



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

JUAN CAMPOS DE OLIVEIRA

SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DO
GENE *Chi* (QUITINASE) PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Aedes (Stegomyia)*
***aegypti* (Linnaeus, 1762).**

MANAUS
2018

JUAN CAMPOS DE OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DO
GENE *Chi* (QUITINASE) PARA O CONTROLE BIOLÓGICO De *Aedes (Stegomyia)*
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 do requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

**MANAUS
2018**

JUAN CAMPOS DE OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE *Bacillus spp.* DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PORTADORES DO
GENE *Chi* (QUITINASE) PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Aedes (Stegomyia)*
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: 29/08/2018

Banca Examinadora:

Dr. Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Dra. Maria Dolores Pinheiro Fonseca
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dra. Rudi Emerson de Lima Procópio
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

**MANAUS
2018**

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.

82s	<p>Oliveira, Juan Campos de Seleção de <i>Bacillus spp.</i> da Amazônia Brasileira portadores do gene <i>Chi</i> (quitinase) para o controle biológico de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762) / Juan Campos de Oliveira. Manaus : [s.n], 2018. 82 f.: color.; 30 cm.</p> <p>Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei</p> <p>1. Bioprospecção. 2. Microbiota amazônica. 3. Enzimas hidrolíticas. 4. Insetos vetores. I. Dr. Wanderli Pedro Tadei (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Seleção de <i>Bacillus spp.</i> da Amazônia Brasileira portadores do gene <i>Chi</i> (quitinase) para o controle biológico de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762).</p>
-----	--

Dedicatória

Ao meu pai Valmir Oliveira a minha mãe Joana (In Memórian) e aos meus irmãos Antônio Lucas e Lindalva Sãmela Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que ao longo de toda minha jornada sempre esteve comigo guiando meus caminhos e me concedendo forças em todos os obstáculos, permitindo a realização deste objetivo. A caminhada foi árdua, mas uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.

A CAPES e a FAPEAM pelo auxílio financeiro, que sem dúvida foram mais que importantes a cada dia longe da casa dos meus Pais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA pela oportunidade da realização de um dos meus objetivos na jornada acadêmica.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, pela oportunidade, dedicação e disponibilidade em contribuir com seus conhecimentos para a realização deste trabalho.

Aos meus avós João e Maria, meu Pai Valmir Oliveira, por tudo que representam, pelo amor, carinho, dedicação e todas as lições de vida que sempre me proporcionaram. São exemplos de amor incondicional, de caráter que tenho na vida. Amo Vocês!

Aos meus familiares Tia Adma, Tia Jacira, Tia Juliana, Tia Jorlene pelo incentivo e carinho. A minha tia Jocely Campos pelo acolhimento durante o período de minha estadia na cidade de Manaus. Sem dúvida serei grato por toda minha vida. Muito obrigado.

A minha irmã, Lindalva Sâmela Oliveira, pela consideração e companheirismo não apenas no decorrer da pós-graduação, mas em toda a minha vida me proporcionando carinho e incentivo para tudo dar certo. Ao meu irmão Antônio Lucas, por todo seu amor e carinho.

Aos meus amigos; Elerson Matos, Deidre Machado, Laura Viana, Veranilce Muniz e em especial ao Ricardo Katak, pelo companheirismo em todos os momentos da pós-graduação, nos procedimentos laboratoriais, com elogios, críticas e acima de tudo com a sua grande amizade.

Aos amigos do Laboratório da Malária e Dengue do INPA; Augusto, Adriano, William, Thamiles, Eunice, Neila, Leandro e Marta pelo acolhimento e descontração nos momentos vividos nos intervalos de trabalho.

A todos, que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é um importante vetor na transmissão do vírus dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya. A principal ferramenta utilizada no controle deste vetor são os inseticidas químicos convencionais, porém, o uso contínuo provoca fatores negativos destacando-se a contaminação do meio ambiente e a seleção de populações resistentes. Neste sentido, o controle biológico por microrganismos é uma alternativa biotecnológica no controle de vetores, principalmente os bioinseticidas formulados à base de bactérias do gênero *Bacillus*. Considerando a diversidade de *Bacillus*, estes apresentam capacidade de síntese de biomoléculas bioinseticidas contra diferentes ordens de insetos. Além disso, sintetizam biopolímeros, antibióticos e enzimas como, por exemplo, as quitinases expressas pelo gene *Chi*. Estas enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 entre as unidades constituintes da quitina. Após a ingestão das quitinases pelas larvas do inseto, provoca a degradação da membrana peritrófica que separa o epitélio do intestino médio do lúmen intestinal, cujo principal componente é a quitina. Este fator é um requisito favorável para a sua utilização nos programas de controle de insetos vetores e pragas agrícolas. Neste estudo, foram utilizadas 124 linhagens bacterianas isoladas do solo, água, planta e inseto de diferentes ambientes amazônicos. Todas foram identificadas pelas características fenotípicas como pertencentes ao grupo dos bacilos, sendo, cento e quatorze (91,4%) Gram positivos e dez (8,6%) Gram negativos. Na identificação molecular pela amplificação e sequenciamento do gene 16S (rDNA), 33 linhagens foram identificadas, 27 pertencendo ao gênero *Bacillus*, 4 ao gênero *Serratia*, 1 ao gênero *Paenibacillus* e 1 ao gênero *Achromobacter*. Na detecção molecular do gene *Chi*, seis (4,5%) linhagens, BTAM27LB, 103PHAISP2, BTAM138LB, BTAM18NA, K2NA e R11ISP2, apresentaram amplificação positiva para este gene, dentre estas, duas foram identificadas, BTAM 27- *Bacillus sp.* e R11ISP2- *Bacillus amyloliquefaciens*. No bioensaio seletivo de 124 linhagens, 21 apresentaram atividade larvicida em *Aedes aegypti*. Os bioensaios com os extratos metabólicos produzidos por estas 21 linhagens ativas, cultivadas em meio NA, LB e ISP2, demonstraram que sete apresentaram patogenicidade nas células lisadas e apenas 3 no sobrenadante filtrado. Em outra etapa, foi avaliado os extratos metabólicos produzidos por 9 linhagens ativas cultivadas em meio contendo quitina, das quais apenas 1 apresentou mortalidade tanto no sobrenadante quanto em células liofilizadas, apresentando valores correspondentes a 100%. Sendo assim as linhagens selecionadas apresentaram potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas microbianos.

Palavras-chave: Bioprospecção, Microbiota amazônica, Enzimas hidrolíticas, Insetos vetores.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is an important vector in the transmission of dengue virus, urban yellow fever, zika and chikungunya. The main tool used to control this vector is conventional chemical insecticides. However, continuous use causes many negative factors, such as environmental contamination and selection of resistant populations. In this sense, the biological control by microorganisms is a biotechnological alternative in the control of vectors, mainly the bioinsecticides formulated with bacteria of the genus *Bacillus*. Considering the diversity of *Bacillus*, members of this genus are capable of synthesizing bioinsecticidal biomolecules against different orders of insects. In addition, they are able to synthesize biopolymers, antibiotics and enzymes such as chitinase expressed by the *chi* gene. These enzymes have the ability to hydrolyze β -1,4 glycosidic bonds between the chitin polymer units. After ingestion by the larvae of the insect, it causes degradation of the peritrophic membrane that separates the epithelium from the middle intestine of the intestinal lumen, whose main component is chitin. This factor is a favorable requirement for its use in the control programs of insect vectors and agricultural pests. In this study, 124 bacterial strains isolated from soil, water, plant and insect from different Amazonian environments were used. All strains were identified by phenotypic characteristics as belonging to the bacilli group, being one hundred and fourteen (91.4%) Gram positive and ten (8.6%) Gram negative. In the molecular identification by amplification and sequencing of the 16S (rDNA) gene, 33 lines were identified, 27 belonging to the genus *Bacillus*, 4 to the genus *Serratia*, 1 to the genus *Paenibacillus* and 1 to the genus *Achromobacter*. In the molecular detection of the *chi* gene, six lineages (4.5%), BTAM27LB, 103PHAISP2, BTAM138LB, BTAM18NA, K2NA and R11ISP2 showed positive amplification, of which two were identified, BTAM 27- *Bacillus* sp. and R11ISP2-*Bacillus amyloliquefaciens*. In the selective bioassays of 124 lineages, 21 showed activity in *Aedes aegypti* larvae. The bioassays with the metabolic extracts produced by these 21 lineages cultivated in NA, LB and ISP2 medium demonstrated that 7 presented pathogenicity in the lyophilized culture and only 3 in the filtered supernatant. In another step, metabolic extracts produced by 9 strains cultured in chitin medium were evaluated, of which only 1 presented mortality in both the supernatant and lyophilized culture, presenting values corresponding to 100%. Thus, the selected strains present potential for the development of microbial bioinsecticides.

Key words: Bioprospecting, Amazonian microbial, Hydrolytic enzymes, Insect vectors.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene 16s.....	49
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação.....	51
Tabela 3: Concentrações dos extratos	54
Tabela 4: Isolados de <i>Bacillus</i> spp., conforme o substrato de isolamento e teste de gram.	55
Tabela 5: Identificação molecular das linhagens.....	57
Tabela 6: Resultado do bioensaio seletivo	62
Tabela 7: Percentual de mortalidade das larvas expostas as células lisadas	64
Tabela 8: Percentual de mortalidade das larvas expostas no sobrenadante.....	66
Tabela 9: Percentual de mortalidade das larvas expostas as células lisadas do cultivo com quitina	68
Tabela 10: Resultado de mortalidade das larvas expostas ao sobrenadante do cultivo com quitina	69
Tabela 11: Linhagens com atividade larvicida e a presença do gene <i>Chi</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida holometábolo de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 2: Estrutura molecular da quitina.	24
Figura 3: Estruturas polimórficas da molécula de quitina.	25
Figura 4: Principais classes das quitinases.	26
Figura 5: Representação dos gêneros bacterianos.	58
Figura 6: Perfil eletroforético do gene <i>Chi</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido desoxirribonucleico

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

°C – Graus Celsius

pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

rpm – Rotação por minuto

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

WRBU - Unidade de Biossistemática Walter Reed

MS – Ministério da Saúde

SVS – Secretária de Vigilância em Saúde

NCBI - National Center for Biotechnology Information

WHO - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 O mosquito <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762).	16
2.2 Controle de <i>Aedes aegypti</i>	19
2.3 Biodiversidade Amazônica.....	20
2.3.1 Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> spp.	21
2.4 Enzimas	23
2.4.1 Enzimas Quitinases	24
2.4.2 Classificação e funções das quitinases	25
2.4.3 Aplicações biotecnológicas das quitinases	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos.....	31
REFERÊNCIAS	32
CAPITULO	43
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
Local de estudo.....	47
Reativação e purificação de bactérias.....	47
Seleção fenotípica (Coloração de Gram).....	48
Identificação molecular	48
Extração do DNA genômico das linhagens	48
Reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rDNA.	49
Purificação das amostras de PCR e Reação de Sequenciamento.	50
Deteção molecular do gene <i>Chi</i> (Quitinase).....	50
Bioensaios.....	52
Obtenção e manutenção das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	52
Cultivo das linhagens bacterianas.....	52
Bioensaio seletivo de linhagens bacterianas patogênicas contra larvas de <i>Ae. aegypti</i>	53
Obtenção dos extratos de bactérias.....	53
Atividade larvicida de células lisadas (pellet) e do sobrenadante filtrado das bactérias	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Culicidae, sendo conhecidas mais de 3.500 espécies, distribuídas em todo o globo terrestre (FORATTINI 2002; WRBU, 2018). Apresentam importância para a saúde pública, por estarem envolvidos na transmissão de patógenos causadores de doenças, como a malária, filariose, febre amarela urbana, dengue, febre de chikungunya, febre pelo vírus zika, entre outras arboviroses, cuja gravidade é variável (GUBLER, 1998; LIMA-CAMARA, 2016; MS/SVS, 2017). Milhares de pessoas pelo mundo são infectadas por estas doenças, causando impactos negativos à saúde pública e à economia em áreas de ocorrência, cujas condições ambientais, em conjunto com a ineficácia das políticas públicas de saúde, favorecem o aumento das populações de vetores (WHO, 2017).

Dentre os mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* (Díptera: Culicidae), cujas fêmeas infectadas por arbovírus podem transmiti-los ao homem, por meio da picada, destaca-se a espécie *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (FORATTINI 2002; FERREIRA-DEBRITO et al., 2016). Esta espécie é a mais importante como vetor dos quatro sorotipos circulantes no Brasil (DENV-1, DENV-2 DENV-3 e DENV-4) causadores da dengue, além de transmitir os arbovírus da febre amarela urbana (YFV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV), este último reemergente no Brasil (GUBLER, 1998; ZARA et al., 2016).

Apesar dos investimentos nas pesquisas com vacinas, campanhas educativas, monitoramento e controle vetorial, ainda não há um método eficaz para a erradicação destas arboviroses. Sendo assim, a intensificação do controle da densidade de populações do vetor, é o parâmetro mais relevante para interromper a cadeia de transmissão dos vírus (TAUIL, 2002; ARAÚJO et al., 2015). A redução dos níveis populacionais de *Ae. aegypti* é um desafio para a saúde pública, devido aos inúmeros problemas que abrange esta ação, dentre estes, o uso dos inseticidas químicos sintéticos, a principal ferramenta de controle vetorial (QUIMBAYO et al., 2014). Estes produtos apresentam efeitos imediatos, porém, o uso de forma contínua, com aplicações em campo, apresenta desvantagem, como o desenvolvimento de resistência em algumas populações de mosquitos, poluição ambiental, contaminação de alimentos, efeitos nocivos aos animais e insetos benéficos, além de apresentar um alto custo econômico (TADEI et al., 1998; TADEI et al., 2017).

Diante da importância da obtenção de novos métodos para utilização no controle de vetores de doenças tropicais, o controle biológico surgiu como alternativa promissora para a substituição do uso de inseticidas sintéticos (ALVES, 1998; SALDANÑA et al., 2017). Neste

sentido, medidas de controle biológico pode ser uma alternativa relevante, pelo fato de utilizar recursos oriundos da natureza como, por exemplo, plantas, fungos e bactérias, além disso, são de fácil acesso, baixo custo e com atividade direcionada para organismos alvos (ALVES 1998; GUO et al., 2015). Dentre os microrganismos utilizados, os membros do gênero *Bacillus*, como por exemplo, *B. thuringiensis*, apresenta potencial para síntese de proteínas inseticidas CRY, VIP e CYT com mecanismos de ação contra diferentes ordens de insetos: díptera, lepidóptera, coleóptera, etc (BRAVO et al., 2007; RAYMOND et al., 2010; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2016) .

Considerando o potencial metabólico dos *Bacillus*, diversas enzimas produzidas pelas bactérias deste gênero, que estão envolvidas no processo de patogenicidade a uma diversidade de insetos, foram identificadas, dentre estas, encontram-se as quitinases (E.C.3.2.1.14), expressas pelo gene *Chi* (DJENANE et al., 2017). São enzimas pertencentes à família das glicosil-hidrolases, com capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 entre as unidades de *N-acetilglicosaminas* (GlcNAc) constituintes do polissacarídeo quitina. Estas biomoléculas são sintetizadas por uma diversidade de organismos, incluindo bactérias, plantas, fungos, insetos, crustáceos, mamíferos (USHARANI & GOWDA, 2011; BOYCE et al., 2013). Devido à hidrólise da quitina, estas enzimas apresentam potencial promissor para diversas aplicações biotecnológicas, dentre estas, a utilização como agentes de controle de insetos vetores de doenças (RAMIREZ et al., 2012; HAN et al., 2014).

Sendo assim, há interesse pela busca de linhagens bacterianas com a presença de genes no genoma que expressem enzimas quitinolíticas, com potencial bioinseticida, visto que ainda existe uma lacuna de conhecimentos sobre os *Bacillus* e suas atividades biológicas. Neste contexto, a região Amazônica, hábitat de uma vasta biodiversidade e considerada a maior reserva biológica do mundo, representa um campo a ser explorado, objetivando a descoberta de microrganismos com potencial para a síntese de biomoléculas com aplicações biotecnológicas (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012; OLIVEIRA et al., 2017). Neste sentido, é imprescindível a obtenção de conhecimentos dos recursos genéticos da microbiota amazônica, por meio das técnicas de biologia molecular para fins biotecnológicos (OLIVEIRA et al., 2017).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762).

O mosquito *Ae. aegypti* é objeto de pesquisa no mundo todo. A importância epidemiológica como principal vetor de diferentes arboviroses, além da facilidade de manutenção em condições de laboratório, são fatores que contribuem para estimular estes estudos (FORATTINI, 2002; LIMA-CAMARA, 2016). A ocorrência deste vetor foi descrita no ano de 1762 por Linnaeus no Egito, com a presença nos trópicos e subtropicais, no continente Americano, no sudeste da Ásia e na Índia (CHRISTOPHERS, 1960; KRAEMER et al., 2015). Trata-se de uma espécie de origem africana, considerada a de maior importância epidemiológica na América Latina (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016). Os primeiros registros da presença desta espécie no território brasileiro datam de meados do século XVIII, época em que era feito o comércio de negros africanos como escravos (FORATTINI, 2002; MONTEIRO et al., 2014).

A espécie tem distribuição mundial, com presença principalmente em áreas tropicais e subtropicais. No Brasil foi registrada a presença em todos os 26 estados da Federação, no Distrito Federal e na maioria dos municípios brasileiros (KRAEMER et al., 2015). No estado do Amazonas, foi detectado no ano de 1996, sendo então distribuído em diversos municípios (PINHEIRO & TADEI, 2002). A dispersão geográfica das populações encontra-se relacionada a diversos fatores, como as condições ambientais, hábito alimentar endofílico e antropofílico, facilidades de reprodução, inexistência de saneamento básico em determinadas regiões e à capacidade de resistência dos ovos à dessecação (FORATTINI, 2002; SOARES-PINHEIRO et al., 2017).

O ciclo de vida deste mosquito é holometábolo composto pela fase de ovo, larva, pupa e adulto (figura1). Os ovos apresentam contorno alongado e fusiforme, em condições favoráveis de umidade e temperatura, completam o desenvolvimento embrionário após 48 horas depois da postura. Os instares larvais (L1, L2, L3 e L4) correspondem ao período de alimentação e crescimento, e o tempo de duração é dependente de vários fatores como a temperatura, disponibilidade de alimento orgânico e densidade larvária nos criadouros. Posteriormente, as larvas entram em estágio de pupa, durante o qual não se alimentam e realizam a metamorfose para a fase adulta. O mosquito adulto representa a fase alada e reprodutiva do vetor, com o tempo médio de vida de aproximadamente 30 dias (FORATTINI, 2002; KRAEMER et al., 2015).

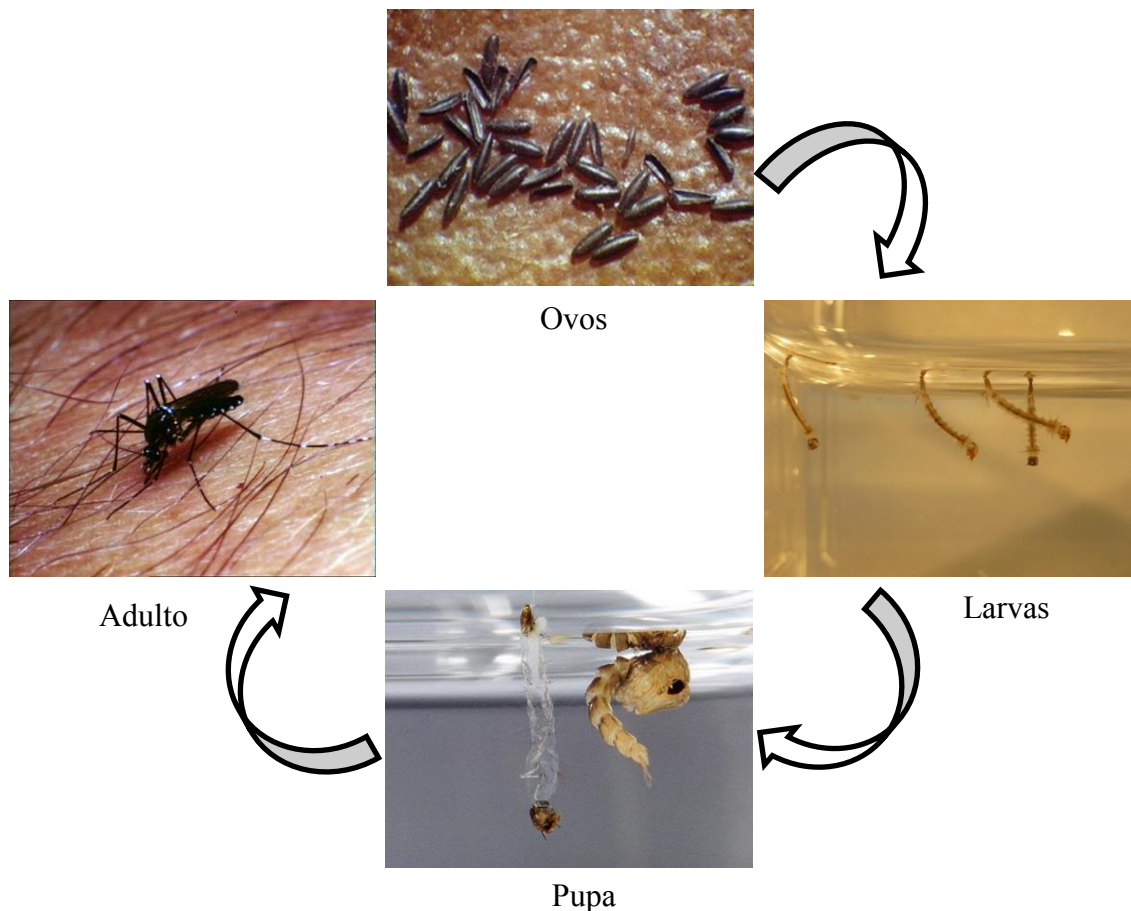


Figura 1: Ciclo de vida holometábolo de *Ae. aegypti*. FIOCRUZ (2014).

Os mosquitos adultos apresentam coloração escura, com escamas brancas nas bases dos segmentos tarsais. Os machos se diferenciam das fêmeas por possuírem antenas plumosas, palpos mais alongados e não realizam hematofagia. Porém, ambos os sexos alimentam-se de néctar obtidos de vegetais, seiva e outras fontes de carboidratos (FORATTINI, 2002; POWELL & TABACHNICK, 2013). Após a cópula, a fêmea realiza inúmeras posturas, devido à capacidade de armazenar espermatozoides na espermateca. Estas são hematófagas, pois, necessitam alimentar-se de sangue, preferencialmente de humanos, para a obtenção das proteínas necessárias ao desenvolvimento do ciclo gonadotrófico. Dessa forma, ao completar este ciclo, está apta para a oviposição, que é realizada após cada repasto sanguíneo. Após o desenvolvimento embrionário, em condições desfavoráveis à eclosão das larvas, os ovos entram em diapausa embrionária e podem permanecer viáveis à eclosão no meio ambiente por cerca de um ano (SILVA & SILVA, 1999; POWELL & TABACHNICK, 2013). Esta resistência é um dos principais obstáculos para o controle, pois possibilita a dispersão passiva da espécie, enquanto que, a dispersão ativa dos adultos é reduzida, devido à

autonomia de vôo de aproximadamente 200 metros (FORATTINI, 2002; SIMMONS et al., 2012).

Na fase adulta, a fêmea infectada, tem capacidade de transmitir ao homem, por meio da picada, múltiplos patógenos causadores de doenças, como a dengue, febre amarela urbana, zika, chikungunya, febre do Nilo, etc (FORATTINI 2002; LIMA-CAMARA, 2016). A dengue cujo agente etiológico é um vírus da família *Flaviviridae*, é atualmente uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (SOO et al., 2016; BRASIL, 2018). Esta arbovirose pode ser causada por cinco sorotipos, que diferem quanto ao comprimento genômico viral: DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 e DENV5, sendo que no Brasil, desde a sua identificação em 1846, ainda não houve relatos de casos com o sorotipo DENV5 (SOO et al., 2016).

Outra doença transmitida por este vetor é a febre zika, ocasionada pelo vírus ZIKV da família *Flaviviridae*, que também pode ser transmitido por meio do ato sexual e *in útero* (GANGULI et al., 2017). Esta doença se manifestou no Brasil no ano de 2015, com relatos de casos graves, ocasionando anormalidades fetais (microcefalia) e distúrbios neurológicos em recém-nascidos de mães que apresentaram sintomas da infecção, no decorrer da gravidez (VALERIO et al., 2016). Além disso, há um consenso que o zika vírus está relacionado com a síndrome de Guillain-Barré (CÁRDENAS et al., 2017; WHO, 2017).

Em relação à chikungunya, esta arbovirose é ocasionada por um vírus da família *Alphavirus*, que surgiu nas Américas no ano de 2013 (BURT et al., 2014; KANTOR, 2016). A região nordeste foi a que mais apresentou casos prováveis no ano de 2017 (BRASIL, 2018). Considerando estas arboviroses, de acordo com o Ministério da Saúde, até a 19^a semana epidemiológica do ano de 2018, foram registrados no Brasil 98 casos de dengue grave, 1.124 casos de dengue com sinais de alarme e 50 óbitos; 22.255 casos de febre de chikungunya e 4 óbitos; 1.295 febre pelo vírus Zika e 1 óbito (MS, 2018).

O fato de ainda não existir vacina eficaz contra estes vírus, tem permitido a expansão para diferentes localidades (BRASIL, 2017). Assim, a principal estratégia de prevenção e controle dessas arboviroses tem como alvo, o combate ao vetor, por meio do uso de inseticidas químicos convencionais, além de campanhas de conscientização da população, visando à destruição de criadouros e o bloqueio de sua reprodução (TAUIL, 2002; ARAÚJO et al., 2015). Por esta razão, a implementação de medidas alternativas são necessárias para o controle deste vetor, principalmente as que não causem danos ao ser humano e ao meio ambiente (TADEI et al., 2017).

2.2 Controle de *Ae. aegypti*

O controle da densidade populacional do vetor *Ae. aegypti*, consiste na aplicação de inseticidas químicos sintéticos, contendo ingredientes ativos, como os organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides (PINHEIRO & TADEI 2002; QUIMBAYO et al., 2014). Porém, o uso excessivo desses compostos, resulta em diversos fatores negativos, dentre estes, a intoxicação de seres humanos e o desenvolvimento de resistência (MAESTRE, 2014; MOYES et al., 2017). Os mecanismos de resistência a quatro classes de inseticidas químicos sintéticos como os carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretróides, foram detectados em populações de *Ae. Aegypti* presentes em três continentes, nas quais ocasionaram mutações em sítios alvos dos inseticidas, também conhecidas como resistência *target site* e mutações do tipo Kdr “*knock-down resistance*” (CARVALHO & SILVA 1999; ZARA et al., 2016; MOYES et al., 2017).

Diante deste cenário, há necessidade de obtenção de métodos alternativos ecológicos e com menor possibilidade de desenvolvimento de resistência, para o controle populacional deste vetor (MOYES et al., 2017). Neste contexto, os agentes de controle biológico, podem ser uma alternativa viável para a manutenção de baixos níveis populacionais de *Ae. aegypti*, ocasionando dessa forma, a redução do uso de pesticidas químicos sintéticos (ALVES, 1998; GUO et al., 2015). A utilização deste método de controle vetorial apresenta inúmeras vantagens, em relação aos inseticidas químicos convencionais, como por exemplo, a capacidade de interação de forma específica com o inseto alvo, menor chance do desenvolvimento de resistência pelo inseto, além de não ocasionar danos negativos aos ecossistemas (ALVES, 1998; CORBEL et al., 2017). Sendo assim, a inserção de medidas de controle biológico, pode ser uma ferramenta fundamental para utilização nas ações de combate a manutenção de níveis populacionais desejáveis de *Ae. Aegypti* (TADEI et al., 1998, 2010, 2017).

O controle biológico pode ser definido como métodos que tem como objetivo, a redução da densidade populacional de um determinado organismo, por meio de outra população que apresenta capacidade de ação nesse sentido (ALVES, 1998; MOYES et al., 2017). De acordo com a maneira de ocorrência de determinados mecanismos de ação, os inimigos naturais podem ser considerados como predadores ou parasitas. Estes também são relacionados como microparasitismo ou macroparasitismo, pelo fato destes agentes se reproduzirem ou não no organismo hospedeiro (ALVES, 1998; FORATTINI, 2002).

Considerando os mecanismos de ação biológica, estas medidas de controle são classificadas em quatro tipos: 1- Controle biológico clássico, que envolve o uso de inimigos naturais; 2- Manipulação genética- técnica com capacidade de interferir na reprodução do inseto; 3- Modificadores de comportamentos da praga- exploram condutas específicas de forma a confundi-las ou alterá-las, conseguindo assim o seu controle; 4- Controle microbiano- utiliza microrganismos capazes de causar doenças ou de prevenir o estabelecimento de microrganismos patogênicos (ALVES, 1998; PARRA et al., 2002). Dentre os microrganismos utilizados, destacam-se as bactérias e os fungos entomopatogênicos. No grupo dos procariotos, encontram-se duas espécies mais estudadas e utilizadas, *B. thuringiensis israelensis* (Bti) e *B. sphaericus*, as quais sintetizam uma diversidade de biomoléculas com propriedades eficazes contra larvas de insetos de diversas ordens. Ambas sintetizam endotoxinas proteicas, que ao serem ingeridas pelos mosquitos na fase larval, destroem o epitélio do intestino médio, ocasionando a morte (BRAVO et al., 2011; BEN-DOV, 2014).

O controle populacional de *Ae. aegypti*, é um importante desafio na saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Diante de um quadro grave e preocupante em relação às arboviroses, delineado pela expansão destes vírus em todo o mundo, torna-se imprescindível, a adoção de estratégias específicas, com maiores investimentos em métodos adequados, que forneçam sustentabilidade às ações estabelecidas pelas redes de vigilância (FORATTINI, 2002; MS, 2017). Com os avanços das técnicas de biologia molecular, várias estratégias para o controle de mosquitos adultos estão em fase de desenvolvimento e aprimoramento (ZARA et al., 2016; MACIAS et al., 2017). Dentre estas, as técnicas de manipulação genética, como por exemplo, *sterile insect technique*, e a utilização de fêmeas de *Ae. aegypti* infestadas com a bactéria *Wolbachia sp.*, que mostrou capacidade de bloquear a infecção dos mosquitos pelos patógenos, estão sendo estudadas (ALPHEY et al., 2010; MACIAS et al., 2017).

2.3 Biodiversidade Amazônica

A utilização de medidas de controle vetorial que não ocasionem danos ao homem e ao meio ambiente é de extrema importância. Estes fatores são pré-requisitos no desenvolvimento de bioprodutos, e para isto, tem se buscado na diversidade biológica, biomoléculas que possam ser utilizadas como agentes de controle (SINGH et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017). O Brasil é considerado detentor da maior diversidade biológica do planeta, com cerca de 20% da biodiversidade mundial, fator este, de grande importância para a obtenção de

biomoléculas para fins biotecnológicos (MORAIS et al., 2014). Considerando a biodiversidade da região Amazônica, a maior reserva biológica do mundo, ainda há pouco conhecimento acerca das espécies que a compõem e, conseqüentemente, de suas biomoléculas sintetizadas, que podem representar uma fonte promissora de bioprodutos (SOUSA et al., 2017).

A obtenção de conhecimentos dessa biodiversidade é de extrema importância, visto que, os organismos podem apresentar conteúdos genéticos e funções diversificadas nos ecossistemas. Desse modo, o desenvolvimento de pesquisas nestes habitats poderá contribuir para o conhecimento da biodiversidade, além de permitirem a descoberta de novos produtos de interesse biotecnológico (ARAUJO et al., 2007; PEREIRA et al., 2017). Considerando a variabilidade de microrganismos com perfis genéticos e características metabólicas diferentes, estes despertam interesses biotecnológicos, devido à capacidade de síntese de proteínas e outros metabólitos com aplicações em diversos setores, como por exemplo, na agricultura, indústria farmacêutica, etc (CONTI et al., 2012; MORAIS et al., 2014).

2.3.1 Bactérias do gênero *Bacillus* spp.

Considerando as linhagens de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Bacillales* e Família *Bacillaceae*, constituem um extenso grupo taxonômico que apresentam características fenotípicas e genotípicas diversificadas (MADIGAN et al., 2010; VILLA-LOBOS et al., 2018). Membros deste gênero são nocivas, inócuas e benéficas à saúde humana. A capacidade de síntese de endósporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas são fatores, que fazem com que estes microrganismos sejam considerados ubíquos (BRAVO et al., 2011; SOARES-DA-SILVA et al., 2017). Dessa forma, podem ser isoladas de uma diversidade de substratos e habitats, tanto em ecossistemas aquáticos como em terrestres, sendo que o solo é o principal substrato, uma vez que a maioria das espécies são saprófitas, e utilizam as diversas matérias orgânicas presentes no solo (BRAVO et al., 1998; SOARES-DA-SILVA et al., 2015).

De acordo com os processos fisiológicos, as espécies do gênero *Bacillus* podem ser aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. Dessa forma, utilizam vários substratos tanto na forma orgânica quanto inorgânica (BRAVO et al., 2011; GLAZER & FILHO, 2016). Na fase vegetativa em condições desfavoráveis, desenvolvem um ciclo de esporulação típico de *Bacillus* e gêneros mais próximos, no qual são produzidos esporos com ausência de atividade metabólica, representando uma fase altamente resistente contra as condições ambientais

adversas (ALVES, 1998; POLANCZYK & ALVES, 2003). A formação de endósporos resistentes ao calor e à dessecação é uma característica importante, para a formulação de produtos biotecnológicos (CAL S, 2016). O endósporo pode permanecer viável no ambiente até que as condições se tornem favoráveis para iniciar os processos metabólicos e, conseqüentemente, originar uma célula vegetativa (TEJERA-HERNÁNDEZ et al., 2011; CAL S, 2016).

No grupo dos *B. cereus*, que compreendem espécies com alta similaridade genética, encontram-se sete espécies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* e *B. cytotoxicus* (LECHNER et al., 1998; GUINEBRETIERE et al., 2013; XU et al., 2014). Dentre estas espécies, duas são consideradas de maior importância médica: *B. cereus* e *B. anthracis* apresentam grande impacto como agentes patogênicos em seres humanos, enquanto que *B. thuringiensis* é utilizada no controle biológico de insetos (VILAS-BOAS et al., 2007; LIU et al., 2016). As células de *B. thuringiensis*, sintetizam inclusões cristalinas proteicas, que apresentam atividade entomopatogênica, em uma diversidade de insetos pertencentes a várias ordens, como por exemplo, Lepidoptera, Díptera, Coleóptera, Hymenoptera (SCHNEPF et al., 1998; POLANCZYK & ALVES, 2003; BADRAN et al., 2016). Estas proteínas denominadas delta-endotoxinas CRY (Crystal) com massa molecular entre 40 a 140 kDa e as toxinas CYT (Citolíticas) com 27 a 30 kDa, são codificadas pelos genes *Cry* e *Cyt*, que geralmente encontram-se localizados em plasmídeos, e em menor frequência, no cromossomo bacteriano (SCHNEPF et al., 1998; ELLEUCH et al., 2015).

Além disso, uma das características importantes dos membros deste gênero é a síntese de lipopeptídeos, incluindo peptídeos cíclicos não ribossômicos (VILLA-LOBOS et al., 2018). Estes metabólitos apresentam potencial promissor para uso no controle biológico, pois, são capazes de inibir o crescimento de microrganismos fitopatogênicos, como por exemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, etc (ZHANG et al., 2016). Os lipopeptídeos (LPs) consistem estruturalmente de um peptídeo cíclico unido a uma cadeia de β -hidroxi ou β -amino ácidos graxos. De acordo com as sequências de aminoácidos e comprimento do ácido graxo, estes são classificados em três famílias diferentes: iturinas, fengicinas e surfactinas (ONGENA & JAQUES, 2008; FALARDEAU et al., 2013). Essas biomoléculas são sintetizadas por complexos multienzimáticos, conhecidos como peptídeos sintetase não ribossômico (NRPS), as quais são independentes do RNA mensageiro (CHOWDHURY et al., 2015).

Bactérias deste gênero são também conhecidas como produtoras de uma diversidade de enzimas líticas extracelulares, como por exemplo, a celulase, glucanase, amilase, proteinase e quitinase, as quais apresentam diversas aplicações biotecnológicas (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012; VILLA-LOBOS et al; 2018). Estas enzimas são utilizadas em vários processos biológicos, por exemplo, as quitinases e β -glucanases são responsáveis pela degradação dos principais polissacarídeos que compõem a parede celular dos fungos, pela hidrólise de suas ligações glicosídicas (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012; SHAFI et al., 2017). Sendo assim, o isolamento de espécies de *Bacillus* que apresentem no genoma, genes codificadores de enzimas com novas propriedades biológicas, é de extrema relevância para a comunidade científica, visto que, estes microrganismos apresentam facilidade de produção em larga escala industrial (POLANCZYK & ALVES, 2003; PERALTA & PALMA, 2017).

2.4 Enzimas

Enzimas são moléculas orgânicas sintetizadas pelas células e apresentam mecanismo de ação catalisador de reações químicas. Estas moléculas possuem alta especificidade em relação ao substrato e devido a isso, executam diversas transformações de maneira seletiva e rápida (ZHANG et al., 2016). No entanto, demonstram sensibilidade a diversos fatores, tendo essa eficiência afetada por condições químicas ou físicas. Dessa forma, podem ocorrer alterações no mecanismo de ação enzimático (PELCZAR et al., 2012).

De acordo com o tipo geral de reação que catalisam, as enzimas são classificadas em seis classes principais - oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Dentre estas classes, as hidrolíticas são responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos e são sintetizadas, em grande variedade, pelos microrganismos como fungos e bactérias (ISLAM & DATTA, 2015). A obtenção de microrganismos, produtores de protease, amilase, celulase e quitinase, são importantes, pois, estas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas, visto que se busca detectar enzimas com maior eficácia e adequada às condições químicas destes processos (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; ZHANG et al., 2016).

Diante deste contexto, as enzimas sintetizadas pelos microrganismos despertam o interesse das pesquisas, devido à biocatálise e outras características dos produtores, como, por exemplo, rápido desenvolvimento em meio de cultura, alta quantidade de produto em menor tempo, possibilidade de produção em larga escala, produção independente de fatores sazonais e além das possibilidades de manipulações genéticas para melhor produtividade (SOARES et

al., 2012; LUZ et al., 2016). As enzimas fitase, celulase, amilase e quitinase, para a utilização em processos industriais, podem ser sintetizadas por microrganismos como *Aspergillus niger*, *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, etc. As quitinases possuem as suas aplicações, devido à capacidade de hidrólise do polímero quitina (SINGH et al., 2016).

2.4.1 Enzimas Quitinases

As quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas hidrolíticas sintetizadas por uma diversidade de seres vivos, tanto eucariotos como procariotos (GUAN et al., 2009; ISLAM & DATTA, 2015). Estas moléculas apresentam tamanhos variados de 20 kDa a 90 kDa, são membros da família das glicosil hidrolases, que catalisam a hidrólise das ligações β -1,4 entre as unidades de *N*-acetilglicosaminas, constituintes da quitina (HAMID et al., 2013). Estas biomoléculas foram detectadas em organismos que contêm quitina no exoesqueleto ou na parede celular como, por exemplo, insetos, crustáceos, fungos, e também em organismos que não contêm quitina, como bactérias, plantas superiores e vertebrados (NURDEBYANDARU et al., 2010; USHARANI & GOWDA, 2011). A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante e renovável no meio ambiente. É funcionalmente e estruturalmente idêntico á celulose e dependendo da disposição de suas cadeias, apresentam três diferentes estruturas polimórficas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina (figura 3) (FREDERIKSEN et al., 2013). A função deste hidrato de carbono estrutural é proporcionar a rigidez ao exoesqueleto e uma barreira física contra os microrganismos invasores. Esta importância primordial da quitina, em diferentes funções biológicas das espécies de pragas agrícolas e insetos vetores de doenças tropicais fazem dela um alvo das pesquisas (SUBBANNA et al., 2018).

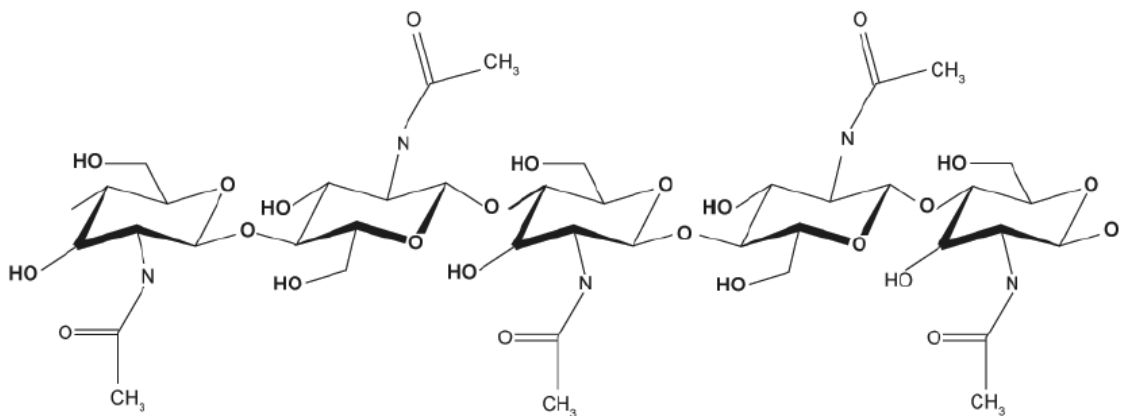


Figura 2: Estrutura molecular da quitina. Fonte: (BOLDO et al., 2009).

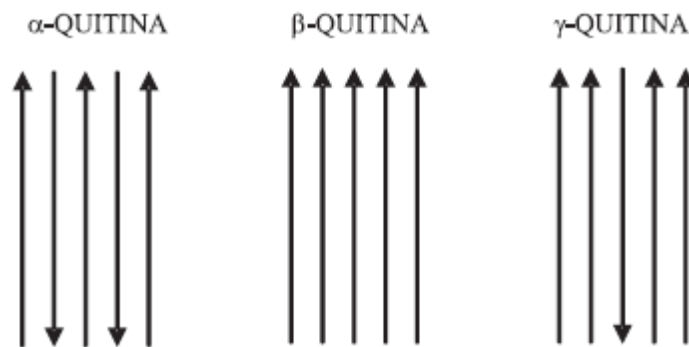


Figura 3: Estruturas polimórficas da molécula de quitina.

A α -quitina é composta por cadeias poliméricas de *N-acetilglicosaminas* dispostas de forma antiparalela. Enquanto que a β -quitina é composta por cadeias poliméricas de *N-acetilglicosaminas* dispostas paralelamente. Já a γ -quitina é composta de cadeias poliméricas de *N-acetilglicosaminas* paralelas intercaladas por uma cadeia antiparalela (BOLDO et al., 2009).

2.4.2 Classificação e funções das quitinases

De acordo com a ação enzimática de hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 entre as unidades de *N-acetilglicosaminas* constituintes da quitina, as quitinases são classificadas em duas classes principais: endoquitinases e exoquitinases (figura 4) (LIU & KOKARE, 2017). A primeira hidrolisa as ligações β -1,4 em sítios aleatórios no interior do polímero, liberando dessa forma, quitooligossacarídeos como, por exemplo, quitotetraose e quitotriose. Já as exoquitinases são classificadas em duas subcategorias: quitobiosidases que clivam o polímero na extremidade não redutora, liberando diacetilquitobiose e a 1-4- β -glucosaminidases que clivam os produtos gerados pela ação das endoquitinases e quitobiosidases, resultando em monômeros de *N-Acetilglicosaminas*. Existem também as endo-exoquitinases que apresentam os dois mecanismos de ação (DUO CHUAN, 2006; HAMID et al., 2013).

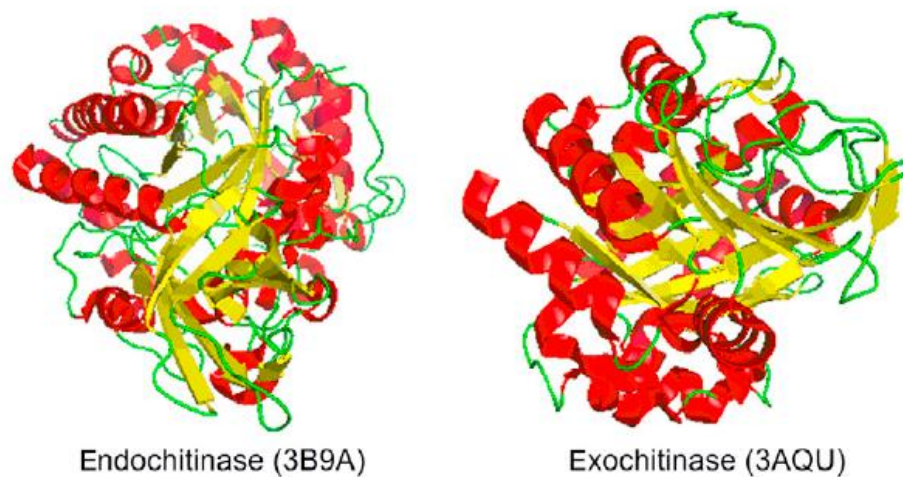


Figura 4: Principais classes das quitinases (LIU &KOKARE, 2017).

De acordo com as diferenças das sequências de aminoácidos da cadeia e dos domínios de mecanismos catalíticos, as quitinases são agrupadas em diferentes famílias das glicosil hidrolases (GH), como por exemplo, GH18, GH19 e GH20 (HENRISSAT, BAIROCH, 1993; LOMBARD et al., 2014). As quitinases bacterianas pertencem à família GH18 e são separadas em três subfamílias principais, A, B e C (LI & GREENE, 2010; ADRANGI & FARAMARZI, 2013). As quitinases da família GH 19 são sintetizadas principalmente pelos vegetais, embora também sejam detectadas em procariontos (SEIL et al., 2005; PRAKASH et al., 2010). As enzimas pertencentes a esta família, possuem domínios catalíticos α -hélices que ocasionam mudanças na conformação anomérica do substrato, envolvendo uma substituição nucleofílica pela molécula de água. Além disso, apresentam dois resíduos catalíticos com grupos carboxílicos, que ativam a molécula de água e protona o oxigênio da ligação glicosídica. Este mecanismo é de inversão e os produtos são α -anômeros (ARAKANE & MUTHUKRISHNAN, 2010; TANAKA et al., 2017). Já as enzimas da família GH18 possuem domínios formados por oito α -hélices e oito folhas- β . A reação de catálise retém a configuração anomérica do substrato, ocorrendo um mecanismo de deslocamento duplo que resulta em quitooligossacarídeos com configuração β -anomérica (HUANG et al., 2012; ITOH et al., 2013).

De acordo com a fisiologia e a necessidade do organismo produtor de quitinases, estas enzimas apresentam diversas funções biológicas, como na morfogênese, ciclagem de nutrientes e no mecanismo de defesa (DAHIYA et al., 2006; HAMID et al., 2013). Em plantas, estão presentes nos caules, sementes, flores e tubérculos e são expressas em resposta a diversos fatores como, por exemplo, estresse ambiental, resistência à pressão osmótica,

defesa contra patógenos e a processos fisiológicos vitais, como a embriogênese e síntese de etileno (FUKAMIZO et al., 2003; ISLAM & DATTA, 2015). Além disso, as quitinases dos vegetais inibem o crescimento dos microrganismos fitopatógenos, devido à atuação em sinergismo com outras enzimas como a β -1,3-glucanases (ISLAM & DATTA, 2015).

As quitinases sintetizadas pelos insetos são expressas principalmente no tegumento e no intestino, onde desempenham papéis essenciais no desenvolvimento pós-embriônico, pois, degradam a quitina durante o processo de ecdise. Neste processo, as endoquitinases dividem aleatoriamente a cutícula em quitoooligosacarídeos, os quais são posteriormente hidrolizados pelas exoenzimas em *N-acetilglucosaminas* (LI et al., 2015). Dessa forma, este monômero é reutilizado na síntese de uma nova cutícula. Além disso, estas enzimas participam de processos imunológicos na hemolinfa e nos sistemas traqueal e reprodutivo ou na digestão de alimentos constituídos de quitina (ZHU et al., 2016).

Nos vertebrados, as enzimas quitinolíticas foram descritas em diversos organismos, sendo encontradas em tecidos e órgãos como, por exemplo, o trato digestivo, no qual participam do metabolismo de carboidratos (HAMID et al., 2013). A síntese destas enzimas foi também descrita em seres humanos, apesar de não haver a produção de quitina por esses organismos, há genes codificadores de quitinases que degradam este polissacarídeo, seja ele oriundo da ingestão ou inalação, tais como conídios de fungos. Desta maneira, desenvolvem importantes funções nos mecanismos de defesa (PATIL et al., 2000; BUSSINK et al., 2007).

Nos fungos, as quitinases são produzidas para múltiplas funções fisiológicas na nutrição, parasitismo, morfogênese e nos processos de crescimento dos fungos como, por exemplo, autólise, germinação de esporos, separação de células, desenvolvimento de micélios, ramificações e hifas (HAMID et al., 2013; ISLAM & DATTA, 2015). Do mesmo modo que os fungos e invertebrados, os protozoários sintetizam quitinases durante o processo de morfogênese (SAHAIKH & DESHPANDE, 1993).

Em relação aos procariotos, muitas espécies secretam quitinases na degradação da quitina, para a obtenção de energia em condições aeróbicas e anaeróbicas, e são encontradas em uma diversidade de habitats (VAAJE-KOLSTAD et al., 2013). Em ambientes marinhos, as bactérias produzem quitinases para a utilização no ciclo de nutrientes da quitina, derivadas de artrópodes e outras fontes (SOUZA et al., 2011). No solo e na rizosfera são utilizadas na degradação da quitina de insetos e fungos para a obtenção de carbono e nitrogênio (ANITHA & RABEETH, 2010). Considerando as diferentes funções, estas enzimas, são essenciais para a maioria como fonte nutricional ou no mecanismo de defesa contra outros microrganismos (BHATTACHARYA et al., 2007).

Devido à complexidade molecular, insolubilidade, tamanho e composição heterogênea da quitina, detalhes do mecanismo de ação e subsequente metabolismo dos produtos de degradação das quitinases, ainda permanecem por serem elucidados (ITOH et al., 2013). No entanto, foi descrito que apresentam mecanismos de ação com potencial no processo de inibição do crescimento de fungos patogênicos, por meio da degradação da quitina das paredes celulares. Além disso, podem favorecer o aumento da efetividade da ação larvicida das proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* (SURYANTO et al., 2011; PATIL & JADHAV, 2015).

Neste sentido, as enzimas quitinolíticas bacterianas, após a ingestão pelas larvas dos insetos, ocasionam a degradação da membrana peritrófica que separa o epitélio do intestino médio do lúmen intestinal, cujo principal componente é a quitina (PARDO-LÓPEZ et al., 2009; DJENANE et al., 2017). Esta membrana é constituída de uma rede de quitina incorporada em uma matriz de proteínas e carboidratos, proporcionando uma barreira física contra danos e invasão de microrganismos (REGEV et al., 1996; CAROZZI & KOZIEL, 2005; PATIL & JADHAV, 2015). Alguns estudos relataram danos causados pela ação das quitinases na membrana peritrófica, tornando-a uma barreira menos efetiva (WIWAT et al., 2000; OTSU et al., 2003). Brandt et al., (1978) observaram que a membrana peritrófica de *Orgyia pseudotsugata* foi degradada pela endoquitinase *ChiAII* de *Serratia marcescens* e posteriormente, REGEV et al., (1996) também observaram este mecanismo em *Spodoptera littoralis*. Estes danos ocasionados à membrana peritrófica de insetos, podem resultar na diminuição significativa na alimentação e na eficiência da digestão, diminuição da utilização de nutrientes e redução de crescimento (OTSU et al., 2003; TERRA & FERREIRA, 2005).

A acessibilidade de toxinas ao epitélio do intestino médio dos insetos pode ser restrita pela matriz peritrófica. No entanto, a alta quantidade de quitinases no intestino médio das larvas é capaz de alterar a integridade das membranas peritróficas e com isso facilitar o contato entre as toxinas e as proteínas receptoras nas membranas epiteliais. Este efeito, conseqüentemente aumenta o potencial larvicida das toxinas (DRIS et al., 2010). Considerando este mecanismo, as quitinases foram utilizadas em combinações com os cristais de delta endotoxinas, sintetizados por *B. thuringiensis*, e foi observado que proporcionou aumento do efeito larvicida (JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015).

2.4.3 Aplicações biotecnológicas das quitinases

As quitinases são de extrema importância, devido à diversidade existente na natureza e pelos mecanismos de hidrólise da quitina, que resulta na síntese de monômeros. Estas biomoléculas podem ser utilizadas em uma diversidade de aplicações biotecnológicas em diferentes áreas, como, agricultura, medicina, controle biológico e indústria farmacêutica (RAMPINO et al., 2013; PATIL, JADHAV, 2015). Neste contexto, a quitina é considerada como uma molécula alvo das pesquisas, objetivando à utilização pelos agentes biológicos produtores de quitinases, inibidores da síntese de quitina ou microrganismos antagonistas (SUBBANNA et al., 2018).

A utilização das quitinases na agricultura, por meio do desenvolvimento de bioinseticidas e plantas transgênicas, resistentes ao ataque de fungos fitopatogênicos, é uma das principais aplicações (SURYANTO et al., 2011). Há também considerável interesse no potencial biotecnológico de oligossacarídeos biologicamente ativos, dentre estes, destacam-se os quitooligossacarídeos (HAMID et al., 2013; KIDIBULE et al., 2018). Estes compostos atuam como elicitores de defesa de plantas, na sinalização para a formação de nódulos radiculares, além disso, apresentam potencial promissor para uso na medicina, como por exemplo, N-acetil chitohexaose (GlcNAc) e N-acetil chitoheptaose (GlcNAc)₇, os quais apresentam atividade antitumoral (CHEN et al., 2010; KIDIBULE et al., 2018).

Estas enzimas apresentam também potencial promissor no desenvolvimento de agentes modificados e novas estratégias para o controle biológico de insetos pragas e vetores de doenças (SUBBANNA et al., 2018). Outro campo de aplicação destas enzimas é no desenvolvimento de métodos de bioconversão de resíduos contendo quitina, como por exemplo, cascas de camarão e conchas de mariscos, para a obtenção de quitosana e derivados (LIU & KOKARE, 2017). O monômero da quitina *N-acetilglucosamina* é utilizado na síntese de intermediários químicos, farmacêuticos e em produtos alimentares como, adoçantes e fatores de crescimento. Além disso, cremes e loções antifúngicas e soluções oftalmológicas também podem ser oriundas das quitinases (DAHIYA et al., 2006). Embora existam restrições imunológicas a serem analisadas, há também evidências que estas enzimas podem ser utilizadas, como agentes terapêuticos no combate a infecções fúngicas.

Diante deste contexto, é possível observar o universo de processos biotecnológicos nos quais as quitinases podem ser utilizadas. Sendo assim, o isolamento, obtenção e caracterização destas enzimas, são fatores atraentes do ponto de vista biotecnológico (LIU & KOKARE, 2017). No entanto, o sucesso do uso das quitinases nas diferentes aplicações

biotecnológicas, depende da fonte de produção. Neste sentido, a maioria dos processos industriais utiliza como fonte a biodiversidade microbiana natural ou linhagens microbianas geneticamente modificadas que sintetizam quitinases em grande escala, visando à obtenção de quantidades eficientes (LIU & KOKARE, 2017).

Apesar das possibilidades de aplicações destas enzimas, ainda há pouco conhecimento dos mecanismos de ação, o que enfatiza a necessidade de compreensão da bioquímica, pois, isto é de extrema importância para torná-los úteis em uma diversidade de processos biotecnológicos (HAMID et al. 2013; KIDIBULE et al., 2018). Considerando a importância da obtenção de conhecimentos sobre as quitinases, diversas sequências de genes codificadores destas enzimas, foram caracterizadas e depositadas no banco de dados do NCBI (The National Center for Biotechnology Information (MATSUO et al., 1999; VAAJE-KOLSTAD et al., 2013) .

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Selecionar linhagens de *Bacillus* spp., isoladas de diferentes ambientes Amazônicos, com potencial para produção de quitinases, visando o controle de populações de *Ae. aegypti*.

3.2 Específicos

- ✓ Caracterizar por métodos fenotípicos e moleculares linhagens de *Bacillus* spp., isoladas de diferentes ambientes amazônicos.
- ✓ Detectar por biologia molecular, linhagens de *Bacillus* spp., isoladas da Amazônia brasileira, portadoras do gene *Chi*;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida de cada linhagem de *Bacillus* spp., por meio de bioensaios seletivo e de dose.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S., CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology** . 844 - 856, 2012.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.8, p.1786-1795, 2013.
- ALPHEY, L.; BENEDICT, M.; BELLINI, R.; CLARK, G. G.; DAME, D. A.; SERVICE, M. W.; DOBSON, S. L. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 10: 295-31, 2010.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 1163 pp, 1998.
- ANITHA, A; RABEETH, M. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. **African J Plant Sciencias**. v. 4, n. 3, p. 61- 66, 2010.
- ARAKANE, Y & MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase like proteins. **Cell. Mol. Life Sci**. 67: 201-216, 2010.
- ARAÚJO, A. S.; FERREIRA-DE, M.; ROSIM, T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Journal of Biosciences**, Uberlândia-Mg, v.23, n.3, p.66-75, 2007.
- ARAÚJO, H.; CARVALHO, D.; IOSHINO, R.; COSTA-DA-SILVA, A.; CAPURRO, M. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015.
- BADRAN, A. H.; GUZOV, V. M.; HUAI, Q.; KEMP, M. M.; VISHWANATH, P.; KAIN, W.; NANCE, A. M.; EVDOKIMOV, A.; MOSHIRI, F.; TURNER, K.H. Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. **Nature**, 533: 58-63, 2016.
- BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, 6, 1222–1243, 2014.
- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.27, p.21-28, 2007.
- BOLDO, J. T.; JUNGES, A.; AMARAL, K. B.; STAATS, K. B.; VAINSTEIN, C. C.; HENNING, M.; SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 551-60, 2009.
- BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; VELAYAUDHAN, R.; ROBERTOS, B.; HORSTICK, O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**. V. 18 no 5 p. 564–577, 2013.

BRANDT, C. R.; ADANG, M. J.; SPENCE, K. D. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. **J Invertebr Pathol** 32: 12–24, 1978.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Dengue, vírus e vetor**. Portal da Saúde. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>. Acesso em 26 de jul. 2018.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Dengue, Zika e Chikungunya**. Portal da Saúde. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>. Acesso em 26 de jul. 2018.

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

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

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A. Characterization of Cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 4965-4972, 1998.

BURT, F; CHEN, S; MAHALINGAM, W. Chikungunya virus and arthritic disease. **Lancet Infect. Dis.** 14: 789–790, 2014.

BUSSINK, A. P.; SPEIJER, D; AERTS, J. M.; BOOT, R. G. Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. **Genetics**, v. 177, n. 2, p. 959-70, 2007.

CALS, P. **College of Agriculture and Life Sciences. Bacterial Endospores. Department of Microbiology**. Cornell University. Ithaca, Nueva York 14850, EE. UU, 2016.

CÁRDENAS, E. M.; MARCELLO, A. Switch-on the LAMP to spot Zika. **AnnTransl med**, vol. 5(24), 2017.

CAROZZI, N. B; KOZIEL, M. Chitinase for insect control, In: Editors, **Advances in insect control: the role of transgenic plants**, London: Taylor & Francis, 211–220, 2005.

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

CHEN, J. K; SHEN, C. R; LIU, C. L. *N-acetylglucosamine*: production and applications. **Mar. Drugs** 8, p. 2493–2516, 2010.

CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X .; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. **Frontiers in Microbiology**. 6:780. 2015.

CHRISTOPHERS, S.R. *Aedes aegypti* (L.): the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press; 1960.

CONTI, R.; GUIMARÃES DO, M.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbioses como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc Cult**; 64 (3):43-7, 2012.

CORBEL, V.; FONSECA, D. M.; WEETMAN, D.; PINTO, J.; ACHEE, N.L.; CHANDRE, F. International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, Rio de Janeiro, Brazil. **Parasites & Vectors**, 10: 278, 2017.

DAHIYA, N.; TEWARI, R; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Appl Microbiol Biotechnol** 71: 773–782, 2006.

DJENANE, Z., NATECHE, F., AMZIANE, M., GOMIS - CEBOLLA, J., EL- AICHAR, F., KHORF, H., FERRÉ, J. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. **Toxins** 9, 139–158, 2017.

DRISS, F.; ROUIS, S.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Integration of a recombinant chitinase into *Bacillus thuringiensis* parasporal insecticidal crystal. **Curr. Microbiol.**v. 62, n. 1, p. 281–288, 2010.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**. 161:345-360, 2006.

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). **Journal of Invertebrate Pathology**, 124: 90–97, 2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Educs**, pp. 510, 2004.

FALARDEAU, J.; WISE, C.; NOVITSKY, L.; AVIS, T. J. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. **Journal of Chemical Ecology**. 39:869- 878, 2013.

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

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. Universidade de São Paulo, São Paulo Brasil. 880pp, 2002.

FREDERIKSEN, R. F.; PASPALIARI, D. K.; LARSEN, T.; STORGAARD, B. G.; LARSEN, M. H.; INGMER, H., PALCIC, M. M.; LEISNER, J.J. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. **Microbiology** 159, 833e847, 2013.

FUKAMIZO, T.; SAKAI, C.; TAMOI, M. **Plant Chitinases: Structure function relationships and their physiology**. *Foods Food Ingredients J Jpn*, v. 208, n. 8, p. 631-632, 2003.

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

GANGULI, A.; ORNOB, A. YU, H.; DAMHORST, G. L.; CHEN, W.; SUN, F.; BHUIYA, A.; CUNNINGHAM, B. T.; BASHIR, R. Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomed Microdevices**, vol. 19:73, 2017.

GONGORA, C. E.; WANG, S.; BARBEHENN, R. V.; BROADWAY, R. M. Chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* expressed in tomato plants: effects on *Trichoplusia ni*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.99, p.193-204, 2001.

GUAN, S.P., MOK, Y.K., KOO, K. N., CHU, K. L., WONG, W. F. Chitinases: biomarkers for human diseases. **Protein and Peptide Letters** 16 (5), 490-498, 2009.

GUBLER, D. J. **Resurgent vector - borne disease as a global health problem**. *Emerging infectious diseases*, v.4, n.3, p.442-450, 1998.

GUINEBRETIERE, M.H; AUGER, S; GALLERON, N; CONTZEN, M; DE, S. B, DE B UYSERM, L; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E; LERECLUS D, DE, V. P; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:31-40, 2013.

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.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z; MUSARRAT, J; JAVED, S. **Chitinases: An update**. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 5, p. 21–29, 2013.

HAN, Y; LIM, H.K.; LEE, J.M.; JANG, Y.G. Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA transcription coactivator complex. **EMBO J** 33 (21): 2534-46. 2014.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. **New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino acid sequence similarities**. *Biochem J*, v. 293, p. 781–788, 1993.

HUANG, L.; SHIZUME, A.; NOGAWA, M.; TAGUCHI, G.; SHIMOSAKA, M. Heterologous expression and functional characterization of a novel chitinase from the chitinolytic bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.76, p.517-522, 2012.

ISLAM, R., DATTA, B. **Diversity of chitinases and their industrial potential**. *Int. J. Appl. Res.* 1, 55–60, 2015.

ITOH, T.; HIBI, T.; FUJII, Y; SUGIMOTO, I; FUJIWARA, A.; SUZUKI, F.; IWASAKI, Y.; KIM, J.; TAKETO, A.; KIMOTOA, H. Cooperative Degradation of Chitin by Extracellular

and Cell Surface Expressed Chitinases from *Paenibacillus* sp. Strain FPU-7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 7482–7490, 2013.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E. O.; CASADOS-VÁZQUEZ, L. E.; RINCÓN-CASTRO, M. C.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BIDESHI, D. K.; BARBOZA-CORONA, J. E. *Bacillus thuringiensis subsp. Israelenses* producing endochitinase *ChiA74* (sp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti*. **J. Appl. Microbiol.** 119, 1692–1699, 2015.

KANTOR, I. N. **Dengue, Zika y Chikungunya**. Medicina, (B. Aires), Ciudad Autonoma de Buenos Aires, v. 76, n.2, p.93-97, 2016.

KIDIBULE, P. E.; PALOMA, S. M.; ELENA, J. O.; MERCEDES, R. E.; LIMÓN, M. C.; REMACHA, M.; PLOU, F. J.; APARICIO, J. S.; LOBATO, M. F. Use of chitin and chitosan to produce new chitooligosaccharides by chitinase *Chit42*: enzymatic activity and structural basis of protein specificity. **Microb Cell Fact.** 2018.

KRAEMER, M. U. G.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A.; SHEARER, F. M.; BARKER, C. M. **The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus***. Elife. Jun; 4:e08347, 2015.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRUSS, B. M.; KAPLAN, T.; WIESSNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Syst. **Bacteriol.** 48:1373-1382, 1998.

LI, H.; GREENE, L. H. **Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding**. PLoS One 5: e8654, 2010.

LI, X.; XU, Z.; ZHOU, G.; LIN, H.; ZHOU, J.; ZENG, Q.; MAO, Z.; GU, X. Molecular characterization and expression analysis of five chitinases associated with molting in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v.187, p.110-120, 2015.

LIMA-CAMARA, T.N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 50, 2016.

LIU, Q.; HALLERMAN, E.; PENG, Y.; LI, Y. Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control. **International Journal of Molecular Sciences**, 17: 1561. 2016.

LIU, X., KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry Biotechnology of Microbial Enzymes. Cap.11. **Elsevier Inc.** All rights reserved, 2017.

LOMBARD, V; GOLACONDA, R. H; DRULA, E.; COUTINHO, P. M; HENRISSAT, B. **The Carbohydrate active enzymes database (CAZy) in 2013**. Nucleic Acids Res 42: D490–D495, 2014.

LOPES, N. Características Gerais e Epidemiologia dos Arbovírus Emergentes no Brasil. **Rev. Pan-Amazônica de Saúde**, Para, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil. **Interbio**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.13-24, 2016.

MACIAS, V. M.; OHM, J. R.; RASGON, J. L. Gene Drive for Mosquito Control: Where Did It Come from and Where Are We Headed? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 14: 1006, 2017.

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

MAESTRE-SERRANO, R.; GOMEZ-CAMARGO, D.; PONCE-GARCIA, G, FLORES A. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. **Pestic Biochem Phys**. 116:63–73, 2014.

MATSUO, Y.; KURITA, M.; PARK, J. K.; TANAKA, K.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; MATSUDA, H. Purification, characterization and gene analysis of *N-acetylglucosaminidase* from *Enterobacter* sp. G-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n.7, p. 1261-1268, 1999.

MINISTERIO DA SAÚDE (2017). **Febre Zika**. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf. Acessado em 12/03/18.

MINISTERIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v.49, 2018.

MONTEIRO, F. A; SHAMA, R; MARTINS, A. J; GLORIA-SORIA, A; BROWN, J. E. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. **PLoS Negl Trop Dis** 8(9): e3167, 2014.

MORAIS, J. F.; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecting of microorganisms producing bioactive compounds with antitumoral activity. **Revista UNINGÁ Review**. Vol. 17, n. 1, pp. 27 - 34, 2014.

MOYES, C. L.; VONTAS, J.; MARTINS, A. J.; KOOU, S. Y.; DUSFOUR, I.; RAGHAVENDRA, K.; PINTO, J.; CORDEL, V.; DAVID, J. P.; WEETMAN, D. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 11: 1-20, 2017.

NURDEBYANDARU, N.; MUBARIK, N. R.; PRAWASTI, T. S. Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Application as Biocontrol for *Aphis gossypii*. **Microbiology Indonesia**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.103-107, 2010.

OLIVEIRA DE, S. M.; SILVA DA, D. F.; SANTOS DOS, I. N.; CORRÊA, C. V. P.; LIBERAL, T. C. DE F.; BRANCO, F. L. C.; COLARES, C. N. J.; ESCHER, S. K. S.; ISHIDA, J. K.; MUIT, S.; ARAÚJO DE, J. M.; AMORIM DE, E. L. C. Prospecção de

enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactéria isolado de solo na Amazônia. **Scientia Plena** 13, 031001, 2017.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiology**. 2008.

OTSU, Y.; MORI, H.; KOMUTA, K.; SHIMIZU, H.; NOGAWA, S.; MATSUDA, Y.; NONOMURA, T.; SAKURATANI, Y.; TOSA, Y.; MAYAMA, S.; TOYODA, H. Suppression of leaf feeding and oviposition of phytophagous ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) by chitinase gene-transformed *Phylloplane* bacteria and their specific bacteriophages entrapped in alginate gel beads. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v.96, n.3, p.555-563, 2003.

PARDO-LÓPEZ, L.; MUNÓZ-GARAY, H.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, New York, v.30, p.589-595, 2009.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole, São Paulo. 609p, 2002.

PATIL, N. S. JADHAV, J. P. Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. **Chemosphere**, 128, 231–235, 2015.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 473-483, 2000.

PELCZAR, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: Aplicações e conceitos. **Makron Books**, 2 ed. 2012.

PERALTA, C.; PALMA, L. Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins** 9, 39, 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.

PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, vol. 44, no. 5, pp. 245-250, 2002.

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

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, p. 11-17, 2013.

PRAKASH, N.A.U.; JAYANTHI, M.; SABARINA-THAN, R.; KANGUEANE, P.; MATHEW, L.; SEKAR, K. Evolution, homology conservation, and identification of unique

sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v.70, n.5, p.466-478, 2010.

QUIMBAYO, M.; RÚA-URIBE, G.; PARRA-HENAO, G. TORRES, C. Evaluation of lethal ovitraps as a strategy for *Aedes aegypti* control. **Biomedica** 34, 473 – 482, 2014.

RAMÍREZ - LEPE, M.; RAMÍREZ - SUERO, M. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Insecticides – Pest Engineering**. Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, 2012.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B.; CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **Pharmaceutical nanotechnology**, v. 455, p. 219 - 228, 2013.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an important pathogen? **Trends Microbiol.** v. 18, p. 189 - 194, 2010.

REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SHEN, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.3581-3386, 1996.

SAHAIKH, S. A.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 468-475, 1993.

SALDAÑA, M. A.; HEGDE, S.; HUGHES, G. L. Microbial control of arthropod borne disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 112: 81-93, 2017.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N; VAN, R. J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**62:775-806, 1998.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B & KUBICEK, C. P. A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of Family 18 chitinases. **FEBS. Journal.** 272: 5923-5939, 2005.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**. 31: 446-459, 2017.

SILVA, H. H.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 32, no. 4, pp. 349-355, 1999.

SIMMONS, C. P; FARRAR, J. J; CHAU, N. V. V; WILLS, BRIDGET. **Dengue**. N Engl J Med 366: 1423-32, 2012.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, K. P. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 **Biotech**, [s.l.], v. 6, n. 174, p.1-15, 2016.

SINGH, S.P.; BHARAL, P.; KONWAR, B.K. Optimization of nutriente requirements and culture conditions for the production of rhamnolipid form *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 7815) using Mesua férrea seed Oil, Indian. **J. Microbiol.**v. 53, p. 467-476, 2013.

SOARES, I.; TÁVORA, Z.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Microorganism-Produced Enzymes in the Food Industry. In: VALDEZ, B. **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**. [s.i]: Intech, 2012.

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.

SOARES-DA-SILVAA, J.; QUEIRÓS, S. G; AGUIAR, J. S.; VIANA, J. L.; NETA, R. A. V; MARIA C. DA SILVA, C. M; PINHEIRO, C. S. V; POLANCZYKD, R. A; CARVALHO-ZILSEE, G.A; TADEI, W. P. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis Berliner* isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta Tropica** 176- 197–205, 2017.

SOARES-PINHEIRO, V. C.; DASSO-PINHEIRO, W; TRINDADE-BEZERRA, J.M.; TADEI, W.P. Eggs viability of *Aedes aegypti Linnaeus* (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 77: 396-401, 2017.

SOO, K. M.; KHALID, S. M.; CHING, S. M.; CHEE, H. Y. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. **PLoS ONE** 23: e0154760, 2016.

SOUSA, I. J. O.; ARAÚJO, S; NEGREIROS, P. S.; FRANÇA, A. R. S.; ROSA, G. S.; GONÇALVES, R. L. G. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista UNINGÁ Review**. Vol. 31, n.1, pp. 35-39, 2017.

SOUZA, C. P.; ALMEIDA, B. C.; COLWELL, R. R. The importance of chitin in the marine environment. **Mar Biotechnol** 13: 823, 2011.

SUBBANNA, A. R. N. S; RAJASEKHARA, H; STANLEY. J.; MISHRA, K. K.; PATTANAYAK, A. Pesticidal perspectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest Management. **Soil Biology & Biochemistry** 116, 52e66, 2018.

SURYANTO, D.; IRAWATI, N.; MUNIR, E. Isolation and Characterization of Chitinolytic Bacteria and Their Potential to Inhibit Plant Pathogenic Fungi. **Microbiol Indones**, v. 5, n. 3, p. 144-148, 2011.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. **Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle**. Pesquisa Científica e Tecnologia em Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. Cap. MCT-INPA. p.112-125, 2010.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brasilian Amazon. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 59: 325-35, 1998.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B. ; RAFAEL, M. S ; SAMPAIO, R. T. M. ; MESQUITA, H. G. ; PINHEIRO, V. C. S. ; ZEQUI, J. A. C.; ROQUE, R. A.; DOS SANTOS, J. M. M.. **Adaptative processes control measures, genetic background, and resilience of malária vectors and environmental changes in the Amazon region. Hydrobiologia** (The Hague. Print), v. 1, p. 1-18, 2017.

TANAKA, J.; FUKAMIZO, T.; OHNUMA, T. Enzymatic properties of a GH19 chitinase isolated from rice lacking a major loop structure involved in chitin binding. **Glycobiology**, Oxford, v.27, n. 5, p. 477- 485, 2017.

TAUIL, P. L. **Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil.** Caderno de Saúde Pública 18:867-871. Trop., 29(1), pp. 95–100, 2002.

TEJERA-HERNÁNDEZ, B.; ROJAS-BADÍA, M. M. Y.; HEYDRICH-PÉREZ, M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC Ciencias Biológicas.** 42: 131-138, 2011.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L. I., IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds.) **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.4: **Biochemistry and Molecular Biology.** Elsevier, Amsterdam, p. 171-224, 2005.

USHARANI, T. R.; GOWDA, T. K. S. Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. **Indian Journal of Biotechnology.** V. 10, p. 264-269, 2011.

VAAJE-KOLSTAD, G.; HORN, S. J.; SØRLIE, M.; EIJSINK, V. G. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. **FEBS J**, v. 280, n. 13, p. 3028-49, 2013.

VALERIO SALLEN, L.; DIEZ, S. R.; RIVAS, G. F. **Zika vírus infection or the future of infectious diseases.** Med. Clin. (Barc). pii: S0025-7753(16)30007-0, 2016.

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

VILLA-LOBOS, S. S.; CIRA, L. A.; PARRA-COTA, F. I.; VILLA-RODRIGUEZ, E. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Researchgate.** 32: 2259-714, 2018.

WANG, G.; MANNS, D.C.; CHUREY, J.J.; WOROBO, R.W. Homologous expression system development and the systematic site-directed mutagenesis analysis of thurincin H, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. **Applied and Environmental Microbiology.** V. 80 DOI: 10.1128/AEM, 00433-14, 2014.

WHO– World Health Organization. **Draft Global Vector Control Response 2017–2030,** 2017.

WIWAT, C.; THAITHANUN, S.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A. Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.76, p.270-277, 2000.

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. Mosquito identification resources. (<http://www.wrbu.org/VeclD MQ.html>). Acesso em 30 de Julho de 2018.

XU, C.; WANG, B.; YU, Z.; SUN, M. Structural Insights into *Bacillus* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. **Toxins**; Vol. 6; 2732-2770; ISSN 2072-6651, 2014.

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

ZHANG, Q.; HUA, G.; ADANG, M. J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. **Insect Science**, 24: 714-729, 2016a.

ZHANG, Y. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 4-5, p. 773 – 784, 2016 b.

ZHU, K. Y.; MERZENDORFER, H.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; MUTHUKRISHNAN, S. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.61, p.177-196, 2016.

CAPITULO

**POTENCIAL LARVICIDA DE *Bacillus* spp., DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA PRODUTORES DE QUITINASES.**

Potencial larvicida de *Bacillus* spp., da Amazônia Brasileira produtores de quitinases.

Oliveira, J.C¹; Katak, R.M²; Rocha, E.M²; Muniz, V.A¹; Tadei, W. P³.

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

Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* é um importante vetor na transmissão dos vírus dengue, febre amarela urbana, zika e chikungunya. A principal ferramenta para o controle deste vetor são os inseticidas químicos convencionais, porém, o uso contínuo provoca fatores negativos, destacando-se a contaminação do meio ambiente e a seleção de populações resistentes. Neste sentido, o uso do controle biológico é uma alternativa biotecnológica, principalmente os bioinseticidas formulados à base de bactérias do gênero *Bacillus*. Considerando a diversidade química e biológica dos *Bacillus*, podemos encontrar biomoléculas com atividade inseticida. Além disso, são capazes de secretar enzimas hidrolíticas, como por exemplo, as beta-glucanases e as quitinases. Estas últimas são importantes para o controle de diversas pragas agrícolas e vetores de doenças. Enzimas quitinolíticas, após a ingestão pelas larvas dos insetos, ocasionam a degradação da membrana peritrófica que separa o epitélio do intestino médio do lúmen intestinal, cujo principal componente é a quitina. Este mecanismo é um requisito favorável para uso nos programas de controle de vetores e pragas agrícolas. Neste estudo, foram utilizadas 124 linhagens bacterianas isoladas do solo, água, planta e inseto de diferentes localidades da Amazônia. Por meio de análises de métodos fenotípicos foram identificados como bacilos, sendo 114 (91,4%) Gram positivos e 10 (8,6%) Gram negativos. Pela amplificação e sequenciamento do gene 16S (rDNA), 33 linhagens foram identificadas, sendo 27 membros do gênero *Bacillus*, 4 de *Serratia*, 1 de *Paenibacillus* e 1 de *Achromobacter*. Na detecção molecular do gene *Chi*, seis (4,5%) linhagens - BTAM27LB, 103PHAISP2, BTAM138LB, BTAM18NA, K2NA e R11ISP2 apresentaram amplificação positiva e dentre estas, duas foram identificadas - BTAM 27LB: *Bacillus* sp. e R11ISP2: *B. amyloliquefaciens*. No bioensaio seletivo de 124 linhagens, 21 demonstraram atividade larvicida em *Aedes aegypti*. Os bioensaios com os extratos metabólicos, produzidos por estas 21 linhagens ativas cultivadas nos meios NA, LB e ISP2, demonstraram que sete apresentaram patogenicidade nas células lisadas e apenas 3 no sobrenadante filtrado. Em outra etapa, foram avaliados os extratos metabólicos produzidos por 9 linhagens ativas cultivadas em meio com quitina, das quais apenas uma apresentou mortalidade, tanto no sobrenadante quanto nas células lisadas, com valores correspondentes a 100%. Foi possível observar a correlação entre atividade larvicida com a presença do gene *Chi*. Desta forma, as linhagens selecionadas apresentaram potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas microbianos.

Palavras-chave: Bioprospecção, Microbiota amazônica, Enzimas hidrolíticas, Insetos vetores.

Abstract

The *Aedes aegypti* mosquito is an important vector in the transmission of dengue virus, urban yellow fever, zika and chikungunya. The main tool for the control of this vector is conventional chemical insecticides, however, continuous use causes negative factors, especially environmental contamination and selection of resistant populations. In this sense, the use of biological control is a biotechnological alternative, mainly bioinsecticides formulated with bacteria of the genus *Bacillus*. Considering the chemical and biological diversity of *Bacillus*, we can find a diversity of biomolecules with insecticidal activity. In addition, they are capable of secreting hydrolytic enzymes, such as beta-glucanases and chitinases. The latter are important for the control of various agricultural pests and vectors of diseases. Chitinolytic enzymes, after ingestion by the larvae of the insect, cause degradation of the peritrophic membrane that separates the epithelium from the middle intestine of the intestinal lumen, whose main component is chitin. This mechanism is a favorable requirement for use in vector control and agricultural pest programs. In this study, we used 124 bacterial strains isolated from soil, water, plant and insect from different locations in the Amazon. Phenotypic and molecular methods were identified as bacilli, with 114 (91.4%) Gram positive and 10 (8.6%) Gram negative. By the amplification and sequencing of the 16S gene (rDNA), 33 lines were identified, being 27 members of the genus *Bacillus*, 4 of *Serratia*, 1 of *Paenibacillus* and 1 of *Achromobacter*. In the molecular detection of the *Chi* gene, six lineages (4.5%) - BTAM27LB, 103PHAISP2, BTAM138LB, BTAM18NA, K2NA and R11ISP2 showed positive amplification and two of them were identified - BTAM 27LB: *Bacillus* sp. and R11ISP2: *Bacillus amyloliquefaciens*. In the selective bioassay of 124 lineages, 21 demonstrated larvicidal activity in *Aedes aegypti*. The bioassays with the metabolic extracts produced by these 21 lines cultivated in NA, LB and ISP2 medium demonstrated that seven presented pathogenicity in the lyophilized culture and only 3 in the filtered supernatant. In another step, the metabolic extracts produced by 9 strains cultured in chitin medium were evaluated, of which only one presented mortality, both in the supernatant and in the lyophilized culture, with values corresponding to 100%. It is not possible to observe the correlation between larvicidal activity and the presence of the *Chi* gene. In this way, the selected strains presented potential for the development of microbial bioinsecticides.

Key words: Bioprospecting, Amazonian microbial, Hydrolytic enzymes, Insect vectors.

INTRODUÇÃO

Considerando os diferentes níveis organizacionais dos mosquitos, com seus respectivos grupos taxonômicos, presentes nos diferentes ecossistemas contribuem significativamente para a extensa biodiversidade no mundo todo (FORATTINI, 2002; WRBU, 2018). Entretanto, a interação do ser humano com o meio ambiente de forma inadequada, afeta o equilíbrio dos ecossistemas e, conseqüentemente torna-o vulnerável a doenças transmitidas por alguns mosquitos, como a malária, febre amarela urbana, dengue, filariose, dentre outras, cuja gravidade é variável (GUBLER, 1998; CÁRDENAS et al., 2005; WILKERSON et al., 2015; MS/SVS, 2017). Milhares de pessoas pelo mundo são infectadas e desenvolvem estas doenças, que causam grandes impactos negativos à saúde pública e aos setores econômicos, em suas áreas de ocorrência (WHO, 2017).

Dentre as espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, cujas fêmeas infectadas por arbovírus podem transmiti-los ao homem, por meio da picada, destaca-se o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (FORATTINI, 2002; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016). Esta espécie é a mais importante como vetor dos quatro sorotipos circulantes no Brasil - DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, causadores da dengue, além de transmitir os arbovírus da febre amarela urbana (YFV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV), este último reemergido no Brasil (GUBLER, 1998; ZARA et al., 2016).

Apesar dos investimentos nas pesquisas com vacinas, campanhas educativas, monitoramento e controle vetorial, ainda não há um método eficaz para a erradicação destas arboviroses, controle e monitoramento do vetor (BRASIL, 2017). A redução dos níveis populacionais de *Ae. aegypti* é um desafio para a saúde pública, devido aos inúmeros problemas que abrange esta ação, dentre estes, o uso dos inseticidas químicos, a principal ferramenta de controle deste vetor (QUIMBAYO et al., 2014). Porém seu uso contínuo ocasiona diversos problemas como a poluição ambiental, danos aos organismos associados, alto custo econômico e leva a seleção de populações de mosquitos resistentes (TADEI, et al., 1998; TADEI, et al., 2017).

Neste sentido, medidas de controle biológico podem ser uma alternativa, ao uso de inseticidas químicos sintéticos, para o controle de vetores de doenças tropicais, pelo fato de utilizar recursos obtidos da natureza como as plantas, fungos e bactérias. Além disso, é de fácil acesso, baixo custo e apresentam atividades direcionadas para organismos alvo (ALVES 1998; GUO et al., 2015). Dentre os microrganismos utilizados no controle biológico, destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus* como, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloquenefaciens*, *B. pulmilus*, etc. Considerando a diversidade química e biológica dos *Bacillus*, os membros deste gênero sintetizam diversos metabólitos primários e secundários com aplicações biotecnológicas, em vários setores; na indústria farmacêutica, alimentícia e bioinseticidas, como por exemplo, as proteínas (CRY, VIP, CYT) com mecanismo de ação contra diferentes ordens de insetos: díptera, lepidóptera e coleóptera (BRAVO et al., 2007; ELLEUCH et al., 2015). Além disso, sintetizam diversas enzimas hidrolíticas, como as quitosanases, proteases, β -glucanases e as enzimas quitinases, estas últimas são codificadas pelo gene *Chi* (DJENANE et al., 2017).

As enzimas quitinoliticas são encontradas em uma diversidade de organismos eucariotos e procariotos, apresentam tamanhos variados de 20 kDa a 90 kDa, com capacidade de hidrólise entre as ligações β -1,4 das unidades de *N-acetilglicosaminas* do polímero quitina (BOYCE et al., 2013; ISLAM & DATTA, 2015). Enzimas quitinoliticas, após a ingestão

pelas larvas dos insetos, ocasionam a degradação da membrana peritrófica que separa o epitélio do intestino médio do lúmen intestinal, cujo principal componente é a quitina. Foram detectadas em organismos que contêm quitina no exoesqueleto ou na parede celular como, por exemplo, insetos, crustáceos e fungos, e também em organismos não quitinolíticos, como bactérias, plantas superiores e vertebrados (USHARANI & GOWDA, 2011; BOYCE et al., 2013). As quitinases são classificadas em duas classes principais: endoquitinases que clivam as ligações β -1,4 da quitina em sítios aleatórios e as exoquitinases que se dividem em duas subcategorias: quitobiosidases e as 1,4 - β -N-acetilglicosaminidases (SAHAIKH & MANOCHA 1993; DUO CHUAN, 2006).

Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas desta natureza, é importante na detecção de moléculas bioativas do metabolismo microbiano, para diversas aplicações. Neste sentido, torna-se imprescindível a obtenção de conhecimentos dos recursos genéticos da microbiota amazônica, por meio das técnicas de biologia molecular, para fins biotecnológicos (OLIVEIRA et al., 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar linhagens de *Bacillus* spp. isoladas de diferentes ambientes Amazônicos, com potencial bioinseticida contra larvas de *Ae. aegypti*, ou como fontes do gene *Chi*, que codificam para as enzimas quitinolíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue-INPA. As linhagens bacterianas foram isoladas de amostras de solo, planta, água e inseto (díptera) de três municípios do Estado do Amazonas: Coari (4°06'45.2"S 63°07'43.6"W), Manaus (3°02'46.6"S 59°52'56.8"W) Parintins (2.66741.1"S 56.73754.7"W).

Reativação e purificação de bactérias.

Foram reativadas 124 linhagens, pertencentes à coleção de trabalhos acadêmicos do Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (INPA), Laboratório de Genética Aplicada a Saúde (UEA). Em tubos de ensaio com capacidade de 20 mL, contendo 2 mL do meio Nutriente Broth (NB) (5 g tecido animal, 5 g cloreto de sódio, 1.5 g extrato de carne, 1.5 g extrato de levedura), Luria Bertani (LB) (5 g extrato de levedura, 10 g peptona de caseína, 10 g cloreto de sódio) e ISP2 (10 g amido, 10 g extrato de malte, 4 g

extrato de levedura, 4 g dextrose), foram adicionados 20 µL do cultivo bacteriano, de acordo com o meio de preservação. Em seguida, incubados em estufa rotativa a 30 °C e 180 rpm, de 24 à 48 h, até o crescimento padrão de número 2, comparado à turbidez da escala de McFarland ($3 \cdot 10^8$ n°de células). Após isso, 20 µL deste cultivo foram transferidos para placas de Petri, contendo os respectivos meios. Em seguida, com uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada em bico de Bunsen foi feito o espalhamento. As placas foram incubadas na câmara B.O.D a 28 °C, de 24 à 48 h para o crescimento das colônias. Posteriormente, com auxílio de uma alça de Drigalsky, foi feita a purificação das colônias pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas.

Seleção fenotípica (Coloração de Gram)

Na obtenção de conhecimento das características morfológicas, todas as colônias foram submetidas à coloração pelo método de Gram. 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 s e o descolorante de solução álcool-acetona durante 15 s, seguido de lavagem em água corrente. Posteriormente, foi adicionada a solução de fuccina durante 30 s e lavadas em água corrente. Após secas as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico na lente objetiva (100X), utilizando-se óleo de imersão. (MARTINEZ & TADDEI, 2008). 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, as quais foram armazenadas em freezer a -20 °C, para a realização de estudos posteriores.

Identificação molecular

Na identificação molecular, foram realizadas as seguintes etapas: extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA e comparação das sequências obtidas com banco de dados de nucleotídeos públicos.

Extração do DNA genômico das linhagens

A extração do DNA genômico, foi realizada por meio de uma resina de troca iônica do kit de extração de DNA InstaGene Matrix (Bio-Rad, EUA), de acordo com as recomendações

do fabricante. Neste procedimento, uma alíquota da colônia de cada um dos isolados, foi adicionada em placas de Petri contendo meio de cultivo ágar nutriente. Em seguida, a técnica de esgotamento por estrias cruzadas e, posteriormente, as placas foram incubadas em B.O.D a 30 °C durante 12 h. Após isso, uma colônia isolada foi transferida para um microtubo contendo 1 mL de água destilada (Milli-Q) estéril. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 1 min a 12000 rpm e 20 °C, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 200 µL de InstaGene Matrix (Bio-Rad) no microtubo contendo o pellet, o qual foi incubado em Banho-maria a 56 °C durante 25 min, seguido de agitação no aparelho vortex por 10 s e incubação em Banho-maria a 100 °C durante 8 min. Em seguida, a amostra foi novamente submetida à agitação no vórtex a 12000 rpm durante 10 s e centrifugado a 12000 rpm por 3 min a 20 °C. O DNA obtido foi armazenado em um congelador a -20°C para a realização de estudos posteriores. A qualidade e a quantidade do DNA foram analisadas por meio do NanodropTM2000/Espectrofotômetros (Thermo Scientific).

Reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rDNA.

Na amplificação da sequência nucleotídica do gene 16S, a quantidade do DNA genômico dos isolados foi ajustado de 1-10 ng/µl e submetido à técnica de PCR com os seguintes oligonucleotídeos (Tabela 1).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene 16S.

Iniciadores	Sequência	(pb)
Primer 8F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(f)	1400
Primer 1401R	5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3'(r)	

(f): foward; (r): reverso

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com as sequências dos iniciadores bem como os volumes e concentrações dos reagentes descritos a seguir: MgCl₂ (50mM) 1,5µL, Tampão (10X) 2,5 µL, dNTP (10 pmol) 0,5 µL, Taq polimerase (1U) 0,125 µL, Primer 8F (10 pmol) 0,5 µL, Primer 1401R (10 pmol) 0,5 µL, H₂O milli-Q 18,375 µL e DNA 1-10ng 1 µL com um volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Thermal Cycler®. O perfil térmico da PCR foi programado de acordo com as seguintes condições: Desnaturação inicial 95 °C 3 min, Desnaturação das fitas molde 94 °C 25 s, Pareamento dos iniciadores 62 °C 25 s, Extensão 72°C 1 min e 25 s, Extensão final 72 °C 5min e Hold 4 °C ∞ com um total de 35 ciclos (BOICHENKO, 2000).

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

Purificação das amostras de PCR e Reação de Sequenciamento.

Os fragmentos do gene 16S amplificados, foram purificados utilizando o kit QIAquick™ PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida submetidos à corrida em um campo elétrico em gel de agarose a 1%. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais, foi utilizado o kit de BigDye Terminator V3.1 (Life Technologies) utilizando os seguintes reagentes: Big Dye 0,5µL, Tampão 5X BigDye 2µL, Primers 0,5µL, H₂O milli-Q 6µL e DNA 1 µL com um volume final de 10 µL descritos. Neste processo, foi feito uma reação para cada primer.

As reações foram submetidas ao termociclador e o perfil térmico da PCR foi programado de acordo com as seguintes condições: Desnaturação inicial 95 °C 3 min, Desnaturação das fitas moldes 95 °C 30 s, Pareamento do iniciador 58 °C 30 s, Extensão 60 °C 30 s, Extensão final 60 °C 4 min e Hold 4 °C ∞ em um total de 40 ciclos.

Em seguida, foi feita a precipitação em 4 µL de Etanol NG, homogeneizado em vórtex e depois adicionado 45 µL de etanol absoluto (vórtex novamente). Em seguida, centrifugado em 14000 rpm por 45 min, após isso, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 110 µL de etanol 70%. Em seguida, foi centrifugado a 14000 rpm por 30 min, descartado o sobrenadante e adicionado 110 µL de etanol 70%, centrifugado novamente a 14000 rpm por 10 min, descartado o sobrenadante e deixado para secar no fluxo laminar em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 10 µL de formamida recomendado para o equipamento. Em seguida as amostras foram inseridas no Analisador genético ou (de fragmentos) (ABI3500 XL, Applied Biosystems) para a determinação das sequências. Após a leitura, o equipamento gerou os eletroferogramas que foram analisados utilizando o programa BioEdit 7.2 disponível para download no link <http://bioedit.software.informer.com/7.2/>. Em seguida comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI.

Detecção molecular do gene *Chi* (Quitinase)

Na detecção do gene *Chi*, o DNA genômico das linhagens foi diluído e submetido à técnica de PCR com os seguintes oligonucleotídeos (Tabela 1). Estes primers foram

elaborados com base na sequência do gene *ChiA74* (BARBOZA-CORONA, 2003) e no alinhamento das sequências de genes de quitinases de *B. turingiensis* depositadas no banco de dados do NCBI (AY452507.1, AF424979.1, AY189740.2, AY129671.1, AF526379.1)

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação.

Iniciadores	Sequência	pb
ChiF	5' ATG AGG TCT CAA AAA TTC 3'(f)	2027
ChiR	5' CTA GTT TTC GCT AAT GAC 3' (r)	

(f): foward; (r): reverso

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). Foram utilizadas as sequências dos iniciadores bem como os volumes e concentrações dos seguintes reagentes: MgCl₂ (25mM) 0,96µL, Tampão (10X) 2,5µL, Primer F (10pmoles) 1,0 µL, Primer R (10pmoles) 1,0 µL, dNTP (2,5mM) 2 µL, Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (0,5U) 0,2 µL, DMSO 1,0 µL, Água (q.s.p) 14,34 µL e DNA 2 µL em volume total de 25 µL.

As condições térmicas de amplificação foram programadas de acordo com as seguintes condições: Desnaturação inicial 95 °C 5min, Desnaturação 94 °C 1 min, Anelamento 45 °C 1 min, Polimerização 72 °C, 1: 50 min, Extensão final 72 °C 10 min e Hold 4 °C ∞ em um total de 30 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%. Foram retirados 3 µL de cada amostra da PCR e adicionado em 3 µL 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).

Atividade larvicida

Bioensaios

Foram realizados os bioensaios seletivos com objetivo de selecionar as linhagens com atividade larvicida, com o cultivo de bacilos, e os bioensaios de dose com o sobrenadante filtrado e células liofilizadas. Estes testes foram realizados em temperatura de 26 ± 2 °C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 h (WHO, 2005).

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 ± 1 °C, umidade relativa em torno de 80% -90% e fotofase de 12 h. 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 alados e manutenção da colônia. Para estes, foi adicionada em *Erlenmeyer* 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.

Condições de cultivo das linhagens bacterianas

Nesta etapa, foram cultivadas 124 linhagens em placas de Petri contendo os meios NA (Nutriente ágar), LB (Luria bertani) e ISP2, pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas. Em seguida, incubadas em câmara B.O.D a 30 °C por 24 h. Posteriormente, com auxílio da alça de Drigalski, uma colônia isolada foi transferida para tubos de ensaio com capacidade de 20 mL, contendo 2 mL dos respectivos meios. Em seguida, foram incubados em estufa rotativa a 30 °C e 180 rpm, durante 24 h. Posteriormente, 20 µL do pré inóculo de cada linhagem foi transferido para *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL dos mesmos meios de

cultivo e novamente incubados em estufa rotativa a 30 °C e 180 rpm por 72 h. O cultivo bacteriano obtido foi utilizado no bioensaio seletivo.

Bioensaio seletivo de linhagens bacterianas patogênicas contra larvas de *Ae. aegypti*.

Para cada linhagem testada, foi montada uma réplica de cinco copos plásticos (50 ml) contendo nove mL de água destilada, 10 larvas de terceiro ínstar de *Ae. aegypti* e 1 mL do cultivo total dos bacilos. Como controle negativo, foi feita uma réplica sem inoculação de cultivo de bacilos e no controle positivo foi utilizado o cultivo da linhagem padrão *B. thuringiensis var. israelenses*. Após a aplicação da cultura bacteriana, foi feita a leitura de mortalidade das larvas em intervalos de 24, 48 e 72 h. Por meio de registro do número de larvas mortas em cada copo, obteve-se o percentual de mortalidade. As linhagens que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50% foram selecionadas com potencial larvicida e utilizadas nos bioensaios com extratos brutos intra e extracelulares (WHO, 2005).

Obtenção dos extratos de bactérias.

Inicialmente foram selecionadas as 21 linhagens com toxicidade igual ou superior a 50%, em seguida, cultivadas nos respectivos meios de preservação, NA, LB e ISP2. Além disso, dentre estas linhagens selecionadas, nove foram cultivadas em meio quitinolítico, Soares (2016). Este meio foi composto por 4 g de dextrose, 4 g de cloreto de sódio (NaCl), 4 g peptona de caseína, 2 g de quitina coloidal. Em tubos de ensaio, contendo 2 mL dos meios descritos, 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 1000 mL, contendo 400 mL dos respectivos meios. Em seguida, incubados a 30 °C, 180 rpm por 96 h a 120 h, até o nível 6 de crescimento comparado a turbidez da escala de Macfarland ($18,10^8$ cel/ mL). Em seguida, 40 mL das amostras foram distribuídas em tubos falcon (50 mL) e centrifugadas a 4 °C e 5000 rpm, por 40 min. O sobrenadante obtido, foi filtrado em membrana millipore 0,22 µm, com auxílio de uma bomba a vácuo, visando a isenção de células bacterianas. O pellet foi previamente congelado e liofilizado em aparelho Liofilizador (Enterprise I, TERRONI) durante 24 a 48 h. Após isso, os produtos obtidos foram utilizados nos bioensaios em larvas de terceiro ínstar de *Ae. aegypti*.

Atividade larvicida de células lisadas (pellet) e do sobrenadante filtrado das bactérias

De acordo com o percentual de rendimento, as células lisadas de cada linhagem foram diluídas na concentração padrão de 0,0724 g em 40 mL de água destilada e homogeneizada em vórtex por 10 min. Em seguida, desta mistura foram retiradas 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 375, 250, 187,5, 125 e 93,75 µL e adicionadas em cada copo com o volume final de 20 ml, contendo 10 larvas. Em cada concentração foi utilizado como controle, um copo contendo apenas água destilada e 10 larvas. As concentrações das células lisadas em cada volume aplicado estão descritas na tabela 3 e representadas de C1 a C14. O sobrenadante filtrado foi avaliado nos seguintes volumes (tabela 3): 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 375, 250, 187,5, 125 e 93,75 µL de acordo com as condições do bioensaio das células lisadas. Ambos os bioensaios foram realizados em quintuplicata, seguido de três repetições em dias diferentes e leituras de mortalidade em 24, 48 e 72 h.

Tabela 3: Concentrações

	Células lisadas		Sobrenadante (µL)
	Volume (µL)	Concentração (mg/ml)	
C1	4000	0,362	4000
C2	3500	0,31675	3500
C3	3000	0,2715	3000
C4	2500	0,22625	2500
C5	2000	0,181	2000
C6	1500	0,13575	1500
C7	1000	0,905	1000
C8	750	0,067875	750
C9	500	0,04525	500
C10	375	0,0339375	375
C11	250	0,022625	250
C12	187,5	0,0169688	187,5
C13	125	0,0113125	125
C14	93,75	0,0084844	93,75

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção fenotípica (Coloração de Gram)

Por meio da caracterização morfo-tintorial e visualização em microscopia óptica na lente objetiva (100X), foi possível observar que as linhagens analisadas neste estudo, apresentam características morfológicas referentes ao grupo dos bacilos. Foram observadas linhagens com características em formato de bastonetes com extremidade reta ou de ponta arredondada. Do total de 124 linhagens, cento e quatorze (91,4%) são bacilos Gram positivos e dez (8,6%) bacilos Gram negativos (Tabela 01). Observações semelhantes foram feitas por

Goto et al., (2000), os quais enfatizam que o grupo dos bacilos compreendem bactérias cilíndricas com formas de bastonetes isoladas ou em pares (diplobacilos) ou em cadeias (streptobacillos), com parede celular Gram negativa ou positiva. De acordo com Martinez & Tadei, (2008) as bactérias Gram positivas, apresentam capacidade de absorção do corante cristal violeta, devido à alta quantidade de ácido teicóico e menor quantidade de lipídeos. Isto ocasiona a diminuição da permeabilidade na parede celular aos solventes orgânicos. Já as bactérias Gram negativas têm maior quantidade de lipídeos e conseqüentemente maior permeabilidade aos solventes orgânicos, o que permite a coloração com a fucsina.

Tabela 4: Isolados de *Bacillus* spp, conforme o substrato de isolamento e teste de Gram.

Nº	Linhagem	Substr.	Morf.	Gr.	Nº	Linhagem	Substr.	Morf.	Gr.
01	Bio03LB	Solo	Bacilo	+	63	C48ENA	Inseto	Bacilo	-
02	Bio16LB	Solo	Bacilo	+	64	C25ENA	Água	Bacilo	+
03	2WISP2	Solo	Bacilo	+	65	C38NA	Inseto	Bacilo	+
04	RAPANA	Água	Bacilo	+	66	C. G	Solo	Bacilo	+
05	BTAM141	Solo	Bacilo	+	67	82 PHA	Solo	Bacilo	+
06	BTAM27	Solo	Bacilo	+	68	K6NA	Planta	Bacilo	+
07	BTAM220	Solo	Bacilo	+	69	BTAM 33	Solo	Bacilo	+
08	103 PHA	Solo	Bacilo	+	70	54ISP2	Solo.	Bacilo	+
09	38 PHA	Solo	Bacilo	+	71	26 MENA	Inseto	Bacilo	+
10	BTAM138	Solo	Bacilo	+	72	25 MENA	Inseto	Bacilo	-
11	R8ISP2	Planta	Bacilo	+	73	C22ME	Água	Bacilo	+
12	R13ISP2	Planta	Bacilo	+	74	52 MENA	Inseto	Bacilo	+
13	K4NA	Planta	Bacilo	+	75	C1DE NA	Água	Bacilo	+
14	K5NA	Planta	Bacilo	-	76	C24ENA	Água	Bacilo	-
15	BTAM74	Solo	Bacilo	+	77	31 MENA	Inseto	Bacilo	+
16	J1NA	Água	Bacilo	+	78	C26	Água	Bacilo	+
17	R21	Planta	Bacilo	+	79	K2NA	Planta	Bacilo	+
18	2R6.2.1.1	Planta	Bacilo	+	80	Bio01LB	Solo	Bacilo	+
19	R1	Planta	Bacilo	+	81	Bio08LB	Solo	Bacilo	+
20	R14ISP2	Planta	Bacilo	-	82	C. p.1	Solo	Bacilo	+
21	61PHA	Solo	Bacilo	+	83	C39	Inseto	Bacilo	+
22	LA1LB	Água	Bacilo	+	84	BT30NA	Solo	Bacilo	+
23	BTAM118	Solo	Bacilo	+	85	Bio17	Solo	Bacilo	+
24	15PHA	Solo	Bacilo	+	86	BT3NA	Solo	Bacilo	-
25	K30NA	Planta	Bacilo	-	87	BTAM16	Solo	Bacilo	+
26	BTAM57	Solo	Bacilo	+	88	R4	Planta	Bacilo	+
27	Bio14	Solo	Bacilo	+	89	R7	Planta	Bacilo	+
28	Bio11	Solo	Bacilo	+	90	225 PHA	Solo	Bacilo	+
29	BTAM75	Solo	Bacilo	+	91	R16	Planta	Bacilo	+
30	RKA1	Solo	Bacilo	+	92	L. F. P	Água	Bacilo	+
31	Bio05	Solo	Bacilo	+	93	PL 03.8	Água	Bacilo	+
32	BTIP2	Solo	Bacilo	+	94	K2NA	Planta	Bacilo	+
33	Bio09	Solo	Bacilo	+	95	R17	Planta	Bacilo	+
34	3IISP2	Solo	Bacilo	+	96	58PHA	Solo	Bacilo	+
35	51BTISP2	Solo	Bacilo	+	97	R22	Planta	Bacilo	+
36	59PHA	Solo	Bacilo	+	98	R2	Planta	Bacilo	+
37	C.A2	Solo	Bacilo	+	99	BTAM44	Solo	Bacilo	+
38	ARISP2	Solo	Bacilo	+	100	R19	Planta -	Bacilo	+
39	R10ISP2	Planta	Bacilo	+	101	GD02.11	Água	Bacilo	+
40	PDV Lev	Planta	Bacilo	+	102	BTAM162	Solo	Bacilo	+
41	BTAM18	Solo	Bacilo	+	103	GD02.8	Água	Bacilo	+
42	BT130	Solo	Bacilo	+	104	JB 01.4	Água	Bacilo	-

43	BOTO69	Solo	Bacilo	+	105	BTAM51	Solo	Bacilo	+
44	R23NA	Planta	Bacilo	+	106	GD02.4	Água	Bacilo	+
45	BTAM06	Solo	Bacilo	+	107	GD0.3	Água	Bacilo	+
46	X9NA	Solo	Bacilo	+	108	GD02.12	Água	Bacilo	+
47	27 NA	Solo	Bacilo	+	109	GD02.3	Água	Bacilo	+
48	Bd2NA	Solo	Bacilo	+	110	PL03.1	Água	Bacilo	+
49	RWISP2	Solo	Bacilo	+	111	JB02.6	Água	Bacilo	+
50	80PHA	Solo	Bacilo	+	112	JB01.9	Água	Bacilo	+
51	Bio07NA	Solo	Bacilo	+	113	JB01.2	Água	Bacilo	-
52	BTAM38	Solo	Bacilo	+	114	GD01.15	Água	Bacilo	+
53	54MENA	Inseto	Bacilo	+	115	GD02.13	Água	Bacilo	+
54	K7NA	Planta	Bacilo	+	116	77M	Solo	Bacilo	+
55	2 R.5.1LB	Planta	Bacilo	+	117	LA2LB	Água	Bacilo	+
56	BIO04LB	Solo	Bacilo	+	118	BTAM02	Solo	Bacilo	+
57	2MENA	Água	Bacilo	+	119	GD02.5	Água	Bacilo	+
58	39ISP2	Solo	Bacilo	+	120	GD02.6	Água	Bacilo	-
59	42PHA	Solo	Bacilo	+	121	R11ISP2	Planta	Bacilo	+
60	4MENA	Água	Bacilo	+	122	BSBIO	Solo	Bacilo	+
61	K1NA	Planta	Bacilo	+	123	BCLBIO	Solo	Bacilo	+
62	K8NA	Planta	Bacilo	+	124	BTAM49	Solo	Bacilo	+

Legenda: N°= Número de isolados; Subst= substrato; Gr= Gram.

Os caracteres morfológicos observados neste estudo, que classificam as linhagens como membros dos bacilos, são importantes na identificação de bactérias. No entanto, a identificação apenas por meio de critérios morfológicos não é suficiente, pois, há necessidade de outros métodos de análises, visto que, existe uma diversidade de microrganismos com características fenotípicas semelhantes. Este fato enfatiza a utilização de métodos bioquímicos e moleculares (HABIB et al., 1998; IKEDA et al., 2013). Neste sentido, o uso de técnicas moleculares, como por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos do gene codificador do RNA ribossômico 16S, possibilitou uma evolução nos estudos de filogenia em procariotos. Por meio de análises da amplificação e sequenciamento do referido gene, diversos microrganismos não adaptados aos meios de cultivos artificiais, também se tornaram possíveis de serem estudados (NILSSON& STROM, 2002; IKEDA et al. 2013; ORRILLO et al., 2015). Sendo assim, para a identificação mais confiável das linhagens utilizadas neste estudo, foi feita a identificação molecular.

Identificação molecular pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA.

Do total de 124 linhagens utilizadas neste estudo, foi possível até o presente momento, a identificação molecular de trinta e três linhagens. A sequência de nucleotídeos que codifica para o gene 16S foi utilizada como método de identificação. Esta sequência com aproximadamente 1500 nucleotídeos foi utilizada, por ser considerado o método mais

eficiente para a identificação da diversidade microbiana em amostras naturais (GARCIA-MARTINEZ et al.,1999; BOAKYE et al., 2016).

As sequências obtidas neste estudo foram analisadas com o programa BioEdit 7.2 e comparadas com as sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI. As análises demonstraram que dentre as 33 linhagens identificadas, há representantes de quatro gêneros distintos: *Bacillus sp*, *Paenibacillus sp*, *Acromobacter sp* e *Serratia sp*. O parâmetro de decisão para proceder com a identificação molecular derivou do alinhamento comparativo entre sequências de DNA de espécies no BLAST, assumindo-se o percentual de confiança para identidade (ID) entre 94% a 100% (Tabela).

Tabela 5: Identificação molecular das linhagens.

Nº	Lin.	Id. Molecular	Id.	Nº	Lin.	Id. Molecular	Id.
01	BTAM49LB	<i>B. thuringiensis</i>	97%	18	C25ENA	<i>S. marcescens</i>	100%
02	2WISP2	<i>B. pumilus</i>	100%	19	C38NA	<i>S. marcescens</i>	94%
03	RAPANA	<i>B. velezensis</i>	99%	20	R11ISP2	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%
04	BTAM141LB	<i>S. marcescens</i>	99%	21	82PHAISP2	<i>B. tequelensis</i>	98%
05	BTAM 27LB	<i>Bacillus sp</i>	99%	22	25MENA	<i>Bacillus sp.</i>	100%
06	BTAM220LB	<i>B. cereus</i>	98%	23	C22ME	<i>B. wiedmannii</i>	100%
07	4MENA	<i>Bacillus sp.</i>	100%	24	54ISP2	<i>Bacillus sp.</i>	96%
08	38PHAISP2	<i>B. licheniformis</i>	98%	25	26 MENA	<i>B. aerius</i>	99%
09	R13ISP2	<i>B. subtilis strain</i>	94%	26	52 MENA	<i>P. barcinonensis</i>	99%
10	K4NA	<i>B. safensis</i>	99%	27	C24ENA	<i>Bacillus sp.</i>	99%
11	BTAM74LB	<i>B. pumilus</i>	99%	28	31 MENA	<i>Bacillus sp</i>	99%
12	J1NA	<i>B. velezensis</i>	98%	29	C26ENA	<i>S. marcescens</i>	95%
13	LA1LB	<i>Bacillus sp</i>	99%	30	C39ENA	<i>B. stratosphericus</i>	99%
14	15PHAISP2	<i>B. safensis</i>	99%	31	BD2NA	<i>B.wiedmannii</i>	99%
15	31ISP2	<i>Bacillus sp</i>	100%	32	X9NA	<i>B.cereus</i>	98%
16	51BTISP2	<i>A. xylosidans</i>	98%	33	2MENA	<i>Bacillus sp.</i>	99%
17	R10ISP2	<i>Bacillus sp</i>	99%	34	-	-	-

Legenda: Nº=Número de isolados; Lin=linhagens; Id. Molecular=Identificação molecular; Id=Identidade.

A obtenção de conhecimentos sobre os microrganismos por meio das análises do sequenciamento do 16S é de extrema importância, visto que, este gene apresenta regiões variáveis e conservadas de uma bactéria para outra. Assim, as espécies podem ser identificadas e classificadas em diferentes grupos filogenéticos, isto conseqüentemente, possibilita o estudo de suas aplicações (GARCIA-MARTINEZ et al.,1999; BOAKYE et al., 2016). O uso de técnicas moleculares no estudo da sistemática de *Bacillus* e gêneros e mais próximos são essenciais para uma melhor classificação dos membros (LOGAN et al., 2007; IKEDA et al., 2013). Neste sentido, Clarrige (2004); Orrillo et al., (2015), abordaram que as técnicas moleculares, são importantes ferramentas para a identificação de bactérias, uma vez que a caracterização de microrganismos apenas por métodos fenotípicos não são tão precisos quanto a identificação com métodos genotípicos.

Dentre os isolados identificados neste estudo, houve predominância de representantes do gênero *Bacillus* sp., sendo identificadas 27 linhagens pertencentes a este gênero, correspondendo a 82% do total (figura 1). Foram identificadas 17 linhagens em nível de espécie: 2 *B. pulmilus*, 2 *B. velezensis*, 2 *B. cereus*, 2 *B. safensis*, 1 *B. licheniformis*, 1 *B. subtilis*, 1 *B. wiedmannii*, 1 *B. thuringiensis*, 1 *B. amyloliquefaciens*, 1 *B. stratosphericus*, 1 *B. wiedmannii*, 1 *B. aerius*, 1 *B. tequelensis*. Não foi possível a identificação de 10 linhagens em nível de espécie, apenas de gênero. Em relação ao gênero *Serratia*, foram identificadas 4 linhagens da espécie *S. marcescens*. Apenas a linhagem *P. barcinonensis* foi identificada como membro do gênero, *Paenibacillus*. Resultado similar foi observado para o gênero *Achromobacter* que também foi identificada somente a linhagem *A. xylosoxidans*.

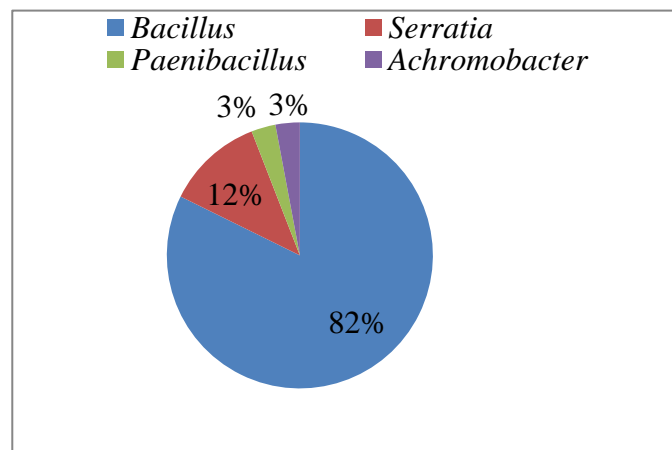


Figura 5: Representação dos gêneros bacterianos.

Em relação ao gênero *Bacillus*, os resultados obtidos neste estudo, corroboram com a literatura descrita. Estudos realizados evidenciam que este gênero é bastante heterogêneo. A capacidade de formação de esporos inertes ambientalmente e metabolicamente resistentes é um fator que os tornam ubíquos, podendo ser isolados de uma diversidade de habitats como a água, planta, inseto e principalmente a partir do solo, considerado o principal substrato de isolamento (LOGAN & VOZ, 2009; SCHMIDT et al., 2011; EL-KERSHET al., 2016). Este gênero bacteriano da família *Bacillaceae*, é constituído por uma diversidade de linhagens e as características fenotípicas e genotípicas, dificulta a classificação taxonômica dos membros (MADIGAN et al., 2010; REBIÉRI, 2015). Desta forma, muitas espécies ainda encontram-se sem classificação. Entretanto, com os estudos da sistemática bacteriana, principalmente por meio do uso da sequência do 16S rDNA, foi possível classificar diversas espécies (LOGAN & VOS, 2009; SCHMIDT et al., 2011).

Detecção molecular do gene *Chi* (Quitinase) nos isolados.

Na detecção molecular do gene *Chi*, o DNA genômico dos isolados foi submetido à amplificação, por meio da técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o respectivo gene. Dessa forma, foi possível obter a amplificação de fragmentos de DNA do gene *Chi* do tamanho de aproximadamente 2027 pares de bases. As análises permitiram verificar que entre 124 linhagens, houve amplificação positiva em apenas seis (4,5%); BTAM27LB, 103PHAISP2, BTAM138LB, BTAM18LB, K2NA e R11ISP2. O mesmo fragmento foi observado na linhagem padrão Bti01 com o mesmo tamanho de pares de base. (Figuras 2, 3,4 e 5). Eletroforese em gel de agarose 1%.

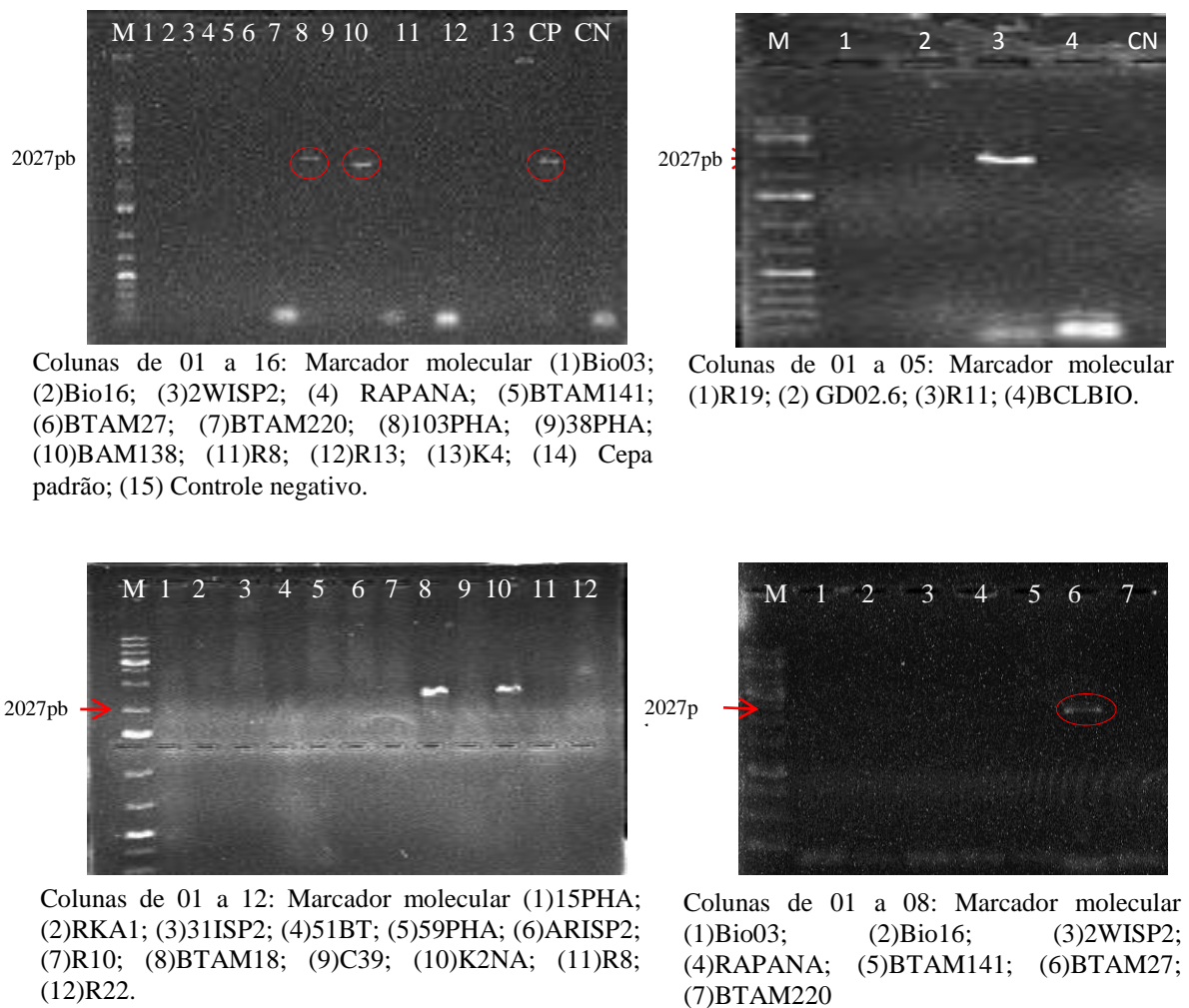


Figura 6: Perfil eletroforético do gene *Chi*

As linhagens com amplificação do gene *Chi* obtidas neste estudo, despertam o interesse das pesquisas, visto que o produto expresso por este gene apresenta capacidade de hidrolisar polímeros insolúveis. Neste sentido, as quitinases expressas por organismos procariotos, são utilizadas em uma diversidade de aplicações, como por exemplo, na degradação de resíduos quitinosos, e principalmente no combate de fungos fitopatógenos ou insetos pragas (SURYANTO et al., 2011; VELIZ et al., 2017; SUBBANNA et al., 2018). Neste contexto, Boer et al., (1998) relataram a ocorrência de membros dos gêneros *Pseudomonas* e *Streptomyces* como bactérias produtoras de quitinases com mecanismo de ação inibitória no crescimento dos fungos *Fusarium culmorum*, *Mucor hiemalis* e *Phoma exigua*. Yan et al., (2011), estudaram uma quitinase sintetizada por *B. subtilis* SL-13, que causou a mortalidade de células de uma colônia do fungo *Rhizoctonia solani*. Da mesma forma, Senol et al., (2014), analisaram uma quitinase purificada de *B. subtilis* e observaram que a enzima apresentou atividade antifúngica eficaz contra o fungo *F. culmorum*. Okay et al., (2013), também evidenciaram a atividade antifúngica de quitinase de *Serratia marcescens* contra os fungos *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryza*.

Em relação ao biocontrole de insetos, Mubbarik & Prawasti (2010) isolaram uma bactéria produtora de quitinase e com parede celular Gram positiva, cuja atividade quitinolítica, apresentou capacidade de degradação da quitina do exoesqueleto do piolho-do-algodão, *Aphis gossypi*. Chandrasekaran et al., (2012) analisaram a atividade de uma quitinase sintetizada pela linhagem *B. subtilis* e observaram que a enzima foi capaz de causar a mortalidade das larvas, em diferentes estágios de desenvolvimento de *Spodoptera litura*. Diante disso, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas, visando à verificação do potencial inseticida das quitinases isoladas ou em sinergismo com outras proteínas inseticidas, como por exemplo, as endotoxinas CRY e CYT de *B. thuringiensis* (PRASANNA et al., 2013; AGGARWAL et al., 2015; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; SUBBANNA et al., 2018).

Neste sentido, Ibarra et al., (2003), isolaram 4 linhagens de *B. thuringiensis* com perfis de genes *Cry* e *Cyt*, semelhantes ao da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelenses*. No entanto, estas linhagens apresentaram maior toxicidade aos mosquitos do que a linhagem padrão. Dessa forma, os autores ressaltaram que a maior bioatividade das linhagens isoladas, pode ter sido ocasionada devido a três fatores: (i) os genes *Cry* e *Cyt* amplificados podem estar codificando novas variantes proteicas; (ii) os genes *Cry* e *Cyt* podem ser idênticos, mas seus níveis de expressão podem ser diferentes; ou (iii) um fator ou proteína não detectado pode ser responsável pelo aumento da atividade. Elkersh et al., (2016) estudaram o potencial inseticida da linhagem selvagem Bt55, e assim observaram maior

atividade contra mosquitos, do que a linhagem padrão *B. thuringiensis var. israelenses*. Além disso, no DNA genômico da linhagem Bt55, foi também detectado a sequência do gene *Chi*. Dessa forma, linhagens que codificam as enzimas quitinases podem influenciar no aumento da atividade mosquitocida ao perfurar a membrana peritrófica, permitindo maior acessibilidade das toxinas CRY e CYT aos receptores da membrana epitelial (CAI et al., 2007; ARGÔLO-FILHO & LOQUERCIO, 2014).

Foi também demonstrado por meio do estudo de Abdullah et al., (2014), que a transferência da sequência codificadora do gene da quitinase de *B. subtilis* para a linhagem *B. thuringiensis*, foi expressa positivamente, pois, aumentou a sua bioatividade inseticida. Costa et al (2010) selecionaram isolados de *B. thuringiensis* de diversas regiões do território brasileiro, com alta toxicidade a larvas de *Ae. aegypti*, com diferentes combinações de genes *Cry* e *Cyt* (díptero-específicos), além do gene *Chi*, este último, atuando conjuntamente com os demais pode ter aumentado a toxicidade dos isolados. Da mesma forma, Soares-da-Silva et al., (2017), obtiveram linhagens de *B. thuringiensis* isoladas de três biomas brasileiros, com atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e *An. darlingi*, além da combinação dos genes *Cry/Cyt* nestas linhagens patogênicas, foi também observado a presença do gene (*Chi*) em 35% das linhagens. Dessa forma, é possível evidenciar a importância deste estudo na detecção do gene (*Chi*) em linhagens bacterianas, na utilização isolada ou em combinação com outras proteínas inseticidas. Além disso, há também considerável interesse no potencial biotecnológico nos produtos da ação enzimática das quitinases sobre a quitina, dentre estes, encontram-se os quito oligossacarídeos (HAMID et al., 2013; KIDIBULE et al., 2018) .

No presente estudo, todas as linhagens obtidas com amplificação positiva para o gene *Chi*, apresentaram características morfológicas referentes ao grupo dos bacilos, com parede celular Gram positiva. Em alguns estudos realizados foi observada maior quantidade de bactérias do tipo bacilo que secretam quitinases. De acordo com as atividades prospectivas de Kamil et al., (2007) e Mubarik et al., (2010), houve predominância de bactérias em formato de bacilos, com atividade quitinolítica, os quais isolaram respectivamente, 5 e 25 bactérias, sendo todas Gram positivas. Suryanto et al., (2011), isolaram 6 linhagens bacterianas produtoras de quitinases, sendo todas com formato de bacilo. No estudo de Chandrasekaran et al., (2012), os autores obtiveram 27 isolados produtores de quitinases, dentre as linhagens, 23 apresentaram morfologia do formato de bacilo.

Dentre as linhagens portadoras do gene *Chi*, detectadas neste estudo, apenas duas, R11ISP2 –*B. amyloquefaciens* e BTAM27LB – *Bacillus sp.* foram identificadas pelo gene

16S rDNA. Sendo assim, verificou-se que estas linhagens são pertencentes ao gênero *Bacillus*. Os membros deste gênero são conhecidos pelo potencial para secretar uma série de enzimas degradativas, dentre estas, as quitinases (BRAVO *et al.*, 2007; DJENANE *et al.*, 2017). Outros gêneros de bactérias também já foram relatados por apresentarem membros quitinolíticos, como por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa* por Gupta *et al.*, (2006); *Streptomyces sp* (SOWMYA *et al.*, 2012); *Serratia marcescens* JPP1 (WANG; YAN; CAO, 2014) e *Paenibacillus pasadenensis* CS0611 (GUO *et al.*, 2017).

Bioensaios seletivos

A análise dos resultados das taxas de mortalidade demonstrou que dentre as 124 linhagens, vinte e uma (16,93%) apresentaram atividade larvicida maior ou igual a 50% (Tabela 01). Considerando a leitura de mortalidade das larvas em 24 h de exposição, sete linhagens - C25ENA, C39ENA, GD02.13ISP2, BTAM16NA, BTAM06NA, 26MENA e 4MENA, ocasionaram 100% de mortalidade. Além disso, as linhagens - 2WISP2, BT30NA, BT130NA e 51BTISP2, ocasionaram 56, 60, 70 e 90% de mortalidade, respectivamente.

Considerando a leitura de mortalidade das larvas em 48 h de aplicação, as linhagens 58PHAISP2, BSBIOLB, BCLBIO, BTAM49LB, 59PHAISP2, 15PHAISP2, R22ISP2 e R11ISP2, ocasionaram mortalidade com valores correspondentes: 50, 53,3, 56,6, 56,6, 56,6, 66,6, 80 e 80%, respectivamente. Na leitura de mortalidade em 72 h de exposição, as linhagens - GD02.3ISP2 e R17ISP2, ocasionaram 50 e 53,33% de mortalidade. Desta forma foi observado que estas linhagens - GD02.3ISP2 e R17ISP2, ocasionaram mortalidade em maior tempo de exposição.

Dentre as linhagens selecionadas com potencial patogênico obtidas no presente estudo, oito foram identificadas. O gênero *Bacillus* foi predominante, pois, houve a identificação de seis membros, C39ENA *B. stratosphericus*, 26MENA *B. aerius* e 4MENA *Bacillus sp.* 15PHAISP2 *B. safensis*, BTAM49LB *B. thuringiensis* e R11ISP2 *B. amyloliquefaciens*. Enquanto que para os gêneros *Serratia* e *Acrhomobacter* foi identificada apenas uma linhagem de cada: C25ENA - *S. marcescens* e 51BTISP2- *A. xylosoxidans*.

Tabela 6: Resultado do bioensaio seletivo

Nº	Linhagem	Mortalidade %			Nº	Linhagem	Mortalidade %		
		24h	48h	72h			24h	48h	72h
01	Bti01	100	-	-	12	C25ENA	100	-	-
02	15PHAISP2	-	66,6	-	13	BT30NA	60	100	-
03	51BTISP2	90	96,6	-	14	58PHAISP2	46,6	50	70
04	R22ISP2	46,6	80	83,3	15	59PHAISP2	36,6	56,6	-
05	BT130NA	70	-	80	16	4MENA	100	-	-

06	26MENA	100	-	-	17	BTAM06NA	100	-	-
07	C39ISP2	100	-	-	18	BTAM16NA	100	-	-
08	R17ISP2	3,3	23,3	50	19	GD02.3	-	36,6	53,3
09	GD02.13	100	-	-	20	R11ISP2	10	80	90
10	BSBIOLB	33,3	53,3	63,3	21	BCLBIOLB	26,6	56,6	66,6
11	BTAM49LB	100	-	-	22	2WISP2	56	63,3	66,6

Legenda: N°= Número de isolados; Cont = controle.

No presente estudo, 16,93% das linhagens mostraram atividade patogênica contra larvas de *Ae. aegypti*, demonstrando a ocorrência de uma quantidade expressiva de linhagens com potencial entomopatogênico. Ao contrário de diversos estudos realizados no Brasil, que enfatizam a baixa ocorrência de linhagens patogênicas. Dias et al., (2002), em testes de patogenicidade com 210 linhagens de *B. thuringiensis*, observaram ação entomopatogênica contra larvas de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em apenas 1,9%.

Da mesma forma, Praça et al., (2004), visando selecionar entre 300 linhagens de *B. thuringiensis*, as efetivas contra larvas de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, demonstraram que apenas 1% apresentaram atividade contra as duas espécies respectivamente. Com o mesmo objetivo, Ootani et al., (2011), realizaram testes de patogenicidade com 101 linhagens bacterianas isoladas de solo e apenas 1 demonstrou capacidade de causar alta mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*. Em relação aos estudos realizados com *Bacillus* isolados de solos da Amazônia, Pereira et al., (2013) utilizaram 96 linhagens em testes seletivos, das quais apenas 2% ocasionaram mortalidade em larvas de *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Soares da Silva et al., (2015, 2017), isolaram linhagens de *B. thuringiensis* de diferentes biomas brasileiros e obtiveram 8,8 e 6,7% respectivamente, de linhagens entomopatogênicas ativas contra larvas de *Ae. aegypti*. Lobo et al., (2017), investigaram o potencial de 300 linhagens de *B. thuringiensis* obtidas na região do cerrado do estado do Maranhão e observaram atividade larvicida contra *Ae. aegypti* em apenas 4%.

Atividade larvicida do extrato bruto (células lisadas) de bacilos em larvas de *Aedes aegypti*

Na análise do potencial da atividade larvicida no produto intracelular, foi realizado o bioensaio de dose com 21 linhagens tóxicas contra larvas de terceiro ínstar de *Ae. aegypti*, utilizando células lisadas. Após aplicação, a mortalidade das larvas foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 h. Sendo assim, foi demonstrado que dentre as 21 linhagens utilizadas, sete ocasionaram mortalidade com valores superiores a 50% (tabela).

Tabela 7: Percentual de mortalidade das larvas expostas na cultura liofilizada

Linhagem	Pellet Liofilizado + H ₂ O estéril						C
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	24h após aplicação						
R22ISP2	100	100	100	100	100	100	-
GD02.13ISP2	100	100	100	100	100	100	-
BTAM49LB	100	100	100	100	100	100	-
BTAM16NA	100	100	99,33	100	99,33	100	-
BT30NA	64,66	62	40,33	40,33	25,33	5,33	-
15PHAISP2	43,33	27,33	25,33	5,33	2	4	-
BSBIOLB	-	-	-	-	-	-	-
	48h após aplicação						
R22ISP2	-	-	-	-	-	-	-
GD02.13ISP2	-	-	-	-	-	-	-
BTAM49LB	-	-	-	-	-	-	-
BTAM16NA	-	-	100	-	100	-	-
BT30NA	85,33	81,33	53,33	45,33	35,33	8	-
15PHAISP2	55,33	45,33	34,66	22	22	18	-
BSBIOLB	13,33	2	0,66	-	-	-	-
	72h após aplicação						
R22ISP2	-	-	-	-	-	-	-
GD02.13ISP2	-	-	-	-	-	-	-
BTAM49LB	-	-	-	-	-	-	-
BTAM16NA	-	-	-	-	-	-	-
BT30NA	97,33	93,33	84,66	72,66	40,66	13,33	-
15PHAISP2	74,66	62	57,33	34,66	27,33	23,33	-
BSBIOLB	51,33	12	10	-	-	-	-

Legenda: C1 a C6= Concentrações; C= Controle.

Considerando a leitura de mortalidade em 24 h de aplicação, as linhagens - R22ISP2, GD02.13ISP2, BTAM49LB e BTAM16NA apresentaram 100% de mortalidade nas concentrações: 0,362 mg/ml, 0,31675mg/ml, 0,2715 mg/ml, 0,22625 mg/ml, 0,181 mg/ml, 0,13575 mg/ml, exceto a última linhagem que apresentou 93,3% nas concentrações 0,2715 mg/ml e 0,181 mg/ml. Já a linhagem BT30NA, ocasionou mortalidade acima de 50% apenas nas concentrações 0,362 mg/ml, 0,31675mg/ml, com os valores de mortalidade de 64,66% e 62% respectivamente. Na leitura de 48 h, a linhagem 15PHAISP2, ocasionou 55,3% de mortalidade na concentração 0,362 mg/ml. Já a linhagem BT30NA apresentou aumento de mortalidade, em relação à leitura de 24h, nas concentrações 0,362 mg/ml, 0,31675 mg/ml, demonstrando 85,33 e 81,3% de mortalidade. Além disso, apresentou mortalidade de 53,33% na concentração 0, 2715 mg/ml.

Considerando a leitura de 72 h, a linhagem BCLBIO apresentou 51,33% de mortalidade na concentração 0,362 mg/ml, demonstrando que a atividade larvicida ocorreu no maior tempo de leitura. A linhagem BT30NA apresentou mortalidade nos três intervalos de leitura nas concentrações: 0,362mg/ml, 0,31675mg/ml, 0,2715 mg/ml, sendo que nesta última leitura, foi observado 97,33, 93,33 e 84,66%, respectivamente. Além destas, a concentração

0,22625 mg/ml, ocasionou 72,66% de mortalidade. A linhagem 15PHAISP2, demonstrou mortalidade nas concentrações 0,31675 mg/ml e 0,2715 mg/ml, com os valores de 62 e 57,33%, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as linhagens - R22ISP2, GD02.13ISP2, BTAM49LB e BTAM16NA, BT30NA, 15PHAISP2 e BSBIOLB, foram promissoras nos testes com células lisadas. Dessa forma, a ingestão das células lisadas pelas larvas podem ter ocasionado diversos fatores que causaram a morte das mesmas. No processo de alimentação, as larvas de *Ae. aegypti* se alimentam por filtração, ingerindo diversos sedimentos, assim como também podem ingerir células ativas de microrganismos como fungos e bactérias (CLEMENTES, 2000; MUNIARAJ et al., 2012). Ao ingerir bactérias, por exemplo, estes microrganismos secretam enzimas e toxinas ao nível da membrana peritrófica e do epitélio intestinal, tornando-as permeáveis à passagem de diversas substâncias e até mesmo outros microrganismos para a hemolinfa, o que conseqüentemente pode causar a septicemia (ALVES, 1998; BADRAN et al., 2016).

De acordo com os resultados deste estudo, é possível evidenciar que as linhagens com atividade larvicida, podem sintetizar compostos com propriedades promissoras ao desenvolvimento de produtos para uso no controle de vetores e com menores efeitos negativos ao meio ambiente. Além disso, dentre as três linhagens que ocasionaram 100% de mortalidade em 24h, a BTAM49LB foi identificada como espécie *B. thuringiensis*. De acordo com a literatura diversas linhagens de *B. thuringiensis* com potencial larvicida significativamente alta contra mosquitos já foram isoladas de amostras de solo (CAMPANINI et al., 2012; EL-KERSH et al., 2016). Neste sentido, Alves (1998); Zhang et al., (2016), abordaram que após a ingestão de esporos ou proteínas de *B. thuringiensis* por insetos, são formados poros permeáveis na membrana celular do epitélio intestinal, como decorrência das endotoxinas. Estes danos nas membranas celulares e conseqüentes danos ao nível de vacúolos e mitocôndrias, pode se iniciar após alguns minutos de ingestão. Sendo assim, estes fatores podem justificar a alta mortalidade das larvas em 24 h de aplicação do cultivo da linhagem BTAM49LB.

Avaliação da atividade larvicida do extrato bruto de bacilos (sobrenadante filtrado).

Para a verificação do potencial das bactérias entomopatogênicas, como secretoras de metabólitos com atividade larvicida eficazes contra o *Ae. aegypti*, larvas de terceiro ínstar deste mosquito, foram expostas ao sobrenadante em diferentes concentrações. Em seguida, a mortalidade das larvas foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 h. As análises dos resultados

demonstraram que o sobrenadante das linhagens, 15PHAISP2, BT30NA e BSBIOLB ocasionaram mortalidade superior a 50% (tabela).

Tabela 8: Percentual de mortalidade das larvas expostas no sobrenadante

Linhagem	Sobrenadante Filtrado						C
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	24h após aplicação						
BT30NA	64,66	62	40,33	40,33	25,33	5,33	-
15PHAISP2	43,33	27,33	25,33	5,33	2	4	-
BSBIOLB	-	-	-	-	-	-	-
	48h após aplicação						
BT30NA	85,33	81,33	53,33	45,33	35,33	8	-
15PHAISP2	55,33	45,33	34,66	22	22	18	-
BSBIOLB	13,33	2	0,66	-	-	-	-
	72h após aplicação						
BT30NA	97,33	93,33	84,66	72,66	40,66	13,33	-
15PHAISP2	74,66	62	57,33	34,66	27,33	23,33	-
BSBIOLB	51,33	12	10	-	-	-	-

Legenda: C1 a C6= Concentrações; C= Controle.

Considerando a leitura de mortalidade das larvas expostas em 24h de aplicação, nenhuma linhagem ocasionou mortalidade acima de 50% nas concentrações testadas. Na leitura de 48h, apenas a linhagem 15PHAISP2 ocasionou 69,66% de mortalidade na concentração 1000 μ L e 66% na concentração 750 μ L. Em leitura de 72h, esta linhagem ocasionou mortalidade de 53,33% na concentração de 500 μ L. Neste mesmo intervalo de tempo, a linhagem BT30NA apresentou atividade larvicida nas concentrações: 1000 μ L, 750 μ L, 500 μ L, 375 μ L, com os valores de 56,66, 54, 52 e 50%, respectivamente. Já a linhagem BSBIOLB demonstrou potencial larvicida nas concentrações: 1000 μ L e 750 μ L, demonstrando mortalidade de 82,99 e 59%, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, estas três linhagens apresentaram potencial promissor para a síntese de biomoléculas com propriedades de ação inseticidas. Porém, ocasionaram a mortalidade das larvas em um intervalo de tempo maior quando comparados a outros estudos. Patil et al., (2012) testaram o sobrenadante filtrado das linhagens entomopatogênicas de *B. thuringiensis* (SV2) e *Serratia sp.* (SV6), contra larvas de *Ae. aegypti*. Os autores observaram taxas de mortalidades superior a 50%, após 6h para as linhagens de *B. thuringiensis* e após 12h para as linhagens de *Serratia sp.* Cem por cento de mortalidade foi observada, após 24h de exposição a *B. thuringiensis* e 48h a *Serratia sp.* Neste sentido, Ârgolo (2014), aborda alguns fatores que podem contribuir para as diferenças nas atividades entomopatogênicas como, por exemplo, diferenças de obtenção do sobrenadante, volume de cultura, condições de inóculo e condições de culturas gerais. Além disso, diversos fatores podem estar associados com a eficiência da atividade larvicida,

ocasionando diferenças nos intervalos de exposição, assim como a baixa eficiência, interferindo significativamente nos resultados.

No presente estudo, as linhagens que demonstraram capacidade de causar a mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, despertam o interesse para futuras análises, visando a descrição e identificação dos metabólitos, presentes no sobrenadante dos respectivos cultivos. Por meio de estudos posteriores, será possível o isolamento e a identificação da biomolécula com mecanismo de ação, capaz de ocasionar a morte das larvas. De acordo com a literatura, o sobrenadante obtido, a partir do cultivo bacteriano, pode conter uma diversidade de moléculas secretadas com propriedades metabólicas desconhecidas. Neste sentido, Bode, (2009); Rosa da Silva, (2017), abordaram que a maioria dos metabólitos secretados por espécies bacterianas entomopatogênicas são desconhecidos. Este fato enfatiza que a síntese de biomoléculas por microrganismos pode ser uma fonte promissora na obtenção de agentes de controle de insetos vetores, como por exemplo, o *Ae. aegypti*.

Dessa forma, a ocorrência de mortalidade das larvas observadas neste estudo, pode ter sido ocasionada por meio do mecanismo de ação de apenas uma biomolécula ou do sinergismo entre diferentes compostos. Acredita-se que os procariotos são capazes de secretar no meio de cultivo, uma diversidade de moléculas com diferentes aplicações, sendo que dentre estas, podem estar presentes os exopolissacarídeos. Estes compostos são biodegradáveis e não tóxicos aos seres humanos, o que enfatiza a necessidade de pesquisas objetivando as aplicações no controle de insetos, vetores de doenças (ABINAYA et al., 2018). Estudos realizados por Abinaya et al., (2018) afirmaram que o exopolissacarídeo isolado do sobrenadante do cultivo da linhagem *B. licheniformes*, apresentou mortalidade máxima das larvas de *Ae. aegypti* e de *An. stephensi* na concentração de 150µg/ml.

Considerando as características fenotípicas das linhagens com maior atividade larvicida neste estudo, todas são pertencentes ao grupo dos bacilos com parede celular Gram positivas. Na identificação molecular, apenas a linhagem 15PHAISP2 *B. safensis* foi identificada. Os membros do gênero *Bacillus* são conhecidos pela capacidade de síntese de metabólitos bioativos com diferentes aplicações (DEMAIN & FANG, 2000; BADRAN et al., 2016). Neste sentido, Revathi et al., (2013) demonstraram que, as larvas de *Ae. aegypti*, são suscetíveis aos metabólitos produzidos pela linhagem *B. subtilis*, com mortalidades em diferentes dosagens. As linhagens de *B. subtilis* sintetizam uma diversidade de peptídeos bioativos, com potencial para uso nos programas de controle de pragas e mosquitos vetores. Dentre estes compostos, estão incluídos os lipopeptídeos com potencial para a atividade inseticida.

Avaliação da atividade larvicida do pellet (células lisadas) em meio com quitina

Neste experimento foram utilizadas nove linhagens, todas cultivadas em meio quitinolítico. O uso de células lisadas obtidas pelo cultivo bacteriano em meio contendo quitina foi aplicado contra larvas de terceiro ínstar de *Ae. aegypti*, objetivando avaliar a influência da indução da quitina, na atividade larvicida. Os resultados obtidos referentes à mortalidade das larvas estão descritos na tabela.

Tabela 9: Percentual de mortalidade das larvas expostas a células lisadas com quitina

Linhagem	Cultura liofilizada quitina						C
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	24h após aplicação						
BTAM16NA	100	100	100	100	100	100	-
	48h após aplicação						
BTAM16NA	-	-	-	-	-	-	-
	72h após aplicação						
BTAM16NA	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: C1 a C6= concentrações; C= controle.

Considerando os resultados obtidos neste bioensaio, apenas uma linhagem demonstrou capacidade de ocasionar a mortalidade das larvas superior a 50%. Na leitura de mortalidade de 24h de aplicação das células lisadas, a linhagem BTAM16 ocasionou 100% de mortalidade das larvas, em todas as concentrações: 0,362 mg/ml, 0,31675mg/ml, 0,2715 mg/ml, 0,22625 mg/ml, 0,181 mg/ml, 0,13575 mg/ml. Resultados similares de mortalidade ocasionada por esta mesma linhagem, foi também observado anteriormente, na avaliação de células lisadas do cultivo em meio NA. De acordo com estes resultados, foi demonstrado que dentre as linhagens cultivadas nos diferentes meios de cultivos, apenas a BTAM16 apresentou capacidade de síntese de metabólitos bioativos com atividade larvicida tanto em meio NA, quanto em meio quitinolítico. Considerando esta linhagem, a composição dos respectivos meios, forneceu as condições necessárias para a síntese de compostos, com mecanismos de ação capazes de ocasionar a mortalidade das larvas, em curto período de tempo.

Por meio das análises da atividade larvicida, foi demonstrado que as linhagens BTAM49 e BT30, ocasionaram mortalidade superior a 50%, nas células lisadas do cultivo, nos meios LB e NA, respectivamente, mas não apresentaram mortalidade ao serem cultivadas em meio quitinolítico. De acordo com Bhattacharya et al., (2007); Djenane et al., (2017), a expressão e a produção de compostos bioativos como, por exemplo, as quitinases, por procariotos são bastante variáveis, uma vez que atuam em diferentes funções, como, nutricionais ou nos mecanismos de defesa. Dessa forma, podem ser expressas constantemente ou após a exposição a algum fator externo, como por exemplo, outro microrganismo.

A ausência da atividade larvicida nestas linhagens, no cultivo em meio quitinolítico, necessita de análises posteriores, visto que há a possibilidade de síntese do composto bioativo, com mecanismo de ação larvicida. Considerando as diferentes fontes nutricionais utilizadas, tempo de cultivo e outros fatores, pode ser que estes metabólitos estejam presentes no extrato, porém em concentrações diferentes a cada cultivo microbiano, isto pode ocasionar a ausência de homogeneidade dos resultados. As diferenças na atividade larvicida podem ser ainda em relação à capacidade de interação de proteínas inseticidas, como por exemplo, Cry com receptores específicos presentes no epitélio intestinal dos mosquitos (PIGOTT & ELLAR, 2007). A presença desses receptores é o que torna um inseto susceptível ao mecanismo de ação de uma determinada toxina, pois, mesmo em um grupo homogêneo, podem ocorrer variações quanto ao número desses receptores, o que define a especificidade e os mecanismos de ação de cada proteína inseticida (CHEN et al., 2017).

Neste estudo todas as amostras testadas no bioensaio com as células lisadas, foram submetidas ao processo de liofilização. Este fato poderia ocasionar a concentração do composto bioinseticida. Entretanto, a alta concentração dos extratos, pode ter influencia negativa, pois com a liofilização, outras substâncias interferentes também podem ser concentradas, o que pode reduzir seus efeitos biológicos (SCHULZ et al., 2003).

Avaliação da atividade larvicida do sobrenadante filtrado do meio com quitina.

A aplicação do sobrenadante filtrado obtido do cultivo de bactérias em meio contendo quitina, foi aplicado contra larvas de terceiro ínstar de *Ae. aegypti*, visando a influência da quitina na síntese de metabólitos bioativos.

A mortalidade das larvas foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 h. De acordo com os resultados obtidos, apenas a linhagem BTAM16 ocasionou mortalidade acima de 50% (Tabela). Na leitura de mortalidade em 24 h de aplicação, esta linhagem ocasionou 100% de mortalidade no sobrenadante filtrado. Resultado similar de mortalidade para esta mesma linhagem, foi observada ao serem utilizadas células lisadas obtidas do cultivo em meio com quitina na etapa anterior.

Tabela 10: Resultado de mortalidade das larvas expostas ao sobrenadante com quitina

Linhagem	Cultura liofilizada quitina						C
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	24h após aplicação						
BTAM16NA	100	100	100	100	100	100	-
	48h após aplicação						
BTAM16NA	-	-	-	-	-	-	-
	72h após aplicação						

BTAM16NA	-	-	-	-	-	-	-
----------	---	---	---	---	---	---	---

Legenda: C1 a C6=concentrações; C=Controle.

Considerando os resultados obtidos neste teste, foi possível observar que dentre as nove linhagens analisadas, nenhuma ocasionou mortalidade similar tanto no sobrenadante do meio com quitina, quanto no sobrenadante do cultivo dos meios NA, LB e ISP2. Na leitura de mortalidade em 24h de aplicação, a linhagem BTAM16 apresentou 100% de mortalidade das larvas, em todas as concentrações testadas: 100µL, 750 µL, 500 µL, 375 µL, 250 µL, 187,5 µL, do sobrenadante do cultivo, em meio com quitina. No entanto, esta mesma linhagem ocasionou mortalidade inferior a 50%, em todas as concentrações, nos três intervalos de leitura, no sobrenadante do cultivo, em meio NA. Resultados divergentes foram observados na linhagem BT30. Esta linhagem, não ocasionou mortalidade em nenhum intervalo de leitura no sobrenadante, em meio com quitina. Entretanto, em leitura de 72h apresentou mortalidade superior a 50% no sobrenadante do cultivo em meio NA, em quatro concentrações, com valores correspondentes a 97,33, 93,33, 84,66 e 72,66% respectivamente.

Os resultados de mortalidade obtidos neste estudo, na aplicação do sobrenadante da linhagem BTAM16, mostraram que dentre os dois meios utilizados, o meio com quitina desempenhou importante papel para a síntese dos compostos bioativos, secretados com potencial patogênico. Em relação à produção de biomoléculas como, por exemplo, enzimas quitinases, Avramenko; Galynkin (2010) abordaram que a presença de quitina coloidal no meio de fermentação, ocasionou aumento de 33% na produção destas enzimas, por *Streptomyces griseus*.

Neste estudo, foi também observado que a adição de outra fonte de carbono ao meio de cultura, contendo quitina pode proporcionar efeitos heterogêneos. De acordo com a análise dos resultados, a linhagem BT30 cultivada em meio NA, apresentou atividade larvicida no sobrenadante filtrado. No entanto, esta linhagem não apresentou mortalidade no sobrenadante do cultivo, em meio contendo quitina. As diferenças na atividade larvicida podem ter sido ocasionadas, devido à presença de glicose, no meio com quitina. De acordo com Reyes et al., (2012) a repressão/indução da síntese de enzimas quitinolíticas, por meio da presença de glicose no meio com quitina, pode interferir na expressão dos genes responsáveis pela produção destas enzimas e outros metabólitos bioativos. Outro fator a ser considerado, é o desconhecimento das suas vias metabólicas, então pode ser que esta linhagem apresente capacidade de síntese de enzimas biossintéticas, repressoras de metabólitos, na presença de alta concentração de carbono.

Considerando a alteração no potencial entomopatogênico da linhagem BT30, no sobrenadante do cultivo em meio quitinolítico, pode ser que a produção da biomolécula e consequentemente o mecanismo de ação, foram afetados pelo processo de fermentação ou pelas condições de cultivo. Neste sentido, Abdel-Fattah et al., (2005) abordaram que a síntese de biomoléculas, de origem microbiana, assim como a expressão dos mecanismos de ação, depende de diversas variáveis como, processo de otimização e formulação dos meios de cultivos. De acordo com DEMAIN & FANG, (2000), CHANDRASEKARAN et al., (2014), microrganismos isolados de seu nicho ambiental podem produzir metabólitos bioativos, durante as primeiras culturas, no entanto, no decorrer dos cultivos, podem reduzir a produção, bem como o mecanismo de ação. Dessa forma, o cultivo de microrganismos exige conhecimentos da fisiologia microbiana, para assim fornecer as condições adequadas ao crescimento e a produção da biomolécula desejada.

Em relação à alta atividade larvicida da linhagem BTAM16, no sobrenadante em meio de cultivo com quitina e a baixa atividade no cultivo em meio NA, é provável que devido à presença da quitina, tenha ocorrido mecanismo de ação quitinolítico. Considerando a expressão do mecanismo de ação destas enzimas, possivelmente ocorreram alterações na permeabilidade e capacidade de proteção ao epitélio do intestino médio, da membrana peritrófica das larvas e como consequência pode ter ocasionado à septicemia (KELKENBERG et al., 2015; BERINI et al., 2016). No entanto, os dados obtidos neste estudo são preliminares e sem o isolamento e a caracterização peptídica da enzima, não é possível afirmar tal mecanismo de ação. Estudos posteriores, como por exemplo, a microscopia eletrônica de transmissão poderá fornecer mais informações sobre o efeito desses compostos bacterianos, nas larvas de *Ae. aegypti*.

Correlação entre atividade larvicida e a presença de genes codificadores de enzimas quitinases em linhagens de bacilos

Considerando os resultados da atividade larvicida e os de amplificação do gene *Chi*, foram observados que, apenas a linhagem R11ISP2 apresentou mortalidade acima de 50% após 48 horas de exposição (ver tabela 11). Quando esta mesma linhagem foi testada com o sobrenadante, houve a redução de mortalidade em leituras de 24, 48 e 72 h, apresentando respectivamente 3, 10 e 16%. Nos testes com células lisadas houve também a redução de mortalidade em leituras de 24, 48 e 72 h, demonstrando 9, 12 e 15%. Estes resultados diferem da linhagem padrão Bti01 (*Bacillus thuringiensis serov. israelensis*), no qual foi confirmada a presença do gene *Chi* e atividade larvicida de 100% de mortalidade tanto nos bioensaios

seletivos quanto nos bioensaios de dose. As linhagens BTAM27NA, 103PHAISP2, BTAM138LB e K2NA não apresentaram atividade larvicida, porém, foi confirmada a presença do gene *Chi* nestas linhagens. Já na linhagem padrão houve combinação entre a presença do gene *Chi* e a atividade larvicida, sugerindo que estas enzimas podem estar presentes e contribuindo para o aumento da atividade.

Tabela 11: Linhagens com a presença e ausência de atividade larvicida e do gene *Chi*.

Nº	Linhagem	Mortalidade %				<i>Chi</i>	Nº	Linhagem	Mortalidade %				<i>Chi</i>
		24h	48h	72h					24h	48h	72h		
01	Bti01	100	-	-	-	+	15	C25ENA	100	-	-	-	-
02	2WISP2	56	63,3	66,6	-	-	16	103PHAISP2	-	-	-	-	+
03	BTAM27LB	3,3	-	-	-	+	17	BTAM138LB	-	-	-	-	+
04	15PHAISP2	-	66,6	-	-	-	18	BT30NA	60	100	-	-	-
05	51BTISP2	90	96,6	-	-	-	19	58PHAISP2	46,6	50	70	-	-
06	R22ISP2	46,6	80	83,3	-	-	20	59PHAISP2	36,6	56,6	-	-	-
07	BTAM18LB	10	-	-	-	+	21	BTAM06NA	100	-	-	-	-
08	BT130NA	70	-	80	-	-	22	4MENA	100	-	-	-	-
09	26MENA	100	-	-	-	-	23	K2NA	-	-	-	-	+
10	C39ISP2	100	-	-	-	-	24	BTAM16NA	100	-	-	-	-
11	R17ISP2	3,3	23,3	50	-	-	25	GD02.3	-	36,6	53,3	-	-
12	GD02.13	100	-	-	-	-	26	R11ISP2	10	80	90	-	+
13	BSBIOLB	33,3	53,3	63,3	-	-	27	BCLBIOLB	26,6	56,6	66,6	-	-
14	BTAM49LB												

Legenda: Nº = número; += presença; - = ausência.

Neste estudo, foi possível observar linhagens que apresentaram atividade larvicida e ausência do gene *Chi*, considerando que outros fatores de virulência e patogenicidade podem estar presentes nestas linhagens. Este fato evidencia que outras enzimas quitinolíticas ou moléculas podem estar envolvidas na atividade larvicida. Considerando a grande variabilidade genética e bioquímica de quitinases (diferentes mecanismos de ação, espectro de atividade) é possível que essas biomoléculas não apresentem atividade funcional nas larvas testadas. As enzimas quitinases expressas por diversos microorganismos são bastante variáveis, uma vez que atuam em diferentes funções, como por exemplo, obtenção de meios nutricionais para o organismo ou mecanismos de defesa. Além disso, essas enzimas podem ser expressas constantes ou após a exposição a algum fator externo, como por exemplo, nos mecanismos de microparasitismo ou antibiose (DJENANE et al., 2017).

Outros fatores que influenciam na atividade larvicida são os complexos de sistemas quitinolíticos como, por exemplo, a degradação enzimática completa da quitina insolúvel em *N-acetilglucosaminas* (CHERNIN et al., 1998; SOMEYA et al., 2001). Existem muitos componentes proteicos associados aos sistemas quitinolíticos que podem melhorar ou regular o mecanismo de ação das quitinases (DESPHANDE, 1986; SUSUKI et al., 2002). Além

disso, outros fatores também influenciam na atividade das enzimas quitinases. Neste caso, Juárez-Hernández et al., (2017) relataram que determinados casos de deleção dos domínios ligantes em quitina de quitinases sobre a atividade e estabilidade dessas enzimas nem sempre é muito previsível, podendo exercer efeito sobre a atividade hidrolítica. Já outros autores relatam que podem reduzir a atividade hidrolítica (SHA et al., 2016).

Considerando estes resultados sugerem que investigue o domínio biológico ligante em quitina de uma quitinase sobre o desenvolvimento de insetos ou sobre o sinergismo a fim de confirmar a verdadeira função da enzima no controle de *Ae. aegypti*.

CONCLUSÃO

Caracterização fenotípica e molecular

- ✓ Das 124 linhagens estudadas foram caracterizadas 114 bacilos Gram positivos e 10 bacilos Gram negativos, das quais apenas 33 linhagens foram identificadas em nível de espécie e gênero; dividido em quatro gêneros;

Atividade larvicida

- ✓ O potencial larvicida das 124 linhagens demonstrou que apenas 21 linhagens apresentam atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti*.
- ✓ Considerado os resultados dos extratos brutos intra e extracelulares dos bacilos, apenas três linhagens apresentaram mortalidade para o extrato com sobrenadante e sete linhagens apresentaram mortalidade no extrato bruto de células lisadas.
- ✓ As linhagens cultivadas com meio contendo quitina demonstraram o baixo nível de mortalidade, sendo que apenas a linhagem BTAM16 foi promissora.

Deteção gênica

- ✓ Quanto à detecção molecular, apenas seis linhagens amplificaram para o locus gênico *Chi* que codifica uma enzima quitinase;
- ✓ Não foi possível observar a correlação entre atividade larvicida com a presença do gene *Chi*.

Os resultados apresentados evidenciaram o potencial larvicida de *Bacillus* spp., para o controle das larvas de *Ae. aegypti*. Dessa forma, estas linhagens combinadas com a presença do gene *Chi* surgem como alternativa para o controle biológico desses vetores. Portanto são necessárias mais pesquisas para identificar, caracterizar e elucidar os mecanismos envolvidos na patogenicidade desses mosquitos. Além disso, descobrir novas moléculas bioinseticidas oriundas de bactérias da microbiota Amazônica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; SAEED, H. M.; GOHAR, Y. M.; EL-BAZ, M. A. **Process Biochem**, 40 (5), pp. 1707-1714, 2005.
- ABDULLAH, R. R.; SUKAR, N. A.; GHANIM, N. M. Improving the efficiency of *Bacillus thuringiensis* against insects of different feeding habits by plasmid transfer technique. **Life Sci J**. 11: 308–18.2014.
- ABINAYA, M.; VASEEHARAN, B; DIVYA, M; SHARMILIB, A; GOVINDARAJANC, M. A; SHINE, K. J; KHALEDD, G. B. Bacterial exopolysaccharide (EPS)-coated ZnO nanoparticles showed high anti biofilm activity and larvicidal toxicity against malaria and Zika virus vectors. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 45. 93-103.2018.
- AGGARWAL, C.; PAUL, S.; TRIPATHI, V.; PAUL, B.; KHAN, M. A. Chitinase producing *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera litura* (Fab) and studies on its chitinolytic activities. **Annals of Agricultural Research**, Cairo, v.36, n.2, p.132-137, 2015.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Vol. 4. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 1163pp, 1998.
- ARGÔLO-FILHO, R. C; LOGUERCIO, L. L. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human generated ecological niches. **Insects**. 5:62–91, 2014.
- ARMENGOL, G., ESCOBAR, M.C., MALDONADO, M.E., ORDUZ, S. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. **J. Appl. Microbiol**. 102, 77–88, 2006.
- AVRAMENKO, S. V. GALYNKIN. Características da biossíntese de enzimas quitinolíticas de *Streptomyces griseus* var. *estreptomicina* . **Bioquímica Aplicada e Microbiologia**. Vol. 46, edição 4 , pp 405–408, 2010.
- BARBOZA-CORONA, J. E.; NIETO-MAZZOCCO, E.; VELAZQUEZ-ROBLEDO, R.; SALCEDO-ARNANDEZ, R.; BAUTISTA, M.; JIMENEZ, B.; IBARRA, J. E. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *ChiA74* from *Bacillus thuringiensis*. **Appl Environ Microbiol**. V.69, p.1023–1029, 2003.
- BASSLER, B. L.; YU, C.; LEE, Y. C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. **The Journal Of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v. 268, n. 36, p.24276-24286, 1991.
- BERINI, F; CACCIA, S; FRANZETTI, E; CONGIU, T; MARINELLI, F; CASARTELLI, M; TETTAMANTIA, G. Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 980-989, 2016.
- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial Chitinases: Properties and Potential. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.21-28, 2007.

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, pp 89–99.2016.

BODE, H. B. **Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites**. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 224–230.2009.

BOERA, W. D; PAULIEN, J. A, KLEIN, G. P; LAFEBERA, J. D; JANSEB, B. E; SPITB, J. W. W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Grã-bretanha, v. 30, n. 2, p.193-203. 1998.

BOICHENKO, V. A; KLIMOV, V. V; MIYASHITA, H; MIYACHI, S. Functional characteristics of chlorophyll d-predominating photosynthetic ao oaratus in intact cells of *Acaryochloris marina*. **Photosynth. Res.** 65: 269-277, 2000.

BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; VELAYAUDHAN, R.; ROBERTOS, B.; HORSTICK, O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**. V. 18 no5 p.564–577, 2013.

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

CAI, Y; YAN, J; HU, X; HAN, B; YUAN, Z. Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* by expression of chitinase gene *chiAC* in *Bacillus sphaericus*. **Appl Environ Microbiol.**12: 141–9, 2007.

CAMPANINI, E. B., DAVOLOS, C. C., ALVES, E. C. C., LEMOS, M. V. F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. **Braz. J. Biol.** 72, 243–247, 2012.

CÁRDENAS R, SANDOVAL C, RODRÍGUEZ A, HERNÁNDEZ D, JAIMES E, MENDOZA J. Medio ambiente y protozoosis sistémicas. Características fisiográficas del entorno y su asociación en la leishmaniasis visceral. *Acad.* 2005; 3: 35-40, 2005.

CHAIHARN M, LUMYONG S, HASAN N, PLIKOMOL A. Solid state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shell sandrice straw as a substrate for chitinase production. **Ann Microbiol.** V.63, p. 443-450, 2013.

CHANDRASEKARAN, K. R.; REVATHI, A.; THANIGAIVEL, S. A. KIRUBAKARAN, S. SENTHIL-NATHAN. *Bacillus subtilis* chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of flight/time of flight mass spectrometry has insecticidal activity against *Spodoptera litura* Fab, *Pestic. Biochem Physiol.* 30 1 e 12, 2014.

CHANDRASEKARAN, R., REVATHI, K., NISHA, S., KIRUBAKARAN, S. A., SATHISH-NARAYANAN, S., SENTHIL- NATHAN, S. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.104, n.1, p.65-71, 2012.

CHAPIN, F. S.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L. Consequences of changing biodiversity. **Nature**; 405: 234-4, 2000.

CHEN, J; AIMANOVA, K; GILL, S. S. Functional characterization of *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 involved in the toxicity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and jegathesan. **Peptides**. 98:78-85, 2017.

CHERNIN, L. S.; WINSON, M. K; THOMPSON, J. M; HARAN, S; BYCROFT, B. W; CHET, I; WILLIAMS, P; STEWART, G.S. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, 180 (17), pp. 4435-4441,1998.

CHERNIN, L.; ISMAILOV, Z.; HARAN, S.; CHET, N. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. *Applied And Environmental Microbiology*, [s.l.], v. 61, n. 5, p.1720-1726, 1995.

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.

CODY, R. M. Distribution of Chitinase and Chitobiase in *Bacillus*. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 19, p.201-205,1989.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; DUTOIT, M.; TORRIANI, S. Designation of ATCC334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. **Int J Syst Bacteriol**. 41: 340–342. 1991.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. **The natural functions of secondary metabolites**, Adv. Biochem. Eng. Biotech. 69. 2000.

DESHPANDE, M. V. Enzymatic degradation of chitin & its biological applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, 45, pp. 273-281,1986.

DIAS, D. G. S.; SILVA, S. F.; MARTINS, E. S.; SOARES, C. M. S.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R.G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Brasília, DF**. 2002.

DJENANE, Z.; NATECHE, F.; AMZIANE, M., GOMIS-CEBOLLA, J., EL- AICHAR, F., KHORF, H., FERRÉ, J. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. **Toxins** 9, 139–158, 2017.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**. 161:345-360, 2006.

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** 9, 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). **Journal of Invertebrate Pathology**, 124: 90–97, 2015.

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

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Universidade de São Paulo, São Paulo Brasil. 880pp, 2002.

GAO, H.; KHERA, E.; LEE, J. K.; WEN, F. Immobilization of Multi-biocatalysts in Alginate Beads for Cofactor Regeneration and Improved Reusability. **Journal of Visualized Experiments**, n. 110, p. 1–9, 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.

GENISHEVA, Z.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, J. Production of white wine by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 163–173, 2012.

GENISHEVA, Z.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, J. M. Immobilized cell systems for batch and continuous wine making. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 33–47, 2014.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionichydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan -a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.

GOBATTO, V.; GIANI, S. G.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; SPECHT, A.; BARROS, N. M. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Braz. J. Biol.** 70, 1039–1046, 2010.

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.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 75–107, 1994.

GROVER, A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 57–73, 2012.

GUBLER, D. J. **Resurgent vector-borne disease as a global health problem.** Emerging infectious diseases, v.4, n.3, p.442-450, 1998.

GULERIA, S.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 and its alkaline protease in various matrices for effective hydrolysis of casein. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2016.

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.

GUO, X.; XU, P.; ZONG, M.; LOU, W. Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 38, n. 4, p. 665–672. 2017.

GUPTA, C. P.; BHAVESH KUMAR, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **Biocontrol**, [s.l.], v. 51, n. 6, p.821-835, 2006.

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

HALDER, S. K.; MAITY, C.; JANA, A.; PATI, B. R.; MONDAL, K.C. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. **Biocontrol**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.441-449, 2012.

HALDER, S. K.; MAITY, C.; JANA, A.; GHOSH, K. A.; PAUL, T.; KUMAR, P. M.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 170–177, 2014.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z; MUSARRAT, J; JAVED, S. Chitinases: An update. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 5, p. 21–29. 2013.

HAN, Y.; LIM, H. K.; LEE, J. M.; JANG, Y. G. Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA transcription coactivator complex. **EMBO J** 33 (21): 2534-46. 2014.

HAWK, C. T.; LEARY, S. L. **Formulary of laboratory animals**. American College of Laboratory Animal Medicine, Iowa State University Press / AMES, 101pp, 1995.

HOWARD, M. B.; EKBORG, N. A.; WEINER, R. M.; HUTCHESON, S. W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627–635, 2003.

IBARRA, J. E.; DEL RINCON, M. C.; ORDUZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R. A diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Appl Environ Microbiol.** 69: 5269–74, 2003.

IDRIS, A.; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial Ph and temperature on lactic acid production from pine apple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1117–1123, 2006.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, S.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65: p.154-160, 2013.

IQBAL, M.; SAEED, A. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 178–182, 2005.

ISLAM, R., DATTA, B. Diversity of chitinases and their industrial potential. **Int. J. Appl. Res.** 1, 55–60, 2015.

ITOH, T.; HIBI, T. A.; FUJII, Y. A.; SUGIMOTO, B. I.; FUJIWARA, A. A.; SUZUKI, F. A.; IWASAKI, A. Y.; KIM, A. J.; TAKETO, C. A.; KIMOTO, D. H. Cooperative degradation of chitin by extracellular and cell surface-expressed chitinases from *Paenibacillus sp.* strain FPU-7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7482–7490, 2013.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E.; CASADOS-VÁZQUEZ, L. E.; BIDESHI, D. K.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BARBOZA-CORONA, J. E. Role of the C-terminal and chitin insertion domains on enzymatic activity of endochitinase *ChiA74* of *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.102, p.52-59, 2017.

JUNG, W. J.; MABOOD, F.; SOULEIMANOV, A.; PARK, R. D.; SMITH, D. L. Chitinases produced by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus thuringiensis subsp. pakistani* degrade Nod factor from *Bradyrhizobium japonicum*. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 163, n. 3, p.345-349, 2008.

KAMIL, Z.; SALEH, M.; MOUSTAFA, S. Isolation and identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. **Global Journal of Molecular Sciences**, (s.l.), v.2, n.2, p.57-66, 2007.

KELKENBERG, M.; ODMAN-NARESH, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; MERZENDORFER, H. Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 56, p. 21-28, 2015.

KIDIBULE, P. E.; PALOMA, S. M.; JIMENEZ-ORTEGA, E.; RAMIREZ-ESCUADERO, M.; MIQUEL, M. C.; FRANCISCO, J. P.; SANZ-APARICIO, J.; FERNANDEZ-LOBATO, M. Use of chitin and chitosan to produce new chitooligosaccharides by chitinase *Chit42*: enzymatic activity and structural basis of protein specificity. **Microb Cell Fact** . 2018.

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

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.** 2017.

LOGAN, N. A.; POPOVIC, T.; HOFFMASTER, A. *Bacillus* and other aerobic endospore forming bacteria. In: Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Landry M L, Pfaller M A. Editors. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington D.C: ASM Press. pp. 455- 473, 2007.

LOMBARD, V.; GOLACONDA, R. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. **The Carbohydrate active enzymes database (CAZy) in 2013**. Nucleic Acids Res 42: D490–D495, 2014.

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

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (Eds.). **Microbiologia de Brock. 12ª Edição**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

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.

MINISTERIO DA SAÚDE (2017). **Febre Zika**. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf. Acessado em 12/03/18

MUBARIK, N. R.; MAHAGIANI, I.; ANINDYAPUTRI, A.; SANTOSO, S.; RUSMANA, I. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and its application as biocontrol for White fly (*Bemisia tabaci* Genn.). **Am J Agr Biol Sci** 5:430-5, 2010.

NILSSON, W.; STROM, M. S. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragments length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43:175-185, 2002.

NURDEBYANDARU, N.; MUBARIK, N. R.; PRAWASTI, T. S. Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Application as Biocontrol for *Aphis gossypii*. **Microbiology Indonesia**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.103-107, 2010.

OKAY, S.; ÖZDAL, M.; KURBANOĞLU, E. B. Characterization, antifungal activity, and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 6, p. 639–644, 2013.

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, D. F.; SANTOS, I. N.; CORRÊA, C. V. P.; LIBERAL, T. C. DE F., BRANCO, F. L. C.; COLARES, C. N. J.; ESCHER, S. K. S.; ISHIDA, J. K.; MUIT, S.; ARAUJO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Prospecção de enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactéria isolado de solo na Amazônia. **Scientia Plena** 13, 031001, 2017.

OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; AZEVEDO, E. B.; GARCIA, B. O.; SANTOS, S. F.; AGUIAR, R. W. S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linneus (Díptera: Culicidae). **J. Biotec. Biodivers.** 2, 37–43, 2011.

- 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.
- PATEL, A. K.; AHIRE, J. J.; PAWAR, S. P.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus spp.* isolated from food wastes. **Food Res Int** 42 (4):505–510. 2009.
- PATIL, C. D.; PATIL.; B. K. SALUNKE, R. B. Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. **Parasitol. Res.** 110: 1841–1847, 2012.
- PEREIRA, E.; TELES, B.; MARTINS, E.; PRACA, L.; SANTOS, A.; RAMOS, F.; BERRY, C.; MONNERAT, R. **Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis berliner* strains to larvae of Simuliidae (Insecta: Diptera)**. Bt Res. 4, 8–13, 2013.
- PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 71: 255-281, 2007.
- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera. Coleoptera e Diptera**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, pp. 11–16.2004.
- PRASANNA, L.; EIJSINK, V. G.; MEADOW, R.; GASEIDNES, S. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.97, p.1601-1611, 2013.
- QUIMBAYO, M.; RÚA-URIBE, G.; PARRA-HENAO, G.; TORRES, C. Evaluation of lethal ovitraps as a strategy for *Aedes aegypti* control. **Biomedica** 34, 473–482, 2014.
- RAMÍREZ-LEPE, M.; RAMÍREZ-SUERO, M. **Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis***. Insecticides – Pest Engineering. Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, 2012.
- RANI, R. P.; ANANDHARAJ, M.; SABHAPATHY, P.; RAVINDRAN, A. D. Physiochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. **Int J Biol Macromol** 96:1–10, 2017.
- REBIÈRE, C. Identificação molecular e fenotípica de bactérias de solo rizosférico com tolerância ao fungicida Mancozeb, em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Ver Pan-Amaz Saude**; 6(2): 37-43, 2015.
- REVATHI, K.; CHANDRASEKARAN, R.; THANIGAIVEL, A.; KIRUBAKARAN, S. A.; SATHISH-NARAYANAN, S. SENTHIL-NATHAN. Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. **Pestic. Biochem. Physiol.** 107, 369e376, 2013,

REYES, M. L.; CALDERÓN, G. E.; GUTIÉRREZ, N. A.; GONZÁLEZ, C. R.; AZAOLA, E. A.; BARRANCO, F. E. Caracterización y expresión del gen quitinasa chit II de *Lecanicillium lecanii* en cultivo sólido. **Rev Mex Ing Quím** 11: 97-104, 2012.

ROSA DA SILVA, J. L.; SCHWALM, F. U.; SILVA, E. C.; MARISA DA COSTA, RALF HEERMANN; O. S. Larvicidal and Growth-Inhibitory Activity of Entomopathogenic Bacteria Culture Fluids Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, 110(2), 2017.

SAHAIKH, S. A.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 468-475, 1993.

SCHMIDT, T. R.; SCOTT, 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**, 12(430): 1-16, 2011.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. **Bacteriocins: mechanism of action and use in food preservation**. Alim. Nutr., Araraquara, v.14,n.2,p.229-235, 2003.

SENOL, M. H. N.; DIKBAS, N.; KOTAN, R. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2014.

SHA, L.; SHAO, E.; GUAN, X.; HUANG, Z. Purification and partial characterization of intact and truncated chitinase from *Bacillus thuringiensis* HZP7 expressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.38, p.279-284, 2016.

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.

SOARES-DA-SILVAA, J.; QUEIRÓS, S. G.; AGUIAR, J. S.; VIANA, J. L.; MARIA DOS R.A.V.; SILVA, M. N.; PINHEIRO, V. C.S.; POLANCZYK, R. A.; CARVALHO-ZILSEE, G. A.; TADEI, W. P. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* *Berliner* isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Revista Brasileira de Entomologia**. 59: 1-6, 2017.

SOMEYA, N.; NAKAJIMA, M.; HIRAYAE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. **Journal of General Plant Pathology**, 67 (4), pp. 312-317, 2001.

SOWMYA, B.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; RAVIKUMAR, G.; ARULRAJ, C.; CHANDRASEKAR, U. Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces* sp. from Soil. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 3, p. 25-29, 2012.

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

SURYANTO, D.; IRAWATI, N.; MUNIR, E. Isolation and Characterization of Chitinolytic Bacteria and Their Potential to Inhibit Plant Pathogenic Fungi. **Microbiol Indones**, v. 5, n. 3, p. 144-148, 2011.

SUZUKI, K.; SUGAWARA, N.; SUZUKI, M.; UCHIYAMA, T.; KATOONO, F.; NIKAIIDOU, N.; WATANABE, T. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. **Bioscience. Biotechnology and Biochemistry**, 66 (5), pp. 1075-1083, 2002.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brasilian Amazon. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 59: 325-35,1998.

TADEI, W. P; RODRIGUES, I. B; RAFAEL, M. S; SAMPAIO, R. T. M.; MESQUITA, H. G; PINHEIRO, V. C. S.; ZEQUI, J. A. C.; ROQUE, R. A.; DOS SANTOS, J. M. M.. Adaptative processes control measures, genetic background, and resilience of malária vectors and environmental changes in the Amazon region. **Hydrobiologia (The Hague. Print)**, v. 1, p. 1-18, 2017.

USHARANI, T. R.; GOWDA, T. K. S. Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. **Indian Journal of Biotechnology**. V. 10, p. 264-269, 2011.

VELIZ, E. A.; MARTÍNEZ, H. P.; HIRSCH, A. M. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. **AIMS Microbiology**, Spring field, v.3, p.689-705, 2017.

VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. The Firmicutes**.1450 pp, 2009.

WANG, K.; YAN, P. S.; CAO, L. X. Chitinase from a novel strain of *Serratia marcescens*JPP1for biocontrol of aflatoxin: Molecular characterization and production optimization using response surface methodology. **BioMed Research International**, v, 2014.

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

WHO– World Health Organization, 2017. Draft Global Vector Control Response 2017–2030.

WILKERSON, R. C.; LINTON, Y. M.; FONSECA, D. M.; SCHULTZ, T. R.; PRICE, D. C.; STRICKMAN, D. A. Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe *Aedini* that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. **Plos one**. 0133602, 2015.

WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. 2018. Mosquito identification resources. (<http://www.wrbu.org/VeclD MQ.html>). Acesso em 26 de Julho de 2018.

YAN, L.; JING, T.; YUJUN, Y.; BIN, L. I.; HUI, L. I.; CHUN, L. I. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an Antifungal Chitinase. *Biotechnology And Bio engineering: Chinese Journal of Chemical Engineering*, [s.l.], v. 19, n. 1, p.128-134, 2011.

YOON, J. H.; KIM, I. G.; KANG, K. H.; KWANG, T.; YONG, P. H. *Bacillus marisflavis* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1297-1303, 2003.

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

ZHANG, Q.; HUA, G.; ADANG, M. J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 24: 714-729, 2016.