proteínas CRY em ação conjunta com Polihidroxialcanoatos, principalmente relacionando a atividade biológica com insetos vetores de doenças. Neste sentido, o referido projeto buscou na microbiota Amazônica, o potencial de *Bacillus* spp. portadores dos genes *Cry* e *PhaC* para o controle de *Ae. aegypti* e correlacionar a presença ou ausência com a atividade biológica desejada.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Selecionar *Bacillus* spp., isolados de diferentes ambientes da Amazônia Brasileira portadores dos genes *Cry* e/ou *Phac* via síntese de Polihidroxicanoatos para avaliar no controle de *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

- Selecionar linhagens de *Bacillus* spp. isoladas de diferentes ambientes Amazônicos e de coleções do Estado do Amazonas;
- Triar por Biologia Molecular linhagens de *Bacillus* spp. que apresentam os genes para a produção de proteínas CRY e/ou de PHA;
- Realizar ensaios contra larvas de *A. aegypti* utilizando o produto da fermentação de *Bacillus* spp.;
- Avaliar a toxicidade dos micro-organismos, comparando o metabolismo na presença ou ausência genes *Cry* e *Phac*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento de *Bacillus* spp.

Foram analisadas amostras de solos, águas obtidas dos municípios de Manaus, Parintins–AM, e levada ao laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue-INPA. Neste procedimento, foi utilizado o método de Polanczyk (2004), o qual é uma modificação pelo Método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1985, onde cada amostra de 1g de solo foi homogeneizada em 10 mL de solução salina e submetida à agitação durante 2 min.

Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de microcentrífuga e em seguida foi dado o choque térmico 80 °C por 12 min para eliminar as células vegetativas. Em seguida foi diluída 10 e 100 vezes em solução salina, e uma alíquota de 100 µL da última diluição foi distribuída em placa de Petri contendo ágar nutritivo (0,5 % extrato de levedura; 0,1 de tripton; 0,17 M NaCl e 0,15 % de ágar bacteriológico e encubadas a 30 °C durante 24 h, 48 e 72 horas.



Figura 2: Em A: Isolamento de bactérias; em B: choque térmico; em C: colônias isoladas.

4.1.1 Reativação e Purificação de *Bacillus* spp.

As linhagens de *Bacillus* spp. utilizadas foram de coleções de trabalhos dos Laboratórios de Genética Aplicada a Saúde e Biotecnologia (ESA-UEA), e do grupo de Estudos em Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia (GEMMA/DQ/UFAM) e de coleções de trabalhos de Bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Dengue e Malária (INPA). Foram adicionados 2 mL de meios LB (Luria bertani), NA (caldo nutriente) e ISP2 em tubos de ensaios e uma alça e cultura de bacilos foi adicionado, em seguida, foram inoculados com um dos isolados preservados, cultivados por 24 h, 48 h e 72 horas a 30 °C.

Após a reativação as bactérias crescidas foram purificadas por meio da técnica de esgotamento por estrias cruzadas, com auxílio de uma alça de platina que antes foi embebida no álcool 70 % e flambada em chama no bico de Bunsen. Foram utilizados meios de cultivos apropriados para cada tipo de isolamento. Em seguida, as placas foram colocadas na B.O. D por 24 horas, para o crescimento bacteriano.

4.1.2 Preservação dos novos isolados

Os isolados foram preservados nos mesmos meios de cultivo da reativação e isolamento, com a adição de 20% de glicerol (V/V) em microtubos de 2 mL e estocados em freezer a menos -20 °C para utilização posteriores

4.2 Seleção fenotípica de *Bacillus* spp.

4.2.1 Coloração de Gram

Inicialmente às colônias crescidas e purificadas foram submetidas à coloração pelo método de Gram. Através da coloração de Gram as bactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos, Gram positivas ou Gram-negativas. Os microrganismos Gram positivos são aqueles que retêm o corante violeta devido ao aumento na quantidade de ácido teicoico e a diminuição da permeabilidade da parede celular aos solventes orgânicos, por conterem menos lipídeos na parede celular. A parede celular de bactérias Gram-negativas possui grandes lipídeos (ALTHERTUM, 2008; MARTINEZ; TADEI, 2008), que aumentam a permeabilidade aos solventes orgânicos permitindo a descoloração. Perdem, portanto, o cristal violeta, corando-se com o corante de fundo, safranina ou fucsina (MARTINEZ; TADEI, 2008).

Na realização do método Gram foi adicionada uma gota de 10 µL de água deionizada em lâminas de vidro, com auxílio de uma alça bacteriológica foi retirada uma colônia bacteriana de culturas crescidas em placa de Petri e, em seguida, cada colônia foi friccionada para homogeneização sobre uma lâmina com água. Posteriormente a fixação foi feita em temperatura ambiente.

Após a fixação do material em lâmina foi feito o procedimento de coloração de Gram, inicialmente cada lâmina foi coberta por 1 min com o reagente cristal violeta de genciana sendo imersas rapidamente em água corrente, na segunda etapa do processo as laminas foram novamente cobertas por 1 min com o reagente lugol, o qual foi removido

adicionando sobre a lâmina um descolorante de solução álcool-acetona por aproximadamente 15 s seguido de lavagens em água corrente. Após o processo de descoloração, foi adicionada solução de fuccina sobre as lamínas durante 30 s, novamente as lâminas foram lavadas.

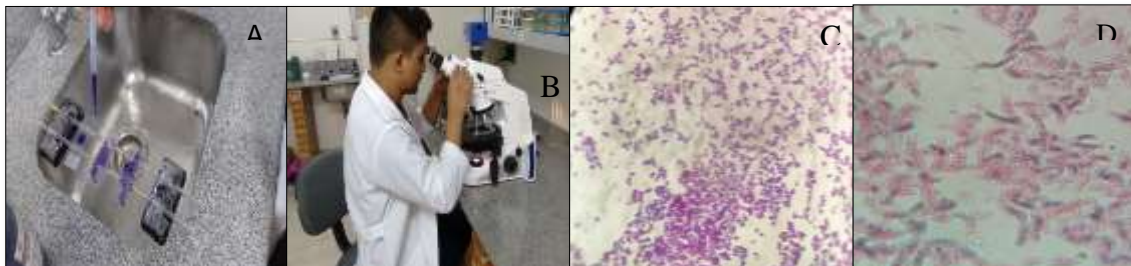


Figura 3: Em A: Coloração de gram; em B: Visualização das lâminas; em C: Células de bacilos gram positivos; em D: Células de bacilos gram negativos.

4.2.2 Extração do DNA genômico das linhagens

Em tubos de 1 ml, foram adicionados, para cada um, 100 μ L de tampão (Tris, EDTA, Dextrose), 5 μ L de lisozima 20 mg/mL e uma pequena massa bacteriana com auxílio de um palito auto clavado a partir das amostras previamente isoladas, purificadas e caracterizadas pela coloração de Gram. Em seguida, foram levados ao banho seco a 37 °C por 30 min. Após esse período, foram adicionados 10 μ L de (Disulfato de sódio) SDS a 10% e novamente levados ao banho seco a 55 °C por 15 min. Posteriormente foram adicionados 90 μ L de Acetato de potássio e em seguida levados ao congelador -20 °C por 30 min. Após esse período foram centrifugados em *Centrífuga Eppendorf Mini plus* 12.000 rfc por 15 min. Em seguida, foram retirados 200 μ L do sobrenadante e transferidos para outros tubos de 1 mL esterilizados contendo 200 μ L de Isopropanol a 100% e em seguida levados ao congelador -20° C por 10 min. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 16.000 RCF por 15 min. Em seguida o sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet ressuspensionado em 500 μ L de Etanol P.A a 70% onde, em seguida, foram centrifugado a 16.000 RCF por 5 min. O sobrenadante foi descartado e todos tubos foram levados a câmara de fluxo onde para total evaporação do etanol. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 30 μ L de TE a 10 mM PH 7,5 contendo RNase 10 mg/mL. Em seguida os tubos foram novamente levados ao banho seco a 37 °C por 5 min. Por fim, foram, armazenados em congelador -20 °C onde 1 μ L, de cada amostra, foi usado para a PCR (SANTOS *et al.*, 2014).

4.2.3 Caracterização gênica

As linhagens de *Bacillus* spp. isolados e reativados de ambientes Amazônicos foram caracterizados para se determinar a presença de genes *Cry* e *PhaC* para Polihidroxilacanoatos (PHAs).

4.2.4 detecção molecular dos genes *Cry4*, *Cry11* e *PhaC*

Na detecção desses genes utilizou-se a técnica da Reação em cadeia da Polimerase – PCR. Foram pesquisados três genes: *cry4*, *cry11* e *PhaC*, com ação inseticida para larvas de *A. aegypti* e para produção de Polihidroxilacanoatos, cuja descrição na tabela 01.

Na extração do DNA das linhagens de *Bacillus* spp. foi utilizado o protocolo de Santos et al (2014). Em seguida, para cada isolado foi realizado o teste de PCR com todos os primers específicos citados na tabela 01.

Para amplificação desses genes *Cry* foram utilizados os reagentes na concentração discriminada na tabela 02. A reação seguiu o protocolo de Crump et al (1999).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR dos genes *Cry4*, *Cry11* e *PhaC*, com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado.

Gene	Sequência	Tamanho (pb)
<i>Cry4Ba</i>	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC(f) 5'-CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT(r)	321
<i>Cry11</i> gral	5'-CGCTTACAGGATGGATAGG(f) 5'-GCTGAAACGGCACGAATATAATA(r)	342-352
<i>PhaC</i>	5'GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC)ATCAACAAGT-3' 5'-GTAGTTCCA(GC)A(CT)CAGGTCGTT-3'	551

Tabela 2: Reagentes, utilizados na amplificação dos genes *Cry* de *Bacillus* spp.

Reagentes	Concentração	Quantidade
Solução tampão	10X	2,5 µL
Mgcl2	25 mM	2,5 µL
dNTPs	2,5 mM	2,5 µL
Primer F	5 pMol/µL	1,0 µL
Primer R	5 pMol/c	1,0 µL
Taq DNA polimerase	5 U/µL	0,3 µL
H2OMiliQ	-	13,2 µL
DNA	-	2 µL
Total		25 µL

A reação de amplificação dos genes foi realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). As condições de amplificação foram programadas de acordo com as especificações abaixo:

Tabela 3: Condições de amplificação dos genes *Cry* de bacilos durante a reação.

Desnaturação inicial	94 °C	30s
Desnaturação	94 °C	30s
Anelamento	50 °C	30s
Polimerização	72 °C	2 min
Extensão final	72 °C	5 min
Hold	4 °C	
Total de ciclos	30	

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5 %. Após a reação de amplificação foi retirado 3 μ L de cada amostra e adicionado em 2 μ L do corante Loading buffer. As amostras foram aplicadas no gel de agarose, sendo estes submetidos a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1 X (Tris/Boroato/EDTA) em pH alcalino. Em cada reação de eletroforese, foi incluído o DNA *Ladder* 1Kb (Invitrogen) como padrão de peso molecular, o qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em um transiluminado ultravioleta e posteriormente foram fotografados em aparelho TCL *Documentation* (Vilber Lourmat).

Tabela 4: Reagentes, utilizados na amplificação do gene *PhaC* que codificam Polihidroxialcanoatos.

Reagentes	Concentração	Quantidade
Mgcl2	1,5 mM	0,75 μ L
dNTPs	0,2 mM	2 μ L
Primer F	10 pMol	2 μ L
Primer R	10 pMOl	2 μ L
Taq DNA polimerase	5 U	0,3 μ L
H2OMiliQ	-	15,95 μ L
DNA	-	2 μ L
Total		25 μ L

Tabela 5: Condições de amplificação do gene *PhaC*.

Desnaturação inicial	95 °C	3 min	
Desnaturação	95 °C	40 s	35 ciclos
Anelamento	57 °C	40 s	
Extensão	72 °C	2 s	
Extensão	72 °C	5 min	
Hold	4 °C		

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR, foi realizada a eletroforese de agarose a 1,3%. Após a reação de amplificação, foi retirado 3 μ L de cada amostra e adicionado em 2 μ L do corante Loading buffer. As amostras foram aplicadas no gel de agarose, sendo estes submetidos a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1 X (Tris/Boroato/EDTA) em pH alcalino. Em cada reação de eletroforese, foi incluído o DNA *Ladder* 1Kb (Invitrogen) como padrão de peso molecular, o qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em um transiluminador ultravioleta e posteriormente foram fotografados em aparelho TCL *Documentation* (Vilber lourmat).

4.3 identificação molecular das linhagens amplificação do gene rDNA16S

As amostras de DNA, foram submetidas ao protocolo de PCR para ampliação de um fragmento interno, de aproximadamente 1100 pb do rDNA bacteriano 16S, afim de fazer a identificação molecular e as análises posteriores.

As reações de amplificação do gene 16s consistiram em um volume final de 25 μ L (1,5 μ L MgCl₂; 2,5 μ L Tampão 10X; 0,5 μ L dNTP; 0,125 μ L Taq polimerase; 18,375 μ L H₂O milli-Q; 1 μ L DNA e 0,5 μ L de cada Primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3')) e realizadas em termociclador Thermal Cycler[®]. Para a padronização das reações, foi preparado um mix com quantidades suficientes para todas as amostras e este dividido em alíquotas para cada reação. O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 94°C por 25 seg, pareamento dos primers a 62°C por 25 seg e extensão a 72°C por 1 min e 25 seg. Ao final um ciclo de extensão a 72°C por 5 min. (BOICHENKO *et al.*, 2000).

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) e corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), onde o registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

4.5 Purificação das amostras

Os fragmentos de rDNA 16S amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 200 ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento.

4.6 Sequenciamento e análise do gene *rDNA 16S*

O sequenciamento do gene rDNA 16S, foi utilizado o Kit BidDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 0,5µM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento ANI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências. As sequências foram analisadas com os programas PHRED/CAP3 disponíveis no site do Laboratório de Biologia Molecular da UNB.

As sequências resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

4.7 Manutenção de *Ae. aegypti* em insetário

Na realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller, as quais foram obtidas a partir das desovas de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Malária e Dengue INPA. As larvas foram criadas sob condições controladas, com temperatura em média de 28 ± 2 °C umidade relativa em torno de 85% e fotofase de 12 horas.

Na criação de *Ae. aegypti* seguiu-se o protocolo de manutenção do Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Os ovos de *Ae. aegypti* foram armazenados em papel filtro, em seguida foram colocados para eclosão em bacias esmaltadas contendo 500 mL de água. Após a eclosão, as larvas receberam alimento, sendo este distribuído nas bacias com água (figura 4A).

O alimento consistia na mistura de ração de peixe (*Tetramim*) com pó de fígado bovino em proporção 1:1. Três vezes por semana era realizada a limpeza dos recipientes nos quais as larvas eram mantidas, com remoção de 1/3 da água, para evitar a formação de película na superfície, resultado da proliferação de microrganismos. Ao atingir o 3º estágio, as larvas foram selecionadas para o bioensaio, sendo as demais deixadas nas bacias esmaltadas até atingirem o estágio de pupa, sendo então transferidas para gaiolas, teladas, para emergência dos alados (figura 4B).



Figura 4: Manutenção de *Ae. aegypti* em laboratório para realização dos bioensaios: Em A: bacia com ovos; em B: gaiolas para manutenção de adultos; em C: alimentos para as larvas e em D: larvas de terceiro instar.

4.8 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, no laboratório de Malária e Dengue em sala com temperatura controlada em 26 ± 2 °C, umidade relativa de aproximadamente 80 % e fotoperíodo de 12 h. Foram realizados dois tipos de bioensaios: O bioensaio seletivo com os extratos brutos do produto da fermentação de bacilos, cujo objetivo foi selecionar as linhagens com toxicidade as larvas de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller, e os bioensaios com os produtos da fermentação com a finalidade de determinar o potencial dos metabolitos produzidos por fermentação de bacilos.

4.9 Etapas dos bioensaios

4.9.1 Cultivo das linhagens bacterianas

Foram utilizadas 41 linhagens de bacilos isolados de diferentes ambientes Amazônicos, cultivadas nos meios de cultivo LB (Luria bertani), NA (Caldo nutriente) e ISP2, no qual uma pequena massa de células bacterianas foi colocada em 2 mL dos respectivos meios e incubadas em estufa agitadora a 180 RPM, a 30 °C durante 24 h.

Após esse período, 20 μL foi retirado e transferido para 50 mL dos respectivos meio e novamente incubadas a 30 °C por 72 h em estufa agitadora a 180 RPM.



Figura 5: Obtenção dos cultivos: Em **A:** pré-inoculo e em **B:** fermentação das linhagens.

Os bioensaios seletivos foram conduzidos no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, sob temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa de 80%. Para cada linhagem testada foi preparada replica de três copos plásticos contendo 16 mL de água destilada, 10 larvas de terceiro estágio e 4 mL das culturas de bacilos.

Após aplicação dos bacilos, foram realizadas leituras de sobrevivência das larvas em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h, registrando-se o número de larvas vivas e mortas em cada copo, obtendo desta forma o percentual de mortalidade dos indivíduos. As linhagens que tiveram percentual de mortalidade igual ou superior a 50% foram selecionadas por apresentarem o potencial para a atividade larvicida.

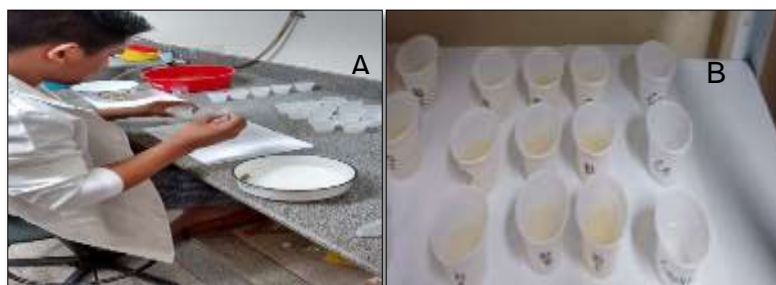


Figura 6: Preparo dos bioensaios: Em **A:** separação das larvas; em **B:** disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Ae. aegypti* durante a realização e um bioensaios seletivo.

4.9.2 Obtenção dos extratos brutos de *Bacillus* spp.

Este experimento procedeu-se pela obtenção dos extratos brutos de *Bacillus* spp., para avaliar a atividade larvicida contra *Ae. aegypti* da cepa Rockfeller. Foram pré-selecionadas 10 linhagens que apresentaram atividade larvicida acima de 50% nos bioensaios seletivos. Foram cultivadas em meio de cultivo LB (Luria bertani), NA (caldo nutriente) e ISP2 em 2 mL de cada meio em 30 °C durante 24 horas a 180 rpm.

Após isso, 20 µL de cada cultura foram adicionados em 50 mL de cada meio respectivo. Novamente foram incubados em 30°C e 180 rpm por 72 horas.

Após 72 h, as linhagens cultivadas foram analisadas utilizando a escala de Macfarland selecionando para os procedimentos seguintes as amostras que apresentaram a escala nº 6 ($18,10^8$ cel/ mL). Estas amostras foram centrifugadas em 14.000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigeradora a 4 °C. O Sobrenadante das linhagens foi separado em tubos falcons de 50 mL, após isso foram filtrados em membrana milipore 0,22 µm, com objetivo de esterilizar o meio de cultura deixando-o isento de células bacterianas. O pellet das linhagens foram autoclavados numa temperatura de 1 Atm 121 °C durante 30 min e que também foi utilizado nos bioensaios.

Etapas do experimento:

1º situação: Sobredante - Filtrado em membrana millipore 0,22 µM à bomba a vácuo.

2º situação: Células lisadas (Pellet) - estéril em 1 Atm á 121 °C durante 30 minutos.

3º Situação: Reunião das Células lisadas (Pellet) + Sobrenadante estéril.

4º Situação: Reunião das Células lisadas (Pellet) + Água destilada estéril.



Figura 7: Separação dos metabolitos produzidos pelos bacilos durante a fermentação: Em **A**: centrifugação em membrana Milipore 0,22µM e em **B**: autoclavagem do pellet.

4.9.3 Esquema da montagem dos bioensaios

Os produtos obtidos após 72 h foram utilizados de diferentes formas nos bioensaios como mostra a figura a seguir.

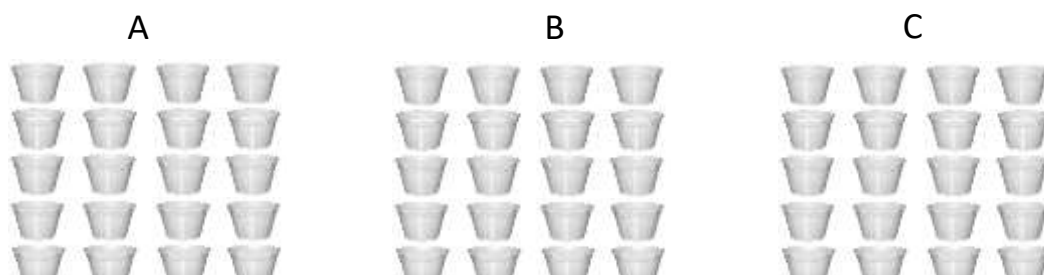


Figura 8: Ilustração dos bioensaios seletivos com diferentes produtos da fermentação de bacilos: Em **A**: Sobrenadante estéril (SNe); em **B**: Sobrenadante estéril + células lisadas (SNP) e em **C**: células lisadas + H₂O autoclavada (SNa).

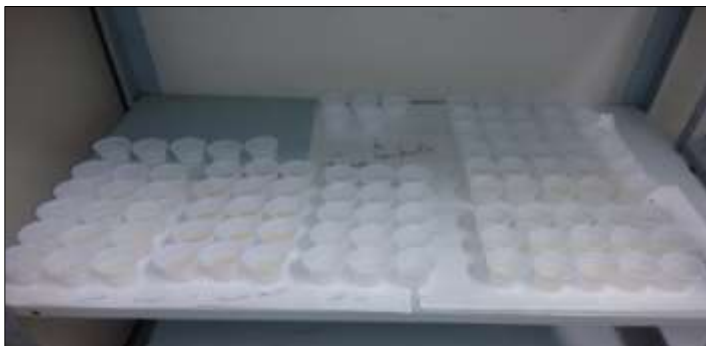


Figura 9: Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Ae. aegypti* durante a realização da segunda etapa dos bioensaios seletivos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Linhagens de *Bacillus* spp.

Das amostras analisadas, a partir de diferentes ambientes Amazônicos (solos, águas e plantas), foram isoladas 118 linhagens bacterianas, sendo que 41 foram identificados por morfologia celular e coloração de gram. As linhagens crescidas em 24, 48 e 72 h foram observadas quanto as suas estruturas celulares e comparadas com o grupo dos bacilos. As características das linhagens observadas apresentaram estruturas de parede celular Gram positivas (exceto duas linhagens que apresentaram características de Gram negativas), bordas onduladas, sem pigmento e formando pela maior parte de arranjos como bacilos e diplobacilos (tabela 6).

Considerado os resultados das análises realizadas neste trabalho, foi observado que as linhagens estudadas apresentaram características as bactérias do gênero *Bacillus*. As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis. As mesmas observações realizadas neste trabalho, foram feitas por Goto *et al* (2000) e Logan *et al* (2007), onde abordam as espécies do gênero *Bacillus* possuem parede de gram positiva, apesar de algumas restrições ocorrem como por exemplo: culturas jovens de bacilos podem apresentar coloração gram negativa. Sosa-Gomes *et al* (1998) também enfatiza que membros desta espécie, apresenta características com formas circulares e bordos ondulados, assim como os resultados das análises observadas.

Das 41 linhagens obtidas para este estudo, verificou-se a predominância de bacilos-gram positivos correspondendo 95% e apenas 0,5% para bacilos gram negativos. A espécie de *Bacillus* não pode ser apenas baseada em critérios morfológicos para diferenciar as espécies, indicando assim a necessidade de outras avaliações para inferir no processo de diferença e identificação das espécies e subespécies (HABIB *et al.*, 1998).

A identificação de espécies microbianas por métodos moleculares fenotípicos pode ser incerta, complicada e demorada a utilização de métodos moleculares revolucionou a sua identificação, melhorando a qualidade e a eficácia desta identificação (DELLAGLIO *et al.*, 1991). Com estudos e sobre a análise da sequência de rRNA 16S revelou a presença de várias linhagens filogeneticamente distintas dentro do gênero *Bacillus* (YOON *et al.*, 2003).

Tabela 6: Resultados dos isolados de *Bacillus* spp., a partir de amostras de diferentes ambientes Amazônicos e de linhagens reativadas de coleções do laboratório (*).

Ordem	Origem	Linhagem	Morfologia	Gram
1	Solo Puraquequara	Bio011NA	Bacilos	+
2	Solo Puraquequara	Bio01	Bacilos	+
3	Coleção INPA	BtAM125LB	Bacilos	+
4	Dg.C. R 1.1.1 isp2	2R6 2.1.1	Bacilos	+
3	Dgcr 1.1.1 isp2	R11ISP2	Bacilos	+
4	QPR 2.3 isp2	K5NA	Bacilos	+
5	CjRco 1.1 isp2	R14ISP2	Bacilos	-
6	Stsp c.2.2.1 ^a	R8ISP2	Bacilos	+
7	Solo Parintins	BISMac	Bacilos	+
8	Dgr1 2.2b aveia	R1ISP2	Bacilos	+
9	Dgcr2 1.3a isp2	R15ISP2	Bacilos	+
10	Qpf2 3.3	R13ISP2	Bacilos	+
11	Anspr1 2.2b isp2	R21ISP2	Bacilos	+
12	Flor1.1.3b2	61PHAISP2	Bacilos	+
13	Solo Puraquequara	Bio16NA	Bacilos	+
14	Coleção INPA	BtAM18LB	Bacilos	+
15	Coleção INPA	BtAM61LB	Bacilos	+
16	Agua Parintins	LA1LB	Bacilos	+
17	Coleção INPA	BtAM116LB	Bacilos	+
18	Caule BDA+ct1.1.1B	PHA56ISPS2	Bacilos	+
19	Coleção INPA	BtAM138LB	Bacilos	+
20	Coleção INPA	BtAM27NA	Bacilos	+
21	Solo Parintins	BSBIOLB	Bacilos	+
22	EJC2 1.2B	38PHAISP2	Bacilos	+
23	Agua Parintins	J1NA	Bacilos	+
24	Agua Parintins	RAPA NA	Bacilos	+
25	GHC2 1.1 ^a	15PHAISP2	Bacilos	+
26	Coleção INPA	BtAM49LB	Bacilos	+
27	Solo Puraquequara	BiO03LB	Bacilos	+
28	Q.r isp2	K4 NA	Bacilos	+
30	Solo INPA	BCLBIO LB	Bacilos	+
31	MA06 CAITA 2.1.2	103PHAISP2	Bacilos	+
32	Coleção INPA	BtAM220 NA	Diplobacilos	+
33	Qpc2c 2.1	K30 NA	Bacilos	-
34	Solo Puraquequara	Bio19LB	Bacilos	+
35	Agua Parintins	ALPI2 ISP2	Bacilos	+
36	Coleção INPA	BtAM141C ₂ ³	Diplobacilos	+
37	Solo INPA	2WISP2	Bacilos	+
38	Coleção INPA	BtAM74LB	Bacilos	+
39	GhCC1 2.1 ^a	PHA50LB	Bacilos	+
40	Solo Parananema	SPLBIO LB	Bacilos	+
41	Solo INPA	BCLB02	Bacilos	+

5.1.1 Extração de DNA genômico e Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A extração de DNA dos bacilos foram quantificadas e ajustadas para a reação de PCR de 1-10 μ L descrito no item 4.2.2.

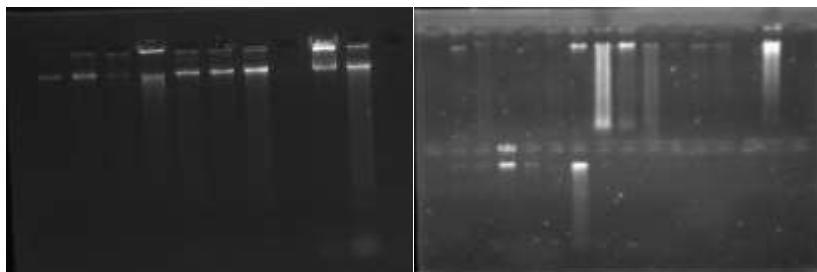


Figura 10: Perfil eletroforético de extração de DNA genômico das linhagens em gel de agarose 0,8 %.

O DNA genômico bacteriano extraído foi amplificado por PCR para amplificação do gene *16S rDNA*, o fragmento molecular de 1500 (pares de bases) foi comparado com o marcador molecular de peso molecular *Ladder* 1Kb (Promega). Após, as amostras foram purificadas e utilizadas na reação de sequenciamento. (Figuras 11-12).

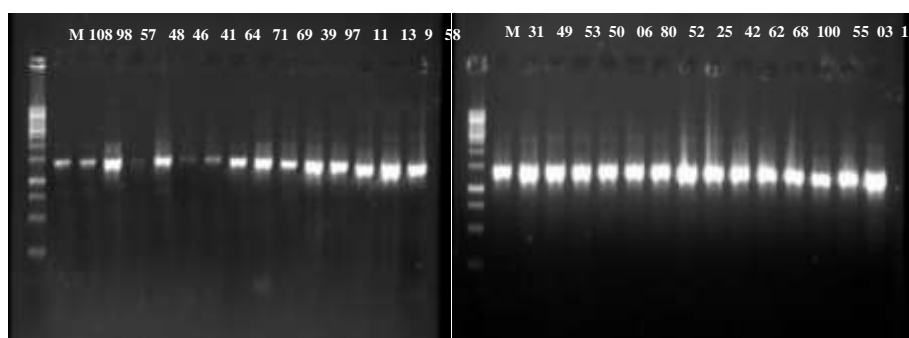


Figura 11: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene 16S rDNA de *Bacillus* spp., isolados da Amazônia.

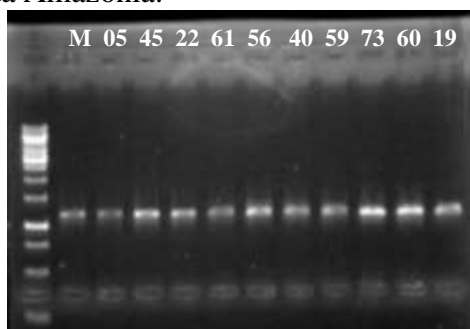


Figura 12: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene 16S rDNA de *Bacillus* spp., isolados da Amazônia.

5.1.2 Identificação molecular dos *Bacillus* spp.

Na identificação molecular foi possível caracterizar três gêneros distintos como: *Bacillus* spp, *Paenibacillus* sp e *Serratia* sp. Foram identificadas 10 linhagens pertencentes ao gênero *Bacillus*, uma linhagem do gênero *Paenibacillus* e uma linhagem pertencente ao gênero *Serratia* (figura 13). A partir de 41 isolados de bacilos de diferentes ambientes Amazônicos foram identificados 29 linhagens (das quais 12 não foi possível identificar) tabela 7.

As linhagens identificadas corresponderam com os critérios morfológicos aos bacilos, exceto a linhagens ALPI2ISP2 e BtAM141NA que foram identificadas como *Paenibacillus polymyxa* e *Serratia marcescens*, respectivamente (tabela 7). O parâmetro de decisão para proceder com a identificação molecular derivou do alinhamento comparativo entre espécies obtidas no BLAST e no RDP assumindo-se o percentual de confiança para identidade bacteriana (ID) a partir de 94 % a 100%. A aplicação de métodos moleculares no estudo da sistemática de membros do gênero *Bacillus* e gêneros relacionados trouxe grande impacto na classificação desse gênero (LOGAN, POPOVIC, HOFFMASTER, 2007).

O sequenciamento do gene *16S rDNA* é frequentemente utilizando como método alternativo para definir o nível de espécies em bactérias (YAMADA, 1977; WOESE, 1978). Além disso, o gene 16S rDNA é bastante usado para identificação de *Bacillus* spp., como por exemplo: *B. subtilis*, *B. thuringiensis* (WATTIAU *et al.*, 2001, HANSEN *et al.*, 2001).

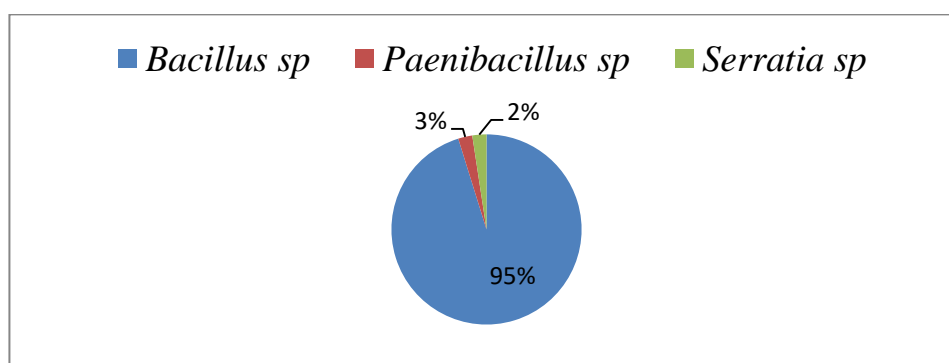


Figura 13: Representação dos gêneros com base na identificação bacteriana.

Tabela 7: Identificação molecular de bacilos isolados da Amazônia.

Colônias/Contig	Identificação	Cobertura	Valor E	Identidade
R11 ISP2 Bt AM 138 LB Bt AM 74 LB PHA 50 ISP2 K4 Na PHA 56 ISP2 RAPA Na PHA 103 ISP2	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus megabacterium</i>	100%	0.0	99%
PHA 15 ISP2	<i>Bacillus safensis</i>	100%	0.0	99%
Bt AM 27 NA PHA 82 ISP2	<i>Bacillus</i> sp	100%	0.0	99%
Bt AM 220 Na R19 ISP2 J 1 Na BC LB 02 Bt AM 125 LB Bt AM 49 LB Bt AM 116 LB BC Bio LB 2 R 6 2.1 LB K 5 Na	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus anthracis</i>	98%	0.0	97%
2 R8 ISP2 PHA 38 ISP2 Bt AM 61 LB R11 ISP2	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	0.0	98%
ALPI 2 ISP2	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	84%	0.0	97%
Bt AM 141 Na	<i>Serratia marcescens</i>	100%	0.0	99%
2W ISP2	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus altitudinis</i>	100%	0.0	100%
R13 ISP2	<i>Bacillus subtilis strain</i>	75%	0,0	94%

5.1.3 Detecção molecular dos genes *Cry4* e *Cry11*

Os bacilos isolados, foram analisados quanto à presença dos genes *Cry4* e *Cry11*. Um total de 41 bacilos foram analisados para verificar a presença dos genes *Cry4* e *Cry11*. Foram observados fragmentos de amplificação de DNA para o gene *Cry4Ba* de 331 pb nas linhagens (K4NA – *B. pumilus*, 103PHAISP2 – *B. pumilus*, BtAM220NA – *B. thuringiensis*, ALPI2ISP2 – *Paenibacillus polymyxa*, BtAM141C , BtAM74LB – *B. pumilus*, PHA50ISP2 – *B. pumilus*, SPLBIOLB, 2R6.2.1LB – *B. thuringiensis*, Bio16LB. Os amplicons do gene *Cry4Ba* também foram observados na cepa padrão Bti01 da linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis*. Os genes *Cry4* são específicos de

dípteros e apresentam o potencial para o controle de populações de mosquitos da ordem Diptera e moscas pretas no mundo todo (MARGALITH BEM-DOV, 2000).

Neste trabalho, as linhagens isoladas K4NA, 103PHAISP2, BtAM74LB, PHA50ISP2 foram as que amplificaram para o gene *Cry4Ba* e identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA, como estirpe *B. pulmilus*, pois sendo uma espécie não muito frequente, considerada entomopatogênica, encontramos uma nestas linhagens um interessante ponto de vista científico. Diana e Garcia *et al* (2016) demonstram que cristais parasporais de *B. pulmilus* produzidos durante esporulação assemelhavam-se aos produzidos pela cepa *B. thuringiensis* tanto aqueles produzidos fora da célula quanto no interior de outras células vegetativas. Sendo que foi a primeira vez que um corpo parasporal dessa natureza tem sido relatada na cepa *B. pulmilus*. Os fragmentos observados na amplificação do gene *Cry4Ba* nas linhagens de *B. pulmilu* neste trabalho, parece sugerir que estas linhagens portadoras do gene *Cry4Ba* também podem expressar e produzir proteínas CRY4 de natureza proteica.

Como os cristais de *B. thuringiensis* são os principais fatores de virulência responsáveis pela toxicidade contra insetos, estas linhagens estudadas, mais especificamente, também podem representar um fator de virulência para o controle de *Ae. aegypti*. A possibilidade de que uma estirpe de *B. pulmilus* adquiriu um plasmídeo de *B. thuringiensis* poderia explicar porque uma espécie entomopatogênica não classica como *B. pulmilus* mostrou a presença do gene *Cry4B* (DIANA; GARCIA *et al.*, 2016).

A importância de conhecer os fatores de patogenicidade e virulência de uma espécie bacteriana para o controle vetorial de mosquitos vetores de doenças, é necessário nos programas de controle biológico. Desse modo, umas técnicas bastante usada para os estudos moleculares é a PCR, cujo alcance tem se tornado essencial como parâmetro de potencialidades para o controle em isolados não identificados, ou mesmo para descrição de novos genes/toxinas, contribuindo para o conhecimento sobre a ação de *B. thuringiensis*, em diferentes ordens de inseto-praga (BRAVO *et al.*, 2013). Das linhagens que amplificaram para o gene *Cry4*, somente a linhagem Bio19LB apresentou atividade acima de 50% em 24 horas.

Foram também observadas nas linhagens BSBIOLB, Bio01LB, Bio19LB e Bio011LB fragmentos de DNA do gene *Cry11* 331 pb. Os mesmos resultados foram observados na linhagem padrão Bti01 (*B. thuringiensis israelenses*). Somente a linhagem Bio19LB apresentou amplicons para os dois genes *Cry4Ba* e *Cry11*.

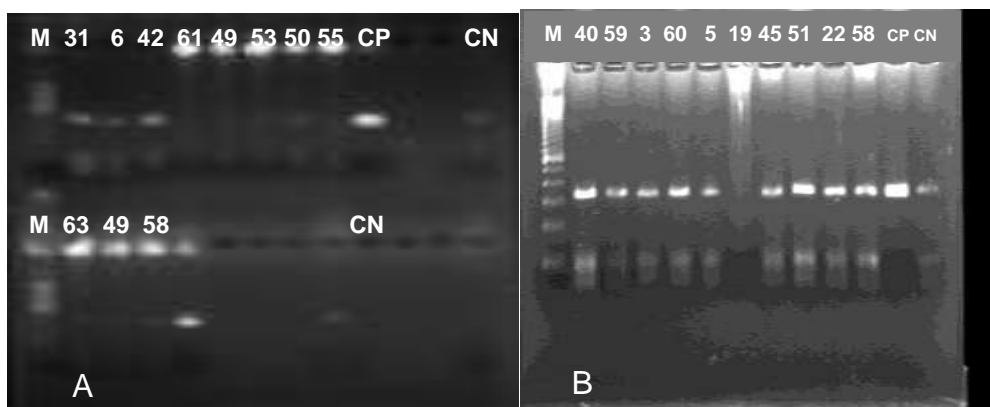


Figura 14: Perfil eletroforético do gene *Cry4Ba* de *Bacillus* spp., em gel de agarose 1,5 %.

Em **A**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); LA1LB (02); BtAM27NA (03); RapaNA (04); 15HAIS2 (05); BtAM116LB (06); HA56ISP2 (07), BtAM138LB (08); BCLB02 (09); Cepa padrão (10); Controle negativo (13). Em **B**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); K4NA (02); 103PHAISP2 (03); BtAM220NA (04); ALPI2ISP2 (05); BtAM141C (06); 2WISP2 (07); BtAM74LB (08); PHA50ISP2 (09); SPLBIBIO (10); BtAM61LB (11); Cepa Padrão (12); Controle negativo (13).

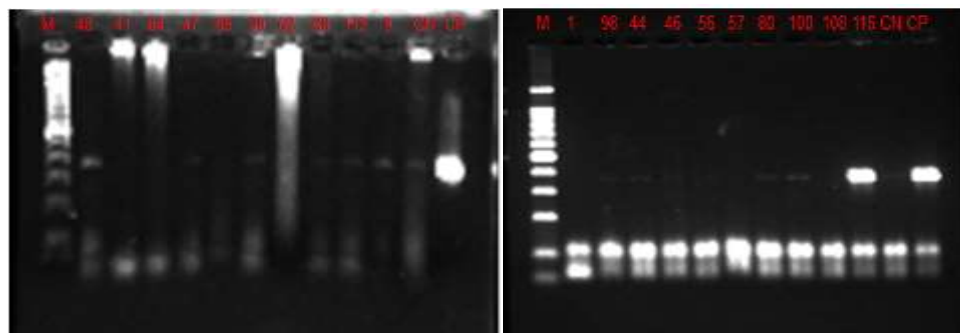


Figura 15: Perfil eletroforético do gene *Cry4Ba* de *Bacillus* spp., em gel de agarose 1,5 %.

Em **A**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); 2R6.2.1.1LB (02); K5NA (03); R14ISP2 (04); R8ISP2 (05); BSMac (06); R1ISP2 (07); R21IS2 (08); 61PHAISP2 (09); Bio1LB (10); BtAM18NA (11); Controle negativo (12); Cepa padrão (13). Em **B**: Marcador molecular (01); R13ISP2 (02); Bio01LB (03); BCLBioLB (04); R11ISP2 (05); BtAM49LB (06); BtAM125LB (07); BISBIOLB (08); Bio03LB (09); Bio11LB (10); Bio19LB (11); Controle negativo (12); Cepa padrão (13).

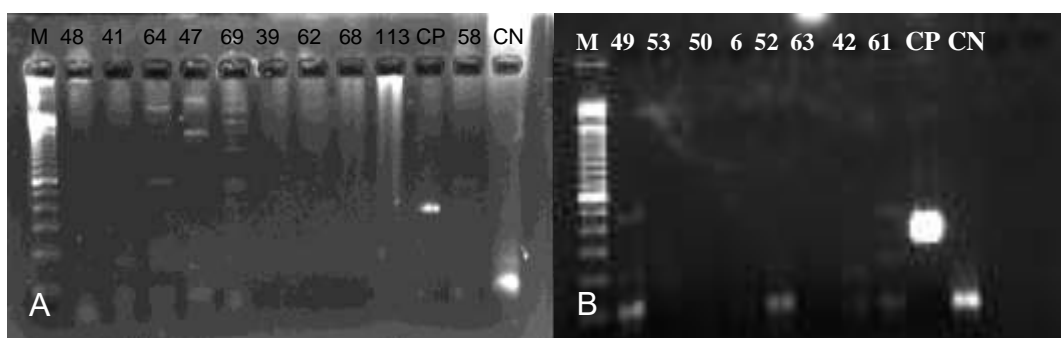


Figura 16: Perfil eletroforético de amplificação do gene *CryIIgral* de *Bacillus* spp., em gel de agarose 1,5 %.

Em **A**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); 2R6.2.1.1LB (02); K5NA (03); R14IS2 (04); R8ISP2 (05); BSMac (06); R1ISP2 (07); R21ISP2 (08); 61PHAISP2 (09); Bio16LB (10); Cepa padrão (11); BtAM61LB (12); Controle negativo (13). Em **B**: Colunas de **01 a 11**: Marcador molecular (01); BtAM116LB (02); PHA56ISP2 (03); BtAM138LB (04); BtAM27NA (05); 38PHAISP2 (06); R15ISP2 (07); RaPaNA (08); 15PHAISP2 (09); Cepa padrão (10); controle negativo (11).

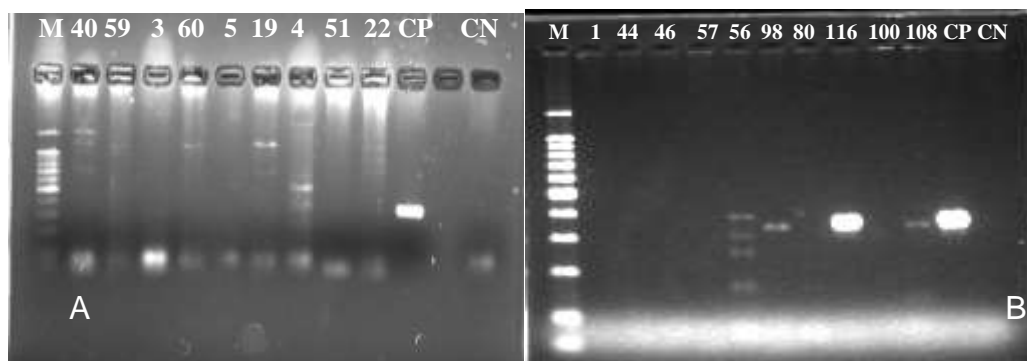


Figura 17: Perfil eletroforético de amplificação do gene *CryIIgral* de *Bacillus* spp., em gel de agarose 1,5 %.

Em **A**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); K4NA (02); 103PHAISP2 (03); BtAM220NA (04); ALPIISP2 (05); BtAM141C (06); 2WISP2 (07); BtAM74LB (08); PHA50(b)ISP2 (09); SPLBIOLB (10); Cepa padrão (11); Controle negativo (13). Em **B**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); R13ISP2(02); BCLBIOLB (03); R11ISP2 (04); BtAM125LB (05); BtAM49LB (06); Bio01LB (07); BISBioLB (08); Bio19LB (09); Bio03LB (10); Bio011LB (11); Cepa padrão (12) ; Controle negativo (13).

5.1.4 Detecção molecular do gene *PhaC* codante para síntese de Polihidroxicanoatos

Considerando os resultados dos fragmentos de amplificação do gene *PhaC* nas linhagens de bacilos estudados foi observado fragmentos de DNA de 551 pb nas linhagens K4N – *B. pulmilus*, 103PHAISP2 – *B. pulmilus*, BtAM220NA – *B. thuringiensis*, ALPIISP2 – *Paenibacillus polymyxa*, 2WISP2 – *B. pulmilus*, BtAM74LB – *B. pulmilus*, PHA50(b)ISP2 – *B. pulmilus*, SPLBIO, K5NA- *B. thuringiensis*, R8ISP2 – *B. licheniformis*, Bio16LB, BtAM125LB – *B. thuringiensis*, BtAM49LB – *B. thuringiensis*. Os mesmos resultados foram observados na linhagem padrão Bti01 (*B. thuringiensis israelenses*). Dos três genes codificadores (*PhaA*, *PhaB* e *PhaC*) codificadores de enzimas da via metabólica de produção de PHAs, o gene *PhaC* é o mais importante e utilizado devido ser codificador para enzima chave da ultima etapa da

via metabólica de síntese de PHAs (SHEU *et al.*, 2000). As pesquisas abordam o estudo das enzimas que estão diretamente envolvidas na síntese de Polihidroxicanoatos.

Existem quatro classes de PHA sintases das quais se destacam as PHA sintases da classe I, capazes de polimerizar unidades de hidroxiacil-CoA com cadeia curta (305 átomos de carbono) e as de classes II, específicas para monômeros de cadeia média (6-14 átomos de carbono) (REHM, 2003). Independente de qual classe a PHA sintase de um determinado micro-organismo pertença, todas elas possuem a subunidade *PhaC*, e, por isso, essa é a região do DNA escolhida para ser detectada pela técnica de PCR, quando se espera detectar molecularmente possíveis linhagens com potencia para produção de Polihidroxicanoatos.

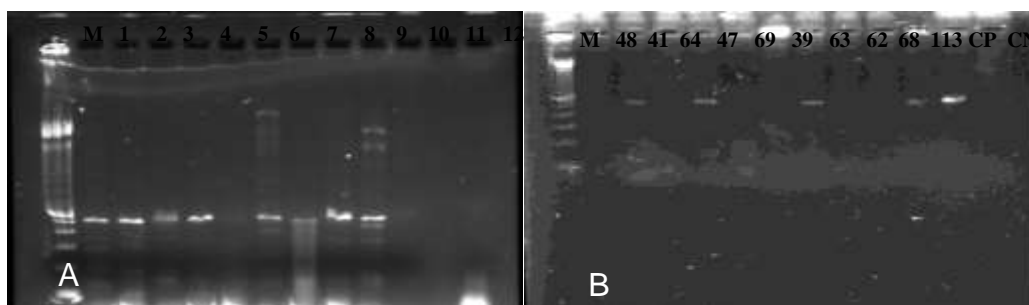


Figura 18: Perfil eletroforético de amplificação do gene *PhaC* de *Bacillus* spp., em gel agarose 1,5 %.

Em **A**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); K4NA (02); 103PHAISP2 (03); BtAM220NA (04); ALPIISP2 (05); BtAM141C (06); 2WISP2 (07); BtAM74LB (08); PHA50(b)ISP2 (09); SPLBIOLB (10); Cepa padrão (12); Controle negativo (13). Em **B**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); 2R6.2.1.1LB (02); K5NA (03); R14IS2 (04); R8ISP2 (05); BSMac (06); R1ISP2 (07); R21ISP2 (08); 61PHAISP2 (09); Bio16LB (10); BtAM61LB (11); Cepa padrão (12); Controle negativo (13).

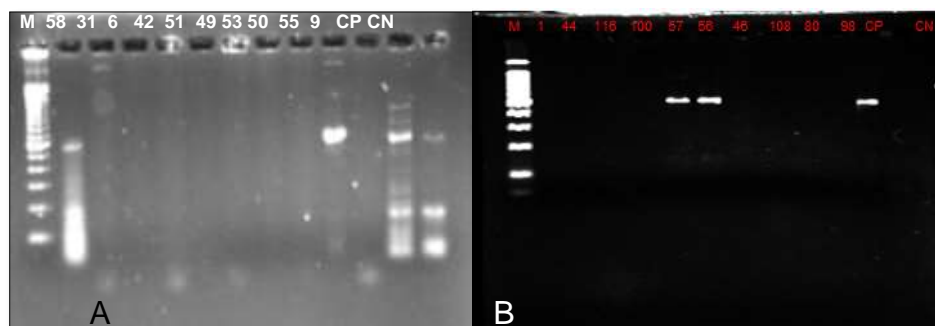


Figura 19: Perfil eletroforético do gene *PhaC* de *Bacillus* spp., em gel de agarose 1,3 %.

Em **A**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); BtAM61LB (02); LA1LB (03); BtAM2NA (04); RaPaNA (05); PHA50(b)ISP2 (06); BtAM116LB (07); PHA56ISP2 (08); BtAM138LB (09); BCLBo2 (10); BtAM18NA (11); Cepa padrão (12); Controle negativo (13). Em **B**: Colunas de **01 a 13**: Marcador molecular (01); R13ISP2 (02); BCLBIOLB (03); R11ISP2 (04); BtAM125LB (05); BtAM49LB (06); Bio01LB (07); BISBioLB (08); Bio19LB (09); Bio03LB (10); Bio011LB (11); Cepa padrão (12); Controle negativo (13).

5.2 Bioensaios seletivos

Os resultados dos bioensaios seletivos, utilizando as linhagens de *Bacillus* spp., e larvas de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller estão apresentados na tabela 8.

Os resultados mostraram que das 41 linhagens testadas, somente 10 apresentaram atividade larvicida acima de 50% - Bio011NA; Bio01LB; BtAM125LB – *B. thuringiensis*; R11ISP2 – *B. pulmilus*; R13ISP2 – *B. thuringiensis*; BSBIOLB; Bio03LB; BCLBIOLB; Bio019LB.

Foi observado que nas primeiras 24 horas apenas a linhagem Bio19LB apresentou mortalidade acima de 50%.

Na leitura de 48 horas, as linhagens BtAM125LB – *B. thuringiensis* ; R11ISP2; R13ISP2 – *B. subtilis*; BSBIOLB; Bio03LB; BCLBIOLB; Bio19LB e BtAM49LB – *B. thuringiensis* apresentaram mortalidade acima de 50%, sendo os valores respectivamente 51,1 %; 87,7%; 62,2%; 51,6 %; 55,5 %; 91 % e 5,7 %.

Considerando ainda a leitura de 72 horas, apenas as linhagens Bio011NA e BSBIOLB mostraram mortalidade, sendo os valores respectivamente 64,4% e 53,4%.

Ainda em relação a linhagem Bio19LB, constatou-se que a mortalidade foi registrada nos três intervalos de leitura, respectivamente, 50,8 %; 91% e 92,2%.

Estes resultados, com bioensaios seletivos contra *Ae. aegypti*, selecionou 10 linhagens com potencial larvicida, apresentado uma quantidade expressiva de cepas entomopatogênicas. Ao contrário de estudos realizados por Praça *et al* (2004), visando a seleção de *B. thuringiensis* com ação em larvas de *Ae. aegypti* e *C. quiquefasciatus*, mostrou que, de 300 isolados testados, apenas dois apresentaram toxicidade contra *Ae. aegypti* e *C. quiquefasciatus*, o que corresponde menos de 1%.

Da mesma forma, Dias *et al* (2002) descreveram atividade de linhagens de *B. thuringiensis* com ação tóxica em larvas de *Ae. aegypti* em apenas 1,9% dos isoaldos. Entretanto, Sousa-Filho (2004) também estudando linhagem de *B. thuringiensis* do Amazonas, verificou elevado porcentual de linhagem em bioensaios seletivos, sendo que, de 46 isolados testados, 21,7% mostraram ação larvicida para *Ae. aegypti*.

Tabela 8: Resultados dos bioensaios seletivos com *Bacillus* spp., de diferentes ambientes Amazônicos, utilizando larvas de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller.

Mortalidade %					Mortalidade %				
Isolado	24 h	48 h	72 h	Contr %	Isolado	24 h	48 h	72 h	Contr%
Bio011NA	13,3	41,1	64,4*	6,6	Bio016NA	7,7	24,7	37,7	0
Bio01LB	31	45,5	67,7	6,6	BtAM18LB	8,8	17,7	25,4	0
BtAM125LB	43,3	51,1	73,3	6,6	BtAM61LB	16,6	38,8	44,4	0
2R6 2.1.1LB	11,1	19,9	42,2	3,3	LA1LB	22,2	39,9	47	0
R11ISP2	19,9	87,7	94,4	3,3	BtAM116LB	16,6	38,8	44,4	0
K5NA	12,2	32,2	37,7	3,3	PHA56ISP2	5	36,6	44,4	0
R14ISP2	4,4	7,5	15,5	3,3	BtAM138LB	18,8	35,5	37,7	0
R8ISP2	25,5	39,9	49,5	3,3	BtAM27NA	15	18	24	0
BSMac	13,3	44,4	45,5	3,3	BSBIOLB	31,1	52,1	53,4	0
R1ISP2	5,3	19,9	35,5	3,3	38PHAISP2	12	28	38	0
R15ISP2	7,7	12,2	24,4	3,3	R19ISP2	12,2	40	45	0
R13ISP2	39,9	62,2	79,7	3,3	RAPA NA	0	7,7	9,9	0
R21ISP2	12,2	16,6	28,8	3,3	15PHAISP2	12,2	17,7	24,4	0
61PHAISP2	13,2	27,7	45,5	3,3	BtAM49LB	37,6	54,7	63,3	0
Bio03LB	36,6	51,6	69	3,3	K4NA	1,1	2,2	6,6	0
BCLBIO LB	19,9	55,5	72,1	3,3	103PHAISP2	0	0	1,1	0
BtAM220NA	2,2	3,3	4,4	3,3	K30NA	0	8,8	11,1	0
BIO019LB	50,8	91	92,2	0	ALPIISP2	25,3	37,6	42,3	0
BtAM141C ₂	1,1	2,2	11	0	2W ISP2	0	0	0	0
BtAM74LB	3,3	5,5	32,2	0	PHA50	0	30	45	0
SPLBBIO	7,7	9,9	45,5	0					

5.2.1 Atividade larvicida de extratos brutos de *Bacillus* spp.

Os resultados obtidos nos Bioensaios com extratos brutos de 10 linhagens de *Bacillus* provenientes da fermentação (descrito no item 4.9.2) testados sobre larvas da cepa Rockefeller, estão representados na tabela 9.

Considerando os resultados obtidos das 10 linhagens de *Bacillus* spp., com extratos brutos de produtos oriundos da fermentação, foi observado que nos três intervalos de mortalidade, somente as linhagens BSBIOLB, R13ISP2 – *B. subtilis*, BIO01LB e BtAM49LB – *B. thuringiensis* foram as que apresentaram os resultados acima de 50% em todos os testes aplicados (Ver tabela 9).

Tabela 9: Resultados dos bioensaios seletivos com linhagens de *Bacillus* spp., de diferentes ambientes Amazônicos contra larvas de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller, exposta em diferentes produtos da fermentação bacteriana.

Linhagem	Sobrenadante esteril %			Celulas lisadas + Sobr. %			Celulas lisadas + H ₂ O %		
	24 h	48 h	72h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72h
R11ISP2	3	10	16	11	19	35	9	13	16
BSBIOLB	10	59	83	9	59	80	7	10	12
BCLBIOLB	8	23	38	23	57	57	2	13	24
R13ISP2	15	39	60	14	30	48	8	12	14
BtAM125LB	5	12	18	4	6	15	8	11	15
Bio011NA	9	23	31	10	23	39	1	6	23
BiO01LB	1	31	57	10	13	30	11	24	32
BtAM49LB	5	58	83	28	75	100	5	28	59,9
Bio019LB	7	10	21	12	58	70	3	5	9
Bio03LB	5	7	14	1	8	18	4	8	8,8

5.2.2 Atividade larvicida com extrato bruto de *Bacillus* (Sobrenadante)

Nestes experimento utilizou-se o sobrenadante estéril para avaliar a eficiência da atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. Considerando os resultados dos extratos brutos do sobrenadante das 10 linhagens de *Bacillus* testados, foi observado que nenhuma linhagem apresentou mortalidade no intervalo de 24 horas. Na leitura de 48 horas, apenas as linhagens BSBIOLB e BtAM49LB - *B. thuringiensis* apresentaram mortalidade entre 60% e 59%, respectivamente (Ver figura 20).

Considerando as 72 horas exposição, os valores de mortalidade para as linhagens BSBIOLB e BtAM49LB - *B. thuringiensis* apresentaram 80% de mortalidade. As linhagens R13ISP2 - *B. subtilis* e Bio01LB só apresentaram atividade no intervalo de 72 horas, correspondendo entre 60% e 58%, respectivamente.

Os bioensaios realizados neste experimento, mostrou a eficiência de quatro linhagens (BtAM49 - *B. thuringiensis*, BSBIOLB, R13ISP2 - *B. subtilis* e Bio01LB) com o potencial larvicida contra *Ae. aegypti* da cepa *Rockefeller*, quando as mesmas foram expostas ao meio sobrenadante insetos de células bacterianas. Com isso, foi observado morte das larvas, principalmente nas 72 horas de exposição. Entretanto, vale ressaltar que o meio sobrenadante podem apresentar uma infinidade de moléculas com potencial desconhecido que é excretado das células bacterianas como, por exemplo, os lipopeptídeos. Estudos realizados por Bais *et al* (2006), afirma que os lipopeptídeos cíclicos (CLPs) presentes no sobrenadante da cultura de *B. subtilis* têm apresentado propriedades larvicida diversos mosquitos. Uma das considerações feitas por Brar *et al*

(2004, 2005), relatam que o sobrenadante excretados de células bacterianas podem ser um grande nicho de outros fatores de virulência, responsável por uma maior atividade entomotóxica. Além disso, autores como Estruch *et al* (1996) e YU *et al* (1997) também já relataram que outras proteínas inseticidas vegetativas (VIP), foram encontradas no sobrenadante de linhagens de *B. thuringiensis israelenses*, e causaram mortalidade em insetos de importância econômica.

Em relação algumas linhagens que apresentaram mortalidade apenas em 72 horas como, por exemplo, a linhagem R13ISP2 (*B. thuringiensis*) e Bio01LB, nos mostra a possibilidade de que as linhagens precisam de mais tempo para demonstrarem sua efetividade. Ârgolo (2014) relata que alguns fatores contribuem para as diferenças nas atividades entomopatogênicas como, por exemplo, diferenças de coletas do sobrenadante, volumes de cultura, condições de inóculo e condições de culturas geral. Além disso, diversos fatores podem estar associados com a eficiência da atividade larvicida, ocasionando diferenças nos intervalos de exposição, assim como baixa eficiência diferenças significativas dos resultados.

Observando os resultados dos ensaios com o meio sobrenadante de *Bacillus* contra larvas de *Ae. aegypti*, foi possível observar a formação de emulsificações nos recipientes após 49 h e 72 horas de exposição. O mosquito da espécie *Ae. aegypti* é antropofílico e endofilo. As larvas utilizam a respiração traqueal e as vias respiratórias sifão está localizado na parte posterior do corpo. Para torca de gás, eles devem permanecer em um ângulo próximo a 90° com a superfície da água ($\pm 20^\circ$) dependendo do estágio larval (Christophers, 1960).

Considerando as observações realizadas neste experimento, sugere-se que existe a possibilidade de ser formado ramnolipídeos durante o período de leitura dos bioensaios. Estas moléculas são biossurfactantes biológico que tem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. Biossurfactantes produzidos por microorganismos podem ser utilizados para controlar outras pragas (AWADA *et al.*, 2005). Alguns autores como relatam que estas moléculas apresentam o potencial para controlar populações de pulgões (KIM *et al.*, 2011). Estes metabolitos microbianos também são eficentes contra *Rhizoprtha dominica*, uma espécie de besouro que ataca grãos armazenados (KAMAL *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Vinicius e Roberta *et al* (2015) com Rhmnolipídeos com as concentrações de 800, 900 e 1000 mg mg/L apresentaram atividade contra larvas,

apresentando mortalidade mínima de 50%. Somente a concentração de 600 mg apresentou atividade de 100% em 48 h. O mesmo estudo realizado por Vinicius e Roberta *et al* (2015) foi observado que as larvas, tendem a permanecer mais tempo na superfície em comparação com o controle. As larvas no grupo de controle tiveram o menor tempo de tempo no fundo do frasco, com uma média de 30,6. Em concentrações de 800-1000 mg/L, a balança hidrostática foi quebrada entre as concentrações reduzidas com o aumento da concentração do biossurfactante (VINICIUS; ROBERTA *et al.*, 2015).

Considerando os resultados dos experimentos dos autores acima, a possibilidade de ser encontrados nos extratos brutos de *Bacillus* isolados de ambientes Amazônicos, moléculas de ramnolipídeos, com potencial larvicida não deve ser descartada. Além disso, as diferentes concentrações também podem influenciar no período de mortalidade dos insetos. O que sugere uma nova investigação mais detalhada neste trabalho.

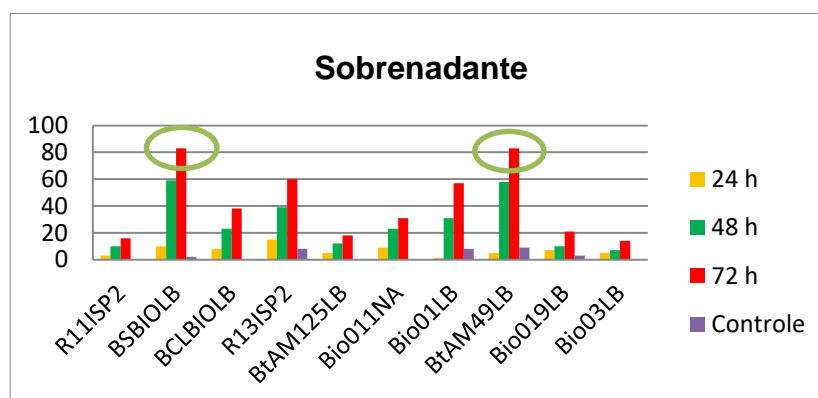


Figura 20: Percentual de mortalidade nos bioensaios das larvas de *Ae. aegypti* da cepa *Rockefeller*, expostas ao sobrenadante, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.

5.2.3 Atividade larvicida de células lisadas (Pellet) de *Bacillus* em associação com seu sobrenadante.

Neste experimento, as células lisadas (Pellet) autoclavadas, descrito no item (4.9.2) e posteriormnete reunidas com o sobrenadante, descrito no item (4.9.2) foram avaliadas quanto a atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* da cepa *Rockefeller*.

Considerando os resultados da atividade larvicida de células lisadas com o sobrenadantes oriundos da fermentação de *Bacillus*, foi observado que não houve mortalidade no intervalo de 24 h para nenhuma linhagem (Ver figura 21).

No intervalo de 48 h, somente as linhagens BSBIOLB, BCLBIOLB, R13ISP2 (*B. subtilis*), BtAM49LB – *B. thuringiensis* e Bio19LB apresentaram atividade acima de 50%, correspondendo 58%, 50%, 58% 78% e 58%, respectivamente.

No intervalo de 72 h, as linhagens BSBIOLB, R13ISP2 – *B. subtilis*, BtAM49LB – *B. thuringiensis* e Bio19LB apresentaram mortalidade de 80%, 50%, 100% e 70%, respectivamente. A linhagem BCLBIOLB permaneceu com a mesma porcentagem da leitura de 48 h.

Estes resultados do consórcio de células lisadas com sobrenadantes, demonstraram a eficiência da atividade larvicida das linhagens BSBIOLB e BtAM49LB – *B. thuringiensis* quando há maior tempo de exposição aos produtos. Fatores como o sinergismo ou a interação molecular podem contribuir para uma eficiente atividade larvicida. Comparando os experimentos deste ensaio com os estudos de Asano *et al* (1994), no qual analisou o efeito sinérgico entre o sobrenadante em associação com células lisadas contra larvas de *Spodoptera litura*, *Plutella xylostella* e *Adoxophes* sp., quando reunidos, apresentaram 100% de mortalidade na concentração de 1,25µL/g. Podemos prever que existe uma relação sinérgica entre as moléculas dos extratos brutos de *Bacillus*, uma vez que o mesmo apresenta a possibilidade de formação de uma grande diversidade de metabolitos.

Estudos realizados por Sameh *et al* (2012) com o sobrenadante de linhagens de *B. thuringiensis* cepa BUMP95; HD1 e S1/4 utilizando o sobrenadante aquecido por uma temperatura de modo a eliminar as atividades sensíveis ao calor segregadas, principalmente Vip3. Demonstrou a mortalidade após 48 horas de incubação cerca de 53% (16/30) para S1, 20% (6/30) para HD1 e 16% para BUPM95 com doses de 10 mL. Por outro lado os mesmos sobrenadantes não foram significativos ativos contra larvas de coleópteros do besouro vermelho *Tribolium castaneum* quando 700 mL foram suplementados a 1g de Semoli. Baseado nestas circunstâncias, pode ser considerado a hipótese de que as interações moleculares dependem de diversos fatores como concentrações, e outros fatores associados.

A virulência de uma linhagem entomopatogênica é um mecanismo complexo não dirigido por um único fator de virulência, mas por vários que atuam sequencialmente ou sinérgicamente para atingir o objetivo como, por exemplo, interagir e colonizar o hospedeiro (DIANA e GARCIA *et al.*, 2016).

Corroborando com Alves (1998) considera que diversas moléculas e outras toxinas (β -exotoxinas, α -exotoxinas, hemolisinas, enteroxinas, quitinases e fosfolipases) produzidas durante o crescimento bacteriano podem estar presentes no meio de cultura, não fazendo parte do cristal das proteínas. Neste contexto, podemos considerar uma possível interação sinérgica entre as moléculas contidas nos respectivos extratos.

A formação de emulsificação também foi observado neste teste, e provavelmente levou à morte das larvas nos recipientes. Uma vez que foi descrito que ramnolípídeos presentes no meio sobrenadante podem contribuir com a efetividade das atividades inseticidas. As soluções contendo ramnolípídeos apresentam contribuição superficial entre 31,4 e 38,7 mNm, resultando, assim, que as larvas experimentam dificuldades na interface água e ar, o que reduz eficiência respiratória e aumenta a quantidade de tentativas de permanência na superfície (Vinicius; Roberta *et al.*, 2015).

A grande possibilidade de moléculas de ramnolípídeos nos extratos de *Bacillus*, pode ser considerada devido a presença da formação de emulsificações nos recipientes. De acordo com Kim *et al* (2011), di-rhamnolípídeos atuam diluindo a cutícula em pulgões, desidratação, que separa célula resulta em morte. Kamal *et al* (2012) relatou atividade inseticida de ramnolípídeos contra *Rhyzopertha dominica* e hipotetizou que este biossurfactante atua sobre ceras cuticulares e membranas inter-segmentais, o que também pode ocorrer em *A. aegypti*.

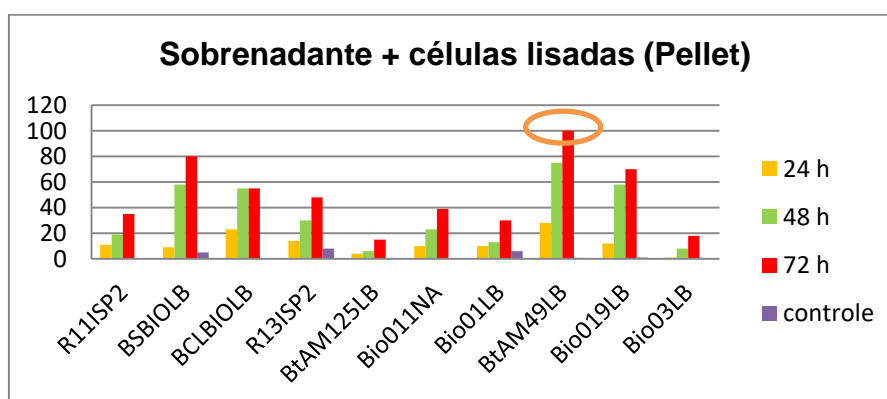


Figura 21: Porcentual de mortalidade nos bioensaios das larvas de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller, expostas ao sobrenadante + células lisadas (Pellet), nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.

5.2.4 Atividade larvívica de células lisadas (Pellet) com água estéril (H₂O destilada).

Neste experimento foi feita a reunião das células lisadas (Pellet) com H₂O estéril para avaliar a eficiência da degradação das células lisadas e aquecidas à temperatura de 121°C por 30 minutos (Ver item. 4.9.2), para avaliar o efeito em larvas de *Ae. aegypti*.

Considerando os resultados das células lisadas obtidas durante fermentação dos *Bacillus* com associação com água estéril, foi observado que no intervalo de 24 e 48 h, não houve mortalidade acima de 50% (Ver figura 22).

Em relação a esse ensaios, houve uma menor quantidade de linhagens com potencial larvívica, uma vez que as células foram autoclavadas por um período de 30 minutos à 120°C por 1 atm.

Em 72 horas de exposição, apenas a linhagem BtAM49LB –*B. thuringiensis* apresentou mortalidade acima de 50%, correspondendo 60% de mortalidade.

Analisando os resultados obtidos da linhagem mais eficiente, foi possível observar que a melhor atividade larvívica foi referente aos ensaios de células lisadas com sobrenadante. Uma vez que neste teste as células foram lisadas e autoclavadas comprometendo a eficiência pelo calor.

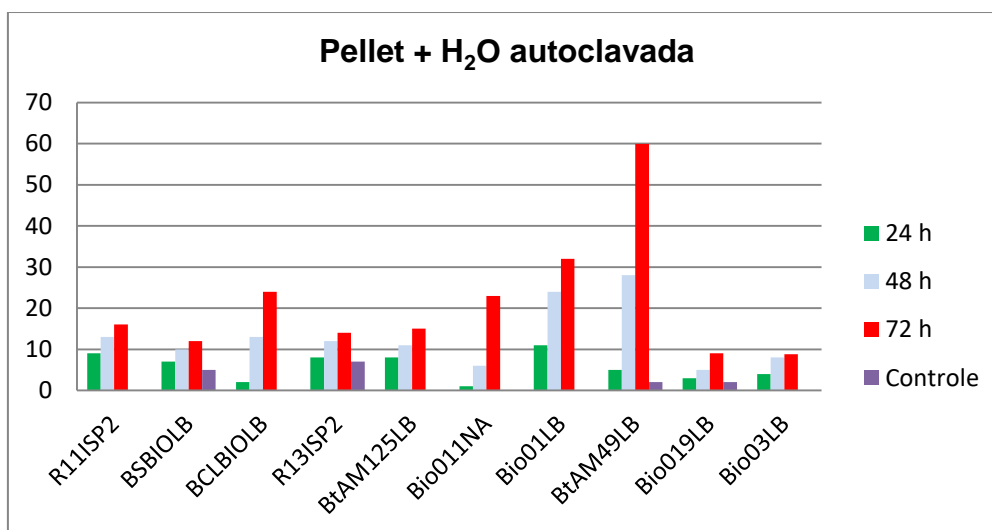


Figura 22: Mortalidade em porcentagem das larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller nos bioensaios com *Bacillus* spp, expostas no produto da fermentação células lisadas + H₂O autoclavado, nos intervalos de leitura de 24, 48 e 72 horas.

Considerandos os intervalos de leitura, observa-se nenhuma linhagem apresentou mortalidade acima de 50% em 24 e 48 horas.

Considerando 72 horas de exposição, apenas a linhagem BtAM49LB – *B. thuringiensis* apresentou mortalidade acima de 50%, apresentando 60%.

Estes resultados mostraram o potencial larvicida da linhagem BtAM49LB – *B. thuringiensis* quando tratadas em diferentes situações, meio sobrenadante; sobrenadante + células lisadas (Pellet); Células lisadas + H₂O esteril, em todos os procedimentos foi a linhagem mais promissora contra *Ae. aegypti*, sugerindo uma investigação mais detalhadas do perfil químico metabólico desta linhagem.

5.3 Correlação dos *Bacillus* spp., portadores dos genes *Cry* e *PhaC* com atividade larvicida contra *Ae. aegypti*.

Considerando os resultados da amplificação dos fragmentos de DNA dos genes *Cry11*, *Cry4Ba* e *PhaC* em linhagens de *Bacillus* spp. (figuras 14 - 19) e suas respectivas atividades larvicidas contra *Ae. aegypti*. As linhagens K4NA – *B. pulmilus*; 103PHAISP2 – *B. pulmilus*, BtAM220NA, ALP2IP2 – *P. polymyxa*, BtAM74LB – *B. pulmilus*, PHA50(b)ISP2 – *B. megaterium*, SPLBIO - apresentaram fragmentos de DNA para os genes *Cry* e *PhaC*. As principais toxinas do cristal são as delta-endotoxinas, codificadas pelos genes *Cry* (GLARE e O' CALLAGHAM, 2000).

Neste trabalho, relatamos que a linhagem ALP2ISP2 – *P. polymyxa* apresentou amplificação para os genes *Cry4Ba*, *Cry11* e *PhaC*. Como isolado natural e nenhum dado relacionado com a produção de proteínas CRY, a dada estirpe foi classificada pelo sequenciamento do gene 16S rDNA como estirpe de *P. polymyxa*.

Neste trabalho, esta linhagem apesar de apresentar fragmentos do gene *Cry4Ba* e *Cry11*, não apresentou atividade larvicida em larvas de *Ae. aegypti*. Considerando a grande variação na estrutura do gene *Cry* e a ocorrência conhecida de tolerância às toxinas proteicas produzidas por vários cepas entomopatogênicas, indicam que existem um intervalo de virulência na natureza. Como, por exemplo, *B. sphaericus* são patogênicos para várias espécies de Díptera, porém a espécie parece ser mais eficaz no controle de insetos que picam animais e seres humanos aos invés dos que atacam culturas agrícolas. Segundo Brian *et al* (2004) aborda que *P. popillae* e *P. lentimorbus* causam doenças leitosa nas larvas de alguns besouros (ordem coleóptera), incluindo aqueles que podem danificar as culturas agrícolas. *P. larvas* causa doenças em *Apis*

mellifera, podendo causar a redução significativamente a atividade de olinização em culturas de frutas e hortaliças. Isso pode explicar a variedade de cada gene e sua toxicidade para cada organismo alvo.

Por meio destes estudos foi possível detectar uma das vias metabólicas responsáveis pela síntese de formação de polihidroxialcanoatos nas linhagens de *Bacillus* spp., isolados de diferentes ambientes Amazônicos. A síntese de PHB membro da família de polihidroxialcanoato, cujo requer três passos enzimáticos, a partir da condensação de duas moléculas de acetil-coenzima A para formar uma molécula de acetoacetil-CoA (reação de condensação, catalisada pela *PhaA* tiolase), seguida pela redução, catalisada pela redutase *PhaB*), o precursor monomérico para PHB. Finalmente, os monômeros 3HB-CoA são polimerizadas para formar PHB pela PHB sintase (*PhaC*) (Anderson e Dawes 1990, Chen, 2009). Algumas relações entre a síntese de PHA e formação de proteínas inseticidas em *Bacillus* já foram descritas por alguns autores. De acordo com Wang *et al* (2013) relata que o processo de esporulação e de acumulação de proteínas inseticidas cristalinas, depende da quantidade de carbono e fontes de energia para entrada nas suas células.

Em um dos ensaios realizados por Kominek e Halvorson (1961) e Valappil *et al* (2007) relatou que o PHB família de polihidroxialcanoato quando acumulado maximamente antes da formação de esporos, logo em seguida é degradado durante o processo de esporulação. Assim como Navarro *et al* (2006) também enfatiza que existe relação linear entre a acumulação de PHB e a formação de cristais parasporais. Considerando os estudo de Chen *et al* (2012), construiu-se o mutante de deleção de *PhaC* de *B. thuringiensis* BMB171 e verificou-se que resulta num atraso de crescimento e num perfil fenotípico deficiente em esporulação. Apesar disso, outros autores relataram que a formação de esporos não é prejudicada numa deleção de muante *PhaC* em *B. thuringiensis* (Chen *et al.*,2010).

Estes resultados mostraram que não foi encontrado correlação de *Bacillus* spp. portadores de genes *Cry* e *PhaC* com atividade larvicida contra *Ae.aegypti* (ver tabela Como descritos na literatura, em muitos casos, o uso de PHB não parece ser imperativo para a esporulação, porque muitos esporos que formam o gênero *Bacillus* que não podem sintetizar PHB ainda esporulam normalmente. Com bases nestes resultados conflitantes, a relação entre a acumulação de PHB e esporulação e formação de proteínas inseticidas ainda permanece obscura. Portanto, não há considerações que

estabeleçam a influencia dos gene *Phac* e *Cry* na linhagens de *Bacillus* para atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, sugerindo investigações mais detalhadas.

A linhagem Bio19 apresentou os dois genes inseticidas *CryBa* e *CryII*, porém sua atividade larvicida foi apenas no meio de sobrenadante com células lisadas, correspondendo 70%.

As linhagens Bio19LB, BISBIOLB, Bio01LB, Bio11LB apresentaram o gene *CryII*, apenas as linhagens Bio19LB, porém somente as linhagens Bio19 e BSBIOLB apresentaram mortalidade de 70% e 80%, respectivamente no meio de células lisadas com sobrenadante.

As linhagens BtAM141, 2R6.2.1Lb –*B. thuringiensis* são portadoras do gene *Cry4Ba*, mas atividade larvicida não foi abaixo de 50%.

As linhagens que apresentaram o fragmento de DNA do gene *PhaC* foram 2WISP2 –*B. altitudinis*, K5NA – *B. thuringiensis*, R8ISP2 –*B. licheniformis*, R15ISP2, Bio16LB, BtAM125LB –*B. thuringiensis* e BtAM49LB – *B. thuringiensis*, SPLBIO, porém somente a linhagem BtAM49LB - *B. thuringiensis* apresentou resultados significativos.

Considerando os resultados sobre os ensaios com os extratos do sobrenadante, sobrenadante + células lisadas e células lisadas + H₂O, foi possível observar uma grande efetividade no meio contendo sobrenadante + células lisadas, podendo apresentar outros fatores de virulência contendo no meio. Atualmente, o controle biológico é uma alternativa ou complemento viável para as estratégias de controle na região Amazônica, que priorize o manejo integrado, reduzindo os inconvenientes de possível desenvolvimento de resistência em mosquitos. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho tem como estratégias investigar de uma forma mais detalhadas os compostos dos extratos de *Bacillus* spp., isolados de diferentes ambientes Amazônicos.

Tabela 10: linhagens de *Bacillus* ssp., isolados da Amazônia, portadores dos genes *Cry* e *PhaC* e ausência e/ou presença da atividade larvicida

Genes	Linhagens	Atividade larvicida
Gene <i>Cry4Ba</i>	BtAM141	Ausente
	2R6.2.1LB	Ausente
Gene <i>Cry11</i>	Bio19LB	Presente presente Presente
	BSBIOLB	
	Bio01LB	
	Bio11LB	
Gene <i>PhaC</i>	2WISP2	Ausente
	K5NA	Ausente
	R8ISP2	Ausente
	R15IS2	Ausente
	BIO16LB	Presente
	BtAM125LB	Presente
	BtAM49LB	Presente
	SPLBIO	Ausente
Genes <i>Cry4Ba</i> + <i>PhaC</i>	K4NA	Ausente
	103PHAISP2	Ausente
	BtAM220LB	Ausente
	BtAM74LB	Ausente
	PHA50(B)	Ausente
	SPLBIO	Ausente
Genes <i>Cry11</i> + <i>Cry4Ba</i>	Bio19	Presente

CONCLUSÕES

As análises fenotípicas proporcionaram a caracterização de 41 isolados de bacilos, sendo representados por 95% 40,7% bacilos gram positivos e 5% 0,82% gram negativos;

As análises moleculares permitiram a caracterização de 29 linhagens, sendo identificados três gêneros bacterianos; *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Serratia*. Contudo, das 29 linhagens houve muitas similaridades entre as sequências, dificultando a identificação em nível de espécies, totalizando 10 espécies do gênero *Bacillus*, uma espécie *Paenibacillus* sp e *Serratia* sp.;

Os dois isolados de bacilos que demonstraram a presença do gene *Cry4*, nenhum apresentou atividade larvicida;

Dos oito isolados de bacilos que apresentaram apenas a presença do gene *PhaC*, somente as linhagens BtAM49LB e BtAM125LB ambas *B. thuringiensis*, apresentaram atividade larvicida acima de 50 %.

O isolado BtAM49LB – *B. thuringiensis* é o mais promissor para ser utilizado no controle de *Ae. Aegypti*, por apresentar mortalidade de 100% nos bioensaios.

Os melhores resultados da atividade larvicida foram na interação de células lisadas + sobrenadantes estéril (SNe) com a linhagem BtAM49LB – *B. thuringiensis*.

Os isolados portadores dos genes *Cry4* e *PhaC* não apresentaram atividade larvicida acima de 50 %;

Somente a linhagem Bio19LB apresentou os genes *Cry4* e *Cry11* e foi eficiente na atividade larvicida nos bioensaios, podendo retratar uma ação sinérgica.

Não foi observado correlação das linhagens portadoras de genes *Cry* e *PhaC* e sua eficiência larvicida contra larvas de *Ae. aegypti*, sugerindo investigações mais detalhadas.

Os isolados tóxicos deste trabalho se constituem em um acervo potencial para busca de novas formulações de inseticidas biológicos, no controle de *Ae. aegypti* e outros vetores de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSINA, O. D. S; ROCHA, A.T.T; SILVA, V.S; SILVA, O.S. **Caracterização física de grânulos de quebra-pedra para uso em leite de jorro.** Revista Eletrônica de Materiais e Processos, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.32-37, 2009.
- ALVES, S.B. **Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens.** In: _____. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Manole, 1998. 1163 p.
- ANDERSON, A.J; DAWES, E.A. **Occurrence, metabolism, metabolic role *Microbiological Reviews*, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** (54): 450–72, 1990.
- ARGÔLO-FILHO, R.C; LOGUERCIO, L.L. ***Bacillus thuringiensis* Is na Environmental Pathogens and Host-Specificity Has Developed as na Adaptation to Human-Generated Ecological Niches.** *Insects, Ottawa*, v.5, n.1, p. 62-91, 2014.
- ARGÔLO-FILHO, R.C; GOMES, R.A. JR; BARRETO, M.R; LANA, U.G. P; VALICENTE, F.H; LOGUERCIO, L.L. **Growth variation among *Bacillus thuringiensis* strains can affect screening procedures for supernatant-secreted toxins against insect pests.** *Pest Manag. Sci.* (67): 1184–1192, 2011.
- ARONSON, A; SHAI, Y. **Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: Unique features of their mode of action.** *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 1–8, 2001.
- ASANO S, OGIWARA K, INDRASITH LS, TAKAHASHI M, SUZUKI N, HORI H. **Synergism of the spore on insecticidal activity of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) is not observed at late stage in bioassay.** *Appl Entomol Zool* (35): 583–90, 2000.
- AZEVEDO, J.L. **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico,** p. 445-461. In: Azevedo, J.L. et al. **Ecologia Microbiana.** Fealq, Piracicaba, São Paulo, 2002.
- BAIS, H.P; FALL, R; VIVANCO, J.M. **Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production.** *Plant Physiol.* (134): 307–319, 2004.
- BESNARD, M; LASTERE, S; TEISSIER, A; CAO-LORMEAU, V; MUSSO, D. **Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia.** December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 19, 2014.
- BLACKWOOD, K.S; TURENNE, C.Y; KABANI, A.M. **Reassessment of sequencebased targets for identification of *Bacillus* species.** *Journal of Clinical Microbiology.* v. 42, n. 4, p. 1626-1630, 2004.
- BÖHME, K; FERNÁNDEZ-NO, I.C; BARROS-VELÁZQUEZ, J; GALLARDO, J.M; CAÑAS, B & CALO-MATA, P. **Rapid species identification of seafood spoilage and**

pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 32, 2951-2965, 2011.

BOICHENKO, LV; BOICHENKO, D.M.V; VINOKURROVA, N.G. Use of Polymerase Chain Reaction for Searching for Products of Ergot Alkaloids From Among Fungi. *Microbiology* 70(12):360-368, 2000.

BOORMAN, J.P; PORTERFIELD, J.S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 50:238-42, 1956.

BORA, L. Polyhydroxybutyrate accumulation in *Bacillus megaterium* and optimization of process parameters using response surface methodology. *J Polym Environ.* 21: 415–20, 2013.

BRAR, S.K; VERMA, M; TYAGI, R.D; VALERO, J.R; SURAMPALLI, R.Y. Starch industry wastewater based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *J Econ Entomol.* 98(6):1890–8, 2005.

BRAR, S.K, VERMA, M, TYAGI, R.G, VALE'RO, J.R, SURAMPALLI, R.Y. Starch industry wastewater based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Water Sci Technol.* 50(9):229-36, 2004.

BRAVO, A; LIKITVIVATANAVONG, S; GILL, S; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423– 431, 2011.

BRAVO, A; GÓMEZ, I; PORTA, H; GARCÍA-GÓMEZ, B.I; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C; PARDO, L. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb. Biotechnol.* 6, 17-26, 2013.

BRAVO, A; SARABIA, S; LOPEZ, L; ONTIVEROS, H; ABARCA, C; ORTIZ, M; LINA, L; VILLALOBOS, F.J; PENA, G; NUNES-VALDEZ, M.E; SOBERÓN, M; QUITERO, R. Characterization of Cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Envir. Microb.* 64: 4965-4972, 1998.

BRIAN, B; MCSPADDEN, GARDENE. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. *In Agricultural System. J the American Phytological.* 94: 1252-1258, 2004.

CAO-LORMEAU VM, ROCHE C, TEISSIER A, ROBIN E, BERRY AL, MALLET HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1085-6, 2013.

CARLSON, C. R., CAUGANT, D. A., AND KOLSTØ, A. B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1719–1725, 1994.

CASE, R. J. et al. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied Environmental Microbiology.* v. 73 , n. 1, p. 278-288, 2007.

CHEN, D; XU, D; LI, M; HE, J; GONG, Y; WU, D et al. **Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* delta PhaC mutant BMB171/PHB(-1) reveals that the PHB synthetic pathway warrants normal carbon metabolism.** *J. Proteomics* 75 5188, 2012.

CHEN, H.J; TSAI, T.K; PAN, S.C; LIN, J.S; TSENG, C.L; SHAW, G.C. **The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation and expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 304 74–81, 2010.

CHEN, G.Q. **A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry.** *Chem. Soc. Rev.* 39 2434-2446, 2009.

CHEN, M. L. AND TSEN, H. Y. **Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites.** *Journal of Applied Microbiology.* 92, 912-919, 2002.

CHRISTOPHERS, S.R. ***Aedes aegypti* (L.), The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics, and Structure.** New York: Cambridge University Press, 1960.

CLAUS, D; BERKELEY, R.C.W. **Genus *Bacillus*.** In: **Sneath PHA**, Mair N.S, SHARPE, M.E, HOLT, J.G, eds. *Bergey's of systematic bacteriology*, vol. 2. Baltimore: The Williams and Wilkins. pp 1105-1140, 1986.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M. AND ZEIGLER, D.R. **"*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature"**. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 10 de junho de 2014.

CRUMP, B; ARMBRUST, E; BAROSS, J. **Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean.** *Appl. Environ.*, 1999.

CONSOLI, R.A.G.B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Fiocruz, Rio de Janeiro, 228p, 1994.

CRICKMORE N, ZEIGLER DR, FEITELSON J, SCHNEPF E, VAN RIE J, LERECLUS D, BAUM J, DEAN DH 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins.** *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 807-813, 1998.

DAFFONCHIO, D; CHERIF, A AND BORIN, S. 2000. **Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "*Bacillus cereus* group."** *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5460-5468, 2000.

DAVE H; RAMAKRISHNA C; DESAI J.D. **Production of PHB by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp.** IPCB-403. *Indian J Exp Biol.* 34:216–9, 1996.

DELLAGLIO, F; DICKS, L.M.T; DUTOIT, M; TORRIANI, S. **Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*.** *Int J Syst Bacteriol.* 41:340–342, 1991.

DERVYN, E; PONCET, S; KLIER, A; RAPOPORT, G. **Transcriptional regulation of the cryIVD gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** *J. Bacteriol.* 177, 2283–2291, 1995.

DIANA, C; GARCIA, R; ALFONSO, M; ANTONIO, O; SUSANA, V. **An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 100: 3637-3654, 2016.

DIAS, D.G.S; SILVA, S.F; DA, MARTINS, E.S; SOARES, C.M.S; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M; PRAÇA, L.B; DIAS, J.M.C; DE S; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos.** *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,* 1676-1340, 2002.

DICK, G.W; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. **Zika virus. I. Isolations and serological specificity.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509-20.

DONOVAN, W.P; ENGLEMAN, J.T; DONOVAN, J.C; BAUM, J.A; BUNKERS, G.J; CHI, D.J; CLINTON, W.P; ENGLISH, L; HECK, G.R; ILAGAN, O.M et al. **Discovery and characterization of sip1a: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae.** *Appl. microbiol. biotechnol.* 72, 713–719, 2006.

DROBNIIEWSKI, F.A. ***Bacillus cereus* and related species.** *Clinical Microbiology Reviews,* 6, 324-338, 1993.

DUFFY, M.R; CHEN, T.H; HANCOCK, W.T; POWERS AM, KOOL JL, LANCIOTTI RS, et al. **Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.** *N Engl J Med.* 360:2536-43, 2009.

DURÁN, N; MATTOSO, L.H.C; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações.** São Paulo, Artiber, p.175-183, 2006.

FAYE, O; FREIRE, C.C; IAMARINO, A; FAYE, O; DE OLIVEIRA, J.V; DIALLO, M et al. **Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century.** *PLoS Negl Trop Dis.* 8:e2636, 2014.

FEDERICI, B.A; LUTHY, P; IBANA, J.E. **Parasporal body of *Bacillus thuringiensis* sub-sp. *israelensis*.** In: de Barjac H, Sutherland DJ (eds) **Bacterial control of mosquitoes and flies: biochemistry, Potential of *Bacillus thuringiensis* in the Management of Pernicious Lepidopteran genetics and application of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*.** Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 16–44, 1990.

FOX, G.E; WISOTZKEY, J.D; JURTSUK, P.Jr. **How close is close: 16S rRNA sequence may not be sufficient to guarantee species identity.** *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 42, p. 166-170, 1992.

GEETHA I; PRABAKARAN G, PAILY KP, MANONMANI AM, BALARAMAN K. **Characterisation of three mosquitocidal *Bacillus* strains isolated from mangrove forest.** *Biol Control*. 42:34–40, 2007.

GREEN, D.H; WAKELEY, P.R; PAGE, A; BARNES, A; BACCIGALUPI, L. **Characterization of two *Bacillus* probiotics.** *Appl Environ Microbiol* 65: 4288-4291 1999.

GOERTZ, H. M. **Controlled release technology, agricultural.** In: KIRK-OTHMER, Encyclopedia of Chemical Technolingu. 4 ed. CIDADE: John Wiley & Sons. p. 251 – 274, 2000.

GOMEZ, J.C.G. **Produção por *Pseudomonas* de Polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência modificação da composição e obtenção de mutantes.** [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

GONZÁLEZ, Y; MEZA, J.C; GONZÁLEZ, O. Y; CÓRDOVA, J.A. **Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano.** *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1), 77-115, 2013.

GOTO, K. et al. **Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*.** *The Journal of General and Applied Microbiology*. v. 46, p. 1-8, 2000.

GOULD, E.A, SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses.** *Lancet* 371: 500-509, 2001.

GRARD, G; CARON, M; MOMBO, I.M; NKOGHE, D; MBOUI ONDO, S; JOLLE, D et al. **Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*?** *PLoS Negl Trop Dis*. 8:e2681, 2014.

GREEN, D.H; WAKELEY, P.R; PAGE, A; BARNES, A; BACCIGALUPI, L. **Characterization of two *Bacillus* probiotics.** *Appl Environ Microbiol* 65: 4288-4291, 1999.

GLUBER, D.J; REITER, P; EBI, K.L; YAP, W; NASCI, R; PATZ, J.A. **Climate Variability and Change in the United States: Potencial Impacts on Vectors and Environm.** *Health Perspectives*. 109 (2): 223-233, 2001.

GONZÁLEZ, Y; MEZA, J.C; GONZÁLEZ, O.Y; CÓRDOVA, J.A. **Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano.** *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1), 77-115, 2013.

HABIB, M. E. M; ANDRADE, C. F. S. **Bactérias entomopatogênicas** In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ. 12, 383-446p, 1998.

HADDOW, A.D; SCHUH, A.J; YASUDA CY, KASPER MR, HEANG V, HUY R, et al. **Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage.** PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1477.

HANSEN, B.M; LESER, T.D; HENDRIKSEN, N.B. **Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells.** FEMS Microbiol Lett. 202: 209–213, 2001.

HELGASON, E; CAUGANT, D.A; OLSEN, I; KOLSTØ A.B. **Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections.** J. Clin. Microbiol. 38:1615–1622, 2000.

HOA, N.T; BACCIGALUPI, L; HUXHAM, A; SMERTENKO, A; VAN, P.H. **Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders.** Appl Environ Microbiol 66: 5241-5247, 2000.

HOFTE, H; WHITELEY, H.R. **Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*.** Microbiol. Rev. 53, 242-225, 1989.

IATSENKO, I; NIKOLOV, A; SOMMER, R.J. **Identification of Distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 Nematicidal Factors Using the Model Nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*.** Toxins; 6:2050-2063; ISSN 2072-6651; 2014.

IGNOFFO CM, BATZER O.F (1971). **Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus.** Journal of Economic Entomology 64: 850–853.

ISHIHARA, H; SASAKI, T; SHIMURA, K. **Distribuição and variation of bacitracin synthase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis*.** Curr, Microbiol. 45:18-23, 2002.

JACKSON, S.G; GOODBRAND, R.B; AHMED, R AND KASATIYA, S. ***Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation.** Lett. Appl. Microbiol. 21, 103–105, 1995.

JESUS, E.C; MARSH, T.L; TIEDJE, J.M; MOREIRA, F.M.S. **Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon Soils.** *The ISME Journal*, v.3, p.1004-1011, 2009.

KAMAL, A; SHAIK, A.B; KUMAR, C.G; MONGOLLA, P; RANI P. U; KRISHNA K. V., et al. **Metabolic profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Pseudomonas* sp. Strain ICTB-745 isolated from Ladakh, India.** *J. Microbiol. Biotechnol.* 22 69–79, 2012.

- KARLOVSKY, P. **Secondary metabolites in Soil ecology**. In: Karlowsky, P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlang. Berlin Heidelberg. Pp 1-19, 2008.
- KIM, S.K; KIM, Y.C; LEE, S; KIM, J. C; YUN, M.Y AND KIM, I.S. **Insecticidal activity of rhamnolipids isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against Green Peach Aphid (*Myzus persicae*)**. J. Agric. Food Chem. 59, 934–938, 2011.
- KOMINEK, L.A; HALVORSON, H.O. **Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus***. J. Bacteriol. 90 1251–1259, 1965.
- KUMAR P, PATEL, S.K. S, LEE, J.K, KALIA, V.C. **Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications**. *Biotechnol Adv* 31:1543–1561. 2013.
- KUNO, G; CHANG, G.J. **Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses**. *Arch Virol*. 152:687-96. 3, 2007.
- KUPKE, T; GOTZ, F. **Post-translational modifications of lantibiotics**. *Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam*, v.69, p.139–150, 1996.
- LANCIOTTI R.S; KOSOY O.L; LAVEN J.J; VELEZ J.O; LAMBERT A.J; JOHNSON, A.J, et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia**. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1232- 9, 2007.
- LAW, K.H; CHENG, Y.C; LEUNG, Y.C; LO, W.H; CHUA, H; YU, H.F. **Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis**. *Biochemical Engineering Journal*, 16, p. 203-208, 2003.
- LEDERMANN, J.P; GUILLAUMOT L; YUG, L; TIDED, M; MACHIENG, P; PRETRICK, M et al. ***Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses**. *PLoS Negl Trop Dis*. 8:e3188, 2014.
- LEE Y. **Plastic bacteria – progress and prospecta for polyhydroxyalkanoate production in bacteria**. *Trends Biotechnol*. 14: 431-438, 1996.
- LENZ, R.W; MARCHESSAULT, R.H. **Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology**. *Biomacromolecules* 6:1-8, 2005.
- LERECLUS, D; AGAISSE, H. **Toxin and virulence gene expression in *Bacillus thuringiensis***. In **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**; CHARLES, J.F; DELÉCLUSE, A; NIELSEN-LEROUX, C., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Heidelberg, Germany, pp. 127–142, 2000.
- LOGAN, N.A. et al. **Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 59, p. 2114-2121, 2009.
- LOGAN, N.A; POPOVIC, T; HOFFMASTER, A. ***Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria**. In: Murray P.R, Baron E.J, Jorgensen J.H, Landry M.L,

Pfaller M.A, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C: ASM Press.pp. 455-473, 2007.

LOZOVEI, A.L. **Culicídeos (Mosquitos)**. P.50-103. In: Marcondes, C.B. Entomologia médica e veterinária. São Paulo. Ed. Atheneu. (In portuguese), 2001.

LUNA, J.E.D et al. **Susceptibilidade de Aedes aegypti aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil**. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, v. 38, p. 842-843, 2004.

MARCHETTE, N.J; GARCIA, R; RUDNICK, A. **Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia**. *Am J Trop Med Hyg*. 1969;18:411-5.

MARTINEZ, M. B; TADDEI, C.R. **Métodos de Diagnóstico**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5.ed. Ed.Atheneu. Cap. 14, p. 117- 125, 2008.

MAZOCHI, K.B.F. **Dengue in Brasil –Situation, Trasmision and Control – A Proposal for Ecological Control**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 89 (2): 235-245, 1994.

MCCOOL, G.J; CANNON, M.C. **PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in Bacillus megaterium**. *J. Bacteriol.*, 183: 4235-4243, 2001.

MCCOOL, G.J; CANNON, M.C. **“Polyhydroxyalkanoate inclusion bodyassociated proteins and coding region in Bacillus megaterium,”** *Journal of Bacteriology*, vol. 181, no. 2, pp. 585–592, 1999.

MCCOOL, G.J; FERNANDEZ, T; LI N; CANNON, M.C. **Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in Bacillus megaterium**. *FEMS Microbiology Letters*, 138, p. 41-48, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014**. 3. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/imagens/pdf/2014/julho/31/Graves-at--2013.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2015b.

MUSSO, D; NILLES, E.J; CAO-LORMEAU, V.M. **Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area**. *Clin Microbiol Infect*. 20:O595-6, 2014.

MYASNIK, R. M.; MANASHEROB, R.; BEM-DOV, E.; ZARITSKY, A.; MARGALITH, Y.; BARAK, Z. **Comparative Sensitivity to UV-B Radiation of two Bacillus thuringiensis Subspecies and Other Bacillus sp**. *Current Microbiology*, New York, NY, v. 43, p. 140-143, 2001.

NAYAK P.K; KUMARMOHANTY, A; GAONKAR, T; KUMAR, A; BHOSLE S.N; GARG, S. **Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for phaC Gene of Bacillus megaterium**. *ISRN Bacteriol*. 2013.

- OLEMBO, R. **Biodiversity and its importance to the biotechnology industry.** *Biotechnonology nd aplied Biochemistry*, 21: 1-6, 1995.
- OLIVEIRA, V.M; SETTE,L.D; GARBOGGINI, F.F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos.** *Multiciência*, v. 7, p. 1-19, 2006.
- OLSON, J.G; KSIAZEK, T.G; SUHANDIMAN; TRIWIBOWO. **Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 75:389-93, 1981.
- PAULA, H.C.B. de, OLIVEIRA, E.F.de, ABREU, F. O. M. S. **Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Paz et Hoff.** *Polímeros* [online], v. 20, n.1, p. 112 – 120, 2010.
- PINHEIRO, V.C.S; TADEI, P.W. **Frequency, diversity, and productivity study on the Aedes aegypti most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil.** *Ver Inst Med Trop São Paulo* 44: 245-250, 2002.
- POLANCZYK, R.A, SILVA, R.F.P, FIUZA, L.M. **Isolamento de Bacillus thuringiensis Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Rev. Bras. Agrocienc.* 10, 209-214, 2004.
- PONCET, S; DERVYN, E; KLIER, A; RAPOPORT, G. **Spo0A represses transcription of the cry toxin genes in Bacillus thuringiensis.** *Microbiology.* 143, 2743–2751, 1997.
- PRIEST, F.G. In: SONENSHEIN, A.L; HOCH, J.A; LOSICK, R. eds. **Bacillus subtilis and other gram-positive bactéria.** Washington, D.C. American Society for Microbiology, Systematics and Ecology of Bacillus. pp 3-16, 1993.
- PROMED-MAIL [homepage da internet]. **Zika vírus - brasil (11) (vários estados), casos confirmados.** [consultado 2015 Jul 20]. Disponível em: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=20150612.3431199>.
- PATEL, H. A.; SHAH, S.; SHAH, D. O.; JOSH, P. A. **Sustained release of venlafaxine from venlafaxine–montmorillonite–polyvinylpyrrolidone composites.** *Applied Clay Science*, v. 51 (1-2); p. 126-130, 2011.
- PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A., **Bacillus thuringiensis insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection.** *Fems Microbiology Reviews*, v. 37, n. 1. p. 3-22. 2013.
- POWERS, A.M; LOGUE, C.H. **Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus.** *Journal of General Virology.* 88(9), 2363-2377, 2007.
- PRAÇA, L.B; BATISTA, A.C; MARTINS, E.S; SIQUEIRA, C.B; DIAS, D.G.S; GOMES, A.C.M; FALCÃO, R; MONNERAT, R.G. **Estirpes de Bacillus**

thuringiensis efativas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq. Agropec. Bras.* 1:11-16, 2014.

PRIETO, M.B; HIDALGO, A; SERRA, J.L; LLAMA, M.J. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV- 1 immobilized on biolite in a packed-bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 97, 1–11, 2002.

RASKO, D.A; ALTHERR, M.R; HAN, C.S; RAVEL, J. **Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms.** *FEMS Microbiol Rev* 29: 303-329, 2005.

REHM, B.H.A. “**Polyester synthases: natural catalysts for plastics,**” *Biochemical Journal*, vol. 376, no. 1, pp. 15–33, 2003.

REHM, B.H.A. **Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoates granules:** a plataforma tecnologia for the production of tailor-mde bioparticles. *Curr. Issues Mol. Biomol.*, v. 9, p. 41-62, 2007.

ROCHA, L.A; TAUIL, P.L. **Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(1): 18-22, jan-fev, 2009.

ROH, J.Y; CHOI, J.Y; LI, M.S; JIN, B.R ; JE, Y. **Bacillus thuringiensis as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control** *Journal of Microbiology and Biothechnology*; Vol. 17(4), 547–559; 2007.

ROHINI, D; DESETTY; VINEET, S; MAHAJAN; KHAN, B.M; SHUBAN, K; RAWAL. “**Isolation and heterologous expression of PHA synthesising genes from Bacillus thuringiensis R1**”. *World J Microbiol Biotechnol*, Vol. 24, pp. 1769–1774, 2008.

SAMEH, S; TAHENI, Z; MAROUA, C; IMEN, Z; SAMIR, J and KAIS, J. **Screening and identification of a Bacillus thuringiensis strains with large and efficient insecticidal activities.** *J of Basic Microbiolog.* 53, 539-548, 2012.

SARRAFZADEH, M.H.; NAVARRO, J.M. **The effect of oxygen on the sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity of Bacillus thuringiensis H- 14.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 305-310, 2006.

SECRETARIA DA SAÚDE (SEMSA). **Levantamento de infestação rápido por Aedes aegypti em Manaus (LIRA).** Disponível em: ><http://semsa.manaus.am.gov/profissionais-de-saude-discutem-reducao-de-casos-de-dengue-e-malaria-em-manaus/>>.

SERRANO, J.Y. **Polihidroxicanoatos (PHA's): Biopolímeros producidos por microorganismos. Uma solución frente a la contaminación del medio ambiente.** *Revista Teoría y Praxis investigativa*, 5 (2), 79-84 2010.

SCHAFFNER F, MEDLOCK JM, VAN BORTEL W. **Public health significance of invasive mosquitoes in Europe.** *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:685–692.

SCHNEPF, E; CRICKMORE, N; VAN RIE, J; LERECLUS, D; BAUM, J; FEITELSON, J, et al. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62:775–806.

SHAMALA, T.R; CHANDRASHEKAR, A; VIJAYENDRA, S.V.N; KSHAMA, L. **Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR).** J Appl Microbiol 94:369–374, 2003.

SHEU, D.S; WANG, Y.T; LEE, C.Y. **Rapid detection of polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR.** Microbiology. 146:2019-2035, 2000.

SHIDA, O; TAKAGI, H; KODOWAKI, K; NAKAMURA, L.K; KOMAGATA, K. **Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitins*, *Bacillus curdolanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *B. kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*.** Int J Syst Bacteriol 47, 289-298, 1997.

SHISHATSKAYA E.I; VOINOVA O.N; GOREVA A.V; MOGILNAYA O.A; VOLOVA T.G. **Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation.** Journal of siberian federal university. biology. 1:66-77, 2008a.

SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. **Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae.** Eur. j. biochem., Berlin, v. 247, n. 3, p. 754-761, 1997.

SIMASATHIEN, S; THOMAS, S.J; WATANAVEERADEJ, V; NISALAK, A; BARBEROUSE, C; INNIS, B.L; SUN, W; PUTNAK, J.R; ECKELS, K.H; HUTAGALUNG, Y; GIBBONS, R.V; ZHANG, C; DE, L.A; JARMAN, R.G; CHAWACHALASAI, W and MAMMEN, M.P, Jr. **Safety and Immunogenicity of a Trivalent Live-attenuated Dengue Vaccine in Flavivirus naive Children** Am. J. Trop. Med. Hyg. 78, 426-433.

SINGH, B.K. **Organophosphorous degrading bacteria: ecology and industrial application.** Nat Rev Microbiol., v. 7, p. 156–164, 2009.

SOBERÓN, M; PARDO, L; MUÑOZ-GARAY, C; SÁNCHEZ, J; GÓMEZ, I; PORTA, H; BRAVO, A. **Pore formation by Cry toxins.** Adv. Exp. Med. Biol. 677, 127–143, 2010.

SCHNEPF, E; CRICKMORE, N; VAN RIE, J; LERECLUS, D; BAUM, J; FEITELSON, J, et al. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Ver. 62:775–806, 1998.

SOLAIMAN, D.K.Y; ASHBY, R.D. **Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications.** Biomacromolecules. 6:532–537, 2005.

SONAKYA, V; RAIZADA, N; KALIA, V.C. **Microbial and enzymatic improvement of anaerobic digestion of waste biomass.** *Biotechnol Lett.* 23: 1463-1466, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D.R; TIGANO, M.S; ALVES, S.B. Caraterização de entomopatógenos In: Alves, S.B. **Controle microbiano de insetos.** São Paulo: FEALQ, 22, 731-764, 1998.

SOUSA- FILHO, A. **Isolamento e Caracterização Molecular de Bacillus thuringiensis do Estado do Amazonas.** Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas/ Escola Superior de Ciências da Saúde. Manaus, Amazonas. 48pp, 2007.

SOUZA, C.O. et al. **Estudo comparativo da caracterização de filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo polpas de manga e de acerola.** *Química Nova*, v.35, n.2 p.262-267, 2012.

SUAYA, J.A; SHEPARD, D.S; CHANG, M.S; CARAM, M; HOYER, S; SOCHEAT, D et al. **Cost-effectiveness of annual targeted larviciding campaigns in Cambodia against the dengue vector Aedes aegypti.** 2007.

SUAVE, J; DALL'AGNOL, E. C; PEZZIN, A.P.T; SILVA, D.A.K; MEIER, M. M; SOLDI, V. **Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas.** *Health na Environment Journal*, v.7, n.2, p. 12- 20, 2006.

SUDESH, K; ABE, H; DOI, Y; **Prog. Polym. Sci.** vol. 25, no. 10, pp. 1503-1555, 2000.
SUIKO, M.L; STACKEBRANDT, E. **Identification of aerobic mesophilic Bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres.** *J. Appl, Microbiol* 94: 25-34, 2003.

STEINBUCHER, A. **Polyhydroxyalkanoic acids**, p. 123–213. In D. Byrom (ed.), **Biomaterials, novel materials from biological sources.** Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke, England, 1991.

STEINBUCHER, A; VALENTIN, H.E. **Diversity for bacterial polyhydroxyalkanoic acids.** *FEMS Microbiology.* 73:691-7, 1995.

STRAATSMA, G; AYER, F; EGLI, S. **Species richness, abundance, and phenology of fungal fruiting bodies over 21 years in a Swiss forest plot.** *Mycological Research*, 105: 515-523, 2001.

STRUCH, J.J; WARREN, G.W; MULLINS, M.A; N.YE, G.J; GRAIG, J.A; KOZIEL, M.G. **Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.93, p. 5398-5394, 1996.

SUIKO, M.L; STACKEBRANDT, E. **Identification of aerobic mesophilic Bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres.** *J. Appl, Microbiol* 94: 25-34, 2003.

THIMOTEO, S.S. **Isolamento e caracterização molecular de três quitinasas de uma biblioteca metagenômica.** 130 f. Dissertação (Mestrado em CiênciasBioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. **Enterobacteriaceae.** In: MARTINEZ, B.M; TRABULSINI, L.R. **Microbiologia.** 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. P. 271-276.

WATANAVEERADEJ, V; SIMASATHIEN, S; NISALAK, A; ENDY, T.P; JARMAN, R.G; INNIS, B.L et al., WEISKOPF, D; YAUCH, L.E; ANGELO, M.A; JONH, D.V; GREENBAUM, J.A; SIDNEY et al. **Insights into HLA-restricted T cell responses in.** 2011.

VALAPPIL, S.P; PEIRIS, D; LANGLEY, G.J; HERNIMAN, J.M; BOCCACCINI, A.R; BUCKE, C; ROY, I. **Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized Bacillus spp. J Biotechnol.** 127:475–487, 2007.

VASILAK, 2013. (<http://News.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-denguevirus-type-50-years>). Acessado: 26/10/2013. 12 hrs30min.

VILAS-BÔAS, G.T; PERUCA, A.P. S, ARANES, O.M.N. **Biology taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis, and Bacillus thuringiensis.** *Canadian J Microbiol.*53: 673-687, 2007.

VINICIUS, L.S; ROBERTA, B; LOVOGLIO; CLAUDIO, J; VAN ZUBEN and JONAS, C. **Rhmanolipids: solution against Aedes aegypti?.** Microbiotechnology Based Surfactants and their applications. J Frontiers of Microbiology. 1664-8714, 2015.

VOLLENBROICH D; PAULI G; ÖZEL M; VATER J. 23. **Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from Bacillus subtilis.** *Appl Environ Microbiol.* 63 : 44-9, 1997.

ZANLUCA, C; MELO, V.C; MOSIMANN, A.L; SANTOS, G.I; SANTOS, C.N; LUZ, K. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110:569-72, 2015.

ZHANG, X; CANDAS, M; GRIKO, N.B; TAUSSIG, R; BULLA, L.A; Jr. **A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 103, 9897–9902, 2006.

WANG, L.T. et al. **Comparasion of gyrB gene sequence, 16S rRNA gene sequence and DNA-DNA hybridization in the Bacillus subtilis group.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* v. 57, p. 1846-1850, 2007.

WANG, S., JACOBS-LORENA, M. **Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes.** Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 185- 193, 2013.

WATTIAU, P; RENARD, ME; LEDENT, P; DEBOIS, V; BLACKMAN, G et al. **A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment.** *Appl Microbiol Biotechnol.*56: 816–819, 2001.

WEAVER, S.C. **Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health.** *PLoS neglected tropical diseases.* 8(6), e292, 2014.

WEAVER, S.C; REISEN, W.K. **Present and future arboviral threats.** *Antivir. Res.* 2010, 85, 328–345.

WEI, W; LAN, Y; GANG, H; WANG, L.Y; WU, J; SU, Z.G; MA, G.H. **Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery.** *Advanced Materials*, v.20, p.2292–2296, 2008.

WEIMANN, G. L; BUTZKE, D; SILVA, D. A. K. **Determinação do teor de Bti em micropartículas de ALG/CMC e delineamento do perfil de liberação do bioinseticida.** 11º CBPol – Congresso Brasileiro de Polímeros, 16 a 20 de outubro de 2010, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2010.

WILKE, A. B., MARRELLI, M. T. **Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, São Paulo*, v. 54, n. 5, p. 287-292, 2012.

WIRTH, M.C. **Mosquito resistance to bacterial larvicidal toxins.** *Open Toxinology J.* 3: 101–115, 2010.

WOESE, C.R. **Bacterial evolution.** *Microbiol Rev.* 51: 221–271, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector-borne Diseases.** Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/> (accessed on 20 January 2015).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DengueNet – WHO’s Internet-based System for the Global Surveillance of Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever (Dengue/DHF) [monograph on the Internet].** Geneva: WHO.

WHO – **World Health Organization, 1985.** Handbook for integrated vector management. WHO, 2012.

WHO - **World Health Organization, 1985.** Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. UNDP/World Bank/WHO. Special Programme For Research and Training in Tropical Diseases, Geneva.

YAMADA, Y; HOSHINO, K; ISHIKAWA, T. **The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the**

subgenus gluconoacetobacter to the genetic level. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61: 1244–1251, 1997.

YE, W; ZHU, L; LIU, Y; CRICKMORE, N; PENG, D; RUAN, L; SUN, M. **Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* based on mixed plasmidenriched genome sequencing and a computational pipeline.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 4795–4801, 2012.

YILMAZI, M; SORAN, H; BEYATLI, Y. **Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 565-566, 2005.

YU, C. G; MULLINS, M. A; WARREN, G. W; KOZIEL, M. G; ESTRUCH, J. J. **The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3a lyses midgut epithelium cells of susceptible insects.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.