



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

VERANILCE ALVES MUNIZ

ATIVIDADE LARVICIDA DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA
PORTADORES DOS GENES *Cry* e *BSglu* (β -GLUCANASE), NO CONTROLE DE *Aedes*
***aegypti* Linnaeus, 1762**

MANAUS
2019

VERANILCE ALVES MUNIZ

**ATIVIDADE LARVICIDA DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA
PORTADORES DOS GENES *Cry* e *BSglu* (β -GLUCANASE), NO CONTROLE DE *Aedes*
aegypti Linnaeus, 1762**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

**MANAUS
2019**

VERANILCE ALVES MUNIZ

**ATIVIDADE LARVICIDA DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA
PORTADORES DOS GENES *Cry* e *BSglu* (β -GLUCANASE), NO CONTROLE DE *Aedes*
aegypti Linnaeus, 1762**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 02/04/2019

Banca Examinadora:

Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA

Érica Simplício de Souza
Universidade do Estado do Amazonas

Édson Júnior do Carmo
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2019**

Ficha Catalográfica

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

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

936a Alves Muniz, Veranilce
ATIVIDADE LARVICIDA DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DOS GENES *Cry* e *Bsglu* (β -GLUCANASE), NO CONTROLE DE *Aedes Aegypti* Linnaeus, 1762. / Veranilce Alves Muniz. Manaus : [s.n], 2019. 79 f.: il., color.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Wanderli Pedro Tadei

1. Microbiota amazônica. 2. proteínas inseticidas. 3. enzimas hidrolítica. 4. controle vetorial. I. Wanderli Pedro Tadei (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. ATIVIDADE LARVICIDA DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DOS GENES *Cry* e *Bsglu* (β -GLUCANASE), NO CONTROLE DE *Aedes Aegypti* Linnaeus, 1762.

CRB-11/463

Dedicatória.
A DEUS acima de tudo, minha fortaleza e refúgio.
Ao meu esposo Paulo Afonso e filho David Luiz, minha família que amo.
Aos meus pais, exemplos de ser humano, ao qual tenho orgulho de ser filha.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pelo seu infinito amor e auxílio em mais uma caminhada. Toda honra e glória a ti Senhor.

Ao meu esposo, Paulo Afonso e filho David Luiz, por me acompanharem nesta etapa de nossas vidas, obrigada por todo apoio, incentivo, paciência e companheirismo. Aos meus pais João Muniz, Vera Lúcia Muniz, minhas irmãs Veriane, Joane, Jovana, Luciana, Jane, sobrinhas Juliane e Karina e cunhado Joezer, que moram em Parintins, sempre me incentivaram a prosseguir meus estudos.

À Universidade do Estado do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, onde realizei o Mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Dr. Wanderli Pedro Tadei pelas oportunidades, apoio, confiança e orientações oferecidas durante o Mestrado.

À Dra Rosemary Roque pelos ensinamentos, incentivos e contribuições ao longo do Mestrado.

À equipe maravilhosa que sempre foi presente e me ajudaram nas etapas dos experimentos: Juan, Dulce e principalmente ao Ricardo Katak, um grande amigo, obrigado por toda ajuda, paciência e por ter contribuído com seu conhecimento, para o andamento dos experimentos sem medir qualquer esforço.

Aos amigos Elerson, Deidre e Laura pela amizade, parceria e troca de experiências.

À todos do Laboratório de Malária e Dengue Neila, Marta, Eunice, William, Thamiles, Augusto e Juracy pelo apoio e troca de experiências.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor dos arbovirus Dengue, Zika e Chikungunya, os quais causam agravos à saúde pública, em diversas regiões do mundo. O controle do vetor é a melhor forma de amenizar esta problemática, que pode ser de caráter socioeducativo, físico, químico e biológico. Contudo, os produtos químicos ocasionam impactos negativos ao meio ambiente e aos seres humanos. O uso de microrganismos entomopatogênicos, principalmente bactérias do gênero *Bacillus* torna-se uma alternativa promissora, no combate a este mosquito. O objetivo deste estudo foi selecionar bactérias isoladas de ambientes amazônicos, portadoras dos genes *Cry* e *BS-glu*, com potencial larvicida, para contribuir no controle de populações de *Ae. aegypti*. Neste trabalho foram obtidas 21 linhagens de coleções de trabalhos acadêmicos, provenientes de solos, água, planta e inseto de diferentes ambientes amazônicos. As linhagens de bacilos deste estudo foram submetidas ao método de reação de PCR com a utilização da sequência de nucleotídeos que codifica para o gene *rRNA16S*. No total 20 linhagens bacterianas foram identificadas, pertencentes aos seguintes gêneros: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Serratia* e *Achromobacter*. Posteriormente, foi realizada PCR para caracterização dos genes *Cry4Ba*, *Cry11e* e *BS-glu*. Os resultados mostraram que das 21 linhagens analisadas, seis linhagens - SPa09, SPa04, 15PHA, BtAM06, R22 e GD 02.13 - apresentaram amplificação para o gene *Cry4Ba*. Considerando o gene *BS-glu*, duas linhagens - SBC2 e cepa padrão Bti001 - amplificaram para o referido gene. Na avaliação da atividade larvicida foram realizados os bioensaios quantitativos com 21 linhagens de bacilos contra larvas de *Ae. aegypti*. Os resultados dos bioensaios quantitativos demonstraram que sete linhagens, foram promissoras nos ensaios com a biomassa bacteriana, onde cinco - R22ISP2, GDO2.13NA, BtAM06, BtAM49LB e SPa09NA - apresentaram 100% de mortalidade em todas as concentrações - 133 mg/L, 66.6 mg/L, 33.3 mg/L, 16.6 mg/L, 8.33 mg/L e 4.16 mg/L em 24 horas de exposição. O mesmo resultado foi observado para a linhagem padrão Bti001 - *B. thuringiensis* que apresentou 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas. No ensaio com biomassa autoclavada, apenas a linhagem R22 apresentou de 90 a 100 % de mortalidade, em 72 horas de exposição. Desta forma, os resultados deste trabalho fornecem informações relevantes do potencial larvicida de linhagens de bacilos isolados de diferentes ambientes amazônicos, que podem ser utilizadas nas ações de controle biológico do *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: Microbiota amazônica, proteínas inseticidas, enzimas hidrolíticas, controle vetorial.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is a vector of the arboviruses Dengue, Zika and Chikungunya, which cause public health problems in several regions of the world. Vector control is the best way to alleviate this problem, which may be socio-educational, physical, chemical and biological. However, chemicals cause negative impacts on the environment and humans. The use of entomopathogenic microorganisms, mainly bacteria of the genus *Bacillus*, becomes a promising alternative in the fight against this mosquito. The objective of this study was to select bacteria isolated from Amazonian environments, carrying the *Cry* and *BS-glu* genes, with larvicidal potential, to contribute to the control of *Ae. aegypti*. In this work 21 lines of collections of academic papers were obtained from soils, water, plant and insect from different Amazonian environments. The bacilli strains of this study were submitted to the PCR reaction using the nucleotide sequence encoding the *rRNA16S* gene. In total, 20 bacterial strains were identified, belonging to the following genera: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Serratia* and *Achromobacter*. PCR was then performed to characterize the *Cry4Ba*, *Cry11* and *BS-glu* genes. The results showed that of the 21 lines analyzed, six lines - SPa09, SPa04, 15PHA, BtAM06, R22 and GD 02.13 - presented amplification for the *Cry4Ba* gene. Considering the *BS-glu* gene, two strains - SBC2 and standard strain Bti001- amplified for said gene. In the evaluation of the larvicidal activity the quantitative bioassays with 21 strains of bacilli against *Ae. aegypti*. The results of the quantitative bioassays showed that seven lines were promising in the bacterial biomass assays, where five - R22ISP2, GDO2.13NA, BtAM06, BtAM49LB and SPa09NA - presented 100% mortality in all concentrations - 133 mg / L, 66.6 mg / L, 33.3 mg / L, 16.6 mg / L, 8.33 mg / L and 4.16 mg / L in 24 hours of exposure. The same result was observed for the standard strain Bti001 - *B. thuringiensis* which showed 100% mortality at all concentrations tested. In the assay with autoclaved biomass, only the R22 line showed 90 to 100% mortality in 72 hours of exposure. In this way, the results of this work provide relevant information about the larvicidal potential of strains of isolated bacilli from different Amazonian environments, which can be used in biological control actions of *Ae. aegypti*.

Keywords: Amazonian microbial, insecticidal proteins, hydrolytic enzymes, vector control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene <i>Cry4ba</i> , <i>Cry11</i> e <i>BS-glu</i>	47
Tabela 2: Características morfológicas e coloração de Gram de bacilos de diferentes ambientes amazônicos.....	50
Tabela 3: Identificação molecular de linhagens de bacilos por meio do sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i>	54
Tabela 4: Linhagens com a presença e ausência de atividade larvicida e dos genes <i>Cry4ba</i> e <i>BS-glu</i>	63
Tabela 5: Percentual de mortalidade das larvas expostas à biomassa bacteriana secretada por bacilos	65

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1: Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 2: Proteínas inseticidas (a) CRY e (b) CYT	21
Figura 3: Hidrólise da β -1,3-glucana pela β -1,3-glucanase	23
Figura 4: Estrutura cristal de β -1,3-1,4 glucanase de <i>Bacillus subtilis</i>	24
Figura 5: Mecanismo de ação de <i>B. thuringiensis</i> no epitélio intestinal de larvas	26

Capítulo

Figura 1: Características morfológicas de bacilos de ambientes amazônicos.....	51
Figura 2: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene <i>16s rRNA</i>	52
Figura 3: Perfil eletroforético da amplificação do dna do gene <i>Cry4Ba</i> , em linhagens de bacilos de diferentes ambientes amazônicos	56
Figura 4: Perfil eletroforético da amplificação do DNA do gene <i>BS-glu</i> em bacilos de diferentes ambientes amazônicos	60
Figura 5: Percentual de mortalidade das larvas expostas à biomassa bacteriana autoclavada da linhagem R22...	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Mosquito <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762.....	14
2.2 Principais arboviroses transmitidas pelo <i>Aedes aegypti</i>	15
2.3 Controle vetorial do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	17
2.4 Biodiversidade Amazônica.....	18
2.5 Bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	19
2.6 Moléculas inseticidas produzidas por <i>Bacillus</i>	20
2.7 Enzimas β -glucanases de <i>Bacillus</i> e potencial biotecnológico	22
2.8 Mecanismos de patogenicidade de moléculas produzidas por <i>Bacillus</i> spp.	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Geral.....	28
3.2 Específicos.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO	39
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISSCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia brasileira, berço de biodiversidade, é considerada um dos maiores reservatórios de fauna, flora e microbiota do mundo. Entretanto, a atividade antrópica nos ecossistemas tem ocasionado impactos na fauna de diversas espécies, incluindo os mosquitos (BURKETT-CADENA & VITTOR, 2018). O efeito do desequilíbrio ambiental ocasiona impactos negativos, com a proliferação de mosquitos vetores e, conseqüentemente, uma alta incidência de doenças aos seres humanos (TAUIL, 2006; ALHO, 2012; PAN AMAZÔNIA, 2015).

Dentre os mosquitos vetores de patógenos, a espécie *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 destaca-se por possuir alta relevância epidemiológica. Este mosquito pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia* (WRBU, 2018). A fêmea é hematófaga e atua na transmissão de diversos arbovirus, tais como o chikungunya (CHIKV), o zika (ZIKV) e o dengue (DENV), responsável pela morbidade e mortalidade de milhares de pessoas em diversas regiões do mundo (FORATTINI, 2002; ZARA et al 2016; WHO, 2018).

Apesar de existir um grande avanço no desenvolvimento de medidas alternativas para controle de populações deste vetor, o uso de inseticidas químicos ainda é uma estratégia bastante utilizada. Porém, seu uso ocasiona diversos problemas ambientais como a poluição do meio ambiente, danos aos organismos associados, além disso, seleciona populações de mosquitos resistentes (ZAMBOLIM & PICANÇO, 2009). Diante disso, o controle biológico apresenta-se como alternativa aos produtos químicos para o controle de pragas agrícolas e vetores de doenças tropicais, pela sua eficiência, especificidade e biodegradabilidade, além de não possuir efeitos poluentes ao meio ambiente (MASCHERETTI et al., 2013; RATHER et al, 2017).

Considerando as bactérias entomopatogênicas que atuam no controle biológico de insetos vetores e pragas agrícolas, destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus* como: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloquenefaciens* e *Bacillus pumilus* (GEETHA et al., 2011; POOPATHI et al., 2015; DEWI et al., 2016). Estas bactérias produzem um cristal proteico composto por proteínas CRY, CYT e VIP, entre outras. Além disso, secretam outros fatores de virulência como, por exemplo, hemolisinas, enterotoxinas, fosfolipases, surfactinas. Estes microrganismos apresentam ação tóxica para diversas ordens de insetos, Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera e Diptera (BRAVO et al., 2007; PARDO-LÓPEZ et al., 2013; MNIF & GHRIB, 2015).

Além do potencial metabólico das bactérias do gênero *Bacillus* em produzir proteínas inseticidas (ICP), estas também secretam uma variedade de enzimas hidrolíticas como, por exemplo, quitinases, proteases e glucanases (LEELASUPHAKUL et al., 2006; SHARMA et al., 2018). Esta última chama atenção pelo fato de ainda não existir estudos com atividade larvicida contra populações de mosquitos vetores.

As enzimas hidrolíticas apresentam uma vasta aplicação em diversos processos biotecnológicos. Estudos com enzimas β -glucanases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, foram descritas atuando no mecanismo de sinergismo de um complexo de enzimas como, por exemplo, exo-glucanases, endo-glucanase, protease e quitinase (HRMOVA et al., 1997; COSTA & CHOUPINA, 2013). A produção dessas enzimas pode ocorrer tanto intra quanto extracelular, com ação na hidrólise de cadeias complexas de β -glucano, um componente importante da parede celular de certos organismos (XU et al., 2016).

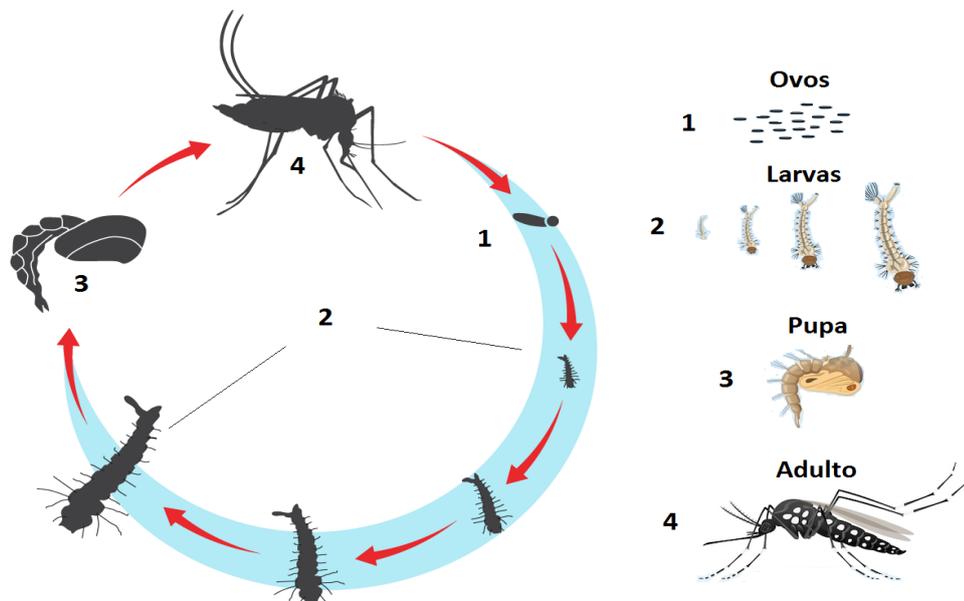
Apesar de vários estudos evidenciarem o potencial metabólico de bactérias do gênero *Bacillus*, no controle biológico de insetos vetores, é necessário buscar na Amazônia novas espécies que apresentem moléculas de interesse biotecnológico. A região amazônica apresenta uma ampla diversidade de microrganismos distribuídos em diferentes ambientes, porém, muitos ainda desconhecidos. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de *Bacillus* spp. de ambientes amazônicos, produtores de enzimas β -glucanases e proteínas CRY, para o controle de *Ae. aegypti*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

Os mosquitos apresentam a capacidade de transportar e transmitir patógenos que causa morbidade e mortalidade em seres humanos, tornando-se um grande problema de saúde pública. Dentre os vetores de doenças, o *Ae. aegypti* é considerado o vetor primário de diversos arbovirus, conhecido popularmente como mosquito, pernilongos, muriçocas, pertence à ordem Díptera, família Culicidae e gênero *Aedes*. Este possui características que o diferencia dos demais mosquitos, como a presença de listras brancas no tórax em formato de lira musical e manchas esbranquiçadas nas pernas (FORATTINI, 2002; WRBU, 2018). Assim como os outros insetos culicídeos, apresenta um ciclo de vida holometábolo, compreendendo quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (em quatro ínstar), pupa e adulto. As larvas e pupas se desenvolvem em ambientes aquáticos, enquanto os adultos são terrestres (Figura 1). As formas larvais vivem em criadouros temporários onde encontram disponível matéria orgânica, principalmente detritos e microrganismos, tais como bactérias, fungos e microalgas (VON DUNGERN & BRIEGEL, 2001; FORATTINI, 2002; MS/SVS, 2018).

Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: www.ciencias.seed.pr.gov.br

Este mosquito é originário da África e vem se espalhando pelas regiões tropicais e subtropicais. O *Ae. aegypti* foi eliminado do Brasil em 1955, porém, provavelmente teve sua reintrodução em 1976, alcançando altas infestações em regiões com umidade e temperatura elevada, típica de países tropicais como o Brasil (MS/SVS, 2018).

Por ser um mosquito antropófilo, habita principalmente ambientes domésticos em áreas urbanas e alimentam-se geralmente de sangue humano. A infestação é mais intensa em regiões com alta densidade populacional, principalmente em espaços urbanos com ocupação desordenada, onde as fêmeas têm mais oportunidades para alimentação e dispõem de criadouros para depositar seus ovos (ZARA et al., 2016). A infestação do mosquito é sempre mais intensa no verão, em função da elevada temperatura e da intensificação de chuvas. Estes fatores favorecem a eclosão de ovos dos mosquitos. A falta de educação ambiental, lixo jogado nas ruas ou acumulados nos domicílios, favorecem a proliferação de criadouros desse mosquito e essas condições contribuem para o aumento do número de doenças causadas pelo agente etiológico, veiculado por esses mosquitos (GUBLER, 2001; FIOCRUZ, 2017).

Devido à infestação do *Ae. aegypti* em habitats urbanos, principalmente em recipientes artificiais, este mosquito tem causado preocupações às populações, pois transmitem diversos arbovírus com a incidência de vários tipos de doenças. O modo de transmissão dos arbovírus aos seres humanos é por meio da picada dos mosquitos fêmea infectada, ou seja, por possuir hábito hematófago se infecta com o vírus ao se alimentar de sangue de um indivíduo contaminado, na fase virêmica (SOUZA NETO et al., 2003; WHO, 2017).

2.2 Principais arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti*

As doenças causadas por vírus e veiculadas por artrópodes vetores são chamadas de arboviroses, e causam impactos negativos a saúde humana. As principais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* são: dengue, febre chikungunya e o vírus zika. Essas doenças de notificação compulsória e estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública (WHO, 2018).

O *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue nas Américas e a doença tem a capacidade de ocasionar casos graves e letais, preocupando as autoridades em saúde pública em todo o Brasil e em diversas regiões do mundo. A dengue é ocasionada por vírus designados como DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4. A dengue afeta a maioria dos países da Ásia e da América Latina e se tornou uma das principais causas de hospitalização e morte entre

crianças e adultos nessas regiões (MARÇAL JR & SANTOS, 2004; BESERRA et al., 2008; MUSTAFA et al., 2015; WHO, 2017).

Este vetor também transmite vírus da Febre Amarela nas áreas urbanas, após picar uma pessoa infectada. No ciclo urbano o homem é o hospedeiro com maior importância epidemiológica. Os principais sintomas iniciais desta arbovirose são: febre, cansaço, mal-estar, dores de cabeça e musculares. A vacina é a principal ferramenta de prevenção e controle da febre amarela (FIOCRUZ, 2017).

A febre chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus chikungunya (CHIKV), transmitido também pela picada de fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*. Esta doença tem caráter epidêmico com elevada taxa de morbidade. No Brasil a transmissão deste arbovirus foi confirmada em 2014, nos estados do Amapá e da Bahia. Apesar de poucos estados vivenciarem epidemias por chikungunya, a alta densidade do vetor, associada à presença de indivíduos susceptíveis e a intensa circulação de pessoas em áreas endêmicas contribuem para a possibilidade de epidemias, em todas as regiões do Brasil (BURT et al., 2012; LANCIOTTI & LAMBERT, 2016; MS/SVS, 2017).

Além das arboviroses mencionadas, o *Ae. aegypti* possui a capacidade de transmitir o vírus zika, descoberto em 1947 em Uganda. As infecções em humanos foram encontradas em toda a África e Ásia, geralmente acompanhadas de doença leve. Durante um surto em 2013-2014 na Polinésia Francesa, o transtorno neurológico síndrome de Guillain-Barré foi associada à infecção zika. Após a emergência do ZIKV no Brasil e restante das Américas, a infecção foi associada à encefalites fatais em adultos, a óbitos fetais, microcefalia e outras malformações fetais (WHO, 2016; DONALISIO et al., 2017). No Brasil, o primeiro relato de transmissão de ZIKV foi confirmado em 2015, na Bahia. No ano de 2016, foi relatada a transmissão da infecção por zika em vários países e territórios das Américas e um surto de milhares de casos (ZANLUCA et al., 2015; CALVET et al., 2016; WHO, 2016).

Considerando o elevado índice de infestação deste mosquito, alguns fatores colaboraram para sua proliferação, como: características ecológicas e biológicas do vetor, variáveis ambientais (água, chuva, temperatura, mudanças demográficas e umidade). Deste modo, os maiores índices de infestação pelo *Ae. aegypti* são registrados em áreas com alta densidade populacional e baixa cobertura vegetal. Outro fator importante é a falta de infraestrutura de algumas localidades, devido ao fornecimento irregular de água, onde o armazenamento ocorre de forma inadequada pelos moradores, tornando-se criadouros do mosquito (GUZMAN et al., 2010; FIOCRUZ, 2017).

Diante disto, diversas medidas são adotadas pelo Governo Federal com planos e estratégias voltadas para a eliminação do mosquito *Ae. aegypti*. De acordo com dados apresentados no boletim epidemiológico, em 2018, até a Semana Epidemiológica 52 (31/12/2017 a 29/12/2018), foram registrados 265.934 casos prováveis de dengue no país. Neste ano de 2019, até a SE 7 (30/12/2018 a 16/02/2019), foram registrados 105.606 casos prováveis de dengue em todo país. Quanto ao zika, em 2018 foram registrados 8.680 casos prováveis de doença pelo vírus Zika no país. Em 2019, até a SE 6 (30/12/2018 a 09/02/2019), foram registrados 1.207 casos prováveis. Em relação à chikungunya, no ano de 2018, foram registrados 87.687 casos prováveis de febre de chikungunya no país. Em 2019, até a SE 7 (30/12/2018 a 16/02/2019), foram registrados 7.257 casos prováveis de chikungunya no país (BRASIL, 2019). No Estado do Amazonas, em 2019, até a Semana Epidemiológica 7 foram registrados 511 casos de dengue, 4 casos de zika e 20 casos de chikungunya (BRASIL, 2019).

Com base nos dados acima citados, essas medidas são necessárias para amenizar os impactos ocasionados por este vetor. Como não existem vacinas compatíveis para todos os sorotipos do vírus dengue e também os demais arbovirus zika e chikungunya, torna-se necessário também o uso de medidas e estratégias voltadas para o controle vetorial (LIMA et al., 2005; LUTINSKI et al., 2017).

2.3 Controle vetorial do mosquito *Aedes aegypti*

Diversas medidas podem ser desenvolvidas para o controle dos mosquitos vetores, as quais podem ser: **controle mecânico ou ambiental** - com métodos que eliminam ou reduzem as áreas onde os vetores se desenvolvem; **controle químico**, com o uso de inseticidas para controlar as diferentes fases dos mosquitos. Estes produtos são formulados de acordo com a fase e os hábitos do vetor, para o qual se utilizam aplicação residual. Além desses métodos, o **controle biológico** também é utilizado, com o uso de microrganismos patógenos ou predadores naturais para o controle de populações do vetor (ZARA et al., 2016; MS/VS, 2017).

O uso de inseticidas químicos ainda é bastante utilizado, porém, o uso indiscriminado causa danos ambientais e à saúde humana, principalmente os de alta toxicidade. Assim, o controle biológico é uma das alternativas aos inseticidas químicos utilizando entomopatógenos, que constituem os componentes ativos dos bioinseticidas (ALVES, 1998; ANGELO et al., 2010; GUO et al., 2015).

Os agentes de controle biológico estudados em diferentes partes do mundo para o controle de mosquitos incluem muitos predadores e patógenos de ocorrência natural de insetos,

incluindo fungos e bactérias (ALVES, 1998; ARANTES et al., 2002). Os produtos oriundos de microrganismos utilizados no controle biológico possuem vantagens, pois são inofensivos ao homem e a outros mamíferos, invertebrados e plantas, com especificidade ao inseto alvo (LUNA-FINKLER & FINKLER, 2012).

Considerando os microrganismos e sua utilização no controle biológico, as bactérias destacam-se, devido sua capacidade de produzir moléculas inseticidas e antimicrobianas. Os membros do gênero *Bacillus* estão entre as bactérias benéficas, exploradas como pesticidas microbianos e fungicidas. Entre eles, *Bacillus sphaericus* (Bs) e *Bacillus thuringiensis* (Bt) são utilizados em programas de controle de vetores de doenças endêmicas. Estas bactérias são capazes de produzir esporos que lhes permitem resistir a condições ambientais adversas e permitir fácil formulação e armazenamento dos produtos comerciais (SCHALLMEY et al., 2004; FRANCIS et al., 2010; LUNA-FINKLER & FINKLER, 2012).

Diante disso, faz-se necessário pesquisas na área da biodiversidade, com o intuito de isolar, identificar, caracterizar e selecionar microrganismos entomopatogênicos de interesse para serem utilizados no controle biológico de insetos, vetores de doenças.

2.4 Biodiversidade Amazônica

O Brasil é um país que ocupa quase metade da América do Sul, com a maior diversidade de espécies no mundo. A biodiversidade envolve uma variedade de espécies de flora, fauna e microrganismos. Estes organismos desempenham diversas funções ecológicas para estabilidade dos ecossistemas. Apesar da diversidade de espécies descritas, pouco se conhece do conjunto de espécies com as quais compartilhamos a vida no planeta (LEWINSOHN & PRADO, 2005; BRASIL/MMA, 2018).

Dentre os diferentes Biomas brasileiros, a floresta amazônica é a maior floresta tropical úmida do mundo, onde abrigam muitas espécies de microrganismos, presentes no solo, colonizando hospedeiros e outros microhabitats como água e animais (KUZYAKOV & BLAGODATSKAYA, 2015). Diversos estudos por grupo de pesquisas regionais mostram a variedade de metabólitos produzidos por bactérias, fungos, plantas e outras fontes amazônicas. Assim, é de fundamental importância conhecer a diversidade microbiológica desta região (DIRZO & RAVEN, 2003; PEREIRA et al., 2017).

Estudos baseados na análise da diversidade de bactérias no meio ambiente, por meio de métodos moleculares revelaram uma rica diversidade de organismos ainda não cultivados (LUDWIG et al., 1997). Portanto, é importante ressaltar que a maioria dos avanços da

biotecnologia são provenientes da diversidade genética e metabólica de microrganismos, diante disso, faz-se necessária a busca de espécies microbianas com potencial biotecnológico.

2.5 Bactérias do gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é o maior gênero dentro da família Bacillaceae, composto por bactérias gram-positivas ou gram negativas, em forma de bastonete que formam endósporos, metabolicamente inertes, resistentes às condições ambientais adversas, como calor e dessecação sendo tipicamente representados por células aeróbicas móveis por flagelos, mas podem também crescer em ambientes anaeróbicos. As espécies mais conhecidas são *Bacillus sphaericus*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (MADIGAN et al., 2010; LOGAN et al., 2011).

Este gênero representa um conjunto grande e diversificado de bactérias que possuem características ubíquas e habitam uma grande variedade de nichos ecológicos. O ciclo de desenvolvimento da formação de endósporos, a produção de antibióticos, a toxicidade de seus esporos e cristais de proteína para muitos insetos, desperta grande interesse, desde a descoberta de Cohn e Koh na década de 1870 (ZEIGLER & PERKINS, 2008; LOGAN et al, 2011, FAN et al., 2018).

As espécies *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* destacam-se como agentes entomopatogênicos e são utilizadas em programas de controle de mosquitos vetores de doenças. Estes microrganismos possuem capacidade de formar esporos e toxinas altamente específicas para diversas ordens de insetos (LUNA-FINKLER & FINKLER, 2012; LOBO et al., 2017).

A espécie *B. thuringiensis* é uma bactéria cosmopolita, que ocorre naturalmente em vários habitats, caracteriza-se por produzir um número elevado de toxinas inseticidas, incluindo, exotoxinas, enterotoxinas, endotoxinas e enzimas hidrolíticas. Esta bactéria sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou excesso, entra em processo de esporulação, durante a fase estacionária. No início da esporulação, *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida de grande importância no controle biológico (YAMAMOTO & DEAN, 2000; LEMES, 2012, ELLEUCH et al, 2015; RICOLDI et al., 2018).

Apesar de *B. thuringiensis*, outras espécies destacam-se pela sua importância biotecnológica. A espécie *B. pumilus* é onipresente no ambiente e possui grande relevância ecológica e biotecnológica, devido à ampla gama de aplicações que este microrganismo e seus produtos têm nos setores da biotecnologia, indústria e meio ambiente. Esta espécie exibe

atividade biológica útil para controle de muitas espécies de fungos fitopatógenos e estudos mostram presença de cristal paraesporal semelhante àqueles produzidos por *B. thuringiensis*, sendo considerada nova cepa entomopatogênica ativa contra *Ceratitidis capitata* (MOLINA et al. 2010, GARCIA-RAMON et al., 2016). Outra espécie que atua no controle de fungos fitopatógenos é *Bacillus subtilis*, conhecido por produzir enzimas hidrolíticas, como por exemplo, quitinase, β -glucanase, protease, lipase e celulase que podem degradar paredes celulares de patógenos fúngicos (CAZORLA et al., 2007; DEWI et al., 2016).

Diversas espécies do gênero *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas de polissacarídeos extracelulares e vários antibióticos, além disso, exibem comportamento antagônico contra patógenos fúngicos, por meio de competição, sendo consideradas importantes em processos de micoparasitismo. Os lipopeptídeos estão entre os compostos antibióticos mais frequentemente produzidos por estas bactérias, além de antibiose, lipopeptídeos podem ter papéis adicionais no biocontrole (SHODA, 2000; PEREZ-GARCIA et al., 2011; CHEN et al., 2015).

Desse modo, bactérias do gênero *Bacillus* possuem habilidade em produzir e secretar enzimas extracelulares, com capacidade de fermentar uma ampla variedade de valores de pH. Esta competência faz com que estas bactérias sejam dominantes nos processos de fermentação microbiológica, gerando produtos enzimáticos comerciais com diversas aplicações biotecnológicas (SCHALLMEY et al., 2004; FIRA et al., 2018).

2.6 Moléculas inseticidas produzidas por *Bacillus*

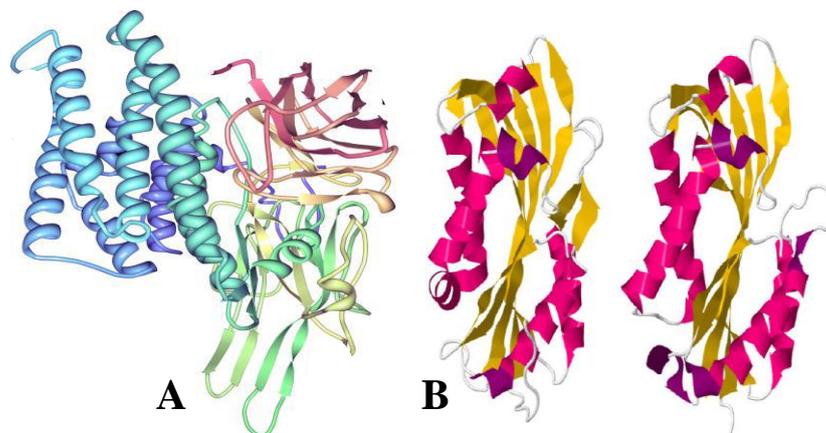
Considerando a diversidade de espécies do gênero *Bacillus* e sua importância no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças, muitas se destacam pela toxicidade de moléculas secretadas e pelo modo de ação no inseto hospedeiro. Diversas moléculas produzidas por bactérias entomopatogênicas já foram caracterizadas com ação tóxica a diferentes ordens de insetos, porém, outras moléculas ainda não foram descritas. (HABIB & ANDRADE, 1998; BRAVO et al., 2011).

Dentre as diferentes toxinas inseticidas descritas, as δ -endotoxinas representam o componente principal dos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (*Bt*). Estas proteínas são produzidas como inclusões cristalinas durante a fase de esporulação do crescimento das bactérias. Trata-se de um agregado de moléculas, geralmente em forma bipiramidal, ativas contra larvas de diferentes ordens de insetos, seu modo de ação é pela ruptura do tecido do intestino médio seguido de septicemia causada provavelmente por *Bt* e por outras espécies bacterianas (RAYMOND et al, 2010; PALMA et al., 2014, PERALTA & PALMA, 2017).

Dependendo da variedade de espécies, as δ -endotoxinas são compostas de diferentes estruturas e pesos moleculares. Essas protoxinas são denominadas de proteínas CRY e são caracterizadas de acordo com seu grau de toxicidade para as várias ordens de insetos suscetíveis (HABIB & ANDRADE 1998; LUNA-FINKLER & FINKLER, 2012). As proteínas CRY são codificadas pelos genes *Cry* localizados em maior parte nos plasmídeos e, em pequenas quantidades, nos cromossomos (VILAS-BÔAS & CASTRO-GÓMEZ, 2010). Os genes responsáveis por expressar esta proteína inseticida foram clonados, sequenciados e classificados com base em sua homologia e especificidade, desta forma, as toxinas foram reunidas de acordo com a sua sequência primária de aminoácidos e mais de 500 diferentes sequências de genes foram ordenadas em 67 grupos - Cry1-Cry78 (CRICKMORE et al., 2010; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

As sequências de genes foram divididas em pelo menos quatro famílias de proteínas, filogeneticamente não relacionadas, que podem ter diferentes modos de ação. Além da diversidade de genes *Cry*, outros genes de *B. thuringiensis* codificam uma toxina citolítica (Cyt) ativa contra dípteros (HABIB & ANDRADE, 1998; BRAVO et al., 2005; 2011). As proteínas CRY e CYT (Figura 2), produzidas por *B. thuringiensis* atuam em sinergismo, o efeito desta interação resulta no aumento da atividade de CRY na membrana do intestino médio de insetos (BRAVO et al., 2005; PALMA et al. 2014, ELLEUCH et al., 2015).

Figura 2: Proteínas inseticidas. (A) CRY e (B) CYT



Fonte: (PALMA et al. 2014)

Além disso, outras proteínas produzidas por *B. thuringiensis* continuam sendo identificadas, como é o caso da Vip (proteína inseticida vegetativa). Esse grupo de proteínas se caracteriza pela atividade inseticida, sendo secretada durante o crescimento vegetativo de *Bt* (ESTRUCH et al., 1996; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al, 2013). Outra proteína inseticida foi descrita como Sip1A (proteína inseticida segregada) de *B. thuringiensis* com atividade larvicida de insetos sobre coleóptera (DONOVAN et al., 2006; BERRY, 2016).

A patogenicidade de *B. thuringiensis* em larvas de insetos ocorre por meio da ação sinérgica de proteínas CRY com outras moléculas associadas. É importante enfatizar que as proteínas CRY agem sinergicamente, ou seja, quando isoladas têm seu efeito reduzido (DE BARROS & SILVA-FILHA, 2007; RAYMOND et al., 2008; GALZER & AZEVEDO, 2016).

Esta espécie de *Bacillus* também produz exoenzimas como quitinases e proteases que desempenham um papel importante em sua patogenicidade. Estas enzimas atuam na ruptura da membrana peritrófica, favorecendo o acesso das δ -endotoxinas ao epitélio intestinal (SÁ et al., 2009, GALZER & AZEVEDO, 2016). Além disso, certas enzimas hidrolíticas provenientes de bactérias do gênero *Bacillus*, a exemplo quitinases, proteases e β -glucanases, possuem ação sinérgica na degradação da parede celular de certos organismos patogênicos. As quitinases vêm sendo estudadas em programas de controle de insetos vetores e apresentam interação com proteínas inseticidas no modo de ação sobre larvas de insetos, principalmente da ordem díptera (COSTA, et al., 2010; SOARES-SILVA, 2015).

Estudos relatam que enzimas glucanases e quitinases atuam em processos de micoparasitismo na degradação de parede celular de agentes patogênicos. Diversas espécies de *Bacillus* produzem β -glucanase para degradar β -glucano como fonte alternativa de nutrição (DEWI et al., 2016). Estas hidrolases foram isoladas e caracterizadas de diferentes espécies de *Bacillus*, como por exemplo, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. thuringiensis*, *B. pumillus* (TANG et al., 2004; CHAARI et al., 2012, SHRESTHA et al., 2015; ELGHARBI et al., 2017).

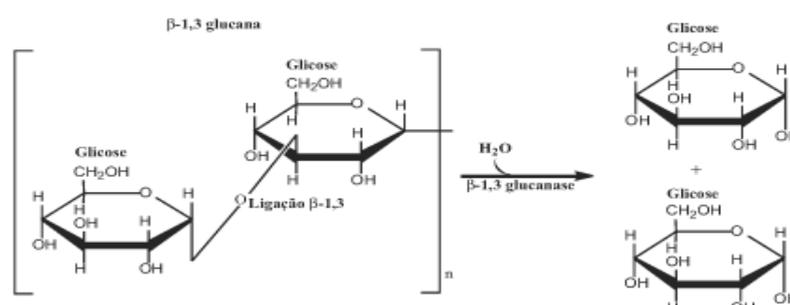
2.7 Enzimas β -glucanases de *Bacillus* e potencial biotecnológico

As enzimas microbianas têm se destacado devido a diversas vantagens com diferentes especificidades e modos de ação. Dentre as enzimas microbianas, as β -glucanases despertam um crescente interesse, principalmente relacionados à termoestabilidade. As β -glucanases são secretadas por microrganismos (bactérias e fungos) e plantas, envolvidas na degradação de

substratos presentes em seu meio natural. Estudos relatam a diversidade de espécies do gênero *Bacillus*, como produtoras de enzimas glucanases, com excelente potencial biotecnológico, como por exemplo, a espécie *Bacillus altitudinis*, que possui genes que codificam enzimas β -1,3-1,4-glucanase com características termostáveis e atividade na degradação de β -glucano (WARREN et al., 1996; MAO et al., 2016; COSTA & CHOUPINA, 2013; XU et al., 2016).

Estas enzimas são classificadas em várias famílias de glicosídeos hidrolase (GH) baseadas em domínios estruturalmente conservados. As β -glucanases que catalisam a hidrólise do β -glucano incluem quatro tipos: β -1,3-1,4-glucanase (lichenase, EC 3.2.1.73), β -1,4-glucanase (celulase, EC 3.2.1.4), β -1,3-glucanase (laminarinase, EC 3.2.1.39) e β -1,3 (4)-glucanase (EC 3.2.1.6). A ação das β -glucanases ocorre por meio de hidrólises do β -glucano, obtendo-se glicose e oligossacarídeos como produtos finais da reação (Figura 3) - (MCCARTHY et al., 2003; BOYCE & WALSH, 2007; YANG et al., 2008; LUO et al., 2010).

Figura 3: Hidrólise da β -1,3-glucana pela β -1,3-glucanase

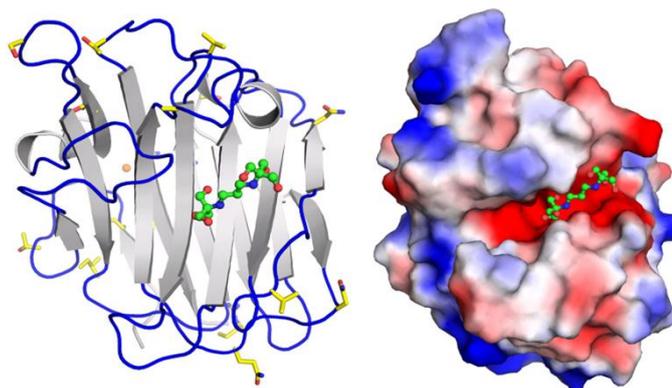


Fonte: (FLEURI & SATO, 2005)

Assim, é importante enfatizar que microrganismos produzem um conjunto de enzimas com propriedades diferentes (massa molar, pH e temperatura) porém, com a mesma especificidade (PLANAS 2000; BARA et al., 2003; MARTIN et al., 2007). A utilização de ferramentas de biologia molecular para microrganismos recombinantes que expressem o gene da β -1,3-glucanase visando o aumento da produção destas enzimas são estudadas, principalmente para aumentar a degradação das β -glucanas (PLANAS, 2000; BAUERMEISTER et al, 2010, FURTADO et al, 2011; ELGHARBI et al., 2017). Diante disto, genes bacterianos de diversas β -glucanases foram isolados de muitas espécies de *Bacillus*, a exemplo, *B. subtilis* (JUNG et al., 2010; FURTADO et al., 2011), *B. altitudinis* (MAO et al., 2016), *Bacillus sp.* (KIM et al. 2013) e *B. thuringiensis* (SHRESTHA et al., 2015). Além de relatos de genes da β -1,3-1,4-glucanase a partir de *Paenibacillus sp.* e *Paenibacillus terrae*

NK3-4 (CHEN et al., 2015; YU et al., 2018). Estudos relatam a presença do gene *BS-glu* em *B. subtilis* MA139, que codifica enzima β -1,3-1,4-glucanase, que apresenta alta atividade para o substrato de β -glucano e liquenano de cevada (QIAO, 2008).

Figura 4: Estrutura cristal de β -1,3-1,4 glucanase de *Bacillus subtilis*



Fonte: (Furtado et al., 2011)

Esta enzima destaca-se dentre as diversas hidrolases, devido à sua habilidade de hidrolisar β -glucano, um grupo heterogêneo de polissacarídeos, consistindo de monômeros D-glicose com ligações glicosídicas. (MARTIN et al., 2007; LORRAQUE et al., 2012, DEWI et al., 2016). Além de atuarem no controle biológico, estas enzimas são utilizadas em diversos processos biotecnológicos, como: na indústria alimentícia, na produção de bebidas como vinho e cerveja, na fabricação de bioetanol e biodiesel, como probióticos, devido a sua excelente estabilidade e eficiência na hidrólise de β -glucano e outros substratos. Além disso, atuam em sinergismo com outras proteínas em diferentes atividades enzimáticas (BAUERMEISTER et al., 2010; CHAARI et al., 2014; EDISON et al., 2017; GOLDENKOVA-PAVLOVA et al., 2018).

No controle biológico, estas enzimas são consideradas importantes hidrolases envolvidas no processo de micoparasitismo. As glucanases atuam em sinergismo com outras enzimas na degradação da parede celular dos organismos patogênicos, composta principalmente de β -glucana e quitina, causando um efeito antagonista, onde desempenham papéis importantes na defesa de plantas contra fitopatógenos (PLANAS, 2000; XU et al., 2016; SHARMA et al., 2018).

Além da descrição dessas enzimas em microrganismos e plantas, há relatos da presença de enzima β -glucanase em insetos das ordens de Coleoptera, Orthoptera, Lepidoptera e Díptera,

incluindo larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Embora sejam descritas glucanases em insetos, as propriedades e funções dessas enzimas ainda são desconhecidas. (SOUZA-NETO et al., 2003; BRAGATTO et al., 2010; MORAES et al., 2014; SOUZA et al., 2016).

Considerando que estas enzimas, são primordiais em mecanismos de patogenicidade sobre fungos patógenos, é de grande relevância investigar genes que codificam enzimas glucanases em linhagens de *Bacillus*, que podem contribuir para controle biológico de fitopatógenos e até mesmo de insetos vetores.

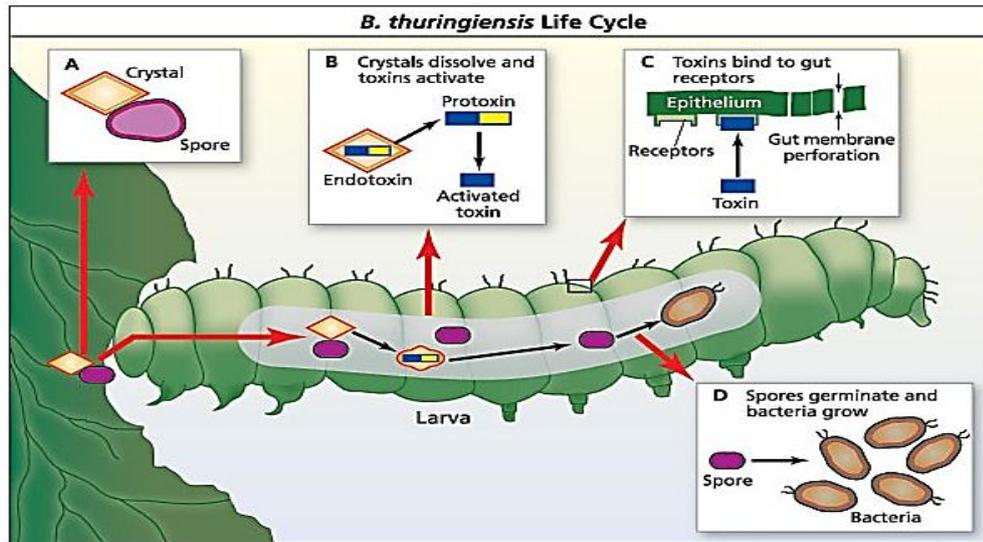
2.8 Mecanismos de patogenicidade de moléculas produzidas por *Bacillus* spp.

Considerando a interação de bactérias entomopatogênicas com seus insetos hospedeiros, a δ -endotoxina representa um dos fatores mais importantes na patogenicidade de insetos, ocasionada principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*. A virulência de um determinado entomopatógeno depende diretamente das suas diferentes características fisiológicas, como a produção de toxinas, enzimas, taxa de crescimento e multiplicação, além da suscetibilidade do inseto infectado (HABIB & ANDRADE, 1998; BRAVO et al., 2007).

As proteínas CRY produzidas pela bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* são conhecidas devido à alta toxicidade que exibem a uma variedade de insetos-alvo. Contudo, embora as proteínas CRY sejam os fatores de virulência inseto-específico mais conhecidos, estas espécies apresentam também uma ampla gama de fatores de virulência, os quais permitem à bactéria atingir a hemolinfa e colonizar eficientemente o inseto hospedeiro. Dentre estes fatores, destacam-se a proteína VIP, CYT, enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases, proteases e enzimas hidrolíticas (BRAVO et al., 2007; VILAS-BOAS et al., 2012; JURAT-FLUENTES & CRICKMORE, 2017).

O modo de ação das δ -endotoxinas inicia-se após ingestão pelas larvas de insetos, posteriormente são solubilizadas pelo pH alcalino no intestino da larva e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por serino-proteases, formando toxinas ativas que se ligarão a receptores das microvilosidades intestinais. Após a ligação, as toxinas se inserem na membrana formando poros e desestabilizando o gradiente osmótico levando à morte da larva (Figura 5) (BRAVO et al., 2007; MNIF & GHRIBI, 2015; JURAT-FUENTES & CRICKMORE, 2017).

Figura 5: Mecanismo de ação de *B. thuringiensis* no epitélio intestinal das larvas



Fonte: www.biologicalcontrol.info

Considerando o modo de ação destas proteínas no intestino médio de larvas de insetos, estudos demonstraram que além das proteínas CRY, várias toxinas com atividade inseticida podem atuar aumentando a toxicidade das δ -endotoxinas. Além das toxinas, os esporos também podem contribuir com a patogenicidade por meio da ação sinérgica desempenhada junto com as proteínas CRY. Diversos estudos relatam que a presença do esporo aumenta a atividade entomopatogênica da bactéria. Assim, em algumas situações, as proteínas CRY agem apenas no enfraquecimento dos insetos suscetíveis, criando condições para a germinação dos esporos, multiplicação das células vegetativas que secretam diversas toxinas adicionais para o desenvolvimento de septicemia. As preparações comerciais baseadas em *B. thuringiensis* são, na maioria das vezes, compostas de esporos e cristais (DONOVAN et al., 2006; VILAS-BÔAS et al., 2012; PERALTA & PALMA et al., 2017).

Além disso, estudos demonstram que a capa dos esporos de *B. thuringiensis* pode conter toxinas. Estas toxinas parecem ter um efeito direto sobre o inseto, uma vez que podem facilitar a germinação dos esporos da bactéria no tubo digestivo do inseto, permitindo que a célula bacteriana expresse outros fatores de virulência, que podem aumentar o efeito das proteínas CRY e permitir o acesso à hemolinfa das larvas, e consequente multiplicação de suas células vegetativas no inseto hospedeiro (DU & NICKERSON, 1996; VILAS-BOAS et al., 2012).

As exoenzimas proteases e quitinases desempenham importantes funções na patogenicidade sobre os insetos, são produzidas pela bactéria e auxiliam na ruptura da

membrana peritrófica favorecendo o acesso das δ -endotoxinas ao epitélio intestinal (SAMPSON & GOODAY, 1998; LIMA, 2010; GALZER & AZEVEDO-FILHO, 2016).

Estudos evidenciaram mecanismos de sinergismo entre as toxinas Cry4, específicas a dípteros e as toxinas citolíticas (Cyt) de *B. thuringiensis israelensis*. Os resultados desta interação mostraram o aumento da atividade de CRY4, este fato se deve a presença da toxina Cyt, que funciona como receptores ligados à membrana, melhorando a ligação de Cry4 a membrana apical do intestino médio das larvas de *Ae. aegypti* (ELLEUCH et al. 2015). O sinergismo entre diferentes toxinas e a ligação à membrana apical das larvas é essencial para que ocorra uma melhor toxicidade. A toxicidade da proteína CRY pode ser reduzida devido alteração na ligação destas toxinas na membrana do inseto, enquanto que uma melhor ligação das toxinas implica em um aumento da atividade larvicida (PÉREZ et al., 2005; CANTÓN et al., 2011).

Além das interações específicas de diferentes toxinas no modo de ação em larvas de diferentes insetos, enzimas hidrolíticas secretadas por *Bacillus* também contribuem para uma melhor toxicidade das proteínas CRY na patogenicidade de insetos. Estudos realizados por Soares-Silva. (2017), demonstram que a presença de genes *Cry*, *Cyt* e quitinase (*Chi*), a partir de isolados de *B. thuringiensis* de diversas regiões brasileiras, são ativas contra larvas de *Ae. aegypti*, onde quitinases causam hidrólise da quitina presente na membrana peritrófica do inseto, formando poros que facilitam o contato entre as δ -endotoxinas e seus receptores no epitélio intestinal, contribuindo com o aumento da toxicidade (COSTA et al., 2010; SOARES-SILVA, et al., 2017). Assim, é de grande relevância investigar em linhagens de *Bacillus* novas moléculas com diferentes modos de ação para contribuir na maior toxicidade a insetos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Selecionar *Bacillus* spp. isolados de ambientes Amazônicos, com potencial para produção de proteínas CRY e enzimas β -glucanases para o controle de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório.

3.2 Específicos

- Identificar por métodos fenotípicos e moleculares, as linhagens bacterianas;
- Triar, por biologia molecular, linhagens portadoras dos genes *Cry4Ba*, *Cry11* (codificadores de proteínas CRY) e o gene *Bsglu* (codificador de enzimas β -glucanases);
- Avaliar o potencial larvicida por meio de bioensaios quantitativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. *Estudos avançados*, v. 26 (74), p. 151–166, 2012.
- ALVES, S. B. **Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens**. In: (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Manole, p. 1163, 1998.
- ANGELO, E. A., VILAS-BÔAS, G. T., CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.. *Bacillus thuringiensis*: Características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILASBÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: **Estratégias no controle biológico**. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). *Biotechnology: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: Agropecuária, p. 269-293, 2002.
- BARA, M. T. F.; LIMA, A. L.; & ULHOA, C. J.. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 1, p. 81–85, 2003.
- BARA, M.T.F.; LIMA AL & ULHOA, C.J. Purification and characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 219, p. 81–85, 2003.
- BAUERMEISTER A.; REZENDE, M. I.; GIESE E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.
- BRASIL. 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 7 de 2019, v. 50, 2019.
- BERRY, C.; CRICKMORE, N.; Structural classification of insecticidal proteins - towards an in silico characterisation of novel toxins. **J Invertebr Pathol**;142:16–22, . 2016.
- BESERRA, E. B.; CASTRO JR, F. P. Biologia Comparada de Populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1. Londrina Jan./Feb, 2008.
- BOYCE, A.; WALSH, G.; Production, purification and applicationrelevant characterization of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 76, p.835–841, 2007.

BRAGATTO, I.; GENTA, F. A.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R.; & FERREIRA, C.. Characterization of a β -1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to β -glucan-binding proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 40(12), 861–872, 2010.

BRASIL - MMA-MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Biodiversidade brasileira. www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira, 2018. Acesso em dez de 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 2017.b. Boletim da febre amarela 2017. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/27663-ministerio-da-saude-atualiza-casos-notificados-de-febre-amarela-no-pais-20022017>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Secretaria de Atenção Básica **Chikungunya: Manejo Clínico**/Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2018. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>. Acesso em 10 de fevereiro de 2019.

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

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

BRAVO, A.; GILL, SS.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert, LI.; Iatrou, K.; Gill, SS., editors. **Comprehensive Molecular Insect Science**. p. 175-206, 2005.

BRAVO, A; GILL SS, SOBERON M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**; v. 49, p.423–435, 2007.

BURKETT-CADENA, N. D.; VITTOR, A. Y. Deforestation and vector-borne: Forest conversion favors important mosquito vectors of human pathogens. **Basic and Applied Ecology**, v. 26, p. 101-110, 2018.

BURT, F. J., ROLPH M, RULLI NE. S., MAHALINGAM S., HEISE M. T. Chikungunya: um vírus re-emergente. **Lanceta**. 2012.

CALVET, G., AGUIAR, R. S., MELO, A. S., SAMPAIO, S. A., FILIPPIS, I., FABRI, A. Detecção e seqüenciamento de vírus Zika a partir de líquido amniótico de fetos com microcefalia no Brasil: um estudo de caso, **Lancet Infect Dis**, p. 653-60, 2016.

CANTÓN, P. E., REYES, E. Z., DE ESCUDERO, I. R., BRAVO, A., & SOBERÓN, M. Binding of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 595–600, 2011.

CAZORLA, F. M., ROMERO, D., PEREZ-GARDA, A., LUGTENBERG, B. J. J., VICENTE, A. DE. AND BLOMBERG, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. **J. Appl. Microbiol**, v. 103, p. 1950-1959, 2007.

CHAARI, F., A.; KAMOUN, F.; BIHRI, M.; BIBECH, R., ELLOUZE-GHROBEL AND S.; ELLOUZ-CHAABOUNI. Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea mace as a novel solid support. **J. Ind. Crop. Prod**, v. 40, p. 192-198, 2012.

CHEN Y., XU H; ZHOU M; WANG Y; WANG S; ZHANG J;. Salecan Enhances the Activities of β -1,3-Glucanase and Decreases the Biomass of Soil- Borne Fungi. **PLoS ONE**, v. 10, n.8, 2015.

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

COSTA, R. A.; CHOUPINA, A. β -glucanases enzymes – appliance of polysaccharides hydrolysis. v. 6, n.2, 2013.

CRICKMORE, N., 2017. Full list of delta-endotoxins <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em 12/12/2018

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, DR.; SCHNEPF, E.; VAN, RIE. J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, DH. *Bacillus thuringiensis* **toxin nomenclature**, 2010.

DE BARROS MOREIRA BELTRÃO, H.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. israelensis Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 2, p. 163–169, 2007.

DEWI, R. T. K.; MUBARIK, N. R.; SUHARTONO, M. T. Medium optimization of-glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 116–125, 2016.

DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. **Annu Rev Environ Resour**, p.28:137–67, 2003.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A.R. R.; VON ZUBEN, A. P. B.; Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev Saude Publica**, p. 51-30, 2017.

DONOVAN, W.P., ENGLEMAN, J.T., DONOVAN, J.C., BAUM, J.A., BUNKERS, G.J., CHI, D.J., CLINTON, W., ENGLISH, L., HECK, G.R., ILAGAN, O.M., KRASOMIL-OSTERFELD, K.C., PITKIN, J.W., ROBERTS, J.K., & WALTERS, M.R. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 713-719, 2006.

DU, C.; NICKERSON, K. W., *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: Physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.10, p. 3722-3726, 1996.

EDISON, L. K.; SHIBURAJ, S.; PRADEEP, N. S., Microbial Beta Glucanase from *Streptomyces* sp. – **Journal Of Biodiversity And Conservation An insight into Western Ghats regions**, v. 1, n. 1, 2017.

ELGHARBI, F.; BEN HLIMA, H.; AMERI, R., BEJAR, S.; & HMIDA-SAYARI, A. A trimeric and thermostable lichenase from *B. pumilus* US570 strain: Biochemical and molecular characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 273–280, 2017.

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

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W; MULIS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, 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 American**, v. 93, p. 5389–5394, 1996.

FAN, L., HOU, F.; MUHAMMAD, A. I.; RUILING, L. V.; WATHARKAR, R. B.; GUO, M.; LIU, D. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores. **Food Research International**, v. 116, p.1094-1102, 2018.

FIOCRUCZ. **Dengue: Vírus e vetor.** Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>. Acesso em: 15 de janeiro de 2018.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I., BERIĆ, T.; LOZO, J.; & STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p.44-55, 2018.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2008.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2002.

FRANCIS, I; HOLSTERS, M; VEREECKE D: The Gram-positive side of plant–microbe interactions. **Environ Microbiol**, v 1, p. 1-12, 2010.

FURTADO, G. P; RIBEIRO, L. F; SANTOS, C. R; TONOLI, C. C; SOUZA, R. S; OLIVEIRA, R. R; MURAKAMI, M. T; WARD, R. J. Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1202–1206, 2011.

GALZER, E. C. W.; AZEVEDO FILHO, W. S. de. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, vol 1. N. 1, 2016.

GARCIA-RAMON, D. C.; MOLINA, A. C.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. 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**, v. 100, p. 3637-3654, 2016.

GEETHA, I.; MANONMANI, A. M.; & PRABAKARAN, G.. *Bacillus amyloliquefaciens*: A mosquitocidal bacterium from mangrove forests of Andaman & Nicobar islands, India. **Acta Tropica**, v. 120, n. 3, p. 155–159, 2011.

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 Vectorrand. Environm. Health Perspectives**. 109 (2): 223-233, 2001.

GOLDENKOVA-PAVLOVA, I. V.; TYURIN, A. A.; & MUSTAFAEV, O. N. The features that distinguish lichenases from other polysaccharide-hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 9, p. 3951–3965, 2018.

GUO, S.; LI, X.; HE, P.; HO, H.; WU, Y.; HE, Y. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 42, 925–937, 2015.

GUZMAN, A. & ISTÚRIZ, E. RAUL: Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial. Agents**, v. 36, p. 40-42, 2010.

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

HERNÁNDEZ-MARTINÉZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J: Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 78-81, 2013.

HRMOVA, M; BANIK, M; HARVEY, A. J; GARRETT, T. P; VARGHESE, J. N; HØJ, P.B; FINCHER, G.B: Polysaccharide hydrolases in germinated barley and their role in the depolymerization of plant and fungal cell walls. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 67-72, 1997.

JUNG, Y. J.; LEE, Y. S.; PARK, I. H.; CHANDRA, M. S.; KIM, K. K; CHOI, Y. L. Molecular cloning, purification and characterization of thermostable β -1,3-1,4 glucanase from *Bacillus subtilis* A8-8. **Indian J Biochem Biophys**, v. 47, p. 203–210, 2010.

KIM, Y. R.; KIM, E. Y.; LEE, J. M.; KIM, J. K.; KONG, I. S. Characterisation of a novel *Bacillus* sp. SJ-10 b-1,3-1,4-glucanase isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented fish. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 36, p. 721–727, 2013.

KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 184- 199, 2015.

LANCIOTTI, R. S; LAMBERT, A. J. Análise filogenética de estirpes de vírus Chikungunya que circulam no hemisfério ocidental. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 4, p. 800-803, 2016.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P. CHUENCHITT, S., Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biol Technol**, v. 48, p. 113-121, 2008.

LEMES, A. R. N. **Proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis*: sinergismo e efeito subletal no controle de *Heliothis virescens***. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal – São Paulo, 2012.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p. 36-42, 2005.

LIMA, A. O. S. QUECINE, M. C.; FUNGARO, M. H.; ANDREOTE, F. D.; MACCHERONI, W. JR.; ARAÚJO, W. L.; SILVA-FILHO, M. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 1, p. 57–65, 2005.

LIMA, G. M. S.; Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p.119-137, 2010.

LOBO, K. S.; SOARES-DA-SILVA, J.; SILVA, M. C.; TADEI, W. P.; POLANCZYK, R. A.; PINHEIRO, V. C. S. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Rev. Brasil. Entomol**, v. 62, p. 5-12, 2017.

LOGAN, N.A. and DE VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: De Vos, P., GARRITY, G.M., JONES, D., KRIEG, N.R., LUDWIG, W., RAINEY, F.A., SCHLEIFER, K.H. AND WHITMAN, W.B., EDS., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Edition, Springer, New York, v. 3, p. 21-128, 2009.

LOGAN, N.A.; HALKET, G. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endosporeforming Bacteria. Em: Endospore-Forming Soil Bacteria. **Springer**, 1^a. Ed, 2011.

LORRAQUE, M.; R. BARRIOT, A.; BARRE, P.; ROUGE, B.; DUMAS AND E. GAULIN. The unique architecture and function of cellulose- interacting protein in oomycetes revealed by genomic and structural analyses. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1-5, 2012.

LUDWIG, W. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 1, p. 181–190, 1997.

LUNA-FINKLER, C. L. & FINKLER, L. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters, **Insecticides - Advances in Integrated Pest Management**, Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-780-2, 2012.

LUO, H.; YANG, J.; YANG.; YANG, P.; LI, J.; HUANG, H.; SHI, P.; BAI, Y.; WANG, Y., FAN, Y.; and YAO, B. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo-beta-1,3-

1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1015-10123, 2010.

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

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (Eds.). **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed., 2010.

MAO, S., GAO, P., LU, Z., LU, F., ZHANG, C., ZHAO, H. AND BIE, X., Engineering of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9 to improve its catalytic efficiency. **J. Sci. Food Agric.**, v. 96, p. 109–115, 2016.

MARÇAL JR., O. & A. DOS SANTOS. Infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e incidência do dengue no espaço urbano: Um estudo de caso. **Cam. Geograf**, v.15, p. 241-251, 2004.

MARTIN.; K.; MCDOUGALL, B. M.; MCILROY, S, CHEN, J.; SEVIOUR, R. J.; Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and b-(1,6)-glucanases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, p. 168–192, 2007.

MASCHERETTI, M.; TENGAN, C. H.; SATO, H. K.; SUZUKI, A.; SOUZA, R. P.; MAEDA, M.; BRASIL, R.; PEREIRA, M.; TUBAKI, R. M.; WANDERLEY, D. M. V.; CASTELO BRANCO, C. M.; RIBEIRO, F. A. Yellow fever: Reemerging in the state of São Paulo, Brazil. **Revista de Saude Pública**, v. 47, n. 5, p. 881–889, 2013.

MCCARTHY, T.; HANNIFFY, O.; SAVAGE. A.; TUOHY, M. G.; Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1, 4-and β -1, 3, 1, 4-linked glucans. **Int J Biol Macromol**, v. 33, p.141–148, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA**. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/29369> sala-nacional-passa-a-funcionar-no-ministério-da-saúde. Acesso em 16 de setembro de 2017.

MNIF, I.; & GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection**, v. 77, p. 52–64, 2015.

MOLINA, C. A.; CANA-ROCA, J. F.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 1320–1327, 2010.

MORAES, C. DA. S.; DIAZ-ALBITER, H. M.; FARIA, M. DO V.; SANT'ANNA, M. R. V.; DILLON, R. J.; GENTA, F. A. Expression pattern of glycoside hydrolase genes in *Lutzomyia longipalpis* reveals key enzymes involved in larval digestion. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–16, 2014.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): a new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed**

Forces India, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

PALMA, L., MUNOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P., *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, p. 3296–3325, 2014.

PAN-AMAZÔNIA. **Visão Histórica, Perspectivas de Interação e Crescimento**/organizadores, OSIRIS M. ARAÚJO DA SILVA E ALFREDO KINGO OYAMA HOMMA – Manaus, AM, 2015.

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

PERALTA C, PALMA L. Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 1, p. 39-44, 2017.

PEREIRA J.O., DE SOUZA A.Q.L., DE SOUZA A.D.L., DE CASTRO FRANÇA S., DE OLIVEIRA L.A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, 2017.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L. E.; SUN, J.; FOLCH, J. L.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, 2005.

PÉREZ-GARCÍA A., ROMERO D., & DE VICENTE A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187–193, 2001.

PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 361–382, 2000.

POOPATHI, P.; DE BRITTO, L.J.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; RAGUL, K.; MANI, C.; BALAGANGADHARAN, K. An investigation on the diversity of mosquitocidal bacteria and its relationship with incidence of vector borne diseases. **Trop Biomed.**, v. 32, n. 1, p.84-97, 2015.

RAYMOND, B.; LIJEK, R.S.; GRIFFITHS, R.I.; BONSALE, M.B. Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, n. 1, p. 307-313, 2008.

RICOLDI, M. C.; FIGUEIREDO, C. S.; & DESIDÉRIO, J. A. Toxicity of Cry2 proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain T01-328 against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Arquivos Do Instituto Biológico**. 85, p. 1-7, 2018.

SÁ, V.G.M. de; FONSECA, B.V.C.; BOREGAS, K.G.B.; WAQUIL, J.M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology, Londrina**, v. 38, p. 108-115, 2009.

SAMPSON, M. N. & GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**, v. 144, p. 2189–2194, 1998.

SCHALLMEY, M., SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol**, v. 50:1, p. 17, 2004.

SHARMA, R.; SINGH, J.; & VERMA, N. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 132–139, 2018.

SHODA, M., Bacterial control of plant diseases. **J. Biosci. Bioeng**, v. 89, n. 6, p. 515–521, 2000.

SHRESTHA, A.; SULTANA, R.; CHAE, J.-C.; KIM, K. E LEE, K.-J. . *Bacillus thuringiensis* C25, que é rico em enzimas que degradam a parede celular, controla eficientemente a queda de alface causada por *Sclerotinia minor*. **Revista Europeia de Patologia Vegetal**, v. 142, n. 3, p. 577-589, 2015.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINHEIRO, V.C.S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANZYK, R.A.; TADEI, W.P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 59: 1-6, 2015.

SOUZA NETO JÁ, GUSMAO DS, LEMOS FJA. Chitinolytic activities in the gut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and their role in digestion of chitin-rich srutures. **Comparative biochemistry and Physiology Part A.**, v.136, p. 717 – 724, 2003.

SOUZA, R. S.; DIAZ-ALBITER, H. M.; DILLON, V.M.; DILLON, R. J.; GENTA, F. A. Digestion of yeasts and beta-1,3-glucanases in mosquito larvae: **Physiological and biochemical considerations**. PLoS ONE, v. 11, n. 3, p. 1–16, 2016.

TANG, X. J., G. Q. HE, Q. H. CHEN, X. Y. ZHANG AND M. ALI. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. **Biores. Technol.**, v. 93, p. 175-181, 2004.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. revista da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 75-277, 2006.

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

VON DUNGERN P, BRIEGEL H. Protein catabolism in mosquitoes: ureotely and uricoely in larval and imaginal *Aedes aegypti*. **Journal of insect Physiology**, v. 47, p. 131-141, 2001.

WALTER REED BIOSYSTEMATICS Unit (WRBU). **Mosquito identification resources**. Disponível em: <http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html>. Acesso em: 01/12/2018.

WARREN, R. A.J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 50, p.183-212, 1996.

WHO - World Health Organization, 2017. **Draft global vector control response**. 2017-2030, 2017.

WHO. Dengue and severe dengue. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **The history of Zika virus 2016**. Disponível em: http://www.who.int/bulletin/online_first/16-171082/en/. Acesso em: 01 de dezembro de 2018.

XU, T., ZHU, T., & LI, S. β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.32, n. 2, 2016.

XU, X.; FENG, Y.; FANG, S.; XU, J.; WANG, X.; & GUO, W. Genome-wide characterization of the β -1,3-glucanase gene family in *Gossypium* by comparative analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32.26, 2016.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F. et al. (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Ottawa: **Kluwer Academic Publishers**, p. 81 – 100, 2000.

YANG S, YAN Q, JIANG Z, FAN G, WANG L. Biochemical characterization of a novel thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 5345–5351, 2008.

YU, W. Q.; ZHENG, G. P.; QIU, D. W.; YAN, F. C.; LIU, W. Z.; & LIU, W. X. *Paenibacillus terrae* NK3-4: A Potential Biocontrol Agent that Produces β -1,3-Glucanase. **Biological Control**, v. 129, p. 92-101, 2018.

ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C. **Controle Biológico - Pragas e Doenças**. Viçosa: Editora UFV 310 pL., 2009.

ZANLUCA, C.; MELO, V.C.; MOSIMANN, A.L.; SANTOS, G. I.; SANTOS, C.N.; LUZ, K. Primeiro relato de transmissão autóctone do vírus Zika no Brasil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*; v, 110, n. 4, p. 569-72. [Http://doi.org/10.1590/0074-02760150192](http://doi.org/10.1590/0074-02760150192), 2015.

ZARA, A. L. S. A.; DOS SANTOS, A. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO G. E; *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Epidemiol. ServSaúde**, v. 25 n.2, p. 392-404, 2016.

ZEIGLER, D. R.; PRAGAI, Z.; RODRIGUEZ, S.; CHEVREUX, B.; MUFFLER, A.; ALBERT, T.; PERKINS, J. B. The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 6983–6995, 2008.

CAPÍTULO

**POTENCIAL METABÓLICO INTRACELULAR DE *Bacillus* spp.,
ISOLADOS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS PORTADORES DOS
GENES *Cry E* *BS-glu* (β -GLUCANASE), TÓXICOS PARA *Aedes aegypti*
Linnaeus, 1762**

POTENCIAL METABÓLICO INTRACELULAR DE *Bacillus* spp., ISOLADOS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS PORTADORES DOS GENES *Cry* E *BS-glu* (β -GLUCANASE), TÓXICOS PARA *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

MUNIZ, V.A¹; KATAK, R.M²; OLIVEIRA, J.C¹; ROCHA, E.M²; TADEI, W. P³.

¹Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas; ²Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas; ³Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor dos arbovirus Dengue, Zika e Chikungunya, os quais causam agravos à saúde pública, em diversas regiões do mundo. O controle do vetor é a melhor forma de amenizar esta problemática, que pode ser de caráter socioeducativo, físico, químico e biológico. Contudo, os produtos químicos ocasionam impactos negativos ao meio ambiente e aos seres humanos. O uso de microrganismos entomopatogênicos, principalmente bactérias do gênero *Bacillus* torna-se uma alternativa promissora, no combate a este mosquito. O objetivo deste estudo foi selecionar bactérias isoladas de ambientes amazônicos, portadoras dos genes *Cry* e *BS-glu*, com potencial larvicida, para contribuir no controle de populações de *Ae. aegypti*. Neste trabalho foram obtidas 21 linhagens de coleções de trabalhos acadêmicos, provenientes de solos, água, planta e inseto de diferentes ambientes amazônicos. As linhagens de bacilos deste estudo foram submetidas ao método de reação de PCR com a utilização da sequência de nucleotídeos que codifica para o gene *rRNA16S*. No total 20 linhagens bacterianas foram identificadas, pertencentes aos seguintes gêneros: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Serratia* e *Achromobacter*. Posteriormente, foi realizada PCR para caracterização dos genes *Cry4Ba*, *Cry11e* *BS-glu*. Os resultados mostraram que das 21 linhagens analisadas, seis linhagens - SPa09, SPa04, 15PHA, BtAM06, R22 e GD 02.13 - apresentaram amplificação para o gene *Cry4Ba*. Considerando o gene *BS-glu*, duas linhagens - SBC2 e cepa padrão Bti001 - amplificaram para o referido gene. Na avaliação da atividade larvicida foram realizados os bioensaios quantitativos com 21 linhagens de bacilos contra larvas de *Ae. aegypti*. Os resultados dos bioensaios quantitativos demonstraram que sete linhagens, foram promissoras nos ensaios com a biomassa bacteriana, onde cinco - R22ISP2, GDO2.13NA, BtAM06, BtAM49LB e SPa09NA - apresentaram 100% de mortalidade em todas as concentrações - 133 mg/L, 66.6 mg/L, 33.3 mg/L, 16.6 mg/L, 8.33 mg/L e 4.16 mg/L em 24 horas de exposição. O mesmo resultado foi observado para a linhagem padrão Bti001 - *B. thuringiensis* que apresentou 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas. No ensaio com biomassa autoclavada, apenas a linhagem R22 apresentou de 90 a 100 % de mortalidade, em 72 horas de exposição. Desta forma, os resultados deste trabalho fornecem informações relevantes do potencial larvicida de linhagens de bacilos isolados de diferentes ambientes amazônicos, que podem ser utilizadas nas ações de controle biológico do *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: Microbiota amazônica, proteínas inseticidas, enzimas hidrolíticas, controle vetorial.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is a vector of the arboviruses Dengue, Zika and Chikungunya, which cause public health problems in several regions of the world. Vector control is the best way to alleviate this problem, which may be socio-educational, physical, chemical and biological. However, chemicals cause negative impacts on the environment and humans. The use of entomopathogenic microorganisms, mainly bacteria of the genus *Bacillus*, becomes a promising alternative in the fight against this mosquito. The objective of this study was to select bacteria isolated from Amazonian environments, carrying the *Cry* and *BS-glu* genes, with larvicidal potential, to contribute to the control of *Ae. aegypti*. In this work 21 lines of collections of academic papers were obtained from soils, water, plant and insect from different Amazonian environments. The bacilli strains of this study were submitted to the PCR reaction using the nucleotide sequence encoding the *rRNA16S* gene. In total, 20 bacterial strains were identified, belonging to the following genera: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Serratia* and *Achromobacter*. PCR was then performed to characterize the *Cry4Ba*, *Cry11* and *BS-glu* genes. The results showed that of the 21 lines analyzed, six lines - SPa09, SPa04, 15PHA, BtAM06, R22 and GD 02.13 - presented amplification for the *Cry4Ba* gene. Considering the *BS-glu* gene, two strains - SBC2 and standard strain Bti001- amplified for said gene. In the evaluation of the larvicidal activity the quantitative bioassays with 21 strains of bacilli against *Ae. aegypti*. The results of the quantitative bioassays showed that seven lines were promising in the bacterial biomass assays, where five - R22ISP2, GDO2.13NA, BtAM06, BtAM49LB and SPa09NA - presented 100% mortality in all concentrations - 133 mg / L, 66.6 mg / L, 33.3 mg / L, 16.6 mg / L, 8.33 mg / L and 4.16 mg / L in 24 hours of exposure. The same result was observed for the standard strain Bti001 - *B. thuringiensis* which showed 100% mortality at all concentrations tested. In the assay with autoclaved biomass, only the R22 line showed 90 to 100% mortality in 72 hours of exposure. In this way, the results of this work provide relevant information about the larvicidal potential of strains of isolated bacilli from different Amazonian environments, which can be used in biological control actions of *Ae. aegypti*.

Keywords: Amazonian microbial, insecticidal proteins, hydrolytic enzymes, vector control.

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia brasileira abriga um elevado número de insetos hematófagos, vetores de doenças de importância médica, como mosquitos do gênero *Aedes*. Dentre as espécies deste gênero, o mosquito *Aedes aegypti* é vetor primário de diversos arbovírus que causam agravos à saúde humana. Este mosquito é amplamente distribuído em zonas tropicais e subtropicais, vive em áreas urbanas próximas aos seres humanos, principalmente em criadouros artificiais (KRAEMER et al., 2015; LIMA-CAMARA, 2016). As fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*, por serem hematófagas, estão entre os maiores transmissores de patógenos que causam a

disseminação de diversas arboviroses como: dengue, chikungunya, zika, febre amarela urbana, tornando-se um grande problema de saúde pública (BENELLI, 2015; DHAYALAN et al 2018).

O controle do vetor é a principal estratégia adotada para reduzir a incidência de doenças, que causam milhares de óbitos em várias regiões do mundo. Assim, há diversos tipos de controle vetorial que vêm sendo utilizado, como as medidas socioeducativas, o controle físico, químico e biológico (ALVES, 1998; ARANTES et al., 2002, ZARA et al. 2016). Apesar das medidas serem eficientes para controlar a proliferação destes mosquitos, o uso contínuo de produtos químicos ocasiona vários prejuízos ambientais como diminuição da biodiversidade natural, seleção de mosquitos resistentes, assim como causa diversas complicações de saúde para os seres humanos (HARRINGTON et al 2013, CHENGALA, 2017). Entretanto, o controle biológico possui vantagens com a utilização de microrganismos, que secretam moléculas tóxicas a diferentes ordens de insetos, sendo considerada segura por serem inócuas a mamíferos, plantas e outros invertebrados (LUNA-FINKLER & FINKLER, 2012).

Atualmente há vários estudos com a utilização de moléculas como, por exemplo, proteínas CRY, CYT, VIP, oriundas de microrganismos que apresentam ação tóxica a este mosquito (DONOVAN et al., 2006, SOARES-SILVA et al, 2015, LOBO et al., 2017). Além destas moléculas, as enzimas hidrolíticas quitinases, glucanases, proteases, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, estão sendo empregadas em programas de controle biológico de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas. Estes microrganismos apresentam capacidade de secretar uma diversidade de enzimas, em meio de cultura, relevantes em diversos processos industriais, ambientais de controle biológico (SCHALLMEY et al, 2004; INCA-TORRES et al, 2018).

Considerando o potencial das proteínas CRY, estudos mostram que essas moléculas apresentam capacidade de interagir com outros fatores de virulência, ocasionando maiores efeitos de mortalidade, em diversas ordens de insetos. Estudos relatam sinergismo de proteínas CRY com proteínas CYT, VIP e enzimas quitinases em populações de mosquitos *Ae. aegypti* (COSTA, et al., 2010; SWIONTEK et al, 2013; PALMA et al. 2014, ELLEUCH et al., 2015).

As enzimas quitinases, proteases e glucanases são importantes em mecanismo de patogenicidade, pois atuam na hidrólise de substratos presentes na parede celular de organismos patogênicos (PLANAS, 2000, SHARMA et al., 2018). Assim, as β -glucanases destacam-se por apresentar importante mecanismo de sinergismo com outras moléculas, atuando na hidrólise do β -glucano, componente da parede celular de fungos fitopatogênicos. Além disso, estudos relatam que o gênero *Bacillus* é portador de genes que codificam enzimas β -glucanases, com atividade antifúngica e antimicrobiana (GAISER et al., 2006; QIAO, 2008; XU et al., 2016).

Apesar da ampla diversidade de microrganismos distribuídos em diferentes ambientes amazônicos e seu potencial metabólico, torna-se necessário investigar novas moléculas inseticidas, para o controle biológico de insetos vetores. O presente estudo teve por objetivo, avaliar a presença dos genes *Cry* e *BS-glu* em *Bacillus* spp., isolados de ambientes amazônicos com potencial larvicida, visando contribuir para o controle biológico de *Ae. aegypti*. Considerando os resultados deste estudo, as linhagens que apresentaram potencial larvicida e a presença dos genes de interesse, tornam-se promissoras para estudos no controle deste vetor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Amazônia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA.

2.1 Reativação de bacilos

Foram obtidas 21 linhagens bacterianas da Coleção de Bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Amazônia (INPA). Em tubos de ensaio com capacidade de 20 mL, contendo 2 mL do meio Nutriente Broth (NB) (5g de tecido animal, 5g cloreto de sódio, 1.5g extrato de carne, 1.5g de extrato de levedura), Luria bertani (LB) (5g de extrato de levedura, 10g peptona de caseína, 10g cloreto de sódio) e ISP2 (10 amido, 10g extrato de malte, 4 g extrato de levedura, 4 g dextrose), foram adicionados 20 µL do cultivo bacteriano, de acordo com o meio que estes microrganismos estavam preservados. Em seguida, foram incubados em estufa rotativa 30°C e 180 rpm, por 24 h ou 48 h, até atingir o crescimento padrão de número 2, comparado à turbidez da escala de McFarland (3×10^8 n° células). Após isso, 20 µL deste cultivo foram transferidos para placas de Petri, contendo os respectivos meios. Posteriormente, com uma alça de Drigalsky embebida em álcool 70% e flambada em bico de Bunsen foi feito o espalhamento. As placas foram incubadas em estufa a 28°C, por 24 horas ou 48 horas para o crescimento das colônias. Posteriormente, com auxílio de uma alça de platina, foi feita purificação das colônias pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas.

2.2 Caracterização fenotípica dos bacilos reativados (morfologia e Coloração de Gram)

As características morfológicas de todas as colônias foram analisadas pelo método de Gram (MARTINEZ & TADEI, 2008) e este procedimento possibilitou caracterizar fenotipicamente as linhagens bacterianas. Inicialmente, foram adicionados 10 µL de água deionizada em lâminas de vidro esterilizadas. Em seguida, com uma alça de platina embebida

em álcool 70% e flambada em bico de Bunsen, foi adicionada uma colônia isolada e friccionada para a homogeneização e fixação em temperatura ambiente, após isso, foi adicionado o reagente cristal violeta de genciana por 1 min e lavada em água corrente. Em seguida, adicionou-se o lugol por 60 segundos e o descolorante de solução álcool-acetona durante 15 segundos, seguido de lavagem em água corrente. Posteriormente, foi adicionada a solução de fuccina durante 30 segundos e lavada em água corrente. Após secas, as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico na lente objetiva (100X), utilizando-se óleo de imersão. Em seguida, foi feita a preservação das linhagens com adição de 20% de glicerol (v/v) e 800 µL do cultivo bacteriano em tubos criogênicos, os quais foram armazenados em freezer a -20°C, para a realização de estudos posteriores.

As colônias bacterianas foram caracterizadas morfológicamente de acordo com o protocolo estabelecido por Fonseca et al. (2000), sendo considerados os seguintes aspectos: tamanho (>2 mm, 1-2mm, puntiforme), forma (circular ou irregular), borda (lisa ou ondulada), homogeneidade (homogênea ou heterogênea), cor (amarelo, amarelo claro, amarelo esverdeado, amarelo forte, creme e branco), transparência (transparente ou opaca), elevação (presença ou ausência), muco (pouco, médio e muito).

2.3 Identificação molecular bacteriana

Na identificação molecular bacteriana, o procedimento consistiu das seguintes etapas: Extração de DNA genômico das linhagens bacterianas, amplificação por PCR da região 16S rRNA, sequenciamento e comparação das sequências obtidas com banco de dados de nucleotídeos públicos.

2.3.1 Extração do DNA genômico

Para todas as extrações realizadas neste trabalho, foi utilizado o produto Matriz InstaGene™ da empresa BioRad e o protocolo de utilização é descrito a seguir: Uma pequena quantidade (0,001g) de massa bacteriana foi adicionada em um tubo de microcentrifuga de 1,5ml contendo 1ml de água ultrapura autoclavada. A mistura foi então homogeneizada e incubada à temperatura de 29 °C durante 25 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 12.000 rpm durante 3 minutos e depois o sobrenadante foi cuidadosamente removido de modo a não agitar o sedimento. Logo após, 200µl da matriz InstaGene™ foram adicionados ao pellet, homogeneizados em vórtex por 10 segundos e incubados a 56 °C em banho maria por 25

minutos. Em seguida, o tubo foi submetido ao vórtex durante 10 segundos e incubado em banho maria a 100 °C durante 8 minutos. Após isso o tubo foi novamente agitado em vórtex durante 10 segundos e depois centrifugado a 12.000 rpm durante 3 minutos. Por fim o sobrenadante foi quantificado num espectrofotômetro e ajustado para 150ng de DNA, depois transferido para outro tubo e armazenado a -20 °C para a utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.3.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação da região 16S rDNA

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

As reações de amplificação do gene 16S consistiram em um volume final de 25µL utilizando o kit Taq Pol - Master mix 2X (Cellco Biotec) seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados, para cada reação, 12,5µL de Mix; 1µL DNA (150 ng/µL); 10,5µL de H₂O milli-Q e 0,5µL (10pMol) de cada primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3').

As reações foram realizadas em termociclador Thermal Cycler[®]. 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 95°C por 1 min, pareamento dos primers a 54°C por 40 seg e extensão a 72°C por 1 min e 30 seg. Ao final, um ciclo de extensão a 72°C por 5 min.

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

2.3.3 Purificação das amostras

Os fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando PCR Purification Kit (Cellco Biotec), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento.

2.3.4 Sequenciamento do gene *16S rDNA*

Foi utilizado o kit de sequenciamento BidDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 0,5µL (10pMol) dos mesmos oligonucleotídeos utilizados para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento ABI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências. As sequências foram analisadas com os programas BioEdit 7.2 e 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.

2.3.5 Análises das sequências por bioinformática

O consenso das sequências 5´- 3´ de cada linhagem bacteriana foi feito utilizando a ferramenta CAP3. Este programa realiza a montagem de sequência contígua, a partir dos arquivos “fasta.screen”, do programa Bioedit 7.0.5. Após a obtenção do consenso das sequências, foi feita uma busca comparativa no banco de genomas bacterianos depositados no “GenBank” utilizando a ferramenta BLASTn do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI).

Na avaliação da semelhança das sequências de DNA das linhagens bacterianas deste trabalho com outros grupos bacterianos, foi feito um alinhamento em conjunto das sequências dos isolados obtidos, juntamente com sequências de estirpes de referência obtidas no banco de dados do GenBank-BLASTn. Os alinhamentos destas sequências foram realizados utilizando-se o programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999), usando a ferramenta ClustalW.

2.4 Caracterização gênica *Cry4Ba*, *Cry11Gral* e *BS-glu*

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para detectar a presença do gene *Cry4* nas linhagens de bacilos, tóxicas as larvas de *Ae. aegypti*.

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

Na caracterização dos genes *Cry4Ba*, *Cry11Gral* e *Bsglu*, o DNA genômico das linhagens foi diluído e submetido à técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores

mostrados na Tabela 1. Os primers foram elaborados com base na sequência do gene *Cry4Ba* e *Cry11Gral*. Os primers do gene *BS-glu* foram projetados com base na sequência do gene *BS-glu* (QIAO, 2008) e no alinhamento das sequências de três genes de β -1,3-1,4-glucanase de *Bacillus subtilis* MA139, com o acesso do GenBank U60830, AF490978 e Z46862, respectivamente. Os primers foram fornecidos comercialmente pela empresa Exxtend Solução em Oligos. A cepa padrão Bti001 foi utilizada como controle positivo e, para o controle negativo, o DNA foi substituído por água ultrapura.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). As reações de amplificação dos genes *Cry4Ba* e *Cry11Gral* e *BS-glu* consistiram em um volume final de 25 μ L utilizando o kit Taq Pol - Master mix 2X (Cellco Biotec) seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados para cada reação 12,5 μ L de Mix; 1 μ L DNA (150 ng/ μ L); 10,5 μ L de H₂O milli-Q e 0,5 μ L (10pMol) de cada primer descritos na tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *Cry4Ba*, *Cry11* e *BS-glu*.

Gene	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Cry4Ba</i>	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC3'(f) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT3'(r)	351
<i>Cry11gral</i>	5'-CGCTTACAGGATGGATAGG(f) 5'-GCTGAAACGGCACGAATATAATA(r)	342-352
<i>BS-glu</i>	5' GGATTGTTTATGAGTTTGT3'(f) 5'TTATTTTTTTGCTATAGCGCA3'(r)	690

(f): foward; (r): reverso

As condições térmicas para amplificação do gene *Cry4Ba* e *Cry11* foram programadas de acordo com as respectivas especificações descritas a seguir: desnaturação inicial a 95 °C 5min, desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 66 °C por 1 min, polimerização a 72 °C por 1min, extensão final a 72 °C por 5 min e hold 4 °C ∞ em um total de 35 ciclos.

As condições do gene *BS-glu* foram programadas de acordo com as respectivas especificações descritas a seguir: desnaturação inicial 95 °C por 3min, desnaturação 95 °C por 30 seg, anelamento 54 °C por 30seg, polimerização 72 °C por 1:50 min, extensão final 72 °C por 10 min e hold 4 °C ∞ em um total de 40 ciclos.

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA oriundos da técnica de PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1% para os genes *Cry4Ba* e *Cry11*, e para o gene *BS-glu*, o gel foi de 1%. Foram retirados 3 μ L de cada amostra da PCR, este foram adicionados

em 3 μ L do corante Loading Buffer contendo Gel Red (0,5mg/mL). As amostras foram aplicadas no gel de agarose, sendo este submetido à corrida eletroforética a noventa volts, durante 90 min, conduzidas em tampão TEB [1X] (89mM de Tris; 89mM de ácido bórico e 2,5mM de EDTA, pH 8,2). Em cada reação de eletroforese foi incluído o DNA *Ladder* 1 Kb (Fermentas), como padrão de peso molecular, o qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados. Os géis com fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador ultravioleta e fotografados em aparelho TCL *Documentation* (Vilber lourmat).

2.5 Atividade larvicida

A partir da obtenção de 21 linhagens tóxicas contra larvas de *Ae. aegypti*, foram realizados os bioensaios quantitativos com a biomassa bacteriana. Estes testes foram realizados em temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 80% e foto período de 12 horas.

2.5.1 Obtenção e manutenção das larvas de *Aedes aegypti*

Na obtenção das larvas, foram utilizados ovos da colônia do Insetário do Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Para a eclosão das larvas, os ovos foram colocados em bacias de plástico retangulares (12 x 22 x 4 cm) contendo 200 mL de água. Após a eclosão das larvas, foi adicionada a alimentação que consistiu na mistura da ração (Teklab global) e da ração Wiskas®, na proporção de 1:1 (LIMA, 2007).

As larvas foram mantidas em temperatura média de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa em torno de 80% a 90% e fotofase de 12 horas. Foram selecionadas para os bioensaios, larvas de 3º instar (L3) e as demais permaneceram na bacia até a fase de pupa. Em seguida, as pupas foram adicionadas em copos de plásticos e inseridas em gaiolas padronizadas (18 cm de diâmetro x 17 cm de altura) para a emergência dos mosquitos adultos e manutenção da colônia. Para estes, foi adicionada em Erlenmeyers água com solução de sacarose a 10% embebido em algodão. No repasto sanguíneo utilizou-se hamsters (*Mesocricetus auratus*), durante 30 min sobre as gaiolas, os quais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e xilazina, como indicado no “Formulary of laboratory animals”, compilado por C. Terrance Hawk e Stevenb L. Leary, 1995, (CEUA: 026/2016).

2.5.2 Escala preparativa de cultivo de bacilos

Inicialmente foram cultivadas 21 linhagens com potencial tóxico contra larvas de *Ae. aegypti* nos respectivos meios de preservação Nutriente Ágar (NA) (5g de tecido animal, 5g cloreto de sódio, 1.5g extrato de carne, 1.5g de extrato de levedura), Luria bertani (LB) (5g de extrato de levedura, 10g peptona de caseína, 10g cloreto de sódio) e ISP2 (10 amido, 10g extrato de malte, 4 g extrato de levedura, 4 g dextrose). Em tubos de ensaios, contendo 2 mL dos meios descritos anteriormente, foram adicionados 20 µL do cultivo bacteriano e incubados na estufa rotativa a 30 °C, 180 rpm, por 24 h. Após isso, 50 µL do cultivo de cada linhagem foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL dos respectivos meios em triplicata. Em seguida, incubados a 30°C, 180 rpm por 120 horas, até atingir o nível 8 de crescimento comparado a turbidez da escala de Macfarland (18, 10⁸ cel/mL). Em seguida, 40 mL das amostras foram distribuídas em tubos falcon (50 mL) e centrifugadas a 4°C e 5000 xg por 30 min. O pellet obtido foi feito por dois tratamentos, primeiro utilizou-se o tratamento com calor em temperatura de 121°C durante 30 minutos e o outro sem tratamento térmico. Em seguida, as amostras foram previamente congeladas e liofilizadas em aparelho Liofilizador (Enterprise I, TERRONI) durante 24 a 48 horas.

2.5.3 Bioensaios quantitativos com larvas de *Ae. aegypti*

Os bioensaios quantitativos foram preparados de acordo com Dulmage et al (1990) e OMS (2005). Nestes bioensaios, para cada linhagem de bacilos, foram utilizadas seis concentrações - 133mg/L, 66.6 mg/L, 33.3 mg/L, 16.6 mg/L, 8.33 mg/L, 4.26 mg/L. Em cada concentração foram preparados cinco copos de plástico, com capacidade de 180mL, cada um contendo 20 larvas de terceiro instar de *A. aegypti* em um volume final de 150 mL. Para o controle negativo, foi preparado um copo de plástico seguindo o mesmo procedimento, mas sem bactérias, e o controle positivo continha a cepa padrão (Bti001). Os bioensaios foram realizados em quintuplicata, seguidos de três repetições em dias diferentes e leituras de mortalidade em 24, 48 e 72 horas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização fenotípica dos bacilos (morfologia e coloração de Gram)

A partir da reativação das linhagens bacterianas, foi possível caracterizar, por métodos fenotípicos, 21 linhagens de bacilos (Tabela 2). Neste procedimento, observou-se por meio da

caracterização morfo-tintorial a visualização em microscopia óptica das linhagens com características em formato de bastonetes com extremidade reta ou de ponta arredondada. As 21 colônias bacterianas, apresentaram características de bacilos gram positivos (Tabela 2).

Tabela 2: Características morfológicas e coloração de Gram de bacilos de diferentes ambientes amazônicos.

Nº	LINHAGENS	SUBSTRATOS	MORF	GRAM
1	SBC1LB	Solo	Bacilo	+
2	SBC2LB	Solo	Bacilo	+
3	SMP1.1ISP2	Solo	Bacilo	+
4	SPa03ISP2	Solo	Bacilo	+
5	SPa04NA	Solo	Bacilo	+
6	SPa07NA	Solo	Bacilo	+
7	SPa09NA	Solo	Bacilo	+
8	BtAM06NA	Solo	Bacilo	+
9	BtAM49LB	Solo	Bacilo	+
10	SPO4NA	Água	Bacilo	+
11	SGD01.NA	Água	Bacilo	+
12	GD02.3NA	Água	Bacilo	+
13	GD02.13NA	Água	Bacilo	+
14	26ME	Água	Bacilo	+
15	15PHALB	Planta	Bacilo	+
16	59PHAisp2	Planta	Bacilo	+
17	R17isp2	Planta	Bacilo	+
18	58PHAisp2	Planta	Bacilo	+
19	R22isp2	Planta	Bacilo	+
20	R11isp2	Planta	Bacilo	+
21	SGD08NA	Inseto	Bacilo	+

Legenda: Nº= Número; Morf= morfologia.

Além da análise pelo método de Gram, também foi realizada a caracterização da morfologia das colônias. Os resultados desta análise mostraram as características diversificadas das colônias bacterianas, como: tamanho, produzindo em sua maioria colônias grandes, coloração branca acinzentadas, de bordas irregulares (Figura 1).

Figura 1: Características morfológicas de bacilos de ambientes amazônicos



Fonte: o autor (2019)

As observações das características fenotípicas das linhagens bacterianas, neste estudo, foram comparadas com as observações feita Goto et al. (2000). Estes autores enfatizam que o grupo dos bacilos possuem características cilíndricas com formas de bastonetes isoladas ou em pares (diplobacilos), ou em cadeia (streptobacilos). De fato, o gênero *Bacillus* compreende basicamente bactérias gram-positivas ou gram-negativas formadoras de esporos facultativas anaeróbias, em forma de bastonete (LOGAN et al., 2009). As características morfológicas observados neste estudo fornecem informações complementares para identificação destas linhagens bacterianas.

As características fenotípicas de um determinado microrganismo são instáveis, dependendo do ambiente que se encontram, ocorrem alterações e pode haver diferenças em cada meio de cultivo (HUNGRIA & SILVA, 2011). Contudo, além da análise microscópica de bactérias, o registro das colônias do crescimento microbiano, na escala macroscópica, é de grande importância para a avaliação de diversidade, pois serve como um complemento importante para as análises genéticas (FONSECA et al., 2000; PRAYITNO & ROLFE, 2010; COBO et al., 2017).

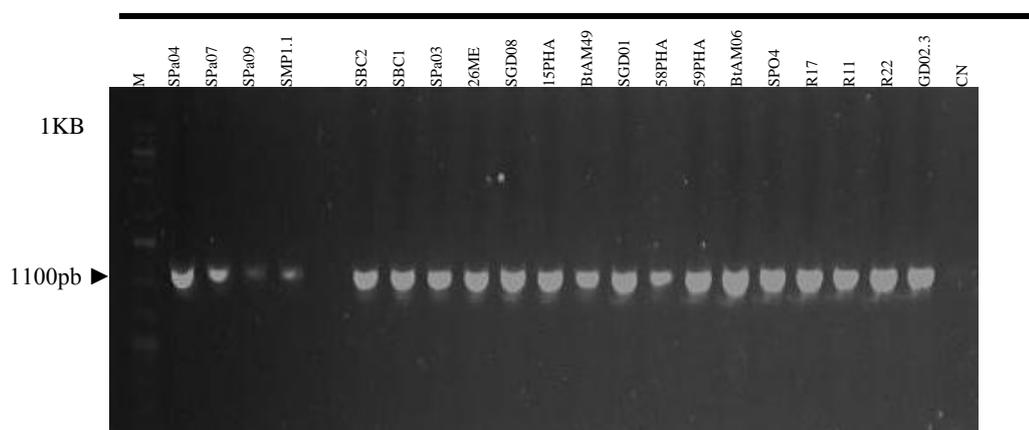
Assim, a utilização de um único método de caracterização não é suficiente, para a identificação de um microrganismo, porém, o emprego conjunto das técnicas clássicas e

moleculares desempenha um papel fundamental na identificação de espécies (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008; HABIB et al., 2013). Embora as linhagens bacterianas apresentem características semelhantes ao grupo de bactérias do gênero *Bacillus*, é imprescindível a caracterização por métodos com marcadores moleculares. Considerando a diversidade e filogenia de procariotos, o gene *16S rRNA* desempenha um papel importante, na identificação e taxonomia microbiana e tem sido o método bastante utilizado. Este gene é altamente conservado, sendo considerado um marcador filogenético adequado para caracterização de bactérias ao nível de gênero e, até mesmo, de espécies (WOESE, 1987; ORRILLO et al., 2015). Diante disso, para a identificação mais precisa das linhagens utilizadas neste estudo, foi feita a identificação molecular pelo gene *16S rRNA*.

3.2 Identificação molecular de bacilos

A região do DNA ribossomal 16S foi amplificada com o intuito de realizar a identificação taxonômica das linhagens de bacilos. Do total de 21 bacilos, foi possível identificar 20 linhagens bacterianas, correspondendo a seis gêneros: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Serratia* e *Achromobacter*. A sequência nucleotídica para a amplificação e sequenciamento utilizada neste estudo, possui aproximadamente 1100 nucleotídeos (Figura 2). A sequência do gene *16S rRNA* é composta de regiões conservadas, úteis para determinar as relações de distância, enquanto que as regiões variáveis são utilizadas para distinguir organismos estreitamente relacionados (BECKER et al., 2004; PEI et al., 2009).

Figura 2: Perfil eletroforético de amplificação do DNA do gene *16S rRNA*



O sequenciamento do gene *rRNA 16S* é considerado eficiente para identificação bacteriana (GOTO et al., 2000; GARCIA-MARTINEZ et al., 1999; BOAKYE et al., 2016). A identificação de bactérias por este método é utilizado em diversos estudos, com o objetivo de caracterização molecular de microrganismos, principalmente de bactérias. As sequências obtidas são comparadas com as disponíveis em bancos de dados, a exemplo, o National Center for Biotechnology Information- NCBI (BECKER et al., 2004; NOLTE & CALIENDO 2003; CIHAN et al., 2012).

A análise da sequência do gene *rRNA 16S* tem sido promissora uma vez que, este gene é considerado universal para bactérias e uma grande quantidade de sequências estão disponíveis em bancos de dados permitindo, assim, a comparação das sequências de linhagens bacterianas desconhecidas (STACKEBRANDT E GOEBEL, 1994; CLARRIDGE, 2004; VINJE et al., 2014).

A utilização da região do gene *rRNA 16S* permitiu a identificação das linhagens bacterianas deste estudo, onde foi possível observar que a maior predominância das linhagens bacterianas obtidas é pertencente ao gênero *Bacillus*, contudo, outros gêneros correlatados também foram observados. O gênero *Bacillus* foi o mais representativo com a identificação de 15 linhagens bacterianas. Do gênero *Brevibacillus* foram identificadas duas linhagens e para os gêneros *Serratia*, *Achromobacter* e *Brevundimonas* foi identificada uma linhagem.

As espécies do gênero *Bacillus* identificadas foram *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. tropicus*, *B. proteolyticus*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. Bacillus aerius* e *Bacillus sp.*. Enquanto que, para os gêneros *Achromobacter*, *Serratia*, *Brevibacillus* e *Brevundimonas* foram: *A. xilosidans*, *S. marcences*, *B. laterosporus*, e *B. olei* (Tabela 3).

De fato, *Bacillus* é o gênero em que ocorre o maior número de espécies, sendo bastante heterogêneo. As bactérias deste grupo possuem capacidade de formação de esporos, inertes ambientalmente e metabolicamente resistentes (LOGAN E VOS, 2009; SCHMIDT et al., 2011).

Tabela 3: Identificação molecular de linhagens de bacilos por meio do sequenciamento do gene *16S rRNA*

Nº	Linhagem	Identificação Molecular	Identidade	Morfologia	Gram
1	SMP1.1	<i>Bacillus cereus</i>	100%	Bacilo	+
2	SBC2LB	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98%	Bacilo	+
3	SPa09	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100%	Bacilo	+
4	BtAM06NA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	Bacilo	+
5	BtAM49LB	<i>Bacillus thuringiensis</i>	97%	Bacilo	+
6	59PHA	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	Bacilo	+
7	R22	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	Bacilo	+
8	SGD08NA	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99%	Bacilo	+
9	SBC1	<i>Bacillus tropicus</i>	100%	Bacilo	+
10	58PHA	<i>Bacillus proteolitycus</i>	100%	Bacilo	+
11	GD.02.3	<i>Bacillus safensis</i>	100%	Bacilo	+
12	15PHAISP2	<i>Bacillus safensis</i>	99%	Bacilo	+
13	R11ISP2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	Bacilo	+
14	SPO4NA	<i>Bacillus sp.</i>	100%	Bacilo	+
15	26MENA	<i>Bacillus aerius</i>	99%	Bacilo	+
16	SPa03NA	<i>Achromobacter xilosidans</i>	98%	Bacilo	+
17	SGD01NA	<i>Serratia marcescens</i>	100%	Bacilo	+
18	SPa04NA	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	100%	Bacilo	+
19	SPa07	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	100%	Bacilo	+
20	R17	<i>Brevundimonas olei</i>	100%	Bacilo	+

A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível observar as diferentes espécies do gênero *Bacillus*, das quais, muitas têm grande importância em inúmeras aplicações biotecnológicas e médica. Sendo assim, muitos estudos com diferentes métodos moleculares de identificação são utilizados, para comparar e discriminar os genomas de bactérias, dentre as diversas técnicas moleculares, está o sequenciamento do gene *16S rRNA* (HARREL et al; 1995; BHANDARI et al., 2013; KUMAR et al., 2014).

As bactérias que pertencem ao grupo *Bacillus cereus* são bacilos gram-positivos, formadoras de esporos, compreende as espécies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B.pseudomycoides*, *B. weihenstephanensise* *B. cytotoxicus*, porém, novas espécies têm sido incluídas neste grupo. As espécies do grupo *B. cereus* são saprófitas, encontradas geralmente em solo e de importância médica e econômica. A espécie *B. anthracis* possui patogenicidade em humanos, enquanto, *B. thuringiensis* são patógenos de insetos, utilizada no controle biológico, como pesticida biológico e considerada inócua para os seres humanos (HELGASON et al., 2006; PATINO-NAVARRETE, et al., 2017). Outras espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* são consideradas promissoras na produção de enzimas, usadas como probióticos.

Além das diferentes espécies identificadas pelo gênero *Bacillus*, duas linhagens foram correspondente ao gênero *Brevibacillus*, identificadas como *Brevibacillus laterosporus*. Liu et al. (2017) e Ghazanchyan et al. (2018) relatam que *B. laterosporus* tem sido usado como uma alternativa aos larvicidas biológicos, produzidos com base em *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*. Esta espécie de *Brevibacillus* tem sido relatada na produção de enzimas e substância antibacterianas e antifúngicas, além disso, são usados como probióticos (RUIU et al. 2007; MARCHE et al., 2018). As linhagens de *B. laterosporus* são aeróbicas, entomopatogênicas, com formação de esporos, apresentam um elevado nível de produção corpo paraesporal, de grande interesse científico e industrial.

Outro gênero identificado nas linhagens de bacilos foi *Brevundimonas*, correspondendo à espécie *Brevundimonas olei*. Este gênero foi anteriormente descrito como *Pseudomonas*, onde foram reclassificados para, o gênero *Brevundimonas* (SEGERS et al., 1994; RYU et al., 2007). A espécie *Brevundimonas olei* sp. nov. foi isolada de um reservatório de óleo, onde foi descrita como uma nova espécie deste gênero (LEE et al., 2010).

A identificação de bactérias do gênero *Bacillus*, por métodos fenotípicos, tornou-se difícil devido o gênero ser um grupo taxonômico grande e heterogêneo, de bactérias gram-positivas e negativas, o que causa muita complexidade em sua classificação taxonômica. Com estudos da sistemática bacteriana, muitas espécies desse grupo foram reclassificadas, principalmente com uso do gene *16S rRNA*, porém, devido à elevada variabilidade genética, muitas espécies de *Bacillus* continuam sem classificação (Vos et al., 2009). De fato, neste estudo, não foi possível a identificação de uma linhagem de bacilo, ao nível de espécie, sendo, denominadas como *Bacillus* sp.

Considerando a região gênica *16S rRNA*, foi possível identificar as linhagens bacterianas de diferentes ambientes amazônicos, os quais podem contribuir para o controle biológico e diversas aplicações biotecnológica.

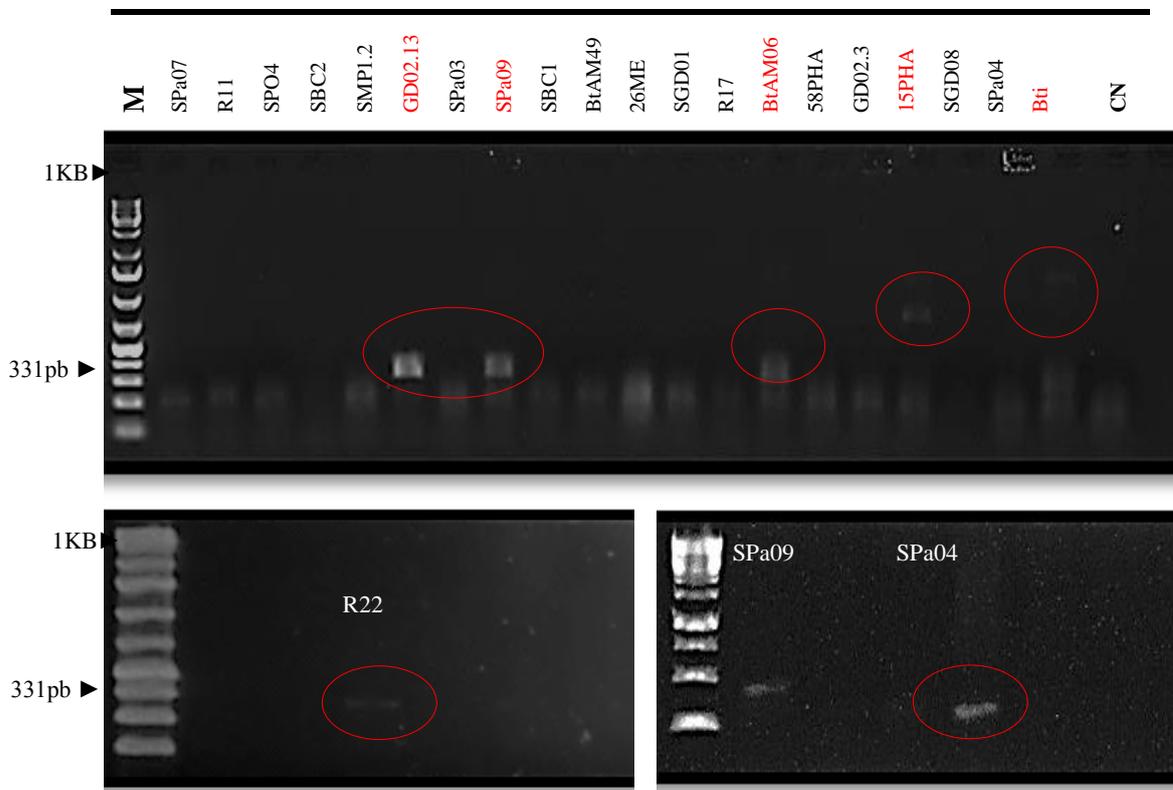
3.3 Caracterização gênica *Cry4Ba*, *Cry11* e *BS-glu* de bacilos

Utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi possível detectar o gene *Cry4Ba* em linhagens patogênicas para as larvas de *Ae. aegypti*. A análise da detecção molecular do gene *Cry4* e *Cry11* das 21 linhagens tóxicas para as larvas de *Ae. aegypti* foram realizados. Os resultados mostraram que de 21 linhagens analisadas, seis -SPa09 – *Bacillus thuringiensis*, SPa04 - *Brevibacillus laterosporus*, 15PHA - *Bacillus safensis*, BtAM06 - *Bacillus thuringiensis*, R22 - *Bacillus pumilus* e GD 02.13 - apresentaram amplificação para o

referido gene, com fragmentos de DNA de tamanho aproximadamente 351 pares de bases. O fragmento também foi observado na linhagem padrão Bti001 - *Bacillus thuringiensis*, com o mesmo tamanho de pares de base, visualizados em gel de agarose 1,5% (Figura 3).

Em relação ao gene *Cry11*, também analisado no presente estudo, não foi observada amplificação positiva nas linhagens investigadas. Apesar da ausência deste gene nos 21 bacilos, é importante investigar outros genes associados ao mecanismo de ação destes microrganismos, em larvas de *Ae. aegypti*.

Figura 3: Perfil eletroforético da amplificação do DNA do gene *Cry4Ba*, em linhagens de bacilos de diferentes ambientes amazônicos



A importância na detecção dos genes *Cry*, utilizado neste estudo, se deve a especificidade de toxinas CRY a mosquitos da ordem diptera. Assim, uma das características que tornam as proteínas CRY específica a diferentes insetos-alvo, é a ligação das toxinas CRY às proteínas localizadas nas microvilosidades das células do intestino médio de insetos. De acordo com a classificação da diversidade de genes *Cry*, baseados em estudos com diferentes ordens de insetos, o gene *Cry4Ba* foi classificado com especificidade a dípteros (CRIKMORE, 1998). Portanto, a detecção da presença de genes que codificam proteínas CRY, nas linhagens

da região amazônica, é de extrema relevância para correlacionar com o potencial larvicida destas linhagens bacterianas, no controle deste mosquito.

A bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* é uma espécie com grande potencial na produção de inclusões de cristais, que contém toxinas inseticidas denominadas δ -endotoxinas. No presente estudo, duas linhagens SPa09 e BtAM06 que amplificaram para o gene *Cry4*, foram identificadas como *B. thuringiensis*. Estudos mostraram que algumas espécies de *B. thuringiensis* apresentam alta toxicidade para o vetor *Ae. aegypti*, *Culex sp.* e *Anopheles gambiae*, com a presença de genes *Cry*, codificadores de toxinas CRY associadas ao mecanismo de patogenicidade no intestino destes mosquitos (MARGALITH & BEN-DOV, 2000; BRAVO et al., 2011).

Analisando as linhagens com amplificação positiva para o gene *Cry*, observou-se que das seis linhagens, quatro são provenientes de solo. Assim, este substrato é considerado adequado para o isolamento de espécies de *Bacillus*, uma vez que, o solo é o principal reservatório natural de esporos, principalmente espécies de *B. thuringiensis* que contribuem para o controle de insetos vetores e pragas agrícolas (POLANCZYK & ALVES, 2003; EL-KERSH et al., 2016; LOBO, et al., 2017).

Lobo et al. (2015) utilizaram a técnica de PCR para detectar genes *Cry4*, *Cry11* e *Cyt*, verificaram a presença destes genes em 10 isolados de *B. thuringiensis*, da região do Cerrado brasileiro, com atividade tóxica sobre as larvas de *Ae. aegypti*. De maneira similar, Soares-Silva et al. (2015) relataram a presença de genes *Cry* em isolados de *B. thuringiensis* do Amazonas, para o controle biológico do vetor *Ae. aegypti*. No presente estudo, as linhagens de bacilos que apresentaram amplificação para o gene *Cry4Ba*, também foram eficientes em causar 100% de mortalidade em larvas do *Ae. aegypti*. Estes dados nos fornecem subsídios da presença de genes codificadores de proteínas CRY, toxinas importantes no mecanismo de ação em larvas de mosquitos vetores.

Bravo et al. (2005, 2011) enfatizam que a toxicidade mais eficiente destas toxinas, se deve ao efeito sinérgico entre as mesmas. Assim, a toxicidade da inclusão cristalina de entomopatógeno, principalmente o Bti, torna-se maior quando as proteínas CRY e CYT presentes neste cristal, estão em sinergismo (BRAVO et al., 2005, BRAVO et al., 2007, PARDO-LÓPEZ et al., 2013). Além das toxinas cristal, *B. thuringiensis* possui outros fatores de virulência como, exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (LIMA, 2010).

Dentre os entomopatógenos Bti destaca-se entre as espécies do gênero *Bacillus*, por apresentar substâncias tóxicas a insetos, sendo classificada como segura por serem inócuas aos

mamíferos, plantas e outros invertebrados. Nesse estudo, as linhagens 15PHA e R22 que apresentaram amplificação para o gene *Cry4Ba*, foram caracterizadas pelo gene *rRNA16S* - *Bacillus safensis* e *Bacillus pumilus*, representando novas espécies deste gênero com potencial larvicida. Garcia-Ramon et al. (2016) demonstraram que a espécie *Bacillus pumilus* isolada de planta, produz inclusão de cristais paraesporais, semelhante as sintetizadas pela espécie *B. thuringiensis*, representando uma bactéria entomopatogênica no controle de *Ceratitidis capitata*. Estes estudos fornecem informações sobre os potenciais fatores de virulência desta espécie de *Bacillus*, principalmente pela presença de um corpo parasporal dessa natureza, na linhagem *B. pumilus*, sugerindo que estas linhagens portadoras do gene *Cry4Ba* também podem expressar e produzir proteínas CRY ativas, na patogenicidade deste inseto (GARCIA –RAMON et al., 2016).

De maneira similar, Katak (2015) demonstrou a presença do gene *Cry4Ba*, em quatro linhagens de bacilos isolados da região amazônica, onde foram identificadas como *B. pumilus*. Esta espécie de *Bacillus* não é considerada entomopatogênica, porém, são portadoras de genes que codificam proteínas inseticidas, sendo bastante significativa a descrição de novas espécies deste gênero, na produção de moléculas inseticidas. A presença de corpo parasporal na espécie *B. pumilus* pode ser decorrente da transferência de plasmídeo, contendo genes que codificam proteínas CRY de *B. thuringiensis* (GONZALEZ & CARLTON, 1984; BERRY et al., 2002; PATINO-NAVARRETE et al., 2016). Os plasmídeos são um importante reservatório de genes e podem funcionar como veículo, para troca de material genético cromossômico entre diferentes espécies do gênero *Bacillus* (PATINO-NAVARRETE et al., 2016).

A bactéria *B. safensis* pertence ao grupo de *B. pumilus*, apresentam características fenotípicas e genotípicas semelhantes. Sendo assim, estudos enfatizam que isolados de *B. safensis* foram identificados como *B. pumilus*, porém, análises moleculares clássicas são usadas para distinguir entre estas duas espécies. Esta linhagem bacteriana possui importantes aplicações biotecnológicas, devido à sua capacidade de produzir uma ampla diversidade de enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários, industrialmente aplicáveis. Além disso, tem sido usada como agente de biocontrole contra fitopatógenos (BRANQUINHO et al., 2014; LATEEF et al., 2015).

Considerando o potencial de espécies *B. safensis* e suas inúmeras aplicações biotecnológicas, é importante enfatizar que a linhagem 15PHA – *B. safensis*, possui o gene *Cry* que codificam proteínas inseticidas, porém, pouco se conhece sobre suas características. Desta forma, tornam-se necessários estudos adicionais para caracterizar as biomoléculas secretadas por esta bactéria, que pode se tornar um microrganismo promissor em diversas aplicações.

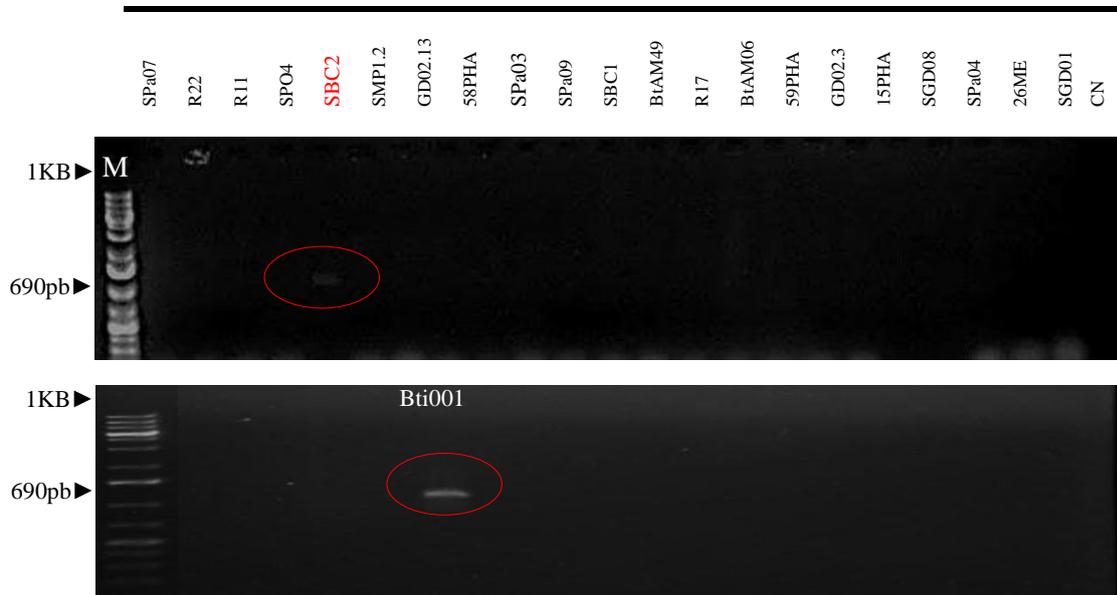
A linhagem SPa04, que também apresentou o gene *Cry4*, foi identificada como *Brevibacillus laterosporus*. Esta espécie mostra potencial para o controle biológico de insetos. Além disso, são utilizadas como probióticos e atuam como agentes antibacterianos e antifúngicos (GHAZANCHYAN et al., 2018).

Diante disso, os resultados do presente estudo demonstram que é possível encontrar, em bacilos de diferentes amostras da região amazônica, genes que codificam proteínas inseticidas e com potencial larvicida a mosquitos vetores da ordem Diptera. Sendo assim, é relevante enfatizar a importância da proteína expressa no mecanismo de ação. Portanto, a virulência das bactérias entomopatogênicas é um mecanismo complexo, incluindo vários fatores de virulência, que atuam em sinergismo para causar patogenicidade no hospedeiro (BRAVO et al., 2007; GARCIA-RAMON et al., 2016). Embora neste estudo seja confirmada a presença do gene *Cry4*, em linhagens que apresentaram um valor significativo na mortalidade das larvas, é necessário investigar se a proteína CRY expressa é ativa e quais moléculas podem estar envolvidas nesta patogenicidade.

Apesar da ampla diversidade do gênero *Bacillus*, da região amazônica há poucos estudos com a descrição de genes *Cry*, os quais codificam moléculas inseticidas em linhagens desta região. Portanto, é necessário investigar novas linhagens que, apresentem perfil de bactérias entomopatogênicas, com toxicidade a vetores de importância médica. As linhagens R22, GD02.13, BtAM06, SPa09 e 15PHA que tiveram amplificação para o gene *Cry4*, também apresentaram atividade larvicida e tornam-se importantes para estudos, objetivando o controle do *Ae. aegypti*.

O gene *BS-glu* que codifica a enzima β -1,3-1,4-glucanase, também foi avaliado nas linhagens tóxicas as larvas de *Ae. aegypti*. Estes genes apresentam um fragmento de aproximadamente 690 pares de base (pb). Os resultados da PCR mostraram duas linhagens - SBC2 – *B. thuringiensis* e Bti001 *B. thuringiensis* – apresentaram amplificação para o referido gene, visualizados em gel de agarose a 1% (Figura 4). Estes resultados revelam que bacilos provenientes da região amazônica apresentam genes que codificam β -1,3-1,4-glucanase, enzima hidrolítica relevante em diversos processos biotecnológicos. Além disso, atuam no controle biológico de fungos fitopatogênicos e participam de mecanismo sinérgico com outras moléculas presentes na parede celular destes hospedeiros (PLANAS, 2000; XU et al. 2016).

Figura 4: Perfil eletroforético da amplificação do DNA do gene *BS-glu* em bacilos de diferentes ambientes amazônicos



Enzimas β -1,3-1,4-glucanases que hidrolisam substrato de β -glucano foram isoladas e caracterizadas a partir de microrganismos, incluindo espécies de *Bacillus*. Dentre estas, citamos: *B. macerans* (BORRIS et al, 1990); *Bacillus subtilis* (QIAO et al, 2009); *B. pumillus* (ELGHARBI et al., 2017), *B. thuringiensis* (SHRESTHA et al., 2015); *B. velezensis* (XU et al., 2016), *Paenibacillus terrae* NK3-4 (YU et al., 2018), *Bacillus licheniformis* GZ-2 (GAO et al., 2016).

Diversos estudos enfatizam a importância de enzimas quitinases que hidrolisam quitina presente na membrana peritrófica de insetos. Estas enzimas facilitam a ligação das proteínas CRY aos receptores no intestino das larvas, proporcionando um aumento da toxicidade (ARORA et al 2003, COSTA et al., 2010; SOARES-SILVA et al. 2017). Enzimas quitinases possuem a capacidade de se ligar ao substrato quitina, presente no intestino de insetos e diversos estudos têm demonstrado o potencial destas proteínas secretadas por bactérias do gênero *Bacillus*, no controle de insetos vetores.

Dentre outras enzimas que atuam no controle biológico, as glucanases produzidas por bactérias e fungos, foram descritas com potencial no biocontrole de fungos fitopatogênicos. Shrestha et al. (2015) relatou o potencial de enzimas proteases, β -1,3-glucanase e quitinase de *B. thuringiensis* na degradação da parede celular do fungo patogênico *Sclerotinia*. As bactérias do gênero *Bacillus* são relevantes na produção de β -glucanase e quitinase, que contribuem para uma maior atividade antifúngica (PLANAS, 2000; XU et al., 2016; SHRESTHA et al., 2015).

A ação hidrolítica das β -glucanases nas paredes desses microrganismos pode causar um efeito antagonista, prevenindo a disseminação da doença. Estas enzimas despertam grande interesse, pois hidrolisam polímeros insolúveis como o β -glucano. Os microrganismos produzem enzimas quitinases ou glucanases para obtenção de nutrientes a partir da hidrólise de quitina, glucano, entre outros substratos (GOHEL et al., 2006; MADIGAN et al., 2012).

As quitinases e glucanases além de degradar a parede celular de fungos, desempenham papéis relevantes na defesa de plantas contra patógenos. Li et al. (2015) relatam o efeito antifúngico aumentado, quando glucanase atua em sinergismo com natamicina e quitinase, na degradação da parede celular de *Botrytis cinerea*. De fato, algumas bactérias e fungos são antagonistas e competem por espaço, com fungos patógenos, os quais produzem enzimas quitinases, glucanases e proteases, que agem de forma sinérgica, na degradação da parede celular de fungos patógenos (MONTERO et al., 2007; ABDULLAH et al. 2008; SHARMA et al., 2018).

Diversos genes que codificam β -glucanase foram isolados de diferentes bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*. Xu et al. (2016) isolaram o gene *Bglu1* (β -1, 3-1, 4-glucanase) de *B. velezensis* ZJ20 com tamanho de 732 pb, clonado e expressado em *E. coli*, onde a glucanase purificada apresentou atividade com uma ampla faixa de pH e temperaturas na degradação da morfologia micelial de três fungos patogênicos. GAO (2016) investigaram genes que codificam β -1,3-1,4-glucanase (lichenases) de *B. licheniformis* GZ-2. O gene foi clonado e expresso em *E. coli* BL21 e atividade da enzima purificada foi bastante significativa, na hidrólise de β -1,3-1,4-glucano de cevada.

Enzimas β -1,3-1,4-glucanase apresentam excelente estabilidade, sendo descritos seu papel na indústria alimentícia, na produção de bebidas como vinho e cerveja, na fabricação de bioetanol e do biodiesel. Além disso, também são utilizadas como suplemento alimentar na melhoria da qualidade de rações. Estas hidrolases atuam no mecanismo sinérgico com outras proteínas em diferentes atividades enzimáticas (QIAO, 2008; FURTADO et al., 2011; GOLDENKOVA-PAVLOVA et al., 2018).

Os resultados do presente estudo mostraram que além da linhagem SBC2 - *B. thuringiensis*, a linhagem Bti001 - *B. thuringiensis* apresentou amplificação para o gene *BS-glu*. Até o presente momento, não há descrição deste gene em linhagens de *B. thuringiensis* da região amazônica. O gene *BS-glu* (β -1,3-1,4-glucanase) foi descrito em *B. subtilis* MA139, onde foi clonado e expresso em *E. coli* BL21, a enzima purificada demonstrou alta atividade para o substrato de β -glucano e liquenano de cevada (QIAO, 2008). Além disso, estudos adicionais mostraram que a β -1,3-1,4-glucanase secretada por *B. subtilis* MA139 apresentou alta atividade

antimicrobiana, a diferentes cepas patogênicas do intestino de suínos, sendo selecionada como promissor probiótico (GUO et al., 2006). Estes dados despertam interesse das biomoléculas secretadas por estes microrganismos. O gene *BS-glu* investigado codifica enzimas glucanases com características importantes em diversas aplicações biotecnológicas.

As enzimas β -1,3-glucanase foram descritas a partir do intestino de insetos das ordens de Coleóptera, Ortóptera, Lepidóptera e Díptera (BRAGATTO et al., 2010). Souza et al. (2016) relataram que β -1,3-glucanase atua na degradação de glucano, presente na parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, observada no intestino das larvas de *Ae. aegypti*. Embora sejam descritas glucanases no intestino de larvas, pouco se conhece sobre as propriedades e funções dessas enzimas, em insetos.

Considerando a importância destas hidrolases, em diversos processos biológicos, é de grande relevância investigar se há interação sinérgica destas enzimas com moléculas presentes no intestino desses insetos. Apesar de não haver estudos relacionados com a interação de glucanases com moléculas inseticidas, é importante avaliar a presença de genes codificadores de glucanases de *Bacillus*, que podem contribuir com o aumento da toxicidade nas larvas de *Ae. aegypti*.

3.3.1 Correlação da atividade larvicida com a presença dos genes *Cry4Ba* e *BS-glu* (β -glucanases) em linhagens de bacilos

Analisando os resultados da atividade larvicida utilizando a biomassa bacteriana das 21 linhagens com os dados da amplificação dos genes *Cry4Ba* e *BS-glu*, foi observado que as linhagens - SPa09, R22, GD02.13 e BtAM06, apresentaram 100% de mortalidade sobre as larvas de *Ae. aegypti*, em todas as concentrações testadas em 24 horas. É interessante enfatizar que as quatro linhagens que apresentaram 100% de mortalidade nos bioensaios quantitativos, são as que amplificaram para o gene *Cry4Ba* (tabela 4). Contudo, a linhagem BtAM49 também apresentou 100% de mortalidade, porém, não foi confirmada a presença dos genes *Cry4* e *BS-glu*.

A análise comparativa da atividade larvicida com a presença do gene *BS-glu* revelaram que a linhagem SBC2LB – *B. thuringiensis*, apresentou o referido gene, porém não mostrou atividade significativa na mortalidade das larvas nos bioensaios quantitativos.

Além da presença do gene *BS-glu* na linhagem SBC2LB, a cepa padrão também mostrou amplificação para este gene. Assim, é interessante enfatizar que a linhagem Bti001 - *B.*

thuringiensis, utilizada como padrão neste estudo, apresentou 100% de mortalidade nos bioensaios quantitativos e foi confirmada a presença dos genes *Cry4Ba* e *BS-glu* (Tabela 4).

Tabela 4: Linhagens com a presença e ausência de atividade larvicida e dos genes *Cry4Ba* e *BS-glu*.

Linhagem	Genes		T. exp.	Atividade larvicida					
	<i>Cry4Ba</i>	<i>BS-glu</i>		Concentração (mg/L)					
				133	66.6	33.3	16.6	8.33	4.16
Bti001	+	+	24h	100	100	100	100	100	100
R22ISP2	+	-	24h	100	100	100	100	100	100
GDO2.13NA	+	-	24h	100	100	100	100	100	100
BtAM06	+	-	24h	100	100	100	100	100	100
BtAM49LB	-	-	24h	100	100	100	100	100	100
SPa09NA			24h	100	100	100	100	100	100
SPa07NA	+	-	24h	64,7	62	40,3	40,3	25,3	5,3
			48h	85,3	81,3	53,3	45,3	35,3	8
			72h	97,3	93,3	84,6	72,7	40,6	13,3
15PHA	+	-	24h	43,3	27,3	25,3	5,33	2	4
			48h	55,3	45,3	34,7	22	22	18
			72h	74,6	62	57,3	34,7	27,3	23,3
*SPa04NA	+	-							
*SBC2	-	+							

+ amplificou o gene; -, não amplificou o gene.

*não apresentaram atividade nos bioensaios quantitativos.

Soares et al. (2017), investigaram e confirmaram a presença do gene *Cry4Ba* em linhagens de *B. thuringiensis* isoladas de solos da região do cerrado, com potencial tóxico para larvas de *Ae. aegypti*. Pereira et al. (2013) mostraram que duas linhagens de *B. thuringiensis* isoladas de solo foram tóxicas a larvas de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, onde ambas apresentaram amplificação para os genes inseticidas *Cry* e *Cyt*.

Lobo et al. (2017) relataram a presença da atividade larvicida com a descrição de diferentes genes *Cry* e *Cyt* em 10 isolados de *B. thuringiensis*, porém, nenhum dos genes foi observado na linhagem com maior toxicidade sobre as larvas de *Ae. aegypti*. No presente estudo, a presença do gene *Cry4* foi observada em quatro linhagens que apresentaram os melhores resultados para atividade larvicida. Contudo, a presença dos dois genes *Cry4* e *BS-glu* foram observadas somente na linhagem padrão Bti001 - *B. thuringiensis*.

Sendo assim, o controle biológico de insetos vetores com formulados à base de *B. thuringiensis* são efetivos, devido ao efeito sinérgico das proteínas *Cry*, *Cyt* e *Chi* (quitinase). Costa et al. (2010) avaliaram atividade tóxica de isolados de *B. thuringiensis* ao vetor *Ae. aegypti* e verificaram, por meio da técnica de PCR a presença de genes *Cry*, *Cyt* e *Chi* (quitinase) que codificam proteínas inseticidas tóxicas a este mosquito. A maior frequência de genes obtidos foi para os genes *Cry4Ba* e *Chi*. De maneira similar, Oliveira (2018) investigou

a presença de genes *Chi* em linhagens de *Bacillus* da região amazônica e os resultados mostraram a presença do gene *Chi*, em seis linhagens de bacilos. Porém, apenas uma linhagem apresentou atividade larvicida para *Ae. aegypti*. Estes estudos mostram que linhagens de *Bacillus* possui potencial larvicida, com a produção de diversas moléculas, incluindo enzimas hidrolíticas que podem estar envolvidas na degradação de substratos, presentes no intestino de insetos.

Considerando a diversidade de genes *Cry*, diversos estudos mostram que *B. thuringiensis* pode apresentar um único gene *Cry*, enquanto outras podem apresentar um complexo de genes, onde a maior toxicidade ocorre com diferentes combinações de genes inseticidas (COSTA et al., 2010; XU et al., 2014; ELLEUCH et al., 2015). Além disso, as diferentes características fisiológicas de um entomopatógeno determinam sua virulência, como a produção de toxinas, enzimas, taxa de crescimento e multiplicação e ainda na suscetibilidade do inseto infectado (HABIB & ANDRADE, 1998).

Neste trabalho, a linhagem SPa04NA, identificada como *Brevibacillus laterosporus*, representa uma nova linhagem do gênero *Brevibacillus*, isolada da região amazônica, com a presença de genes codificadores de proteínas CRY. Orlova et al. (1998) demonstraram que cristais purificados de *B. laterosporus* foram altamente tóxicos para larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens*. Os autores relatam que a atividade larvicida foi associada a esporos e inclusões cristalinas.

Embora os resultados deste estudo demonstrem que linhagens de bacilos amazônicos apresentam potencial larvicida e presença de genes *Cry* e *BS-glu*, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de ação destas moléculas, que podem estar envolvidas na patogenicidade de larvas de *Ae. aegypti*.

3.4 Bioensaio quantitativo com biomassa bacteriana contra larvas de *Ae. aegypti*

Na análise do potencial larvicida da biomassa bacteriana secretada pelos bacilos, foi realizado o bioensaio quantitativo, incluindo a cepa padrão *B. thuringiensis israelensis*. Do total de 21 linhagens testadas neste ensaio, sete ocasionaram mortalidade em larvas de *Ae. aegypti*, com valores superiores a 50% (Tabela 5).

Em relação ao tempo de exposição de 24 horas, cinco linhagens R22ISP2 - *Bacillus pumilus*, GD02.13NA, BtAM49LB - *B. thuringiensis*, SPa09NA - *B. thuringiensis* e BtAM06 - *B. thuringiensis* - apresentaram 100% de mortalidade nas concentrações 133 mg/L, 66.6 mg/L, 33.3 mg/L, 16.6 mg/L, 8.33 mg/L e 4.16 mg/L. O mesmo resultado foi observado para a

linhagem padrão *B. thuringiensis* que apresentou 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas. A linhagem SPa07 NA, ocasionou mortalidade acima de 50% em duas concentrações 133 mg/L e 66.6 mg/mL, com os valores de mortalidade de 64,66% e 62%, respectivamente.

Após 48 horas a linhagem SPa07NA mostrou aumento da mortalidade nas concentrações 133 mg/L e 66.6 mg/L com 85,33 e 81,3%, respectivamente. A linhagem 15PHAISP2 – *B. safensis*, ocasionou 55,3% de mortalidade, na concentração de 133 mg/L.

Considerando o tempo de exposição de 72 h, a linhagem SPa07NA apresentou também aumento da mortalidade, nas concentrações 133 mg/L, 66.6 mg/mL, 33.3 mg/L, 16.6 mg/L, com 97,3, 93,3, 84,6, e 72,7% respectivamente. A linhagem 15PHAISP2 demonstrou mortalidade acima de 50% em três concentrações: 133 mg/L, 66.6 mg/L e 33.3 mg/L, com os valores de 74,6, 62 e 57,33%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Percentual de mortalidade das larvas expostas à biomassa bacteriana secretada por bacilos

		Biomassa microbiana + H ₂ O estéril						
Linhagem	T. exp.	Concentração (mg/L)						C
		133	66.6	33.3	16.6	8.33	4.16	
Bti001 (Cepa padrão)	24h	100	100	100	100	100	100	0
	48h	-	-	-	-	-	-	
	72h	-	-	-	-	-	-	
R22ISP2	24h	100	100	100	100	100	100	0
	48h	-	-	-	-	-	-	
	72h	-	-	-	-	-	-	
GDO2.13NA	24h	100	100	100	100	100	100	0
	48h	-	-	-	-	-	-	
	72h	-	-	-	-	-	-	
BtAM06	24h	100	100	100	100	100	100	0
	48h	-	-	-	-	-	-	
	72h	-	-	-	-	-	-	
BtAM49LB	24h	100	100	100	100	100	100	0
	48h	-	-	-	-	-	-	
	72h	-	-	-	-	-	-	
SPa09NA	24h	100	100	100	100	100	100	0
	48h	-	-	-	-	-	-	
	72h	-	-	-	-	-	-	
SPa07NA	24h	64,7	62	40,3	40,3	25,3	5,3	0
	48h	85,3	81,3	53,3	45,3	35,3	8	
	72h	97,3	93,3	84,6	72,7	40,6	13,3	
15PHA	24h	43,3	27,3	25,3	5,33	2	4	0
	48h	55,3	45,3	34,7	22	22	18	
	72h	74,6	62	57,3	34,7	27,3	23,3	

Legenda = T. exp = tempo de exposição; Cont = controle.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que sete linhagens de bacilos foram promissoras nos ensaios com a biomassa bacteriana, onde cinco causaram 100% de mortalidade, em 24 horas de exposição.

Diversos estudos vêm demonstrando o potencial de espécies do gênero *Bacillus*, devido às moléculas secretadas por estas linhagens bacterianas, com toxicidade a diferentes ordens de insetos vetores. Lobo et al. (2017) identificaram isolados de *B. thuringiensis* de solo com potencial tóxico para larvas de *Ae. aegypti*, das quais três isolados apresentaram potencial larvicida. De maneira similar, Soares et al. (2015) relataram o potencial de isolados de *B. thuringiensis* de diferentes ambientes amazônicos no controle dos vetores *Ae. aegypti*.

Além da espécie *B. thuringiensis*, estudos relatam que *Brevibacillus laterosporus* produzem moléculas tóxicas em larvas e adultos de *Chrysomya putoria* (PEREIRA et al., 2018). Garcia-Ramon et al., (2016) avaliaram o potencial de *Bacillus subtilis* 15.1, que mostrou-se ativa contra *Ceratitis capitata*, os resultados mostraram a presença de corpos de inclusão paraesporais produzidos por esta espécie.

No presente estudo, as linhagens BtAM06, GD02.13, SPa09, 15PHA e R22 que apresentaram atividade larvicida, em menos de 24 horas de exposição nos testes com biomassa bacteriana, apresentaram amplificação para o gene *Cry4Ba*. A mortalidade das larvas, em um curto intervalo de tempo quando expostas a biomassa bacteriana, pode ser explicado pela ingestão de moléculas tóxicas e esporos pelas larvas, dentre outros fatores desconhecidos. Estudos relatam que larvas de *Ae. aegypti* se alimentam de partículas sólidas das superfícies do meio líquido, que podem estar presentes diversos microrganismos ativos como bactérias e fungos (WALKER et al., 1998; MUNIARAJ et al., 2012; SOUZA, 2016). Sendo assim, a biomassa bacteriana exposta às larvas, podem conter esporos e metabólitos secretados por bactérias, ainda desconhecidos. O presente estudo mostra informações do potencial larvicida de linhagens de bacilos isolados de ambientes naturais, porém, é necessário investigar as moléculas envolvidas na patogenicidade, das larvas, para melhor compreensão de seu mecanismo de ação.

Assim, uma das características que leva à utilização de bactérias entomopatogênicas, para o controle de insetos vetores, é o seu mecanismo de infecção. Os fatores que determinam a virulência de um determinado entomopatógeno dependem diretamente das suas diferentes características fisiológicas, como a produção de toxinas, enzimas, taxa de crescimento e multiplicação, além da suscetibilidade do inseto infectado (HABIB & ANDRADE, 1998; BRAVO et al., 2007). Deste modo, as delta-endotoxinas são bastante conhecidas devido à alta toxicidade que exibem a uma variedade de insetos-alvo. O modo de ação das delta-endotoxinas inicia-se pela ingestão das mesmas pelas larvas suscetíveis, posteriormente são solubilizadas pelo pH alcalino, no intestino da larva e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por proteinases e convertidas em mais de um polipeptídeo tóxico que se ligam a receptores das

microvilosidades intestinais, formando poros e desestabilizando o gradiente osmótico, levando à morte das larvas (SCHNEPF et al., 1998 ; BRAVO et al., 2007).

Estudos relatam que as misturas de cristais e esporos são mais patogênicas do que cristais sozinhos. Sendo assim, as delta-endotoxinas paralisam o intestino do inseto, retêm os esporos, destroem a parede do intestino e o conteúdo intestinal, misturam-se com a hemolinfa, reduzindo o pH, onde fornecem nutrientes necessários para a germinação dos esporos. O inseto morto serve como substrato e alimento para o crescimento vegetativo das bactérias (KNOWLLES, 1994). Zambolim (2009) enfatiza que a esporulação é um mecanismo de resposta das células a condições desfavoráveis com a produção de esporos. Assim, a esporulação é estimulada pela falta de nutrientes, induzindo uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas do microrganismo.

Neste sentido, a toxicidade de algumas bactérias entomopatogênicas pode ocorrer devido às interações sinérgicas entre proteínas CRY com outras moléculas associadas à patogenicidade de insetos. Além disso, os esporos podem estar associados a estas toxinas ocasionando um efeito tóxico mais eficiente às larvas destes mosquitos (SCHNEPF et al., 1998; VILAS-BOAS et al., 2012).

Além das proteínas CRY, as exoenzimas produzidas por espécies de *Bacillus* também contribuem com patogenicidade de insetos. Diversos estudos demonstram que enzimas são produzidas pela bactéria e auxiliam na ruptura da membrana peritrófica favorecendo o acesso das delta-endotoxinas ao epitélio intestinal (SAMPSON & GOODAY, 1998; LIMA, 2010; GALZER & AZEVEDO-FILHO, 2016).

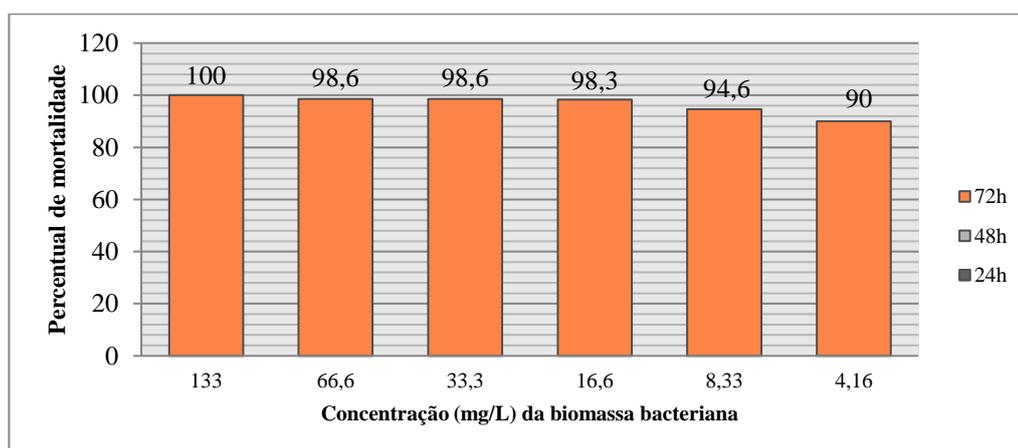
Estudos mostraram que o sinergismo entre diferentes toxinas e a ligação à membrana apical das larvas é essencial para que ocorra uma melhor toxicidade. Elleuch et al. (2015), relataram que toxinas *Cry4*, específicas a dípteros e as toxinas citolíticas (Cyt) de *B. thuringiensis israelensis* atuam em sinergismo, com conseqüente aumento da atividade larvicida. Apesar da elucidação em diversos estudos do mecanismo de ação de certas proteínas inseticidas, na patogenicidade de insetos, não se conhece, o modo de ação das moléculas secretadas pelas linhagens do presente estudo. Há necessidade de estudos adicionais, com ênfase no isolamento e caracterização de toxinas, para confirmar a molécula responsável pela toxicidade as larvas deste mosquito.

3.4.1 Atividade larvicida da biomassa bacteriana lisada

Neste experimento, a biomassa bacteriana foi tratada com calor e, em seguida adicionada em água destilada, com objetivo de avaliar o potencial larvicida.

Analisando os resultados de 24 horas, observou-se que duas linhagens SPa09NA – *B. thuringiensis* e BtAM49LB - *B. thuringiensis* - apresentaram mortalidade inferior a 20%. Após este intervalo de tempo, não ocorreu aumento significativo da atividade larvicida. Entretanto, a linhagem R22ISP2 – *B. pumilus* não mostrou atividade no intervalo de 24 e 48 horas, porém em 72 horas de exposição, atividade foi de 100 % de mortalidade na concentração 133 mg/L e nas concentrações 66.6 mg/L, 33.3mg/L, 16.6mg/L, 8.33mg/L, 4.16 mg/l, o percentual foi de 98.6, 98.6, 98.3, 94.6 e 90% de mortalidade, respectivamente (Figura 5).

Figura 5: Percentual de mortalidade das larvas expostas à biomassa bacteriana autoclavada da linhagem R22



Com relação aos resultados analisados para a linhagem R22ISP2, foi possível observar que nos ensaios com a biomassa bacteriana, o percentual de mortalidade foi de 100% em todas as concentrações testadas, em 24 horas de exposição. No ensaio com biomassa autoclavada a mortalidade foi de 90 a 100 % de mortalidade, em 72horas de exposição.

Estes resultados mostram que as diferentes linhagens de bacilos podem apresentar diferenças ao nível da expressão de moléculas ativas, na patogenicidade de larvas suscetíveis. Embora a natureza e o modo de ação das moléculas presentes na biomassa bacteriana sejam desconhecidos, a atividade destas linhagens pode ser devido à ingestão pelas larvas de moléculas termoestáveis liberados pelas células bacterianas rompidas. Além disso, os esporos podem contribuir na virulência destas linhagens, devido apresentarem resistência à alta temperatura, uma vez que a biomassa bacteriana foi submetida ao calor. Neste contexto, existem diversos fatores que podem contribuir para síntese de moléculas tóxicas por bactérias. O

excesso ou ausência de nutrientes com conseqüente estresse pode induzir o desenvolvimento de mecanismos de resistência e adaptação, como por exemplo, produção de esporos, toxinas, antibióticos e enzimas hidrolíticas (ELLEUCH et al, 2015; DEWI et al., 2016; RICOLDI et al., 2018).

Algumas linhagens apresentaram menor patogenicidade, contra larvas do *Ae. aegypti*, como indicado pelas baixas taxas de mortalidade, este fato pode ser devido a diferenças na capacidade de produzir compostos entre diferentes isolados de *Bacillus*. Entretanto, as bactérias que ocasionaram um alto percentual de mortalidade em larvas de *Ae. aegypti*, em um curto intervalo de tempo possuem vantagens e podem ser utilizadas no controle biológico, além disso, são inócuas para os seres humanos. Diante disso, estudos são necessários na identificação e caracterização do princípio ativo secretado por estas linhagens, para elucidar os mecanismos de ação que ocorrem nas larvas testadas.

4 CONCLUSÃO

Caracterização fenotípica e molecular

- ✓ As vinte uma linhagens bacterianas utilizadas neste estudo, foram caracterizadas como, bacilos gram positivo.
- ✓ Foram identificadas 20 linhagens bacterianas, correspondendo a cinco gêneros - *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Serratia* e *Achromobacter* - onde *Bacillus* foi o gênero mais representativo.

Caracterização gênica

- ✓ Seis linhagens de bacilos isolados da região amazônica apresentaram amplificação para o gene *Cry4Ba* e, duas linhagens para o gene *BS-glu*.
- ✓ As linhagens de bacilos, que apresentaram os melhores resultados para atividade larvicida são as que amplificaram para o gene *Cry4Ba*.
- ✓ A linhagem *B. thuringiensis* utilizada como padrão nesse estudo, apresentou atividade larvicida e foi confirmada a presença dos genes *Cry4Ba* e *BS-glu*.

Atividade larvicida

- ✓ Do total de 21 linhagens avaliadas nos bioensaios quantitativos com a biomassa bacteriana, sete linhagens apresentaram potencial larvicida e uma linhagem apresentou atividade utilizando a biomassa autoclavada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y. and Suleman, P. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, p. 1354-1359, 2008.
- ALVES, S. B. **Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens**. In: (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Manole, p. 1163, 1998.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILASBÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: **Estratégias no controle biológico**. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: Agropecuária, p. 269-293, 2002.
- ARORA N, AHMAD T, RAJAGOPAL R, BHATNAGAR RK A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 307, p. 620-625, 2003.
- AYRES, M., AYRES JR., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat versão 5.3**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, Belém, Pará, Brasil, 2007.
- BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G. & VON EIFF C. Development and evaluation of a qualitycontrolled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of *Staphylococcus* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.
- BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2801–2805, 2015.
- BERRY, C. O'; NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A. Complete sequence and organization of p Btoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 50, p.82-95, 2002.
- BHANDARI, V.; AHMOD, N. Z.; SHAH, H. N.; GUPTA, R. S. Molecular signatures for the *Bacillus* species: Demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 63, p. 2712–2726, 2013.
- BOAKYE, E. Y.; LAWSON, I. Y. D.; DANSO, S. K. A.; OFFEI, S. K. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis**, v. 69, p. 89–99, 2016.
- BOICHENKO, V.A.; KLIMOV, V. V.; MIYASHITA, H.; and MIYACHI, S. Functional characteristics of chlorophyll d-predominating photosynthetic apparatus in intact cells of *Acaryochloris marina*. **Photosynth**, v. 65, p. 269-277, 2000.

BORRIS, R.; BUETTNER, K.; & MAENTSAELAE, P. Structure of the beta- 1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: Homologies to other beta-glucanases. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 222, n. 2-3, p. 278–283, 1990.

BRAGATTO, I.; GENTA, F. A.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R.; & FERREIRA, C.. Characterization of a β -1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to β -glucan-binding proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 40(12), 861–872, 2010.

BRANQUINHO, R.; SOUSA, C.; LOPES, J.; PINTADO, M. E.; PEIXE L.V. & OSORIO H. Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* using MALDI-TOF-MS. **PLoS ONE**, v. 9, p.110-127, 2014.

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

BRAVO, A.; GILL, SS.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert, LI.; Iatrou, K.; Gill, SS., editors. **Comprehensive Molecluar Insect Science**. p. 175-206, 2005.

CLARRIDGE, JILL, E. Impact of 16S rRNA gene sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. 17: 840-862 pp, 2004.

CHENGALA, L. Botanical pesticides a major alternative to chemical pesticides: a review. **Int J Life Sci**, v. 5, n.4, p.722–729, 2017.

CIHAN, A. C., TEKIN, N., OZCAN, B., & COKMUS, C. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 309–324, 2012.

COSTA, J. R. V. DA; ROSSI, MARUCCI, J. R. S. C.; ALVES, E. C. DA C.; VOLPE H. X. L.; FERRAUDO A. S; LEMOS, M. V F; DESIDÉRIO J. A. Atividade Tóxica de Isolados de *Bacillus thuringiensis* a Larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), September - **Biological Control**, v. 39, n. 5, p. 757-766, 2010.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 807-813, 1998.

DEWI, R. T. K.; MUBARIK, N. R.; SUHARTONO, M. T. Medium optimization of-glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 116–125, 2016.

DHAYALAN, A., KANNUPAIYAN, J., GOVINDASAMY, B., & PACHIAPPAN, P.. Extraction and Characterization of Secondary Metabolites from the Soil Bacterium, *Acidovorax*

sp. SA5 and Evaluation of Their Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **International Journal of Environmental Research**, v. 13, n. 5, 2018.

DONOVAN, W.P., ENGLEMAN, J.T., DONOVAN, J.C., BAUM, J.A., BUNKERS, G.J., CHI, D.J., CLINTON, W., ENGLISH, L., HECK, G.R., ILAGAN, O.M., KRASOMILOSTERFELD, K.C., PITKIN, J.W., ROBERTS, J.K., & WALTERS, M.R. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 713-719, 2006.

DULMAGE, H. T.; CORREA, J. A.; & GALLEGOS-MORALES, G. Potential for Improved Formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through Standardization and Fermentation Development. **Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies**, 110–133, 1990.

EL-KERSH, T. A.; AHMED, A. M.; AL-SHEIKH, Y. A.; TRIPET, F.; IBRAHIM, M. S.; METWALLI, A. A. M. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). **Parasit Vectors**, v. 9, p. 647, 2016.

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

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

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 1971.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge University, London, 1971.

FIOCRUZ. Dengue: vírus e Vetor. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>. Acesso em: 25 de novembro de 2018.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; & STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p.44-55, 2018.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B.; CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **Comunicado Técnico**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro: n. 43, p. 1-4, 2000.

FURTADO, G. P; RIBEIRO, L. F; SANTOS, C. R; TONOLI, C. C; SOUZA, R. S; OLIVEIRA, R. R; MURAKAMI, M. T; WARD, R. J. Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1202–1206, 2011.

GAISER, O. J.; PIOTUKH, K.; PONNUSWAMY, M. N.; PLANAS, A.; BORRIS, R.; & HEINEMANN, U. Structural Basis for the Substrate Specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -Glucanase. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 4, p. 1211–1225, 2006.

GHAZANCHYAN, N. L., KINOSYAN, M. H., TADEVOSYAN, P. E., KHACHATURYAN, N. S., & AFRIKIAN, E. G. *Brevibacillus laterosporus* as perspective source of new bioinsecticides. **Annals of Agrarian Science**, 2018.

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

GAO, Z. Purification and characterization of a novel lichenase from *Bacillus licheniformis* GZ-2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 249–256, 2016.

GARCIA-MARTINEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTON, A. I. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v.36, n1, p. 55-64, 1999.

GARCIA-RAMON, D.C.; MOLINA, C.A.; OSUNA, A; AND VILCHEZ, S. 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.**, v. 100, p. 3637–3654, 2016.

GOHEL, V.; SINGH, A.; VIMAL, M.; ASHWINI, P.; CHHATPAR, H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 54-72, 2006.

GOLDENKOVA-PAVLOVA, I. V.; TYURIN, A. A.; & MUSTAFAEV, O. N. The features that distinguish lichenases from other polysaccharide-hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 9, p. 3951–3965, 2018.

GONZALEZ, J.; CARLTON, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid**. v. 11, p. 28-38, 1984.

GOTO, K.; OMURA, T.; HARA, Y.; SADAIE, Y. 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.

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

HABIB, N. Identification and characterization of bacterial population associated with rice leaves infected with bacterial blight. **National Agricultural Research Centre**, 2013.

HADDAD, M. L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: Alves, S.B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. FEALQ, Piracicaba, SP, p. 999–1012, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/96/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98, 1999.

HARREL, L. J.; ANDERSON, G. L.; WILSON, K. H. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. **J Clin Microbiol.**, v.33, p.1847–1850, 1995.

HARRINGTON, J.; KROEGER, A.; RUNGE-RANZINGER, S.; & O'DEMPSEY, T.. Detecting and Responding to a Dengue Outbreak: Evaluation of Existing Strategies in Country Outbreak Response Planning. **Journal of Tropical Medicine**, p. 1–9, 2013.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2011.

INCA-TORRES, A.R.; URBINA-SALAZAR1, A.R.; GARCÍA, F.G.; CARBONERO-AGUILAR, P.; MORGADO, B.R.; PARRADO, J.; BAUTISTA, J. Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge, **Journal of Biotech Research**, v. 9, p. 14-26, 2018.

KATAK, Ricardo de Melo. 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. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

KNOWLES, B. H. Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, n. 2, p. 275-308, 1994.

KRAEMER, M. U., SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A.; SHEARER, F. M.; BRADY, O. J.; COELHO, G. E. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Sci Data**, v. 7, n. 2, 2015.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; & PRATUSH, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus species*. **Springer Plus**, v.3, n. 1, p. 312, 2014.

LATEEF, A.; ADELERE.; I. A.; & GUEGUIM-KANA, E. B. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis* Biologia. **Section Cellular and Molecular Biology**, v. 70, n. 4, p. 411—419, 2015.

LEE, M.K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.A.; DEAN, D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.583-586, 1996.

LEE, M., SRINIVASAN, S., & KIM, M. K. New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacterium. **The Journal of Microbiology**, v. 48(5), p. 616–622, 2010.

LeOra Software Company. **PoloPlus: Probit and Logit Analysis**. User's Guide, Version 2.0. LeOra Software Company, Petaluma, CA. 39 pp, 2003.

LI, J., LIU, W., LUO, L., DONG, D., LIU, T., ZHANG, T.; Wu, H. . Expression of *Paenibacillus polymyxa* β -1,3-1,4-glucanase in *Streptomyces lydicus* A01 improves its biocontrol effect against *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, 90, 141–147, 2015.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 50(0), 2016.

LIMA, G. M. de S. **Proteínas** bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p.119-137, 2010.

LIMA, J. B. P.; VALLE, D. Manutenção das colônias de *Aedes aegypti*. **Protocolo LAVICAF – FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2007.

LIU, Y.; DU, J. LAI, Q.; ZENG, R.; YE, D.; XU, J. and SHAO, Z. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p.2499–2508, 2017.

LOBO, K. S.; SOARES-DA-SILVA, J.; SILVA, M. C.; TADEI, W. P.; POLANCZYK, R. A.; PINHEIRO, V. C. S. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Rev. Brasil. Entomol.**, v. 62, p. 5-12, 2017.

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

LOGAN, N.A.; HALKET, G. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endosporeforming Bacteria. Em: *Endospore-Forming Soil Bacteria*. **Springer**, 1^a. Ed, 2011.

LUNA-FINKLER, C. L. & FINKLER, L. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters, **Insecticides - Advances in Integrated Pest Management**, Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-780-2, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D. *Microbiologia de Brock*. Artmed (Editora), 12^a edição, 2012.

MARCHE, M. G., CAMIOLO, S., PORCEDDU, A., & RUIU, L. Survey of *Brevibacillus laterosporus* insecticidal protein genes and virulence factors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 155, p. 38–43, 2018.

MARGALITH, Y.; BEN-DOV, E. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. israeliensis. In: Rechcigl, JE.; Rechcigl, NA., editors. **Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection**. CRC Press; p. 243, 2000.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de Diagnóstico. In: Trabulsi L R, Nawani N N, Kapadnis B P. Chitin degrading potential of bacteria from extreme and moderate environment. **Indian J. Exp. Biol.**, v.41(3), p. 248-54, 2008.

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.

MONTERO, M.; SANZ, L.; REY, M.; LLOBELL, A.; E MONTE, E. Clonagem e caracterização do gene bgn16 · 3, codificando uma β -1,6-glucanase expressa durante o

coproderismo por *Trichoderma harzianamel*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103 n.4, p. 1291-1300, 2007.

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

NOLTE F.S. & CALIENDO A. M. Molecular detection and identification of microorganisms, In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds), **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. ASM Press, Washington, p. 234-256.2003.

OLIVEIRA, J. C DE. Seleção de *Bacillus* spp. da amazônia brasileira portadores do gene *Chi* (quitinase) para o controle biológico de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.

ORLOVA, M.V. T.A; SMIRNOVA, L.A.; GANUSHKINA, V.Y.; YACUBOVICH, R.R. Azi zbekyan. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus* Appl. Environ. Microbiol., v. 64 , p. 2723-2725, 1998.

ORRILLO, E. O.; GARCIDUENAS, L. E. S.; ROGEL, M. A.; GONZÁLES, V.; PERALTA, H.; MORA, J; MARTÍNEZ, J. Taxonomy of Rhizobia and Agrobacteria from the *Rhizobiaceae* Family in Light of Genomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 287-291, 2015.

PALMA, L., MUNOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P., *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, p. 3296–3325, 2014.

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

PATIÑO-NAVARRETE, R.; & SANCHIS, V. Processos evolutivos e fatores ambientais subjacentes à diversidade genética e estilos de vida de bactérias do grupo *Bacillus cereus*. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 309-318, 2017.

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

PENIL COBO, P. M.; LIBRO, S.; MARECHAL, N.; D'ENTREMONT, D.; PEÑIL, C. D.; BERKMEN, M. Visualizing Bacterial Colony Morphologies Using Time-Lapse Imaging Chamber MOCHA. **J Bacteriol.**, v. 200, n. 2, p. 13-17, 2017.

PEREIRA, E., TELES, B., MARTINS, E., PRAÇA, L., SANTOS, A., RAMOS, F., BERRY, C., MONNERAT, R. Comparative Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner Strains to Larvae of Simuliidae (Insecta : Diptera). **Bt Research**, v. 4, p. 8–13, 2013.

PEREIRA, L. DE A.; JUNQUEIRA, R. M.; CARRAMASCHI, I. N.; QUEIROZ, M. M. C.; & ZAHNER, V. Bioactivity under laboratory conditions of *Brevibacillus laterosporus* towards larvae and adults of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Invertebrate*

Pathology, v. 158, p. 52-54, 2018.

PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1543, n. 2, p. 361–382, 2000.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**. v. 7, p. 1–10, 2003.

POLANCZYK, R.A.; ROGÉRIO, 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. Agrociência*, v. 10, p. 209-214, 2004.

PRAYITNO, J.; ROLFE, B. Characterization of endophytic diazotroph bacteria isolated from rice. **HAYTI Journal of Biosciences**, vol. 17, n. 2, p. 73-78, 2010.

QIAO, J., DONG, B., LI, Y.; ZHANG, B.; & CAO, Y. Cloning of a β -1,3-1,4-Glucanase Gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its Functional Expression in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 334–342, 2008.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P, R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen. **Trends Microbiol.** v. 18, n. 5, p. 189–94, 2010.

RICOLDI, M. C.; FIGUEIREDO, C. S.; & DESIDÉRIO, J. A. Toxicity of Cry2 proteins from *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* strain T01-328 against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Arquivos Do Instituto Biológico**. 85, p. 1-7, 2018.

RUIU, L.; FLORIS, I.; SATTA, A.; & ELLAR, D. J. Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v.43, p.136–143, 2007.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; RODELAS, B.; POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth promoting rhizobacteria. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Ed.). *Plant bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Weinheim: **Wiley-VCH**, cap. 4, p. 55-80, 2008.

RYU, S. H., PARK, M., LEE, J. R., YUN, P. Y. & JEON, C. O. *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 57, p.1561-5, 2007.

SAMPSON, M.N., GOODAY, G.W., Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**. V. 144, p. 2189-2194, 1998.

SANTOS, S; AS, D; BASTOS, E; GUEDES-PINTO, H; GUT, I; GARTNER, F; CHAVES, R. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Res Vet Sci**, v. 86, n. 3, p.421-6, 2009.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; & WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004.

SCHMIDT, T.R., SCOTT II., E.J., DYER, D.W. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. **BMC Genomics**, v. 12, p. 430, 2011.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. van; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SHARMA, V., SALWAN, R. E SHANMUGAM, V. Caracterização molecular da β -endoglucanase do isolado antagonista de *Trichoderma saturnisporum* GITX-Panog (C) induzido sob condições micoparasitas. **Pesticide Bioquímica e Fisiologia**, v. 149, p. 73-80, 2018.

SHRESTHA, A.; SULTANA, R.; CHAE, J.-C.; KIM, K. E LEE, K.-J. . *Bacillus thuringiensis* C25, que é rico em enzimas que degradam a parede celular, controla eficientemente a queda de alface causada por *Sclerotinia minor*. **Revista Europeia de Patologia Vegetal**, v. 142, n. 3, p. 577-589, 2015.

SEGERS, P., VANCANNEYT, M., POT, B., TORCK, U., HOSTE, B., DEWETTINCK, D., FALSEN, E., KERSTERS, K. & DE VOS, P. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., **Respectively. International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 499-510, 1994.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINHEIRO, V.C.S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANZYK, R.A.; TADEI, W.P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 1-6, 2015.

SOUZA, R. S.; DIAZ-ALBITER, H. M.; DILLON, V.M.; DILLON, R. J.; GENTA, F. A. Digestion of yeasts and beta-1,3-glucanases in mosquito larvae: **Physiological and biochemical considerations**. PLoS ONE, v. 11, n. 3, p. 1–16, 2016.

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

SUBBANNA, A. R. N. S.; RAJASEKHARA, H.; STANLEY, J.; MISHRA, K. K.; PATTANAYAK, A. Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.116, p.52-66, 2018.

SWIONTEK BRZEZINSKA, M.; JANKIEWICZ, U.; LISIECKI, K. Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces sporovirgulis*. **Appl Biochem Microbiol.**, v. 49, n. 2, p.154–159, 2013.

TOURASSE, N.J., HELGASON, E., OKSTAD, O.A., HEGNA, I.K., KOLSTO, A.-B. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. **J. Appl. Microbiol.**, v.101, p.579–593, 2006.

VILAS-BÔAS, G.T.; ALVAREZ, R.C.; DOS SANTOS, C.A.; VILAS-BOAS, L.A. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, p. 1-10, 2012.

VINJE, H., ALMOY, T., LILAND, K., & SNIPEN, L. A systematic search for discriminating sites in the 16S ribosomal RNA gene. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 4, p. 4-2, 2014.

VOS P, GARRITY G, JONES D, KRIEG NR, LUDWIG W, RAINEY FA, et al, editors. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. vol. 3, The firmicutes. New York: Springer; 2009.

WALKER, E. D.; OLDS, E.J.; MERRITT, R.W. Gut content analysis of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) using DAPI stain and epifluorescence microscopy. **J. Med. Entomol.**, v. 25, p. 551–554, 1988.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005.

XU, T., ZHU, T., & LI, S. β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, 26, 2016.

XU, C., WANG, B.C., YU, Z., SUN, M. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. **Toxins**, v. 6, p. 2732–2770, 2014.

YU, W. Q.; ZHENG, G. P.; QIU, D. W.; YAN, F. C.; LIU, W. Z.; & LIU, W. X. *Paenibacillus terrae* NK3-4: A Potential Biocontrol Agent that Produces β -1,3-Glucanase. **Biological Control**, v. 129, p. 92-101, 2018.

ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C. **Controle Biológico - Pragas e Doenças**. Viçosa: Editora UFV 310 pL., 2009.

ZARA, A. L. S. A.; DOS SANTOS, A. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO G. E; *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Epidemiol.ServSaúde**, v. 25, n.2, p. 392-404, 2016.