



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

MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS NÃO CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS A ANOFELINOS E SEU HABITAT**

MANAUS - 2015

MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS NÃO CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS A ANOFELINOS E SEU HABITAT**

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

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (UFAM)

Co-Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA)

MANAUS - 2015

“Saudade é o amor que fica”

*Ao meu avô **Socorro Elesbão de Oliveira**
e minha tia **Rosilda Brito de Oliveira** (in memorian).*

Dedico

*Aos meus pais **Raiél Brito de Oliveira**
e **Rosa Maria Rodrigues de Oliveira**, pelo
amor incondicional, pelos exemplos de
dignidade e integridade, que tão dedicados
sempre cuidaram com especial carinho sem
medir esforços para a formação dos filhos.*

*“ É na educação dos filhos que se reconhecem as
virtudes dos pais” (Coelho Neto). Eu os
respeito e os amo muito!!!*

Ofereço

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

“Tenho descoberto cada vez mais que não existe melhor remédio para a ansiedade do que a oração. Enquanto oramos e falamos para Deus o que aflige nossos pensamentos e sentimentos, parece que tiramos a carga pesada da preocupação de nossos ombros e colocamos nas mãos poderosas do Pai celestial.”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu alicerce e socorro nos momentos mais difíceis, por me conceder a vida e por suas infinitas bênçãos.

A toda Minha Família que eu tanto amo, em especial aos meus pais Raiel Brito e Rosa Maria cujo amor e incentivo esgotam minhas palavras de gratidão, meus queridos irmãos Reigison, Rayhele, Raniele e Raniel de Oliveira, minha cunhada Cristiane Saldanha e o Raumiro Brito. Meus Avôs em especial minha avó Maria Brito por seu exemplo de força e me inspirar a buscar meus sonhos e ideais, aos meus maiores e melhores presentes de Deus, meus “filhinhos” Emanuel Ryan e Davi Lucas, aos demais membros desta Grande e amada Família (passamos por duras perdas nesses dois anos, mas o amor, a união e a nossa Fé nos fizeram permanecer firmes).

A *Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza*, meus agradecimentos pela orientação, pela oportunidade de me permitir a participação de um grupo de pesquisa tão competente e contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao *Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei* pela co-orientação e constante apoio no percorrer desta caminhada.

Aos meus amigos de jornada, os quais se tornaram a minha segunda família em Manaus, Leissandra Castelo, Sarar Raquel, Jorge Luiz (Roreer), Elerson Matos, Ricardo Katak, André Higa, Júlia do Carmo (Julinha <3), Leila Castelo, Fabyanne Guimarães, Lendel Monteiro, Dolores Fonseca, Vanda Santos, Kátia Carvalho, Paulo Adrian, Daniel da Silva, Raphaella Vasconcelos, Edilene Araújo, Camila Cordeiro, Erlanilson Torres, pela amizade, apoio, paciência, cumplicidade, companheirismo e principalmente pelos momentos únicos quer sejam eles bons ou ruins que vivemos juntos ao longo desses anos.

A Auricelia Matos da Gama, a qual foi um anjo de Deus na minha vida que me ajudou nas horas precisei, com amor e a maior paciência do universo, a quem eu não tenho palavras pra expressar a minha gratidão.

A todos os amigos e companheiros dos laboratórios (Gemma, Malária e Dengue, Genômica e Proteômica, Microbiologia do Solo, Casa15, Genética de Microorganismos) que trabalhei, em especial, João Bosco, Elias Pacheco, Emerson Barcelar, Antonio Silva, Augustto Aleksey, João Zequi, Jorge Braga, Paulo Alexandre e Elissandro Banhos.

A todos que me receberam na UFMT, Dra. Zorayde de Lima por toda ajuda e a forma carinhosa que me recebeu em seu laboratório, Daniella Gauer pela amizade e companheirismo, e mais que em especial a Carolina Malheiros e a Dra. Daniela Campos por toda amizade, ajuda e pelas lágrimas compartilhadas, sou grata a Deus por ter colocado pessoas tão maravilhosas no meu caminho, não tenho palavras para agradecê-las pela forma em que fui abraçada em Cuiabá (Carol e Daniela vocês me fizeram acreditar um pouco mais na bondade humana).

A todos os professores que colaboraram com a minha formação, em especial ao Dr. Cleiton Fantin (Coordenador PPGMBT).

Aos colaboradores deste projeto Dr. Osvaldo Marinotti, Dr. Olle Terenius e a Louise Nilson.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

Aqui coloco meus agradecimentos a todos os envolvidos, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho e a todos que foram de extrema importância na minha vida acadêmica, deixando clara a inegável importância de cada um daqueles aqui citados e me desculpando previamente do fundo do meu coração com aqueles que por ventura, não foram citados, porém são merecedores da minha mais profunda gratidão.

“Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém. É reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente...”

A todos vocês, o meu simples, mas eterno agradecimento!

RESUMO

A malária é uma doença parasitária responsável por milhares de mortes anualmente em todo o mundo, é transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. Tem como principal vetor no Brasil o *Anopheles darlingi*, Root, 1926. Segundo a literatura estes vetores encontram-se associados a uma grande diversidade de micro-organismos, adquiridos principalmente durante a fase imatura por meio da alimentação larval, dentre os quais se destacam as bactérias, que podem interferir diretamente na capacidade vetorial do mosquito. A interação destas bactérias com as formas imaturas desses vetores em seus criadouros é um fator relevante para estabelecer importantes estratégias de controle da transmissão desta doença. Portanto, considerando que não há estudos sobre a biodiversidade microbiana associada a larvas do *A. darlingi* e seu habitat aquático, especialmente na Região Amazônica, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota bacteriana associada a esta espécie e os seus criadouros naturais e/ou artificiais, no estado do Amazonas-AM. Foram coletadas amostras de larvas e de água dos criadouros de *A. darlingi* no estado de Amazonas. A extração de DNA das amostras de larvas foi realizada pelo kit innuPREP Plant DNA[®], e as amostras de água foram submetidas a choques térmicos para a lise celular. Após a obtenção do DNA genômico, realizou-se a amplificação do gene 16S do rDNA com os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3'). Os produtos de amplificação obtidos foram sequenciados e a identificação taxonômica foi feita a partir da comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados de sequências de 16S rRNA RDP II pelo programa *Classifier*. O sequenciamento da região 16S rRNA das 37 amostras provenientes de larvas de 4^o estágio e de água de criadouros de *A. darlingi*, gerou 827.842 sequências que foram agrupadas em 6.714 OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) bacterianas. Para a realização das análises taxonômicas foram selecionadas as 20 OTUs mais representativas, que apresentaram mais de 10.000 sequências. Destas, foram identificados 11 gêneros, 11 famílias, 8 ordens, 7 classes pertencentes aos filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*. O filo *Proteobacteria* foi o mais predominante, estando presente em 80% das OTUs analisadas. Desta forma demonstrou-se que as larvas de *A. darlingi* e seu habitat aquático abrigam uma rica diversidade bacteriana.

Palavras-Chave: *Anopheles darlingi*, Biodiversidade, Bactérias.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease responsible for millions of deaths annually around the world. Its main vector in Brazil is *Anopheles darlingi*, Root, 1926. According literature, these vectors are found associated with a great diversity of microorganisms, most of them acquired during immature phase through larvae feeding. Bacteria whose can interfere directly on vetorial capacity of the mosquito highlights these microorganism, and its interaction with immature forms from these vectors in their breeding sites is a relevant factor for stablishing important strategies on transmission control of this disease. Therefore, considering there are no studies about microbial biodiversity associated to *A. darlingi* larvae and its aquatic habitat, especially on Amazon region, this work has as objective characterize bacterial microbiota associated to these species and its natural and/or artificial breeding sites, in the state of Amazonas-AM. It was collected larvae samples from the water of breeding sites of *A. darlingi* in the State of Amazonas. DNA extraction from larvae samples was performed through innuPREP Plant DNA[®] kit, and water samples were submitted to heat shock for cellular lysis. After Genomic DNA extraction, amplification of 16S gene from rDNA was performed, through 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3') primers. Amplified products were sequenced, and taxonomic identification was performed by comparison of obtained sequences versus database sequences of 16S rRNA RDP II through *Classifier* program. 16S rRNA region sequencing from 37 samples of 4^oestadio larvae and of water from breeding sites of *A. darlingi*, generated 827.842 sequences which were grouped into 6.714 bacterial OTUs (Operational Taxonomic Unities). To perform Taxonomical analysis the 20 most significant OTUs were selected, and showed more than 10.000 sequences. From these, it was identified 11 genera, 11 families, 8 orders, 7 classes belonging to *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia e Proteobacteria* phyla. *Proteobacteria* phylum was the most predominant, being present in 80% of analyzed OTUs. Thus, it is shown that *A. darlingi* and its aquatic habitat hosts a rich bacterial diversity.

Keywords: *Anopheles darlingi*, Biodiversity, Bacterias.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 01 - Locais de coleta das amostras ambientais e biológicas com suas características e coordenadas geográficas.....	47
Tabela 02 - Amostras dos amplicons obtidos de larvas de <i>A. darlingi</i> e de seus habitats.....	51
Tabela 03 - Número de sequências obtidas por amostra.....	53
Tabela 04 - 20 OTUs com mais de 10.000 sequências.....	54
Tabela 05 - Distribuição das sequências obtidas das 20 OTUs mais frequentes nas amostras das 4 bibliotecas analisadas.....	72
Tabela 06 - Classificação taxonômica das 20 OTUs analisadas.....	75
Tabela 07 - Distribuição das 20 OTUs por todas as amostras analisadas.....	76

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 01 - Distribuição global da transmissão da malária, em 2013.....	18
Figura 02 - Áreas de transmissão da Malária no Brasil, distribuição de acordo com o IPA de 2000 á 2012.....	21
Figura 03 - Distribuição do IPA segundo município, Amazonas, 2010.....	21
Figura 04 - Ciclo de vida do <i>Anopheles</i>	23

CAPÍTULO I

Figura 01 - Esquema de coleta das amostras.....	48
Figura 02 - Distribuição das OTUs em todas as amostras.....	56
Figura 03 - Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_1.....	57
Figura 04 - Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_2.....	57
Figura 05 - Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_3.....	58
Figura 06 - Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_4.....	58
Figura 07 - Classificação taxonômica do Filo nas OTUs.....	59
Figura 08 - Classificação taxonômica da Classe nas OTUs.....	60
Figura 09 - Classificação taxonômica da Ordem nas OTUs.....	60
Figura 10 - Classificação taxonômica da Família nas OTUs.....	61
Figura 11 - Classificação taxonômica do Gênero nas OTUs.....	62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. DIVERSIDADE MICROBIANA.....	13
2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS	14
2.3. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E SEU POTENCIAL METABÓLICO ASSOCIADO A INSETOS.....	15
2.4. ABORDAGEM METAGENÔMICA.....	16
2.5. MALÁRIA.....	17
2.6. CICLO DE VIDA DOS ANOFELINOS	22
2.6.1. Ovo	23
2.6.2. Larva	23
2.6.3. Pupa.....	24
2.6.4. Adulto.....	25
2.7. CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO DE VETORES	25
2.7.1. Bactérias no Controle Biológico de Mosquitos.....	27
2.7.2. Paratransgenesis	29
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO I	44
INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. LOCAIS DE COLETA	47
2.2. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E AMBIENTAL	48
2.3. FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA	48
2.4. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE ÁGUA	49
2.5. TRIAGEM DAS LARVAS DO <i>Anopheles darlingi</i>	49

2.6. EXTRAÇÃO DE DNA	50
2.6.1. Extração pelo kit innuPREP Plant DNA®.	50
2.6.2. Lise Celular por Choque Térmico	50
2.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S DO rDNA	50
2.8 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE DADOS.....	50
3. RESULTADOS	53
3.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS 16S rRNA.....	53
3.2 DISTRIBUIÇÃO DAS OTUs NAS AMOSTRAS ANALISADAS	55
3.3 PERFIL TAXONÔMICO DAS OTU'S	59
4. DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	72

INTRODUÇÃO

O conhecimento da biodiversidade microbiana mundial foi ampliado e modificado com o advento da era molecular. Os avanços nesta área proporcionaram conhecimento de moléculas que servem como marcadores taxonômicos (regiões de DNA e proteínas) extraídos do próprio meio ambiente e permitem o conhecimento, embora que prévio, sobre os micro-organismos cultiváveis e principalmente os não cultiváveis.

Estas novas metodologias moleculares também permitem o conhecimento de novos nichos com poucos ou sem nenhum conhecimento de sua microbiota associada, como os insetos, em especial os mosquitos. Os mosquitos podem ser portadores de um grande número de micro-organismos simbiotes, dos quais se destacam as bactérias. Vale resaltar que os mosquitos são importantes vetores de diversas doenças de importância médica, tais como dengue, febre amarela e malária.

A malária é uma doença responsável por milhares de mortes anualmente no mundo. O agente etiológico são protozoários do gênero *Plasmodium* transmitidos pelos mosquitos do gênero *Anopheles*. Apesar dos constantes esforços pelos diversos programas internacionais para o controle desta doença, ela permanece com o foco voltado aos mosquitos vetores que, a cada década, apresentam modificações dos padrões comportamentais, bem como na susceptibilidade aos inseticidas convencionais do programa de controle do Ministério da Saúde.

Pesquisas sobre controle biológico, utilizando micro-organismos, são as principais alternativas para o controle desses vetores. Considerando que a malária atinge milhares de pessoas em todo o mundo, estes programas de controle biológico são fundamentais para a redução da incidência desta doença. No entanto, pouco se conhece a respeito das comunidades microbianas que convivem em harmonia com as larvas de anofelinos, em criadouros naturais e artificiais.

A interação destas bactérias com as formas imaturas destes mosquitos vetores, em seus criadouros, é um fator relevante para estabelecer as estratégias de controle da transmissão de doenças. Desta forma, é fundamental conhecer a microbiota associada ao vetor da malária e os parâmetros desta associação, que podem revelar um cenário de distribuição de bactérias no seu habitat aquático.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. DIVERSIDADE MICROBIANA

Os micro-organismos evoluíram a, aproximadamente, quatro bilhões de anos e, até dois bilhões de anos atrás, eram a única forma de vida do planeta (WARD et al., 1998). Eles abrangem fungos, arqueas, bactérias, protozoários, algas, vírus e estão presentes em todos os nichos ecológicos da terra (XU, 2006). Apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (SCHIMEL, 1995; MYERS, 1996; LORENZ & SCHLEPER, 2002; XU, 2006).

A capacidade de se adaptar, crescer e se multiplicar, mesmo em ambientes extremos, são devido a sua grande diversidade metabólica e fisiológica que adquiriram ao longo da sua história evolutiva (WARD et al., 1998; HUNTER-CEVERA, 1998; STEELE & STREIT, 2005). Dessa forma, tornam-se uma importante fonte de recursos genéticos para o desenvolvimento sustentável e avanços biotecnológicos (BORNEMAN et al., 1996).

Em decorrência do grande avanço da biotecnologia, produtos derivados dessa grande riqueza foram abundantemente usados nas áreas médica, agrícola e nos mais diversos setores da indústria. Desta citamos a produção de antibióticos, agentes imunossupressores, antifúngicos, drogas anticarcinogênicas, enzimas, polímeros, inseticidas, promotores de crescimento, além de fornecer importantes dados para a implementação de diferentes estratégias no controle biológico de pragas e vetores de diversas doenças (GHAZANFAR et al., 2010; SCHAECHTER et al., 2010).

O Brasil apresenta uma das maiores megadiversidades do mundo e possui um imenso conjunto de espécies que compõem os vários ecossistemas, que ainda não foram devidamente inventariados (PEIXOTO, 2009). Segundo Morais et al. (2014), o país possui cerca de 20% da biodiversidade mundial e constitui uma importante fonte de matéria prima, nos mais diversos setores industriais.

A Amazônia é a região que concentra a maior biodiversidade do planeta, é considerada um inestimável patrimônio natural. Miguel, (2007) ressalta que essa riqueza natural é tomada em seu duplo significado atual, o primeiro, como um imenso conjunto de ecossistemas que pelas suas dimensões e a complexidade das interações ambientais, tem um importante papel na regulação do ambiente global. O segundo está relacionado à dinâmica do clima e sua

megabiodiversidade, considerada atualmente como o repositório genético neotropical mais importante do mundo.

No entanto, ainda pouco se conhece sobre toda essa diversidade biológica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas, inclusive sua microbiota e suas interações com outros seres. O conhecimento dessa biodiversidade e bioprospecção de novos microorganismos tornaram-se um dos principais focos da era biotecnológica. A sua diversidade biológica possui um valor inestimável, considerando os aspectos ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e estético (DIAS, 2000). Portanto, sua valorização é de extrema importância, não só pela preservação dos ecossistemas e suas espécies presentes, como também por ser uma fonte natural de produtos para exploração sustentada e consumo humano.

2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS

As bactérias são organismos relativamente simples, constituídos por uma única célula (unicelulares), desprovidos de envoltório nuclear (procariotos) e organelas membranosas, que podem ser encontradas nos mais diferentes ambientes, como ar, água, solo, entre outros, consistindo em mais de um milhão de espécies identificadas (ALCAMO, 1994; SORUM & SUNDE, 2001).

As células bacterianas podem apresentar-se em três tipos morfológicos fundamentais como: Cocos - são células geralmente arredondadas, mas podem ser ovóides ou achatadas em um dos lados, quando estão aderidas a outras células; Bacilos ou bastonetes - são células cilíndricas ou em bastão; Espirilos - células espiraladas ou helicoidais assemelhando-se a um saca-rolha (espiroquetas) ou em forma de vírgula (vibrião) (TORTORA et al., 2012).

A parede celular das bactérias é uma estrutura rígida que mantém a forma característica de cada célula bacteriana. Ela circunda a frágil membrana plasmática, protegendo-a e ao interior da célula das alterações adversas do ambiente externo, servindo como ponto de ancoragem para os flagelos (TORTORA et al., 2012).

A parede celular bacteriana é composta de uma macromolécula denominada peptideoglicana, presente isoladamente ou em combinação com outras substâncias. As espécies bacterianas podem ser divididas em dois grandes grupos principais, denominados gram-positivos e gram-negativos. Na maioria das bactérias gram-positivas, a parede celular consiste em muitas camadas de peptideoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida. Em contraste, as paredes celulares de gram-negativas contêm somente uma fina camada de peptideoglicana (BROCK, 1997; BROOKS et al, 1998).

As Bactérias ocorrem como um grande grupo cosmopolita de micro-organismos predominante em habitats diferenciados. Possuem uma grande variedade de vias metabólicas, compreendendo organismos heterotróficos e autotróficos quanto à fonte de carbono utilizada. Em relação à fonte de energia, podem ser fototróficos que utilizam energia da luz ou quimiotróficos, que usam compostos químicos que podem ser orgânicos organotróficos ou inorgânicos denominados litotróficos (BARBOSA & TORRES, 1998; CANHOS et al., 1999).

Estes micro-organismos são considerados como parte chave na maioria dos ecossistemas naturais, que por meio das suas atividades controlam ou influenciam os principais aspectos do funcionamento da biosfera, especialmente devido à sua versatilidade metabólica e à sua adaptabilidade fisiológica, o que proporciona capacidade de habitar qualquer ambiente do planeta (CARVALHO, 2008).

Estima-se que menos de 1% das espécies de bactérias são cultiváveis e cerca de 99% ainda não foram cultivadas, permanecendo desconhecidas. Essas bactérias não cultiváveis contêm uma grande e rica diversidade inexplorada (TORSVIK et al., 1990; WHITMAN et al., 1998; VENTER et al., 2004; GIOVANNONI & STINGL, 2005).

2.3. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E SEU POTENCIAL METABÓLICO ASSOCIADO A INSETOS.

Bactérias endossimbiontes são conhecidas por desempenhar um importante papel em muitas funções-chaves nos insetos, tais como nutrição, reprodução, desenvolvimento ou proteção (DOUGLAS, 2011). As comunidades bacterianas dentro de mosquitos variam dependendo da espécie de mosquito, sexo, fase de desenvolvimento e do seu habitat (MINARD et al., 2013).

A enorme diversidade de bactérias associadas a insetos e a complexidade das interações potenciais entre micro-organismos simbiotes e seus hospedeiros, representam um desafio significativo para a compreensão dos fenótipos estendido aos mosquitos. Portanto, ambas as técnicas independente e dependente de cultura têm sido usadas para explorar a microbiota presente em mosquitos (MINARD et al., 2013).

A simbiose é uma relação interespecífica, harmônica e estável, em geral de longa duração, frequentemente encontrada nas comunidades terrestres e aquáticas. Exercendo um papel fundamental no surgimento das principais formas de vida na Terra e na geração da diversidade biológica (MORAN, 2006).

Segundo Conti et al., (2012), os produtos naturais podem ser resultados das interações de organismos entre si e destes com o ambiente, que desempenhem funções precisas e

definidas nessas associações simbióticas, representando uma das vantagens adaptativas e evolutivas para os organismos produtores.

Produtos naturais obtidos a partir de simbiose também têm sido explorados recentemente através de técnicas de metagenômica. Genes putativos para a produção de antitumorais foram isolados a partir de besouros terrestres (*Paederus spp.*) e esponja marinha (*Theonella swinhoei*) (PIEL et al., 2005). Estes genes não se originam a partir dos hospedeiros animais, mas sim de seus micróbios simbióticos.

Conti et al. (2012), salientam que os insetos são um dos filos de animais mais abundantes e complexos, abrigando um surpreendente número de micro-organismos simbiontes. A diversidade bacteriana nas espécies do gênero *Anopheles* é pensada para ser particularmente baixa na fase adulta por causa da renovação do intestino durante a metamorfose de pupas para adultos (ANTONIO-NKONDJIO et al., 2009). No entanto, várias espécies bacterianas têm sido identificadas no intestino de mosquitos adultos utilizando diferentes técnicas mediadas por cultura convencional (LINDH et al., 2005; ITURBE-ORMAETXE et al., 2011). Estas bactérias foram adquiridas a partir do ambiente aquático durante o desenvolvimento do estágio larval (GUSMÃO et al., 2010; CHAVSHIN et al., 2012).

Uma rica taxa bacteriana encontrada em mosquitos capturados em campo, mostra o grau em que as bactérias são adquiridas a partir do habitat e os fatores ambientais devem ser considerados como fatores importantes que afetam a carga e composição de bactérias em mosquitos (MINARD et al., 2013). A prova de que os mosquitos são colonizados por bactérias e transmitidos entre indivíduos ou estágios de desenvolvimento, foi revelada, mas a contribuição relativa destas rotas de transmissão para a diversidade da microbiota permanece em grande parte desconhecido (GENDRIN & CHRISTOPHIDES, 2013).

Diferentes métodos moleculares independentes de cultivo têm estimado indiretamente que o número de espécies bacterianas pode passar da casa de milhões ou até bilhões (AMANN et al., 1995; HEAD et al., 1998). A evolução dessas técnicas tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a vasta diversidade microbiana e suas interações com outros organismos. Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre toda essa biodiversidade são extensos (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998).

2.4. ABORDAGEM METAGENÔMICA

A metagenômica é uma técnica nova e rápida que permite o acesso ao potencial genômico de amostras ambientais; é uma área que se encontra em acelerado desenvolvimento e está gerando um grande número de informações biológicas (WARD, 2006).

Conceitualmente, metagenômica refere-se a uma abordagem independente de cultivo baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é baseado na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN et al., 1998). É considerada uma ferramenta poderosa para explorar a ecologia e perfil metabólico do ambiente complexo das comunidades microbianas, bem como identificar novas biomoléculas pelo uso de bibliotecas construídas oriundas de ácidos nucleicos isolados (HANDELSMAN, 2004; STEELE et al., 2009; SIMON & DANIEL, 2010).

Através desta nova técnica foram construídas várias bibliotecas metagenômicas a partir dos mais distintos tipos de amostras, como solo (RONDON et al., 2000), água (ELEND et al., 2006), biofilmes (SCHMEISSER et al., 2003), rúmem bovino (FERRER et al., 2005), intestino de cupim (WARNECKE et al., 2007), entre outros, tendo como principal objetivo o isolamento de novas enzimas.

2.5. MALÁRIA

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) não são apenas um incômodo, são clinicamente o mais importante grupo de insetos, devido à ampla gama de doenças que transmitem e a magnitude de problemas de saúde que essas doenças causam em todo o mundo. Tem um importante papel como vetores na transmissão da malária, febre amarela, chikungunya, filariose, dengue, entre outras (SHAALAN & CANYON, 2009; ARAÚJO et al., 2012).

A malária se destaca por existir desde a antiguidade e apesar dos constantes esforços para o seu controle, ela permanece como um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo. Segundo a WHO (2014), cerca de 3,2 bilhões de pessoas, em mais de 97 países, encontram-se expostas aos riscos da infecção (**Figura 1**). Afetando principalmente populações pobres em regiões tropicais e subtropicais, sendo predominantemente na região oriental do Mediterrâneo, África e Sudeste Asiático (TADEI, 2001; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; WHO, 2013; 2014).

De acordo com as últimas estimativas, ocorreram cerca de 198 milhões de casos de malária no mundo no ano de 2013 e registraram-se 584 mil óbitos, sendo que, no continente Africano, 90% das mortes ocorrem em crianças com a idade inferior a 5 anos, o que representam 78% de todas as mortes ocorridas (WHO, 2014).

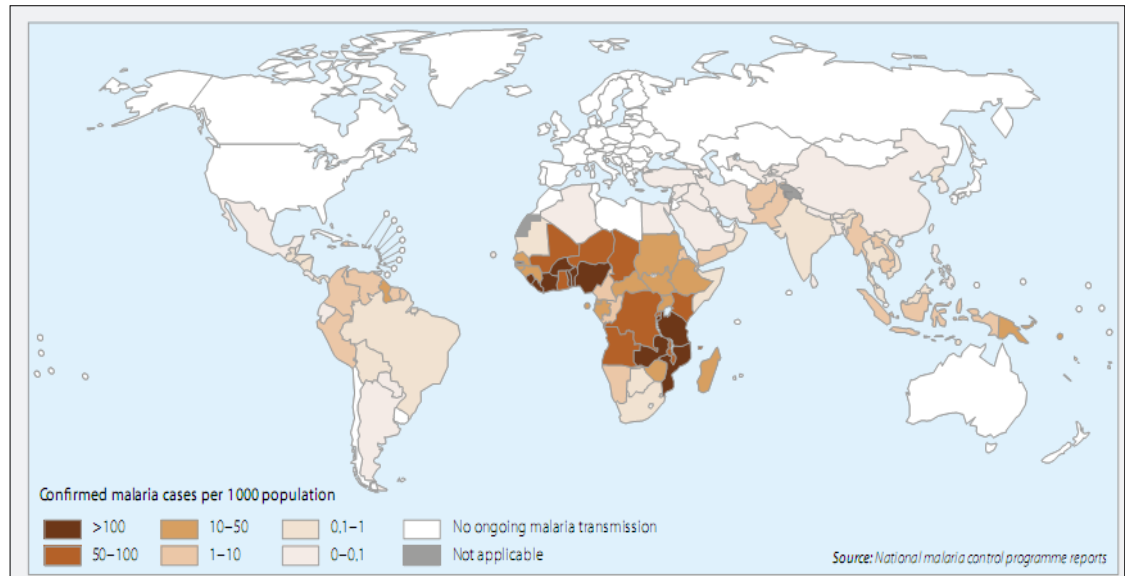


Figura 01. Distribuição global da transmissão da malária, em 2013.

Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014).

A malária é uma doença parasitária, de regiões tropicais, que mais causa problemas socioeconômicos, sobretudo nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (PARISE, 2009). Em virtude dos dias em que deixam de trabalhar, os doentes reduzem os esforços para desenvolver seus recursos econômicos, capacidade produtiva e melhorarem suas condições de vida (BRASIL, 2005), contribuindo desta forma para elevada perda econômica.

São muitas as tentativas de se estabelecer a real origem da malária no mundo. Porém, admite-se que a malária tenha se originado na África Tropical onde o parasita se adaptou bem aos hospedeiros (BRASIL, 2005), ficando a infecção autolimitada a pequenos focos durante os períodos mesolítico e paleolítico. No período neolítico, com o assentamento de grupos humanos e sua migração, a infecção espalhou-se pelos grandes centros de civilizações ribeirinhas como Mesopotâmia, Índia, China, e Vale do Nilo, até as margens do Mediterrâneo, dispersando-se para o mundo tropical inclusive países de clima temperado (SOUZA et al., 1997).

Hipócrates foi o primeiro a citar a malária no século IV a.C., caracterizando-a como uma moléstia grave, descrevendo as formas diárias, terçãs, quartãs, além de pentãs e até nonãs, associando-as às emanções e miasmas dos pântanos; ressaltou ainda as vísceras com coloração escuras, que 22 séculos depois levaria Laveran a investigar o pigmento, e descobrir os plasmódios e então receber o prêmio Nobel em 1907 (DEANE, 1992). Posteriormente, em 1884, foi confirmada a descoberta feita por Gerhardt, de que a malária era um

hemoparasitose; ele conseguiu reproduzir a doença a partir de transfusão de sangue infectado (BRAGA & FONTES, 2005). Em 1897, o médico britânico Ronald Ross, trabalhando na Índia, tornou possível a elucidação do modo de transmissão, ao encontrar formas do parasita da malária no interior de um mosquito que havia se alimentado em um portador da doença. Esse marco na história da protozoologia esclareceu definitivamente o agente causador da doença (FERRARI et al., 1994; SOUZA et al., 1997).

A malária humana é a doença parasitária que tem como agente etiológico, protozoários do gênero *Plasmodium*, no qual são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária, em diferentes hospedeiros vertebrados. Entretanto, apenas cinco são atualmente descritas como capazes de infectar o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* – este ocorre apenas em regiões restritas ao oeste do continente africano (TUTEJA, 2007) e o *P. knowlesi*, um parasita simiano, descrito como a quinta espécie capaz de infectar naturalmente o homem (COX-SINGH & SINGH, 2008; WHITE, 2008).

No mundo, as duas espécies de maior prevalência são *P. falciparum* e *P. vivax*. A primeira espécie é prevalente na África, onde a infecção por *P. falciparum* é responsável pelos casos graves da doença, especialmente em crianças menores de 5 anos, e pelas estatísticas alarmantes, como a morte de uma criança a cada 30 segundos (WHO, 2010). Enquanto no Brasil, o *P. vivax* é responsável por cerca de 85% dos casos registrados de malária, o *P. falciparum* é responsável por aproximadamente de 15% e o *P. malariae* é responsável por uma diminuta percentagem dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Os plasmódios possuem ciclo biológico complexo, existindo duas formas de reprodução que definem dois ciclos distintos em sua evolução, a sexuada ou ciclo esporogônico (que ocorre no vetor) e a reprodução assexuada ou ciclo esquizogônico (que acontece no homem). O ciclo esquizogônico acontece em duas fases, no fígado (esquizogonia tecidual) e nas hemácias (esquizogonia sanguínea) (REY, 2001; TRAMPUZ et al., 2003).

A transmissão da malária dá-se pela picada da fêmea do inseto do gênero *Anopheles*, que agrupa cerca de 400 espécies, das quais 60 são descritas como transmissoras naturais da malária (TUTEJA, 2007). As fêmeas são consideradas eficientes na transmissão da malária, são antropofílicas, ou seja, alimentam-se de sangue humano, endofílicas e endofágicas, assim consideradas pelos seus hábitos domiciliares (KNELL, 1991).

O *Anopheles darlingi*, um dos principais vetores da malária, foi descrito pela primeira vez em 1926 por Root e posteriormente, nomeada pelo Dr. Samuel Taylor Darling, um dos maiores especialistas em doenças tropicais no início do século XX (HIWAT & BRETAS,

2011). Esta espécie tem ampla distribuição geográfica na América do Sul e Central, que se estende do sul do México ao norte da Argentina e do leste da cadeia dos Andes para a costa do Oceano Atlântico (KOMP, 1941; FORATTINI, 1987; MARINOTTI et al., 2013). O *A. darlingi* atua como vetor da malária em quase todos os países da América do Sul, sendo o principal vetor na Amazônia (HIWAT & BRETAS, 2011; ARAÚJO et al., 2012).

Intrusão humana em ecossistemas naturais e as mudanças ambientais modificam nichos estabelecidos e criam condições para novas configurações ecológicas, essas mudanças oferecem oportunidades para o estabelecimento de populações de vetores do mosquito e transmissão das respectivas doenças transmitidas por vetores, entre elas a malária (GUIMARÃES et al., 2004). Vittor et al., (2003), descobriram que a taxa de picada do *A. darlingi* está positivamente relacionada com a quantidade de terras desmatadas e, ainda descobriu que *A. darlingi* encontrados nessas áreas de desmatamento possuíam a taxa de picada 278 vezes maior do que a determinada para as áreas predominantemente florestais.

A Região Amazônica apresenta características socioeconômicas e ambientais extremamente favoráveis à transmissão da malária, as povoações humanas desordenadas (invasões) com consequentes condições precárias de vida, assim como a falta de saneamento básico, a exploração de recursos naturais, colocam o homem em contato direto com a mata. Esse intenso contato homem-vetor provoca a disseminação da malária (RODRIGUES et al., 2008). Além das condições climáticas, principalmente no verão, proporcionam o desenvolvimento dos parasitas nos vetores, tendo como um dos principais facilitadores as águas das chuvas, dos rios, igarapés entre outras, favorecendo dessa forma a instalação de focos epidêmicos na região. A associação desses fatores determina diferentes patamares de transmissão que originam níveis diferenciados na prevalência da endemia (MACHADO et al., 2003).

O Brasil é o país que concentra o maior número de casos de malária no continente americano, estimando-se a ocorrência de mais de 300.000 casos anuais (OLIVEIRA et al., 2010). Sendo sua distribuição heterogênea, uma vez que 99,7% dos casos registrados estão concentrados na Amazônia Legal (**Figura 02**), que engloba nove estados: Amazonas, Amapá, Acre, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão (BRASIL, 2005).

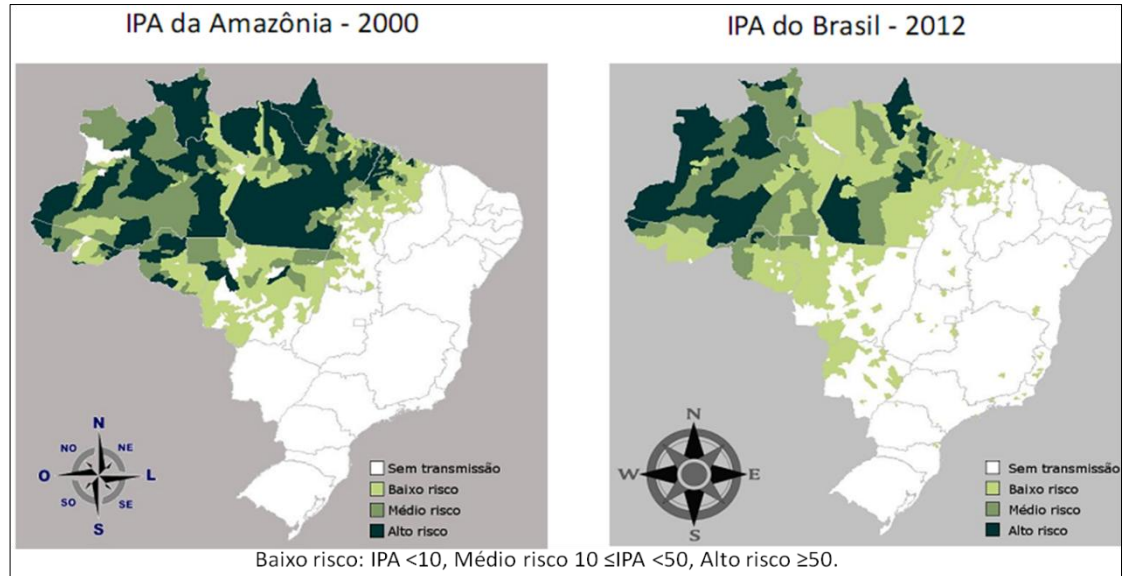


Figura 02: Áreas de transmissão da Malária no Brasil, distribuição de acordo com o IPA de 2000 á 2012.

Fonte: SISMAL, SIVEP-Malária e SINAN.

O Amazonas é o estado que concentra a maior parcela dos casos de malária do Brasil, sendo considerada uma área altamente endêmica (SUÀREZ-MURTIS et al., 2007). Foram registrados elevados números de casos de malária nos anos 2006 (146.568), 2007 (165.167), 2008 (134.049) e nos primeiros meses de 2009 foram registrados 40.551 novos casos (SIVEP, 2009), e identificou-se que 15 municípios do estado foram os que mais contribuíram (com 80% dos casos de malária na Amazônia Legal). Entre eles estavam os municípios de Coari, Barcelos e Manaus, sendo consideradas áreas altamente endêmicas (**Figura 03**).

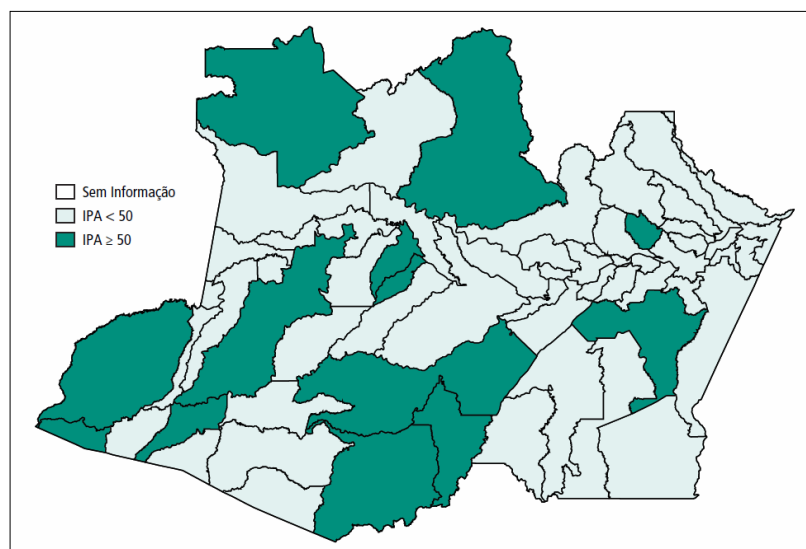


Figura 03: Distribuição do IPA segundo município, Amazonas, 2010.

Fonte: SVNS, (2011).

A distribuição espacial e temporal dos mosquitos *Anopheles* é dependente da disponibilidade de habitats aquáticos adequados onde os estágios imaturos podem se desenvolver, rios constituem um importante habitat para diversas espécies de larvas de *Anopheles* de importância médica (ANTONIO-NKONDJIO et al., 2009). As margens da floresta são os principais locais de reprodução do *A. darlingi* na Amazônia (SINGER & CASTRO, 2001).

Gil et al. (2007), em estudo, fizeram distinção entre a malária de áreas ribeirinhas e malária de terra seca, explicando que as diferenças na natureza e o tempo de estabelecimento de criadouros favoráveis para *A. darlingi*, podem resultar em diferentes modelos ecológicos para a transmissão da malária. Para controlar os mosquitos, sejam adultos ou larvas, é crucial compreender a ecologia relevante das espécies alvo (GRIFFIN et al., 2010). O conhecimento das características ecológicas dos habitats de reprodução e os fatores ambientais que afetam a abundância de mosquitos podem ajudar na concepção de melhores estratégias de controle do vetor (DEANE et al., 1948; MOUTINHO et al., 2011).

2.6. CICLO DE VIDA DOS ANOFELINOS

Os anofelinos são insetos holometábolos, isto é, tem metamorfose completa passando por quatro estágios no seu ciclo evolutivo. Apresentando duas fases no seu ciclo de vida: aquática, que inclui três estágios de desenvolvimento: ovo, larva (quatro estágios larvais) e pupa e terrestre, que corresponde ao mosquito adulto (**Figura 04**) (FORATTINI, 2002).

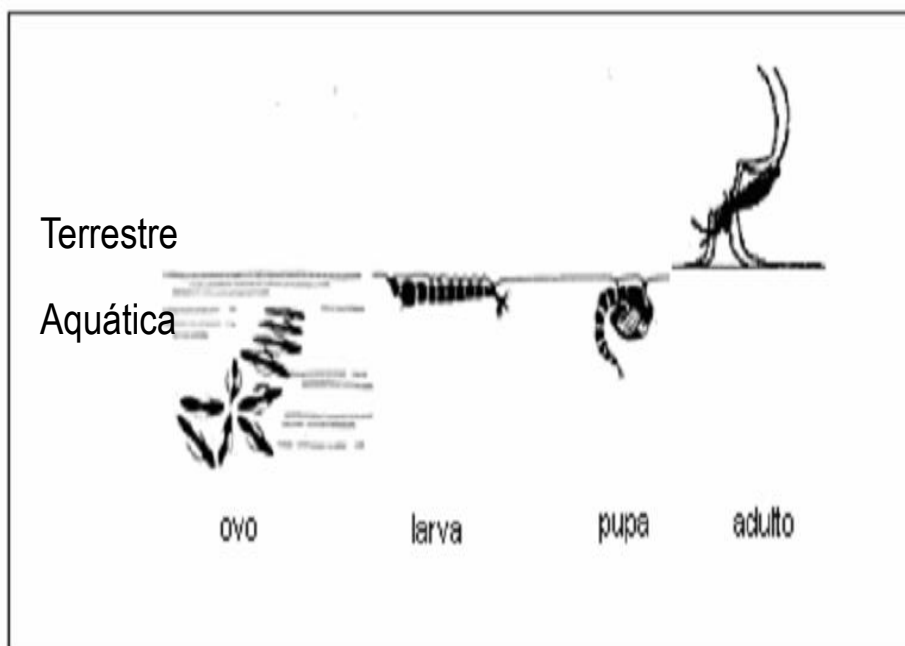


Figura 04: Ciclo de vida do *Anopheles*.

Fonte: adaptado de Rey, (2001).

2.6.1. Ovo

As fêmeas adultas de *Anopheles* acasalam apenas uma única vez e esta única inseminação permite-lhes colocarem ovos durante todo o seu tempo de vida. Estas necessitam de alimentação sanguínea, pois as proteínas presentes no sangue auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos (FORATTINI, 2002).

Os ovos dos anofelinos são postos diretamente na superfície da água, possuem um aspecto alongado, simetria bilateral apresentando flutuadores laterais, o que permite sua flutuação (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). O número de ovos depositados em cada postura varia de acordo com a espécie, mas em média são de 75 a 150 e eclodem assim que completam o seu desenvolvimento embrionário que varia de 2 a 3 dias, dependendo da temperatura e umidade (FORATTINI, 1973; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1992; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

2.6.2. Larva

As larvas dos anofelinos apresentam o corpo claramente dividido em cabeça, tórax e abdome, sendo o abdome semicilíndrico com nove segmentos (FLEMING, 1992; CONSOLI-OLIVEIRA, 1994).

A larva tem uma cabeça bem desenvolvida, apresentando escovas bucais que são usadas para se alimentar através da filtração, podendo filtrar até 2 litros de água por dia (FORATTINI, 1962). Elas se alimentam de micro-organismos presente em seus habitats, constituído de algas, bactérias, protozoários, esporos de fungos, ou quaisquer partículas de matéria orgânica (CLEMENTS, 1963; FORATTINI, 1996). De acordo com Merrit et al. (1992), as bactérias têm sido consideradas os mais importantes micro-organismos na alimentação larval de mosquitos e o crescimento das formas imaturas pode ocorrer apenas com bactérias, como fonte alimentar.

Todas as larvas de mosquitos passam por quatro estádios de desenvolvimento, sendo o último destes o mais longo até se transformarem, por metamorfose em pupa (CLEMENTS, 1963; CONSOLI-OLIVEIRA, 1994). O seu desenvolvimento pode variar de acordo com a espécie por fatores abióticos (temperatura, luz e salinidade) e bióticos (vegetais, os predadores e a disponibilidade de alimentos) (CONSOLI-OLIVEIRA, 1994).

Os anofelinos diferentes dos outros culicíneos não possuem sifão respiratório posterior, esse é substituído por um aparelho espiracular localizado dorsalmente (FORATTINI, 2002). As larvas são facilmente reconhecidas por sua posição de repouso, paralela à superfície da água (RICCIARDI, 1978; FLEMING, 1992). Seus habitats são variados e as espécies neotropicais usam água de lagos e margens de corpos d'água. Os micro-habitats são formados por vegetação flutuante ou emergente, como algas, e entre detritos flutuantes (FORATTINI, 1973; FLEMING, 1992; MANGUINS et al., 1996; FORATTINI, 2002).

2.6.3. Pupa

As pupas de anofelinos tem aspecto de vírgula, estão quase sempre paradas em contacto com a superfície da água, mas são bastante móveis quando perturbadas. Tem um par de trompetas respiratórias através das quais respira quando está à superfície (FORATTINI, 1973; CONSOLI-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Essa fase pupal geralmente dura de dois a três dias e as pupas não se alimentam (FORATTINI 1962; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Das pupas emergem os adultos e é nesta fase que ocorre o maior processo de metamorfose, deixando o meio aquático para o meio terrestre (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). As pupas dos machos são um pouco menores que as das fêmeas e os machos adultos emergem uma hora antes que as fêmeas (FLEMING, 1992).

2.6.4. Adulto

O corpo dos adultos é dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como olhos compostos, antenas, palpos e o aparelho bucal tipo picador. No tórax estão os apêndices especializados na locomoção, isto é, as pernas (2 anteriores, 2 médias e 2 posteriores) e duas asas. O abdome abriga a maior parte dos órgãos internos, como o aparelho reprodutor, digestivo e excretor (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Os mosquitos adultos machos se diferenciam das fêmeas por seus pêlos mais longos nas antenas (FORATTINI 1962). Tanto os mosquitos machos como as fêmeas alimentam-se de néctares e frutos danificados para obter energia. Entretanto, apenas as fêmeas são hematófagas. Após o acasalamento, elas procuram uma refeição de sangue animal para fornecer proteínas que auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Após o repasto sanguíneo ela procura um lugar de repouso, podendo apresentar comportamento endofílico (caso repousem dentro das casas humanas) ou exofílico (caso repousem fora das casas) com atividade crepuscular e noturna (FORATTINI, 1987; ROSA-FREITAS et al., 1998 ; FORATTINI, 2002).

2.7. CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO DE VETORES

Apesar dos grandes avanços no conhecimento e no controle da doença, a malária continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Seu controle é cada vez mais difícil devido à propagação da resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos e a resistência do vetor aos inseticidas atuais (TADEI et al., 1988; HEMINGWAY & RANSON, 2000; TRAPE et al., 2011; WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

Os esforços de controle da malária após a II Guerra Mundial colocou o controle do mosquito vetor, como alvo principal para erradicar a malária (GREENWOOD et al., 2005). O controle químico com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte dos programas de manejo integrado para o controle de vetores doenças em Saúde Pública (ROSE, 2001).

No século XX, diclorodifeniltricloroetano (DDT), o primeiro inseticida orgânico sintético, introduziu uma nova época de controle do vetor (HASSALL, 1982). A utilização do DDT revolucionou as técnicas de combate às pragas agrícolas e aos vetores de doenças por sua grande eficácia. Por um período de duas décadas, o uso de inseticidas no controle de

doenças transmitidas por vetores, como a malária, foi um dos métodos mais confiáveis (KAMARADDINE, 2012). Porém, as experiências de controle foram enfraquecendo em 1967 onde as maiores críticas estabelecidas ao seu uso estavam relacionadas ao fato de deixarem resíduos do produto no ambiente. Os vários efeitos adversos e ordem ecológica, a grande resistência dos insetos e a não especificidade fizeram dele um instrumento de ação não muito significativo a manutenção do controle de vetores (HARGREAVES et al., 2003; FEDERICI et al., 2003; OKOYE et al., 2008).

Com base nisso, novos inseticidas de contato foram introduzidos no mercado como os carbamatos, organofosforados e os piretróides (NICOLAS, 1986). No entanto, o uso intensivo desses produtos químicos para o controle de vetores ao longo dos anos confirmou o seu impacto negativo pelos seus efeitos tóxicos e persistentes sobre o meio ambiente, efeitos adversos à saúde humana e principalmente pelo surgimento de resistência a estes produtos por populações de insetos (TADEI, 2001; ZAIM & GUILLET, 2002; HURWITZ et al., 2011; KAMARADDINE, 2012).

Além disso, Tadei et al. (2007), salientam que somente o controle dos mosquitos adultos não é suficiente para diminuir a densidade do vetor. As formas imaturas desenvolvem-se em coleções hídricas, seus criadouros naturais, sob excelentes condições. Neles há condições de temperatura, luminosidade e pH suficientes para rapidamente se desenvolverem e atingirem a fase adulta. O controle das larvas terá de tornar-se também parte integrante dos programas de manejo integrado de vetores se o objetivo for à eliminação da malária. Assim, aumentou-se a importância das intervenções no período larval nas medidas de controle da malária (KILLEEN et al., 2002). Contudo, o conhecimento sobre a biologia e ecologia da forma larval é limitado (ARAÚJO et al., 2012.). Em decorrência dessa pressão de seleção, há necessidade urgente do desenvolvimento de novos produtos que levem a um mínimo de impacto para o ambiente, servindo de estímulo a busca por estratégias alternativas no controle mais eficaz desses vetores (VAN RIE et al., 1990; ZAIM & GUILLET, 2002; CIRIMOTICH et al., 2011).

Os mosquitos têm seus próprios agentes patogênicos naturais, e este foi um ponto de partida para uma extensa pesquisa sobre agentes de controle biológico de vetores da malária (ABDUL-GHANI et al., 2012). Os micróbios são investigados como alternativas aos inseticidas sintéticos de amplo espectro convencionais devido à sua toxicidade seletiva e segurança ambiental (MOHANTY & PRAKASH, 2004; GHOSH et al., 2006; GHOSH & DASH, 2007). Além de outras inúmeras abordagens para estratégias de controle biológico que têm sido empregadas, incluindo o uso de feromônios, hormônios, manipulações genéticas,

inibidores de crescimento, plantas, sementes e extratos, predadores e patógenos (CHAPMAN, 1974).

A seguir, apresentamos alguns dos principais organismos e seus potenciais como agentes de controle biológico de mosquitos.

2.7.1. Bactérias no Controle Biológico de Mosquitos

As bactérias potencialmente ativas contra insetos são aquelas que apresentam capacidade de se multiplicar na hemolinfa do inseto, levando à septicemia, ou então aquelas capazes de produzir entomotoxinas ativas em qualquer estágio de vida do seu hospedeiro (ANGELO, 2008). Segundo Falcon, (1971) as bactérias entomopatogênicas são agrupadas em duas categorias: esporulantes e não esporulantes. As bactérias esporulantes são tidas como de maior interesse comercial no controle biológico de insetos, por persistirem mais tempo no ambiente e pela facilidade de produção em escala industrial. As esporulantes incluem as espécies aeróbias estritas e a maioria das facultativas (produtoras ou não de cristais protéicos) (HABIB & ANDRADE, 1998; COSTA et al., 2010).

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) e *Bacillus sphaericus (Bs)* são as espécies bacterianas mais estudadas e utilizadas contra mosquitos. Ambas possuem elevadas propriedades biolarvicidas, elas produzem endotoxinas protéicas, as quais, quando ingeridas pelas larvas atacam e destroem o seu epitélio do estômago (intestino médio), levando-as à morte (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; PORTER, 1996; MITTAL, 2003; RAGHAVENDRA et al. 2011). Estes são biolarvicidas eficazes em doses muito baixas, são seguros para outro organismo não alvo para o ambiente, o homem, animais selvagens e são adequados para uso da comunidade (MITTAL, 2003). O *Bti* é eficiente contra espécies dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e até certo ponto contra *Mansonia*, sendo ainda ativo contra larvas de simúlideos, e o *Bs* mostrou-se especialmente eficaz contra larvas de *Culex* (HOLCK, 1988; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Estes biolarvicidas são ambientalmente seguros e pode reduzir significativamente a abundância de larvas em habitats naturais, como mostrado no Quênia (FILLINGER & LINDSAY 2006) e Gâmbia (MAJAMBERE et al., 2007).

Segundo Kroeger et al. (1995), o *Bti* é eficaz em locais de reprodução de mosquito, pois apresentou redução de 50 -70% da densidade de adultos de *Anopheles albuminus* na costa do Pacífico do Peru, do Equador e na região amazônica do Peru. Em uma área urbana de Dares Salaam, na Tanzânia, Geissbühler et al. (2009), relataram que um programa em larga escala com base na comunidade, utilizando larvicidas a partir de *Bti* reduziu significativamente

a prevalência da malária na região. Demonstrando, dessa forma, o importante papel que microbiota associada a vetores pode exercer nas estratégias de controle biológico da malária.

A *Wolbachia* é uma bactéria endossimbionte capaz de infectar uma ampla gama de invertebrados, e estar presente em cerca de 70% dos insetos no mundo. É uma bactéria intracelular que não oferece qualquer risco para a saúde humana ou para o ambiente (HILGENBOECKER et al., 2008; HUGHES et al., 2011; ZUG & HAMMERSTEIN 2012). A importância de se utilizar essa bactéria nas estratégias de controle biológico de vetores, é que mosquitos fêmeas infectadas pela *Wolbachia pipiensis* possuem uma vantagem reprodutiva por causa de uma incompatibilidade citoplasmática (IC) provocada pela bactéria, o que leva ao aumento de indivíduos infectados (YEN & BARR, 1971). A incompatibilidade citoplasmática é a indução de cruzar os padrões de esterilidade, dentro ou entre as populações (CURTIS & SINKINS, 1998; SINKINS, 2004), ou seja, quando os mosquitos machos infectados com *Wolbachia* acasalar com mosquitos fêmeas sem *Wolbachia*, as fêmeas terão ovos, mas eles não vão eclodir. Quando as fêmeas infectadas se acasalam com machos infectados ou não com a *Wolbachia*, toda a sua prole terá a *Wolbachia* (YEN & BARR, 1971; WERREN, 2008; JIN et al., 2009).

Quando mosquitos *Aedes aegypti* foram transfectados com *Wolbachia*, descobriu-se que a presença da bactéria inibia a replicação de patógenos, como os vírus da dengue e da febre Chikungunya (FERGUSON et al., 2015) e no *Anopheles* o parasito da malária de aves *P. gallinaceum* (MCMENIMAN et al., 2009). Atualmente estudos mostram que o *P. falciparum* (causador da malária humana) também é bloqueado na presença dessa bactéria. Segundo Kambris et al. (2009), algumas cepas de *Wolbachia* podem inibir o desenvolvimento de uma ampla gama de patógenos humanos transmitidos por mosquitos vetores, além de poderem encurtar o tempo de vida útil desses (RASGON et al., 2003; MOREIRA, et al., 2009; YEAP et al., 2011).

Cepas de *Wolbachia* têm sido amplamente usadas contra o *A. aegypti*, a bactéria se espalha na medida em que os mosquitos se reproduzem, anulando a transmissão da doença, uma vez que a *Wolbachia* têm ação direta contra vírus e também é capaz de encurtar a expectativa de vida do vetor (WALKER et al., 2011). A expectativa é que logo seja possível a transfecção de mosquitos do gênero *Anopheles* com a bactéria, visando resultados semelhantes com os obtidos contra o *A. aegypti*. Porém, o grande desafio do uso dessa abordagem, é infectar de forma estável o *Anopheles* com essa bactéria, pois os mesmos não são naturalmente infectados pela *Wolbachia*, e isso só é possível *in vitro*.

2.7.2 Paratransgenesis

Paratransgenesis é uma abordagem “cavalo de Tróia”, em que micro-organismos simbióticos de insetos vetores são geneticamente modificados para expressar produtos gênicos que bloqueiam o desenvolvimento ou a transmissão de patógenos, afetando sua competência vetorial (HURWITZ et al., 2011; DJADID et al., 2012; RANGBERG et al., 2012).

A paratransgenesis foi descrita pela primeira vez por Durvasula et al. (1997), eles modificaram geneticamente a bactéria *Rhodococcus rhodnii* para expressar a proteína Cecropina A, tóxica para *Trypanosoma cruzi*. A bactéria *R. rhodnii* é simbiote do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas causada pelo *T. cruzi*. Os resultados obtidos foram considerados excelentes, todos os vetores apresentaram uma grande redução ou total eliminação de *T. cruzi*. Atualmente o grupo está desenvolvendo esta mesma metodologia para controlar a transmissão da leishmaniose visceral, causada pelo *Leishmania donovani* tendo como vetor o flebotomíneo *Phlebotomus argentipes* (HURWITZ et al., 2011).

O uso desta abordagem para o controle biológico do vetor da malária tem como principal objetivo, modificar as bactérias simbióticas do *Anopheles*, para produzir moléculas antiparasitárias e, em seguida, serem reintroduzidas no intestino dos mosquitos, onde inibem o desenvolvimento ou matam os plasmódios causadores da malária (BEARD et al., 2002; FAVIA et al., 2007; AKSOY et al., 2008; COUTINHO - ABREU et al., 2010). Este método também pode ser utilizado para expressar produtos gênicos com efeito patogênico, que agiriam diretamente sobre esses vetores reduzindo a sua fecundidade e longevidade (REN, et al., 2008; COUTINHO-ABREU et al., 2010; CHAVSHIN, et al., 2015).

O sucesso desta estratégia baseia-se no fato, da maior parte da microbiota presente nos mosquitos encontra-se no lúmen do intestino médio, local onde ocorre o desenvolvimento parasitário na sua fase mais vulnerável (WHITTEN et al., 2006; WANG & JACOBS-LORENA., 2013).

Diversos estudos têm sido realizados com objetivo de identificar bactérias com potenciais paratransgênicos para o uso no controle de diferentes vetores da malária. Terenius et al. (2008), identificou bactérias isoladas a partir do intestino médio do *A. darlingi*, criados em laboratórios e coletados no campo. As bactérias identificadas a partir das sequências do gene *16S rDNA*, incluem algumas espécies que também foram encontrados em associação com outros vetores da malária, tais como *Aeromonas*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. Estas se mostraram ótimas candidatas para paratransgenesis.

Gonzalez-Ceron et al. (2003), isolou *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sp.*, *Serratia marcescens*, e *Serratia sp.* do vetor *Anopheles albimanus* capturados no sul do México. Lindh et al. (2005), identificaram 16 espécies bacterianas abrangendo 14 gêneros diferentes, do intestino médio dos *Anopheles gambiae* e *funestus* de populações silvestres. Das populações de *A. gambiae* e *stephensi* criadas em laboratório, foram identificadas bactérias dos gêneros *Asaia*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Serratia* e *Chryseobacterium* (FAVIA et al., 2007; DONG et al., 2009; RANI et al., 2009).

Yoshida et al. (2001) utilizaram a *Escherichia coli* para expressar uma imunotoxina de cadeia simples com atividade parasiticida. Que posteriormente, foi introduzida no intestino médio do vetor *A. gambiae* tendo como alvo principal o *P. berghei*, que causa malária em roedores murinos, apresentando resultados promissores, com o bloqueio de 95,6% da transmissão do *P. berghei*.

Um estudo realizado por Wang et al. (2012) demonstraram que moléculas antiparasitárias excretadas pela *Pantoea agglomerans* inibiu em até 98% o desenvolvimento de dois importantes parasitas, o *P. falciparum* responsável pela malária em humanos e o do *P. berghei* responsável pela malária em roedores. A bactéria *P. agglomerans* foi isolada a partir do mosquito *A. gambiae* e modificada geneticamente para expressar produtos gênicos antiparasitárias no lúmen do intestino médio do vetor.

Briones et al. (2008), estudando na região central do Quênia, em plantações de arroz, encontraram uma bactéria endossimbionte que vive por todo o ciclo do *A. gambiae*. Kampfer et al. (2006) analisaram este microrganismo e verificaram que o mesmo pertence a um novo gênero-*Thorsellia* e uma nova espécie-*Thorsellia anopheles* Kampfer, (2006). Estes autores verificaram que esta bactéria é comum no intestino médio da larva e em adultos de *A. arabiensis*. As caracterizações fisiológicas abordadas por Briones et al. (2008), mostraram que *Thorsellia anophelis* está bem adaptada ao intestino médio de fêmeas de *A. gambiae*, persistindo por toda a metamorfose do mosquito.

O principal gargalo enfrentado pelos pesquisadores para aplicação da paratransgenesis no controle da malária é a falta de conhecimento sobre a microbiota bacteriana presente em todos os estágios de vida dos anofelinos, e que estejam bem adaptadas às suas condições fisiológicas e imunológicas (ABDUL-GHANI et al., 2012). Uma vez que, a transmissão trans-stadial é um critério importante, pois, permitiria que às bactérias geneticamente modificadas, serem introduzidos nos criadouros de larvas e, em seguida, serem naturalmente transferidas para os mosquitos adultos (BEARD et al., 2002; CHAVSHIN et al., 2015).

Bactérias presentes desde o habitat natural das larvas, passando pelas demais fases de vida do mosquito até a fase adulta, seriam os micro-organismos perfeitos para paratransgenesis no combate da malária (LINDH et al., 2005; FAVIA et al., 2007; KLEPZIG et al., 2009; SMITH et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

- ✓ Caracterizar a microbiota bacteriana associada a larvas do *Anopheles darlingi* e dos seus criadouros naturais no município de Manaus-AM.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓
- ✓ Analisar as amostras metagenômicas obtidas das coletas do município de Manaus-AM;
- ✓ Caracterizar as OTUs mais frequentes nas amostras de água dos criadouros naturais e larvas de 4 estágio de *Anopheles darlingi*;
- ✓ Identificar a diversidade taxonômica bacteriana das OTUs mais frequentes nas amostras de água dos criadouros naturais e larvas de 4 estágio de *Anopheles darlingi*.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R; AL-MEKHLAFI, A.M; ALABSI, M.S. Microbial control of malaria: biological warfare against the parasite and its vector. *Acta Tropical* v. 121, p. 71-84, 2012.
- AKSOY, S; WEISS, B; TTARDO, G. Paratransgenesis applied for control of tsetse transmitted sleeping sickness. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.34, n.34, p. 27-35, 2008
- ALCAMO, I. E. Fundamentals of Microbiology. **Editora Benjamin Cummings**. 4ª ed. 695p.1994.
- ANTONIO-NKONDJIO, C; ANDO, C; COSTANTINI, C. AWONO-AMBENE, P; FONTENILLEC,D; SIMARD, F. Distribution and Larval Habitat Characterization of *Anopheles moucheti*, *Anopheles nili*, and Other Malaria Vectors in River Networks of Southern Cameroon. *Acta Tropical*, v. 112, n. 12, p. 270–276. 2009.
- ARAÚJO, M.S; GIL, L.H.S; SILVA, A.A. Larval Food Quantity Affects Development Time, Survival and Adult Biological Traits that Influence the Vectorial Capacity of *Anopheles darlingi* under Laboratory Conditions. *Malaria Journal*, v. 1, n. 261, p. 1-9. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Informação e Documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT. 2012.
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
- BEARD, C.B; DOTSON, E.M; PENNINGTON, P.M; EICHLER, S; CORDON-ROSALES, C; DURVASULA, R.V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector borne Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, v.31, n.31, p.621-627, 2002.
- BORNEMAN, J; SKROCH, P.W; O'SULLIVAN, K.M; PALUS, J.A; RUMJANEK, N.G; JANSEN, J.L; NIENHUIS J; TRIPLETT, E.W. Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, n. 6, p. 1935-1945, 1996.
- BRAGA, E. M; FONTES, C. J. F; Neves, D. P; Melo, A.L; Genaro, O; Linardi, P.M. Plasmodium- Malária. In: **Parasitologia Humana**. São Paulo, Editora Atheneu, 146p. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª edição. Brasília, DF. 2005.
- BRIONES, A.M; SHILILU, J; GITHURE, J; NOVAK, R; RASKIN, L. *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. *ISME J*, v.2, n. 1, p. 74-82, 2008.
- BROCK. **Biology of Microorganisms**. 8 ed. Prentice Hall, New Jersey, USA. 1997.
- BROOKS, G.F; BUTEL, J.S; MORSE, A.S. **Microbiologia médica**. 20 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

CANHOS, V. P; MANFIO, G. P; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARE, V. H. Diversidade no Domínio Bactéria. In: Joly, C. A.; Bicudo, C. E. M. (orgs). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1999.

CARVALHO, M. P; ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J. Microrganismos em favor da saúde humana. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 9, n. 11, p. 77-81, 2008.

CHAAR, J. S; REZENDE, M. O. O; VIEIRA, E. M. Caracterização de Ácidos Húmicos Extraídos de Água e Sedimento do Rio Negro. In: **20ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**. São Paulo : Tec Art Editora Ltda, v. 3. p. 60-68, 1997.

CHAPMAN, H.C. Biological control of mosquito larvae. **Annual Review Entomology**, v.19, n.19, p. 33–59, 1974.

CHAVSHIN, A.L; OSHAGHI, M.A; VATANDOOS, H; YAKHCHALI, B; ZARENEJAD, F;TERENIUS, O. Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas* transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi*. **Parasites & Vectors** , v.8, n.8, p. 1-11, 2015.

CHAVSHIN, A.R; OSHAGHI MA, V.H; POURMAND, M.R; RAEISI, E.A.A; MARDANI N, G.S. Identification of Bacterial Microflora in the Midgut of the Larvae and Adult of Wild Caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. **Acta Tropical**, v. 121, n. 23, p. 129–134. 2012.

CLEMENTS, A. N. *The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction*. London, Chapman & Hall, vol. 1. 1992.

CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R. L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 228p.1994.

CONTI, R; GUIMARÃES, D.O; PUPO, M.T. Aprendendo com as Interações da Natureza: micro-organismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**,v. 64, n. 3, p. 143-152. São Paulo. 2012.

COUTINHO-ABREU, I.V; ZHU, K.Y; RAMALHO-ORTIGAO, M. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. **Parasitol Int**, v.59, n.1, p. 1-9, 2010.

COX-SINGH, J; SINGH, B. Knowlesi Malaria: newly emergent and of public health importance?. **Trends Parasitol**, v. 24, p. 406-410. 2008.

CURTIS, C.F; SINKINS, S.P. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. **Parasitology**, v. 116, n.25, p.111–115, 1998.

DEANE, L.M. Os Grandes Marcos na História do Controle da Malária. 3ª Reunião Nacional dos Pesquisadores em Malária: A pesquisa da malária no Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 1992.

DEANE, L.M; CAUSEY, O.R; DEANE, M.P. Notas Sobre a Distribuição e a Biologia dos Anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Revista Serviço Especial de Saúde Pública*, v. 1, n. 827, p. 965-101.1948.

DIAS, B. F.S. **A Implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. 2000. Disponível em: < [Http://www.bdt.org.br/publicações/padct/cap1/Bráulio](http://www.bdt.org.br/publicações/padct/cap1/Bráulio). [19/01/14]>.

DJADID, N.D; JAZAYERI, H; RAZ, A; FAVIA, G; RICCI, I. Zakeri. Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. Maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *Plos One*, v. 6, n.84, p.1-21, 2012.

DONG, Y; S. A; KULAM, D. M; MCGARRELL, G. M; GARRITY. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathoge*, v.5, n.8, p.21-28, 2009.

DOUGLAS, A.E. Lessons From Studying Insect Symbioses. *Cell Host Microbe*. v. 10, n. 3, p.v359–367. 2011.

DURVASULA, R.V; RAEISI A, E.A.A; MARDANI N, G.S. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.65, n.94, p.3274–3278, 1997.

FALCON, L. A. Use of bacteria for microbial control, p. 67-95. In: BURGESS, N. W (Ed.), **Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, p.86, 1971.

FAVIA, G; RICCI, I; DAMIANI, C; RADDADI, N; CROTTI, E; MARZORATI, M. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.104, n.21, p.23- 34, 2007.

FEDERICI, M; ULGIATI, S; VERDESCA, D; BASOSI, R. Efficiency and sustainability indicators for passenger and commodities transportation systems. *Ecological Indicators*, v.3, p. 155-169, 2003.

FERRARI, T. C. A. Malária. In: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. **Protozooses Humanas**. 2 ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 37p.1994.

FILLINGER, U; LINDSAY, S.W; Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Tropical Medicine & International Health*, v.11, n.1, p.1629–1642, 2006.

FLEMING, G. **Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas**. in: Washington, D.O.P.d.l.S, 1992.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, vol. 2, 860 p. 2002.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública. Editora da USP. vol. 1. 1962.

FORATTINI, O. P; GOMES, A. C; SANTOS, J. L. F; GALATI, E. A. B; RABELLO, E. X; NATAL, D. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.5, n.6, p. 557-586, 1973.

FORATTINI, O. P; KAKITANI, I; MARQUES, G. R. A. M; BRITO, M. Imature Forms of Anopheline in Artificial Containers. *Revista de Saúde Pública*, v. 32, n. 2, p.189-91,1996.

FORATTINI, O. P; KAKITANI, I; MASSAD, E; MARUCCI, D. Studies on mosquitos (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 5- Breeding of *Anopheles albitarsis* ins flooded rice fields in South-Eastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 28: 329 331, 1994.

FORATTINI, O.P. Compartemento Exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em Região Meridional do Brasil. Exophilic Behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil. *Revista de Saúde Publica*, v. 21, n. 3, p. 291-304. 1987.

GHAZANFAR,S; AZIM, A; GHAZANFAR, M.A; ANJUM, M.I;BEGUM, I. Metagenomics and its Application in Soil Microbial Community Studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal & Plant Sciences*. v. 6, n. 2, p. 611- 622. 2010.

GHOSH A, ET AL. The journey of the malaria parasite in the mosquito: Hopes for the new century. *Parasitol Today*.16:196–201. 2006.

GIL, L.H.S; TADA, M.S; KATSURAGAWA, T.H; RIBOLLA, P.E.M; PEREIRA, S L.H. Urban and Suburban Malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 2, p. 271-276. 2007.

GIOVANNONI, S.J; STINGL, U. Molecular Diversity and Ecology of Microbial Plankton. *Nature*. v. 437, n. 25, p. 343–348. 2005.

GONZALEZ-CERON L, SANTILLAN F, RODRIGUEZ MH, MENDEZ D, HERNANDEZ-AVILA JE. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *Journal of Medical Entomology*, v. 3, n.1, p. 371-374. 2003.

GREENWOOD BM, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*,. v.118, n.29, p.1266–1276, 2008.

GRIFFIN, J.T; HOLLINGSWORTH, T.D; OKELL, L.C; CHURCHER, T.S; WHITE, M; HINSLEY, W; BOUSEMA, T; DRAKELEY, C.J; FERGUSON, N.M; BASÁÑEZ, M.G;GHANI A.C. Strategies Towards *Plasmodium falciparum* Malaria Elimination in Africa Using Currently Available Tools. *PLoS Medical*. [s.v], [s.n], p.1-12. 2010.

GUIMARÃES, A.E; GENTILE, C; ALENCAR, J; LOPES, C.M; MELLO, R.P. Ecology of Anopheline (Diptera, Culicidae), Malaria Vectors Around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil.1 – Frequency and Climatic Factors. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 20, n. 1, p. 291-302. 2004.

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

- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 68, n. 4, p. 669–685. 2004.
- HARGREAVES, K. et al. *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, v.17, n.6, p. 417-422, 2003.
- HASSALL, K.A. **The Chemistry of Pesticide: Their Metabolism, Mode of Action, and Uses in Crop Protections**. Chemie, V., Ed.; Weinheim: Deerfield Beach, FL, USA, p. 372. 1982.
- HEMINGWAY, J; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review Entomology*, v. 45, n. 2, p. 369–389, 2000.
- HILGENBOECKER K, HAMMERSTEIN P, SCHLATTMANN P, TELSCHOW A, WERREN JH. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *Fems Microbiology Letters*. 281(2):215-220. 2008.
- HIWAT, H; BRETAS, G. Ecologia de *Anopheles darlingi* Root em Relação ao Vetur Importância: uma revisão. *Parasitas e Vetores*, v. 4, n. 177, p. 145-154. 2011.
- HUGHES, G.L., KOGA, R., XUE, P., FUKATSU, T., RASGON, J.L. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathoge*, v. 7, n.21, p. 12-29, 2011.
- HUNTER-CEVERA, G.C.The Value of Microbial Diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 01, p. 278 - 285. 1998.
- HURWITZ I, et al. Paratransgenic control of vector borne diseases. *International Journal Biology Sciences*, v. 7, n.1, p.1334–1344, 2011.
- ITURBE-ORMAETXE, I; WALKER, T; O' NEILL, S.L. *Wolbachia* and the Biological Control of Mosquito-Borne Disease. *EMBO Reports*, v. 12, n. 6, p. 508–518. 2011.
- JIN, C., REN, X., RASGON, J.L. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, n.45, p. 3373–3376, 2009.
- KAMARADDINE, L.The Biological Control of the Malaria Vector. *Toxins*, v.4, n.34, p. 748-767, 2012.
- KAMBRIS, Z., COOK, P.E., PHUC, H.K., SINKINS, S.P. Immune activation by lifeshortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, v. 326, n.123, p. 134–136, 2009.
- KÄMPFER P., LINDH J.M., TERENIUS O., HAGHDOOST S., FALSEN E., BUSSE H-J. AND FAYE I. *Thorsellia anophelis* gen. nov., sp. nov., a new member of the Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n.12, p.335-338, 2006.

KLEPZIG, K.D., ADAMS, A.S., HANDELSMAN, J., RAFFA, K.F. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology*, 38, 67–77. 2009.

KNELL, A. J. A Manual From the Wellcome Tropical Institute. Malaria. **Oxford: Oxford University Press**, 94p. 1991.

KOMP, W.H.W. The Occurrence of *Anopheles darlingi* Root in Central America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 21, p. 659 - 670. 1941.

KROEGER, A., HORSTICK, O., RIEDL, C., KAISER, A., BECKER, N. The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropical*, v. 60, n.35, p. 47–57, 1995.

LINDH, J.M; TERENIUS, O; FAYE, I. 16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* Sensu Lato and *A. funestus* Mosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 7217–7223. 2005.

LORENZ, P; AND SCHLEPER, C. Metagenome a Challenging Source of Enzyme Discovery. *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic*. v. 19, n. 20, p. 13-19. 2002.

MACHADO, R.L.D; FILHO, A.F.F; CALVOSA, V.S.P; FIGUEREDO, M.C; NASCIMENTO, J.M; PÓVOA, M.M. Correlation Between *Plasmodium vivax* in Belém, Pará state, Brazil and Symptoms and Clearance of Parasitaemia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 7, p.175–177. 2003.

MAJAMBERE, S., LINDSAY, S.W., GREEN, C., KANDEH, B., FILLINGER, U.. Microbial larvicides for malaria control in The Gambia. Malar. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2007.

MARINOTTI, O; CERQUEIRA, G.C; ALMEIDA, L.G.P; FERRO, M.I.T.P; LORETO, E.L; ZAHA, A; TEIXEIRA, S.M.R; WESPISER, A.R; SILVA, A.A; SCHLINDWEIN, A.D; PACHECO, A.C.L.et al., The Genome of *Anopheles darlingi*, the Main Neotropical Malaria Vector. *Nucleic Acids Research*. v. 41, n. 15, p. 7387 – 7400. 2013.

MCMENIMAN, C.J; LANE, R.V; CASS, B.N; FONG, A.W.C; SIDHU, M; WANG, Y.F; O'NEILL, S.L. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection Into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, v. 323, n. 58, p. 141–144. 2009.

MIGUEL, Laís Mourão. **Uso Sustentável da Biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos.** 171 f. Dissertação (Mestrado em Geografia Humana), Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas Departamento de Geografia.São Paulo - SP, 2007.

MINARD, G; MAVINGUI, P; MORO, C.V. Diversidade e Função da Microbiota Bacteriana no Holobiont Mosquito. *Parasitas e Vetores*, v, 6, n. 146, p. 2-12. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. **In DdV Epidemiológica**, Brasília-DF. 2009.

- MITTAL, P.K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *J. Vector Borne Diseases*, v. 40, n.34, p. 20–32, 2003.
- MOHANTY, S.S., PRAKASH, S.. Extracellular metabolites of *Trichophyton ajelloi* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Curr. Sci.* 86, 323–325. 2004
- MORAIS, J.F; YOSHIMOTO, M; RHODEN, S.A; PAMPHILE, J.A. Bioprospecção de Micro-organismos Produtores de Compostos Bioativos com Atividade Antitumoral. *Revista UNINGÁ Review*. v. 17, n. 1, p. 27-34. 2014
- MORAN, N.A. Symbiosis. *Current Biology*, v. 16, n. 20, p. 866-871. 2006.
- MOREIRA LA, ITURBE-ORMAETXE I, JEFFERY JA, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 39:1268-78.2009.
- MOUTINHO, P. R; GIL, L.H.S; CRUZ, R.B; RIBOLLA, P.E.M. Population Dynamics, Structure and Behavior of *Anopheles darlingi* in a Rural Settlement in the Amazon Rainforest of Acre, Brazil. *Malaria Journal*, v. 10, n. 3, p. 174. 2011.
- MYERS, N. Environmental Services of Biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 7, p. 2764 - 2769. 1996.
- NODEN,B.H; VAUGHAN, J. A; PUMPUNI, C. B; BEIER, J. C: Mosquito Ingestion of
- OKOYE, PN et al. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n.94, p. 591 – 598,. 2008.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J., NAKAIE, C. R., DANIEL-RIBEIRO, C. Low frequency of anti-*Plasmodium falciparum* circumsporozoite repeat antibodies and rate of high malaria transmission in endemic areas of Rondonia State in northwestern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 342, n.124, p. 13-21, 1992.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. **Malaria in Brazil: An overview**. *Malaria Journal*, v. 9: p. 115, 2010.
- PARISE, E. V. Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 4, p. 463–468. 2009.
- PEIXOTO, Jean Charles da Cunha. **Análise da Diversidade Bacteriana do Rios Negro e Solimões pela Abordagem Metagenômica**. 133f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas. Manaus-AM, 2009.
- PIEL, J; BUTZKE, D; FUSETANI N, H.U.I D; PLATZER, M; WEN, G; MATSUNAGA S. Exploring the Chemistry of Uncultivated Bacterial Symbionts: antitumor polyketides of the pederin family. *Journal of Natural Products*. v. 68, n. 3, p. 472–479. 2005.

- PORTER, A.G. Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. *Parasitol. Today*, v. 12, n.7, p. 170-175, 1996.
- RAGHAVENDRA, K., BARIK, T.K., REDDY, B.P., SHARMA, P., DASH, A.P. Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research*, v. 108, n.29, p. 757–779. 2011.
- RANI A; SHARMA A; RAJAGOPAL R; ADAK T; BHATNAGAR R. K. Bacterial Diversity Analysis of Larvae and Adult Midgut Microflora Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods in Lab-Reared and Field-Collected *Anopheles stephensi* - an Asian Malarial Vector. *BMC Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 96-106. 2009.
- RAPPÉ MS, GIOVANNONI SJ. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 369–394. 2003.
- RASGON, J.L; STYER, L.M; SCOTT, T.W. *Wolbachia*-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. *Journal of Medical Entomology*, v.40, n.40, p.125-32,2003.
- REN, X., HOICZYK, E., RASGON, J.L. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathoge*, v.4, n.4. p.165-173, 2008.
- REY, L. Parasitologia. **Editora Guanabara Koogan**, 2.ed. Rio de Janeiro- RJ. 2001.
- RIEHLE, M.A; MOREIRA, C.K; LAMPE, D; LAUZON, C; JACOBS-LORENA, M. Using bacteria to express and display anti-Plasmodium molecules in the mosquito midgut. *International Journal for Parasitology*, v.37, n,6, p.595–603, 2007.
- RODRIGUES, A.F; ESCOBAR, A.L; SOUZA-SANTOS, R. Spatial Analysis and Determination of Malaria Control Areas in the State of Rondônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 4, n. 1, p. 55-64. 2008.
- SCHAECHTER, M; INGRAHAM, J. L; NEIDHARDT, L. C. *Micróbio, uma visão geral.* ed. **Artmed**, v. 1, p. 528, 2010.
- SCHIMEL, J. Ecosystem Consequences of Microbial Diversity and Community Structure. *Ecological Studies*, v. 133, n. 64, p. 239-254. 1995.
- SECRETARIA DE INFORMAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (SIVEP). Ministério da Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde**. Relatório de Situação: Amazonas. Brasília, DF. 2009.
- SINGER, B.H; CASTRO, M.C. Agricultural Colonization and Malaria on the Amazon Frontier. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 954, n. 6, p. 184-222. 2001.
- SINKINS, S.P. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol*, v.34, n.21, p. 723–729, 2004.
- SORUM, H; SUNDE, M. Resistance to Antibiotics in the Normal Flora of Animals. *Veterinary Research*, v. 32, n. 4, p. 227–241. 2001.

SOUZA, J. M; COUTO, A; ALMEIDA, A. R. Malária. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infeciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup, Cap.41, 669p. 1997.

STEELE, H. L; JAEGER, K.E; DANIEL, R; STREIT, W. R. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts From Metagenome. *Journal of Molecular Microbiol and Biotechnology*, v. 16, n. 6, p. 25-37. 2009.

STEELE, H.L; STREIT, R.W. Metagenomics: Advances in Ecology and Biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*, v. 247, n. 52, p. 105–111. 2005.

STREIT, R.W; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the Key to the Uncultured Microbes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 492–498. 2004.

SUÀREZ-MURTIS, M; CUERVO, P; LEORATTI, F. M. S; MORAES-AVILA, S. L; FERREIRA, A.W; FERNANDES, O; COURA, J. R. Cross Sectional Study Reveals a High Percentage of Asymptomatic *Plasmodium vivax* Infection in the Amazon Rio Negro Area, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 49, n. 18, p. 159-164. 2007.

TADEI, W. P; PASSOS, R.. A; RODRIGUES, I. B; SANTOS, J. M. M; RAFAEL, M. S. Indicadores entomológicos e o risco de transmissão de malária na área de abrangência do projeto PIATAM. In: CAVALCANTE, K. V; RIVAS, A. A. F; FREITAS, C. E. C. (Org.). *Indicadores Socioambientais e Atributos de Referência para o trecho Urucu-Coari-Manaus, Rio Solimões, Amazônia*, 160 p. 2007.

TADEI, W. P; SANTOS, J. M. M; COSTA, W. L. S; SCARPASSA, V. M. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de Anopheles, dinâmica de transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.30, n.3, p. 221-251, 1988.

TERENIUS, O; OLIVEIRA, C.D; PINHEIRO, W.D; TADEI, W.P; JAMES, A.A; MARINOTTI, O. 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, v.45, n.2, p.172–175, 2008.

TORSVIK, V; GOKSOYR, J; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre:Artmed, 2012.

TRAMPUZ, A; JEREB, M; MUZLOVIC, I; PRABHU, R.M. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*, v. 7, n. 4, p. 315-23. 2003.

TRAPE, J.F, et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Diseases*, v.12, n.1, p. 123-132, 2011.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. *FEBS Journal*, v. 274, n. 18, p. 4670–4679. 2007.

VAL-MORAES, S. P; VALARINI, M. J; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 1, p.7-16. 2007.

VENTER, J.C; REMINGTON, K; HEIDELBERG, JF, HALPERN AL, RUSCH D, ET AL. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, v. 304, n. 67, p. 66-78. 2004.

VITTOR, A.Y. **Deforestation and Malaria: Associations Between Vegetation, Vector Ecology, and Malaria Epidemiology in the Peruvian Amazon**. Dissertation, The Johns Hopkins University. 2003.

WALKER, T; MOREIRA, L.A. Can *Wolbachia* be used to control malaria? *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.106, n.1, p.212–217, 2011.

WANG, S; GHOSH, A.K; BONGIO, N; STEBBINGS, K.A; LAMPE, D.J; JACOBS-LORENA, M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.109, n.21, p. 127-138, 2012.

WANG, S; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnology*, v. 31, n.1, p. 185-193, 2013.

WARD, D.M; FERRIS, M.J; NOLD, S.C; BATESON, M.M. Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 62, n. 4, p. 1353-1370. 1998.

WARD, N. Novos rumos e interações em metagenômica pesquisa. *Microbiology Ecology FEMS*. v. 55, n. 3, p. 331-338. 2006.

WHITE, N.J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. *Clinical Infectious Disease*, v.46, n. 2, p.172-319. 2008.

WHITMAN, W.B; COLEMAN, D.C; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 12, p. 6578–6583.1998.

WHITTEN, M.M.A, et al. Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite Immunology*, v.28, n.2, p.121–130, 2006.

WHO – World Health Organization. 2010. **World Malaria Report**, Geneva. 32 pp.

WHO. World Health Organization World. 2013. **World Malaria Report 2013**: Globalmalaria programme. Geneva. 284pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World malaria report 2010*. In, World Health Organization. 93p. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World malaria report 2014*. In, World Health Organization. 78p. 2014.

XU, J. Microbial Ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 1713-3. 2006.

YEAP, H.L; MEE, P; WALKER, T. Dynamics of the “popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics*, v.187, n.21, p.583-95, 2011.

YEN, J.H; BARR, A.R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, v.232, n.221, p. 657–658, 1971.

YOSHIDA, S, et al. Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathoge*, v.3, n.1, p.12-23, 2007.

ZAIM, M; GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol*, v.18, n.2, p.161-163, 2002.

ZUG, R; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia* : analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One*, v.7, n.7, p.8544-8557, 2012.

CAPÍTULO I

**ABORDAGEM METAGENÔMICA DA
BIODIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA Á
LARVAS DO *Anopheles darlingi* Root, 1926, E SEU
HABITAT AQUÁTICO NO MUNICÍPIO DE
MANAUS/AM/BR**

**ABORDAGEM METAGENÔMICA DA BIODIVERSIDADE BACTERIANA
ASSOCIADAS À LARVAS DO *Anopheles darlingi* Root, 1926, E SEU HABITAT
AQUÁTICO NO MUNICÍPIO DE MANAUS/AM/BR**

¹Oliveira, M. R.; ²Marinotti, O.; ³Terenius, O.; ⁴Tadei, W. P.; ⁵Souza, A. Q. L.

¹Universidade do Estado do Amazonas; ²Universidade da Califórnia Irvine; ³Universidade Sueca de Ciências Agrícolas; ⁴Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia; ⁵Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

A malária é uma doença parasitária responsável por milhares de mortes anualmente em todo o mundo. Tem como principal vetor no Brasil o *Anopheles darlingi*, Root, 1926. Segundo a literatura estes vetores encontram-se associados a uma grande diversidade de microorganismos, adquiridos principalmente durante a fase imatura por meio da alimentação larval, dentre os quais se destacam as bactérias que podem interferir diretamente na capacidade vetorial do mosquito. A interação destas bactérias com as formas imaturas desses vetores em seus criadouros é um fator relevante para estabelecer importantes estratégias de controle da transmissão desta doença. Portanto, considerando que não há estudos sobre a biodiversidade microbiana associada a larvas do *A. darlingi* e seu habitat aquático, especialmente na Região Amazônica, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota bacteriana associada a esta espécie e os seus criadouros naturais e/ou artificiais, no estado do Amazonas-AM. Foram coletadas amostras de larvas e de água dos criadouros de *A. darlingi* no estado de Amazonas. A extração de DNA das amostras de larvas foi realizada pelo kit innuPREP Plant DNA[®], e as amostras de água foram submetidas a choques térmicos para a lise celular. Após a obtenção do DNA genômico, realizou-se a amplificação do gene 16S do rDNA com os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3'). Os produtos de amplificação obtidos foram sequenciados e a identificação taxonômica foi feita a partir da comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados de sequências de 16S rRNA RDP II pelo programa *Classifier*. O sequenciamento da região 16S rRNA das 37 amostras provenientes de larvas de 4^o estágio e de água de criadouros de *A. darlingi*, gerou 827.842 sequências que foram agrupadas em 6.714 OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) bacterianas. Para a realização das análises taxonômicas foram selecionadas as 20 OTUs mais representativas, que apresentaram mais de 10.000 sequências. Destas, foram identificados 11 gêneros, 11 famílias, 8 ordens, 7 classes pertencentes aos filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*. O filo *Proteobacteria* foi o mais predominante, estando presente em 80% das OTUs analisadas. Desta forma demonstrou-se que as larvas de *A. darlingi* e seu habitat aquático abrigam uma rica diversidade bacteriana.

Palavras-Chave: *Anopheles darlingi*, Biodiversidade, Bactérias.

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, considerada como um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo. Cerca de 3,2 bilhões de pessoas, em mais de 97 países encontram-se expostas aos riscos desta infecção (WHO, 2014). Sua transmissão é dada pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*. No Brasil o *Anopheles darlingi* Root, 1926, é o principal vetor da malária, especialmente na região Amazônica, onde ocorre atualmente cerca de 99,7 % dos casos de malária do país (TADEI et al., 1998, 2010; TADEI & THATHER, 2000).

Nos criadouros naturais e artificiais espalhados ao longo da região Amazônica, as larvas de *A. darlingi* compartilham um ambiente que apresenta uma rica diversidade de micro-organismos, dentre os quais se destacam as bactérias. Neste processo, ocorrem relações simbióticas que contribuem para a harmonia ecológica do local e trazem, na maioria das vezes, benefícios para os insetos hospedeiros, como suplementação de nutrientes, aperfeiçoamento dos mecanismos digestivos, tolerância de perturbações ambientais e proteção contra parasitos (ENGEL & MORAN, 2013), além de poderem influenciar na forma e no modo de reprodução destes.

Desta forma, diversos autores ressaltam que as bactérias presentes, desde o habitat natural das larvas e das demais fases de vida do mosquito, até a fase adulta, seriam os micro-organismos mais adequados para serem usados no controle biológico contra os vetores da malária (GONZALEZ-CERON et al., 2003; LINDH et al., 2005; FAVIA et al., 2007; SMITH et al., 2013).

Dong et al. (2014), estudando a relação de bactérias associadas a anofelinos, constataram que as bactérias presentes no intestino médio dos mosquitos reduziram, significativamente, o número de oocistos desta região do intestino das fêmeas ingurgitadas. Os dados possibilitaram concluir que a microbiota associada está diretamente relacionada com a competência vetorial deste grupo.

Várias espécies de bactérias foram identificadas no intestino de mosquitos adultos, por meio de diferentes técnicas mediadas por cultura convencional (ITURBE-ORMAETXE et al., 2011). Porém, este método não é capaz de detectar, nem caracterizar as bactérias não cultiváveis que podem estar presentes nas amostras, levando assim, a uma conclusão incompleta da diversidade de bactérias presentes no trato digestivo do mosquito (DADA et al., 2014).

A metagenômica surge como uma estratégia eficaz entre os métodos utilizados em estudos de genética de micro-organismos não cultiváveis. Esta abordagem é realizada com base nas informações da análise genômica de DNA microbiano, extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN et al., 1998). Esta ferramenta, com base no sequenciamento da região 16S rRNA, permite identificar tanto bactérias cultiváveis como não cultiváveis.

Portanto, pesquisas que buscam conhecer a microbiota associada a insetos vetores, são de grande relevância para implementação de políticas com estratégias mais eficazes de controle da malária no mundo. Considerando que não há estudos sobre a biodiversidade microbiana associada ao *A. darlingi* e seu habitat aquático, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota bacteriana associada a esta espécie e a seus criadouros naturais e/ou artificiais, no estado do Amazonas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAIS DE COLETAS

Os locais selecionados para a realização das coletas foram previamente identificados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde do município de Manaus, como criadouros específicos de Anofelinos.

As coletas foram realizadas em criadouros no município de Manaus do estado do Amazonas de acordo com os dados apresentados pela **Tabela 01**.

Tabela 01

Locais de coleta das amostras com suas características e coordenadas geográficas.

Cidades de Coletas	Criadouros de Anofelinos	Características	GPS
Manaus-AM	Local 1/	Lago / Permanente	S 03° 03. 230' W 059° 53. 533'
	Puraquequara – Portela		
	Local 2/ Puraquequara - Brasileirinho	Barragem / Permanente	S 03° 01. 236' W 059° 54. 664'

2.2 COLETAS DO MATERIAL

As amostras de água e larvas foram coletadas em dois locais no município de Manaus, sendo que em cada local foram amostrados quatro pontos equidistantes (cinco metros cada um) (**Figura 01**). As larvas de quarto estágio do *A. darlingi* foram coletadas com auxílio de concha entomológica com capacidade volumétrica de aproximadamente 350 mL, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de 1 m para alcançar as áreas em torno dos criadouros. Todas as coletas se concentraram na superfície das águas, uma vez que se busca identificar as bactérias associadas às larvas que ficam na superfície desse ambiente aquático. As amostras foram transferidas para depósitos limpos de plástico. As amostras de água foram recolhidas em tubos Falcon estéreis de 50 mL para o isolamento das bactérias, sendo que após padronização do cultivo das bactérias, e em garrafas de vidro estéreis de 1 L para as filtrações em papel de filtro e em membranas *Millipore*[®] de 0,45 μM e de 0,22 μM . Todas as amostras foram mantidas a 4° C até a chegada ao laboratório de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia, localizado na Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas - ESA/UEA.

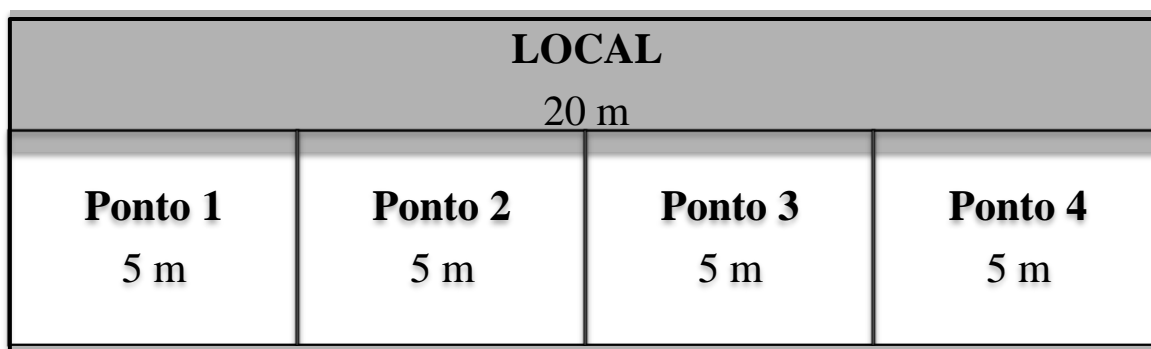


Figura 01: Esquema de coleta das amostras.

2.3 FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras foram inicialmente pré-filtradas em dois papéis de filtro, Whatman n°. 04, em seguida foram novamente filtradas em papel de filtro e mais membranas filtrantes de 0,45 μM (*Millipore*[®]) e 0,22 μM (*Millipore*[®]), as quais foram substituídas à medida que se encontravam completamente obstruídas.

Após a filtração, as membranas e o papel de filtro foram cortados em quadrados de 1x1 cm, com lâminas de bisturi estéreis em placa de Petri e, em seguida todo o conteúdo foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. Para cada tubo foram acrescentados 2 mL de água

destilada autoclavada, agitando vigorosamente no vortex e depois a água foi transferida para microtubos de 2 mL, os quais foram centrifugados a 14.000 rpm durante 12 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 200 µL de água destilada autoclavada, o qual seguiu para a lise celular por choque térmico.

2.4. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE ÁGUA

De cada amostra de água dos tubos Falcon, foram inoculados 100 µL em placa de Petri contendo os meios de cultura Luria-Bertani (LB) e Ágar Nutriente (NA), com 100 µg/mL de fluconazol. As amostras foram espalhadas nas placas, com o auxílio de uma alça de drigalsk em triplicatas. Em seguida, as placas foram identificadas e armazenadas em uma estufa incubadora B.O.D a 26° C, mantidas por um período de 48 h. A etapa seguinte foi a contagem das unidade formadora de colônia (UFC) e a seleção das diferentes colônias, para proceder à continuidade do isolamento. Entretanto, observou-se que ocorreu um crescimento demasiado em 11 placas, que impossibilitava a contagem e a seleção das diferentes bactérias. Desta forma, decidiu-se selecionar estas placas de isolamento do Local 2, que posteriormente, adicionou-se 2 mL de água destilada e autoclavada nas placas para lavá-las e transferiu-se 1 mL do material obtido para microtubos de 2 mL, que foram homogeneizados no vortex e centrifugados a 10.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e essa etapa foi repetida por mais duas vezes. Após essas etapas de lavagem o precipitado foi resuspensionado em 200 µL de água e as amostras foram submetidas à lise celular, por choque térmico.

2.5 TRIAGEM E PROCESSAMENTO DAS LARVAS DO *Anopheles darlingi*

Para cada depósito contendo as amostras de larvas, foram selecionadas 10 unidades (larvas de 4° estádios), estas foram transferidas para microtubos de 2 mL, para a etapa de triagem. Esta foi realizada com auxílio do microscópio e a identificação morfológica foi feita por meio das chaves dicotômicas propostas por Faran, (1980), Faran & Linthicum, (1981) e Consoli & Oliveira, (1994).

Em seguida, as larvas foram lavadas com água destilada estéril e centrifugadas por 3 min. a 8.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, esse passo foi repetido por duas vezes. O pellet obtido foi ressuspensionado em 200 µL de tween 80 % (0,2 %) e agitado vigorosamente em vortex, em seguida centrifugado por 3 min. a 8.000 rpm e o precipitado foi novamente transferido para um novo microtubo 2 mL. O pellet foi ressuspensionado em 200 µL de água estéril e submetido à maceração com o auxílio de um bastão de vidro autoclavado, seguido

por centrifugação por 3 min. a 8.000 rpm. Doprecipitado obtido foi realizado a extração do DNA genômico.

Neste trabalho foi utilizado somente as larvas do Local 2, as quais seguiram para a extração após a realização de dois pools de larvas (juntou-se as larvas dos pontos 1 e 2 = 18 e as larvas dos pontos 3 e 4 = 30 unidades em microtubos de 2 mL).

2.6. EXTRAÇÃO DE DNA

2.6.1 Extração pelo kit innuPREP Plant DNA®.

As amostras das larvas de *A. darlingi* foram submetidas à extração de DNA pelo kit innuPREP Plant DNA®, seguindo as instruções do fabricante, mas o volume de eluição do DNA foi alterado de 50 µL para 20 µL para concentrar o volume final.

2.6.2 Lise Celular por Choque Térmico

Cada microtubo contendo material biológico obtido das membranas, papéis de filtro e das placas foram submetidos a choques térmicos para a lise celular, conforme descrito por Stemmer et al. (1994), para obtenção do DNA total.

2.7. AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S DO rDNA

Após a obtenção do DNA genômico, realizou-se a amplificação do gene *16S* do rDNA com os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3') (WHITE et al., 1990).

As reações de amplificação tiveram o volume final de 50 µL (3 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de Tampão 10X, 2 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5U) da Fermentas, 35,5µL de H₂O milli-Q, 2 µL de DNA e 1 µL de cada Primer (10 pmol)). A amplificação foi realizada em termociclador Thermal Cycler®. As amplificações da PCR consistiu em: um ciclo inicial a 95° C por 5 min. seguido por 30 ciclos de 94° C por 1 min., 56° C por 1 min. e 72° C por 2 min. Ao final mais um ciclo a 72° C por 10 min. e para finalizar a 4° C. A verificação do produto da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% coradas com GelRed™ e como marcador usou-se o Ladder de 1 Kb plus da Invitrogen®, após a corrida o gel foi fotodocumentado pelo Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch Locus®, posteriormente os amplicons foram para a etapa de sequenciamento.

2.8. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os produtos de amplificação (≈ 1 Kb) obtidos foram sequenciados e analisados no Laboratório de Genética, Microbiologia e Toxicologia Swedish University of Agricultural Sciences – SLU (Sveriges lantbruksuniversitet).

Os produtos da PCR foram clonados no vetor 2.1 TOPO (Invitrogen), e os clones foram sequenciados pelo (Laguna Scientific, Laguna Beach - CA). As sequências químéricas foram eliminadas após a análise com o Banco de Dados Ribossomal Projeto II (RPD) Chimera programa Check (COLE et al., 2005). A porcentagem da cobertura das análises das sequências foram calculadas pelo método de Good, com a fórmula $[1 - (n / N)] \times 100$, em que n é o número de espécies moleculares representados pelas Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), e N é o número total de sequências (GOOD, 1953). As OTUs foram definidas como um conjunto de todas as sequências com < 2 % de divergência de nucleotídeos homólogos alinhados (PIDIYAR et al., 2004). A identificação taxonômica foi feita a partir da comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados de sequências de 16S rRNA RDP II pelo programa *Classifier* que tem como objetivo fornecer uma classificação taxonômica inicial para a sequência submetida e requer um alinhamento prévio dessa sequência com as sequências disponíveis no *RDP Hierarchy* que segue a proposta do Manual Bergeys (GARRITY et al., 2004) no qual os principais níveis taxonômicos, em ordem decrescente são: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.

Ressalta-se que no presente trabalho foram usados dados de 37 amostras dos locais 1 e 2, sendo 24 amostras dos papéis de filtro e membranas, duas amostras de larvas e 11 amostras das placas que apresentaram crescimento demasiado (Item 3.4), de tais amostras foram criadas quatro bibliotecas (uma para cada tipo de amostra por local de coleta) de acordo com a identificação apresentada pela **Tabela 02**.

Tabela 02

Amostras dos amplicons obtidos de larvas de *A. darlingi* e de seus habitats.

Amostras Local 1- Água	
Biblioteca 1	1. Port1_0,22
	2. Port1_0,45
	3. Port1_pf
	4. Port2_0,22
	5. Port2_0,45
	6. Port2_pf

	7. Port3_0,22
	8. Port3_0,45
	9. Port3_pf
	10. Port4_0,22
	11. Port4_0,45
	12. Port4_pf
	<hr/> Amostras Local 2 – Água <hr/>
Biblioteca 2	13. Bras1_0,22
	14. Bras1_0,45
	15. Bras1_pf
	16. Bras2_0,22
	17. Bras2_0,45
	18. Bras2_pf
	19. Bras3_0,22
	20. Bras3_0,45
	21. Bras3_pf
	22. Bras4_0,22
	23. Bras4_0,45
	24. Bras4_pf
	<hr/> Amostras Local 2 –Placas <hr/>
	25. Bras_1
	26. Bras_2
Biblioteca 3	27. Bras_3
	28. Bras_4
	29. Bras_5
	30. Bras_6
	31. Bras_7
	32. Bras_8
	33. Bras_9
	34. Bras_10
	35. Bras_11
	<hr/> Amostras Local 2-Larvas <hr/>
Biblioteca 4	36. Bras_L_1
	37. Bras_L_2

As amostras do Local 1 foram nomeadas de acordo com os pontos de coleta e origem das amostras e dos filtros usados no processo de filtração da água (Exemplo: Port1_0,22 - Port (Local de Coleta Portela) 1 (Ponto um) e 0,22 (Membrana 0,22 usada na filtração)). Do Local 2, as 12 primeiras amostras também foram nomeadas de acordo com os pontos de coleta e origem da dos filtros usados no processo de filtração das amostras de água (Exemplo: Bras1_0,22 - Bras (Local de Coleta Brasileirinho) 1 (Ponto um) e 0,22 (Membrana 0,22

usada na filtração; Bras_1 - Bras (Local de Coleta Brasileirinho), 1 (placa 1 com cultivo bacteriano); Bras_L_1 - Bras (Local de Coleta Brasileirinho), L (amostra de larvas) e 1 (pool 1)). Vale ressaltar que desse Local foram utilizadas as amostras advindas do processo de filtração da água, das placas de cultivo e dos pools das larvas.

3. RESULTADOS

3.1 ANALISE DAS SEQUÊNCIAS 16S rRNA

O resultado das análises do sequenciamento de 37 de amostras gerou 827.842 sequências que foram agrupadas em 6.714 OTUs (**Tabela 03**).

Tabela 03

Número de Sequências obtidas por amostra.

	Amostras	Nº de Sequências
Biblioteca 1	1. Port1_0,22	78.680
	2. Port1_0,45	36.439
	3. Port1_pf	24.224
	4. Port2_0,22	27.828
	5. Port2_0,45	18.633
	6. Port2_pf	20.507
	7. Port3_0,22	9.495
	8. Port3_0,45	21.421
	9. Port3_pf	48.931
	10. Port4_0,22	35.460
	11. Port4_0,45	25.466
	12. Port4_pf	26.527
Biblioteca 2	13. Bras1_0,22	26.564
	14. Bras1_0,45	20.538
	15. Bras1_pf	5.679
	16. Bras2_0,22	39.125
	17. Bras2_0,45	25.888
	18. Bras2_pf	4.878
	19. Bras3_0,22	2.770
	20. Bras3_0,45	9.128

	21. Bras3_pf	3.181
	22. Bras4_0,22	7.049
	23. Bras4_0,45	4.178
	24. Bras4_pf	3.743
Biblioteca 3	25. Bras_1	35.675
	26. Bras_2	41.278
	27. Bras_3	54.292
	28. Bras_4	3.354
	29. Bras_5	4.651
	30. Bras_6	3.901
	31. Bras_7	12.763
	32. Bras_8	38.064
	33. Bras_9	32.014
	34. Bras_10	11.241
	35. Bras_11	6.947
Biblioteca 4	36. Bras_L_1	29.964
	37. Bras_L_2	27.366
<hr/>		
Total de Sequências		827.842

Das 6.714 OTUs foram selecionadas 20, que se destacaram por apresentarem mais de 10.000 sequências que representam um total de 65,6% (542.959) de todas as sequências obtidas. A quantidade de sequências apresentadas pelas OTUs selecionadas estão expostas na **Tabela 04**, nela pode-se observar que as OTUs mais representativas foram a OTU_5 com 21,6% das sequências seguida pela OTU_8 com 11,3% e OTU_13 com 9,7%.

Tabela 04

20 OTU's com mais de 10.000 sequências.

Ranking	Identificação da OTU	Quantidades de Sequências Obtidas	%
1.	OTU_5	117.384	21,6%
2.	OTU_8	61.203	11,3%
3.	OTU_13	52.571	9,7%
4.	OTU_9	36.577	6,7%
5.	OTU_17	26.882	4,9%
6.	OTU_21	24.882	4,6%

7.	OTU_35	24.815	4,6%
8.	OTU_31	23.372	4,3%
9.	OTU_1962	21.097	3,9%
10.	OTU_47	19.672	3,6%
11.	OTU_69	18.334	3,4%
12.	OTU_0	16.599	3,1%
13.	OTU_115	14.624	2,7%
14.	OTU_24	14.451	2,7%
15.	OTU_15	13.893	2,5%
16.	OTU_5982	12.991	2,4%
17.	OTU_84	12.326	2,3%
18.	OTU_114	10.517	1,9%
19.	OTU_113	10.488	1,9%
20.	OTU_65	10.281	1,9%
Total de Sequências =		542.959	100%

3.2 DISTRIBUIÇÃO DAS OTUs NAS AMOSTRAS ANALISADAS

A **Tabela 05** (em anexo) mostra os dados das quatro bibliotecas analisadas, na qual pode ser observada quais amostras apresentaram maior número de sequências. Além disso, nela também é possível avaliar a OTU mais representativa em cada biblioteca e a quantidade de sequências que cada OTU apresentam por amostra.

As **Figuras de 1 a 5**, a seguir, demonstram a distribuição das OTUs por amostra de acordo com as bibliotecas analisadas.

As amostras que apresentaram maior riqueza de OTUs foram a Port1_pf e Bras1_0,22 (17 OTUs) e as amostras Bras_11, Bras2_pf e Bras3_pf (4 OTUs) foram as menos representativas. As OTU_5 e OTU_0 foram as mais frequentes, estando em 32 e 31 das amostras analisadas respectivamente (**Figura 02**).

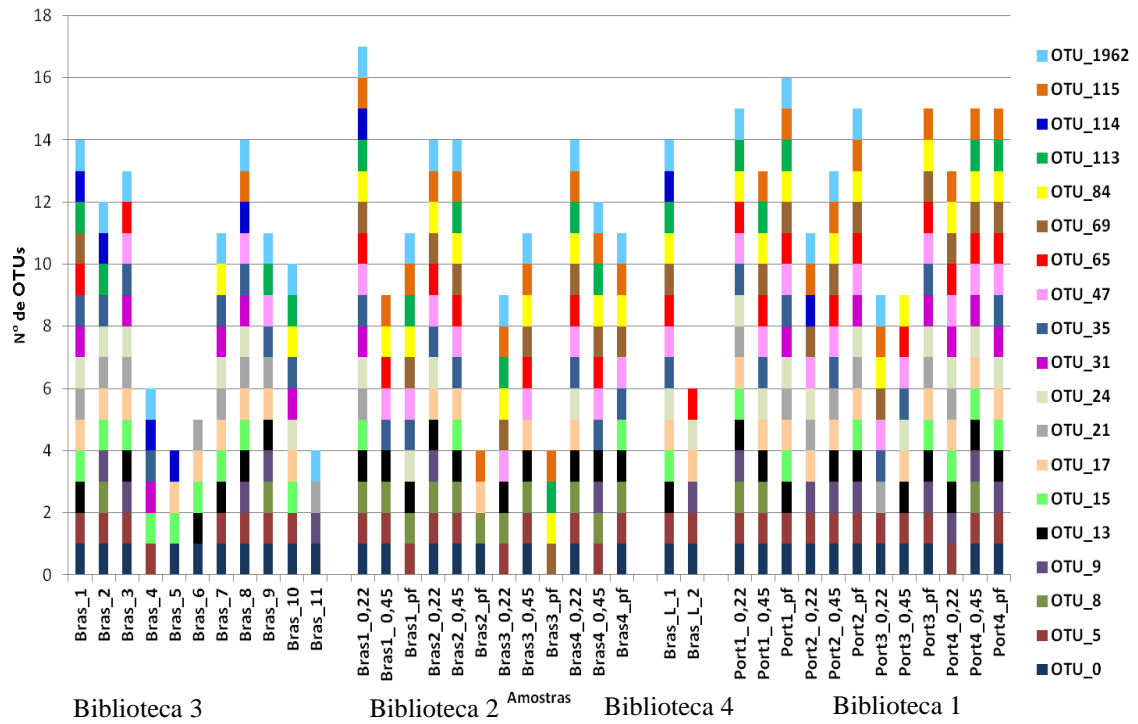


Figura 02: Distribuição das OTUs em todas as amostras.

Na análise da biblioteca_1 observa-se que as OTUs_5 e 47 estão presentes em todas as amostras e a OTU_114 está em apenas uma. As amostras Port1_pf, Port1_0,22 e Port4_pf foram as mais diversas, estando presentes em 17 e 16 OTUs respectivamente (**Figura 03**).

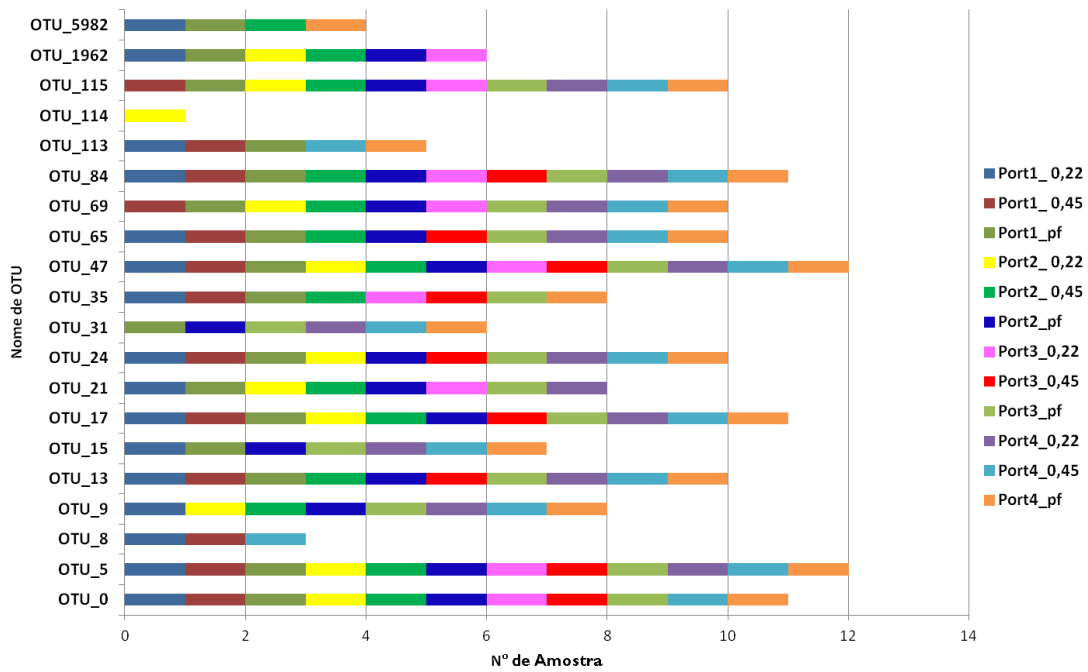


Figura 03: Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_1.

A **Figura 04** mostra que a OTU_115 foi a mais frequente nas amostras da biblioteca_2 e as menos frequentes foram as OTUs 21,31 e 114 estando presente em apenas uma única amostra (Bras1_0,22) sendo esta, a amostra mais diversa contendo 17 OTUs.

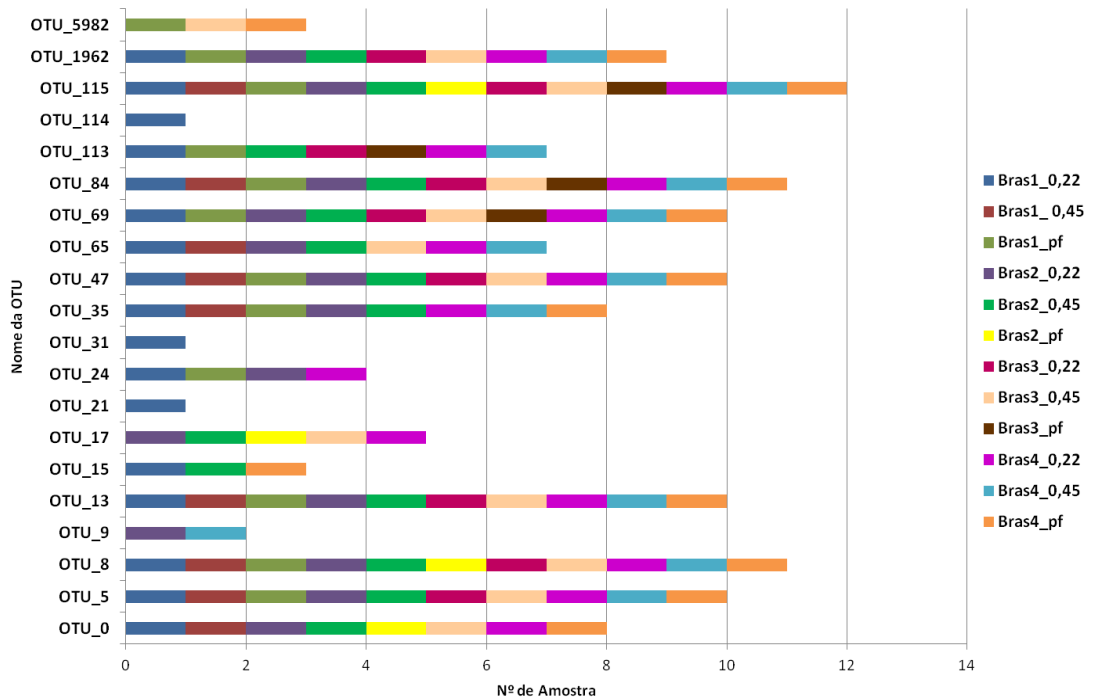


Figura 04: Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_2.

Quanto à distribuição das OTUs nas amostras da biblioteca_3 pode ser observado que a OTU_0 foi a mais predominante presente em 10 amostras e as OTUs 69 e 115 estavam apenas nas amostras Bras_1 e Bras_8 respectivamente. A amostra a Bras_1 foi a que apresentou mais diversidade contendo 15 OTUs (**Figura 05**).

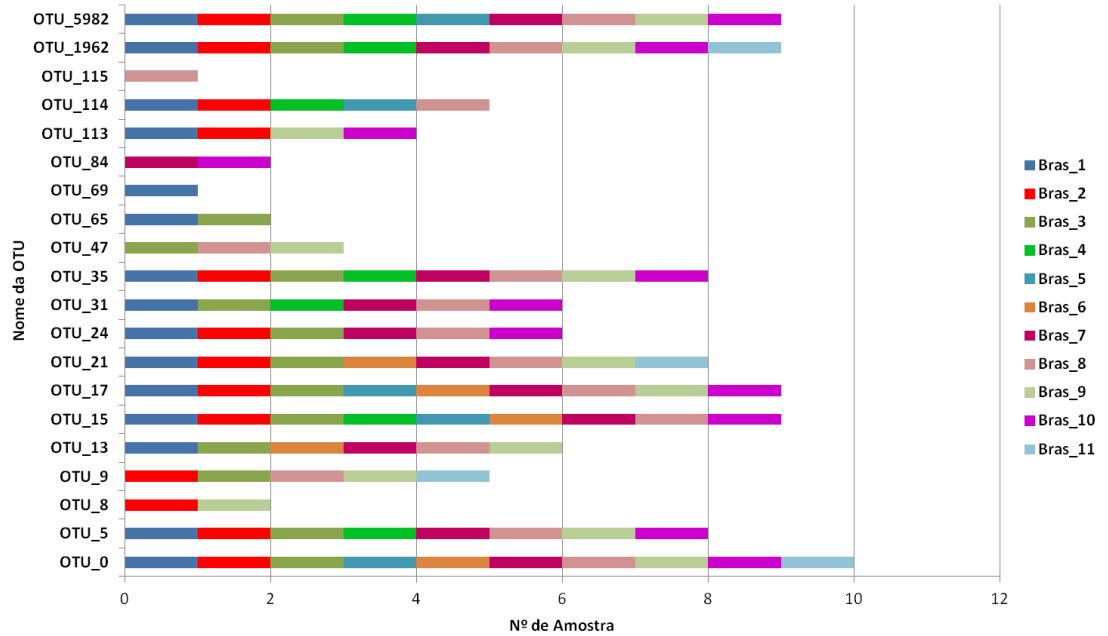


Figura 05: Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_3.

As amostras da biblioteca_4 compartilham apenas cinco OTUs as demais OTUs das 16 identificadas estavam presentes em apenas uma amostra cada uma (**Figura 06**).

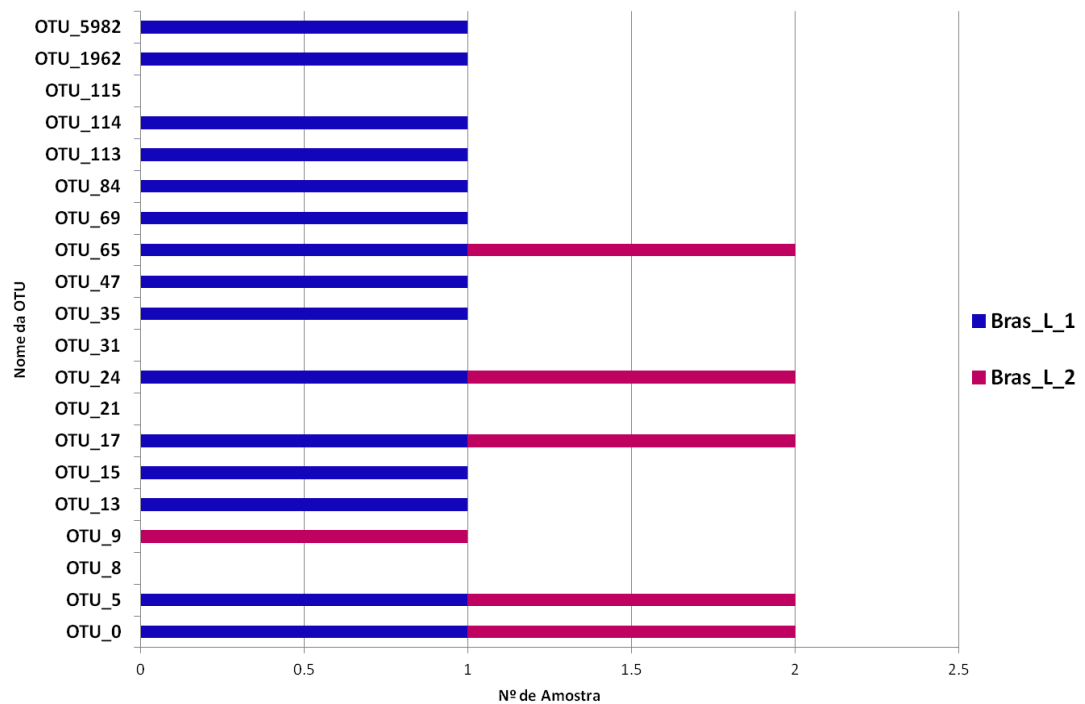


Figura 06: Distribuição das 20 OTUs mais frequentes nas amostras da biblioteca_4.

3.3. PERFIL TAXONÔMICO DAS OTUS

A classificação taxonômica das OTUs foi realizada a partir do resultado das comparações das sequências parciais da região 16S rRNA, obtidas das amostras das quatro bibliotecas analisadas com as amostras depositadas no banco de dados de sequências de 16S rRNA RDP II pelo programa *Classifier*. Pôde-se identificar que todas as sequências pertencem ao Domínio *Bactéria* com 100% de confiança, e que a identificação de apenas 11 OTUs feita até nível de gênero, as demais não foram possíveis realizar a classificação total da ordem, família e gênero mostra a **Tabela 06** (em anexo).

Quanto à classificação dos filos, identificaram-se os filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*. De acordo com a **Figura 07**, o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante estando presente em 16 OTUs e os demais estavam presentes apenas em uma OTU cada.

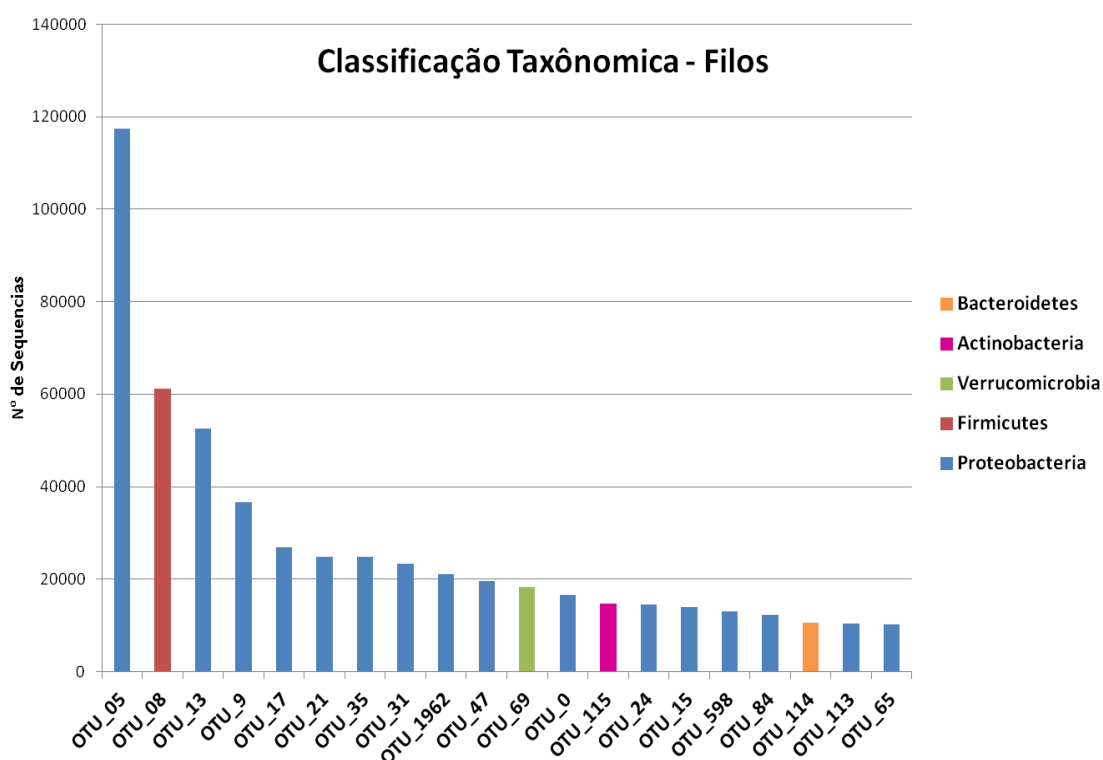


Figura 07: Classificação taxonômica do Filo nas OTUs

Foram identificadas as Classes *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Spartobacteria*, *Sphingobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* sendo as mais abundantes às últimas três classes pertencentes ao filo *Proteobacteria*.

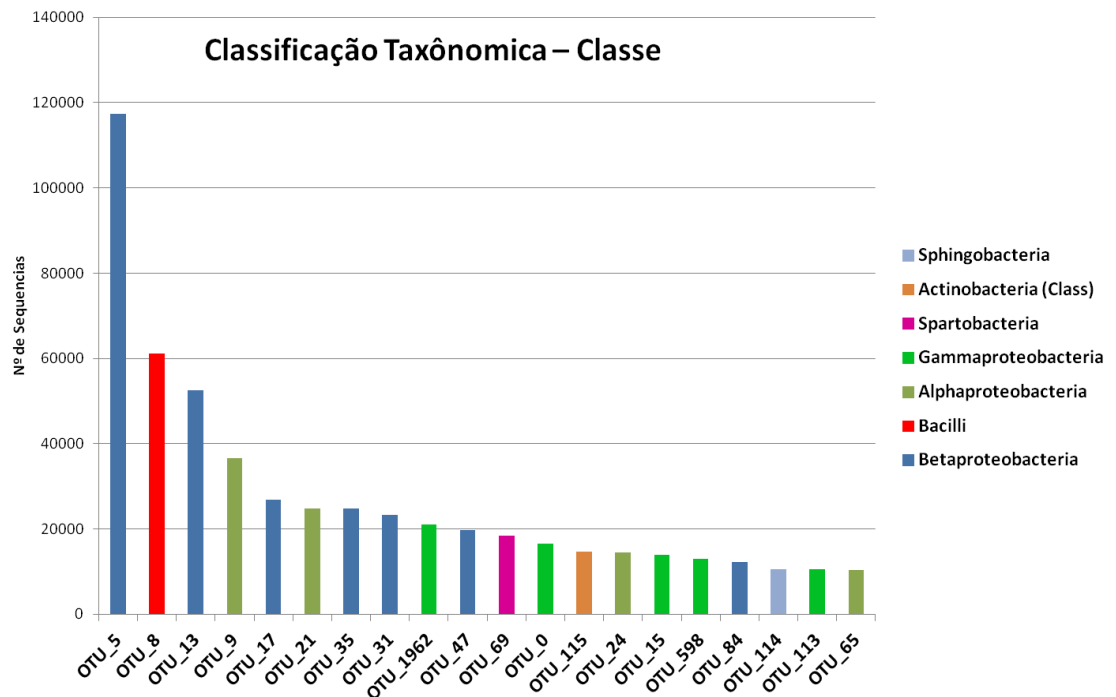


Figura 08: Classificação taxonômica das Classes nas OTUs.

Das 20 OTUs analisadas, apenas duas não tiveram a Ordem identificadas; das demais identificou-se as ordens *Bacillales*, *Chthoniobacterales*, *Enterobacterales*, *Frankiales*, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Spingobacteriales* e a mais abundante *Burkholderiales* em sete OTUs, como mostra a **Figura 09**.

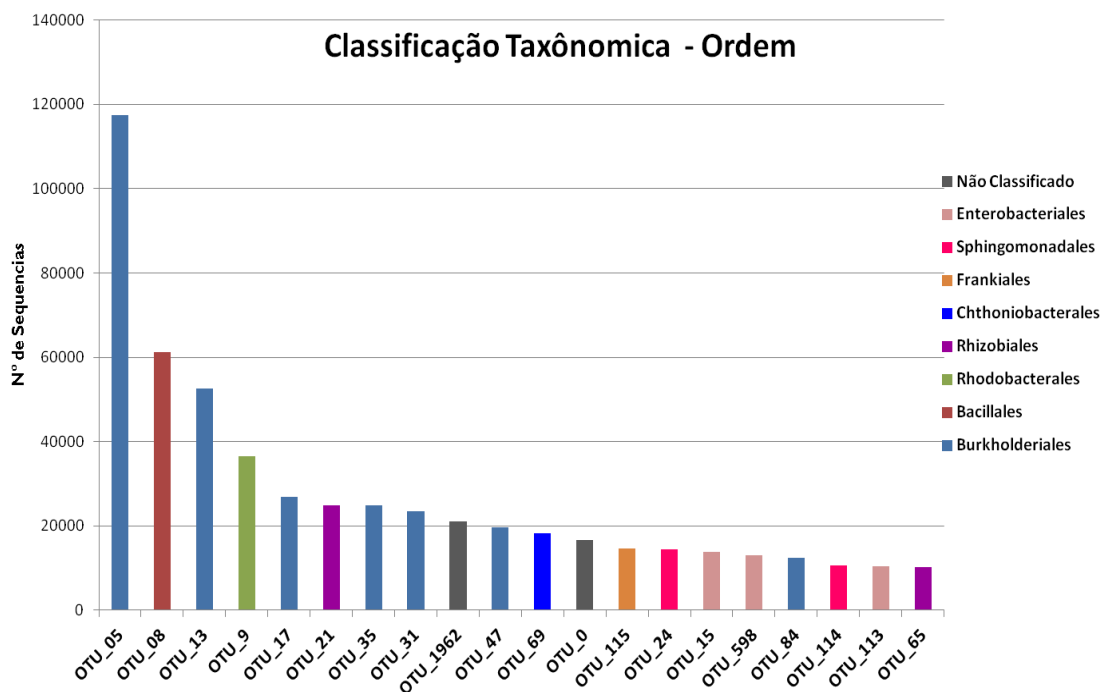


Figura 09: Classificação taxonômica da Ordem nas OTUs.

Foram identificadas as Famílias *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *FukuN18*, *Methylobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Sporichthyaceae* (**Figura 10**). Entretanto, não foi possível identificar a que família pertenciam duas OTUs.

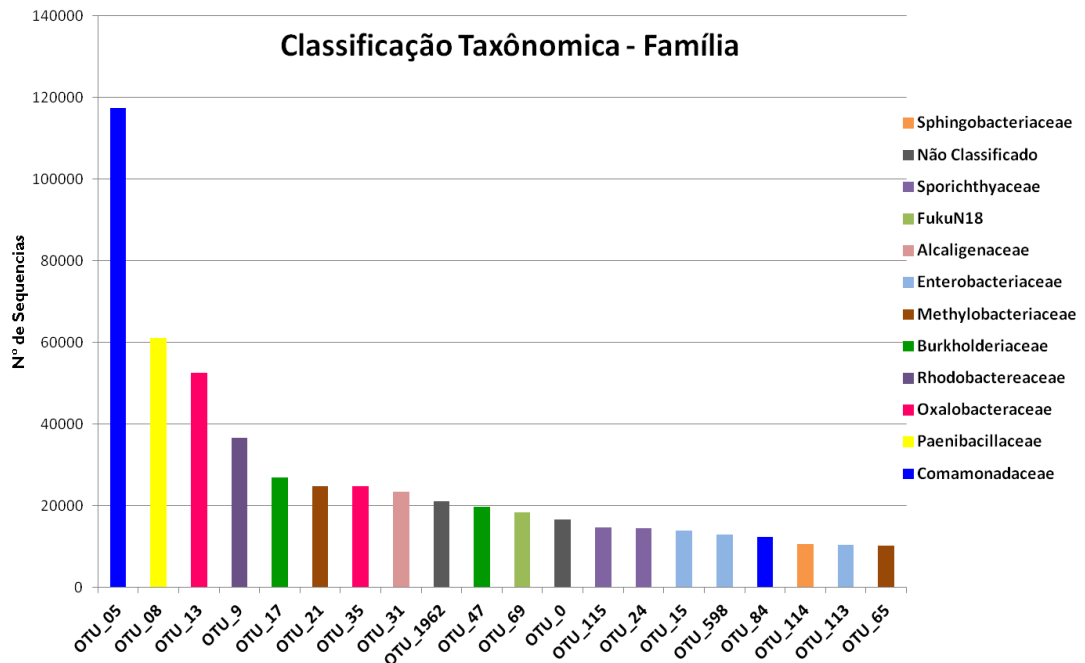


Figura 10: Classificação taxonômica da Família nas OTUs.

As análises taxonômicas das sequências obtidas demonstraram que foram identificados 11 diferentes gêneros sendo eles, *Cuvibacter* com 117.384 sequências, *Paenibacillus* com 61.203, *Undibacterium* com 52.571, *Burkholderia* com 26.882, *Methylobacterium* com 24.882, *Polynucleobacter* com 19.672, *Freshwater group* com 18.334, *HGCL clade* com 14.624, *Serratia* com 13.833, *Limnohabitans* com 12.326 e o *Sphingobacterium* com 10.517 sequências que corresponderam à identificação de 11 OTUs e 172.406 sequências não foram classificadas em nenhum gênero que corresponderam a nove OTUs não classificadas (**Figura 11**).

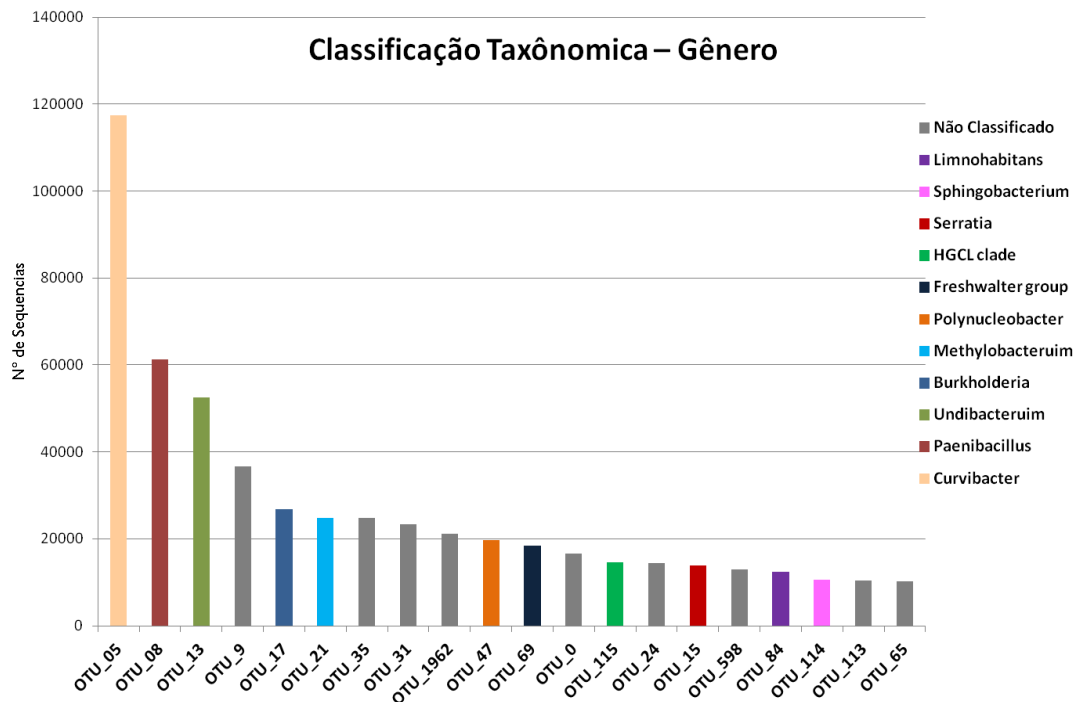


Figura 11. Classificação taxonômica do Gênero nas OTUs.

4. DISCUSSÃO

Ambientes de águas doces fornecem habitats para uma grande variedade de organismos incluindo bactérias, protozoários, fungos, vários grupos de insetos e entre outros (LEWINSOHN, 2005). Embora as comunidades microbianas associadas a esses ambientes constituam a base das cadeias alimentares principalmente de invertebrados que passam parte do seu ciclo de vida no ambiente aquático, como coleópteras, dípteras e muitos outros organismos, elas ainda são pouco estudadas e o seu conhecimento permanece escasso (PERCENT et al., 2008).

Além disso, salienta-se quanto à escassez de estudos que comprovem a presença destes micro-organismos em larvas de anofelinos, que são mosquitos de grande importância para a saúde pública. Ressaltando desta forma, a importância do conhecimento da biodiversidade de bactérias deste ambiente apresentada por este trabalho. No qual os resultados do sequenciamento das quatro bibliotecas analisadas demonstraram a eficácia da metodologia utilizada neste trabalho, gerando um total de 827.842 sequências.

As bibliotecas 1 e 2 construídas a partir das amostras de DNA metagenômico extraídos das membranas e papel de filtro geraram respectivamente 373.611 e 152.721 sequências, a biblioteca 3 a partir do DNA obtido das bactérias cultivadas em placas Petri

gerou 244.180 sequências e a biblioteca 4 constituída a partir do DNA metagenômico obtido das amostras pool de larvas gerou 57.721 sequências. Todas as 827.842 sequências obtidas foram agrupadas em 6.714 OTUs.

O ambiente aquático, apresentou grande diversidade microbiana, assim como as amostras de larvas, mesmo apesar de serem amostras de apenas 2 pools. A biblioteca 1 apresentou maior riqueza de sequências quando comparadas com as demais. Inesperadamente as amostras de organismos cultiváveis da biblioteca 3 apresentaram mais sequências do que as da biblioteca 2 e ambas as bibliotecas tem origem do mesmo local de coleta. A possível explicação para este resultado é, que estes micro-organismos foram cultivados em meio de cultura específico que propiciou o desenvolvimento acelerado das colônias bacterianas, resultando na obtenção de um maior número de sequências das amostras desta biblioteca.

A riqueza de bactérias obtida nas bibliotecas analisadas já era esperada, uma vez que estudos realizados com este enfoque demonstram que existe uma grande biodiversidade microbiana associada a todas as fases do ciclo de vida dos mosquitos e estas são obtidas principalmente do seu habitat aquático. Duguma et al. (2013), investigou a biodiversidade microbiana de bactérias presente em larvas, na água de seus criadouros naturais e no intestino médio de adultos do *Culex tarsalis*. A partir da análise do DNA metagenômico de 60 amostras (20 de água, 20 larvas e 20 de mosquitos adultos) por meio do sequenciamento da região *16S* rDNA, obteve um total de 12.177.876 sequências agrupadas em 123.814 UTOs.

Quanto á identificação do perfil taxonômico de OTUs bacteriana pode se observar que o conhecimento da diversidade microbiana expandiu-se rapidamente devido principalmente ao sequenciamento do *16S* rDNA, por meio dos novos métodos de sequenciamento de nova geração. Atualmente, com base nas sequências *16S* rDNA, o domínio *Bactéria*, é composto de 52 filos, destes apenas 26 tem origem de micro-organismos cultiváveis e os demais são de origem não cultiváveis ou de difícil cultivo (RAPPE & GIOVANNONI, 2003). Alguns destes filos consistem em uma única ou algumas poucas espécies descritas, como os filos *Bacteriodetes* e *Verrucomicrobia*, enquanto outros, como *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* incluem milhares de espécies, as quais correspondem a 95% de todas as espécies de bactérias conhecidas (NUNES, 2006).

As análises taxonômicas das OTUs obtidas neste trabalho demonstraram que os cinco filos bacterianos (*Actinobacteria*, *Bacteriodetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*) encontradas nas larvas de *A. darlingi* e no seu habitat aquático estão intimamente associados aos diferentes estágios de vida dos Anofelinos, como descrito pela literatura.

Neste trabalho, o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante estando presente em 80% das 20 OTUs analisadas (16 OTUs), deste foram identificadas as classes *Betaproteobacteria* em 35% (7 OTUs), *Gammaproteobacteria* em 25% (5 OTUs) e *Alphaproteobacteria* em 20% (4 OTUs). As demais classes e seus respectivos filos, encontrados em menores proporções foram: a classe *Actinobacteria* do filo *Actinobacteria*, *Bacilli* do filo *Firmicutes*, *Spartobacteria* do filo *Verrucomicrobia* e a classe *Sphingobacteria* do filo *Bacteroidetes* presentes em apenas 5% das OTUs (1 OTU) cada um.

Dados semelhantes foram descritos por Gimonneau et al. (2014), os quais identificaram que 97% da diversidade microbiana presentes nas larvas de *A. coluzzii* e *A. gambiae* pertenciam aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, e as principais classes foram: *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidia* e *Actinobacteria*. Investigações da microbiota bacteriana associadas a mosquitos da família *Culicidae* identificou que os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* são predominantemente encontrados no intestino médio de mosquitos adultos do gênero *Anopheles* (ZOUACHE et al., 2011; SHARMA et al., 2014).

Wang et al. (2011), caracterizaram comunidades bacterianas de amostras de larvas, pupas, adultos de *A. gambiae* e águas de seus criadouros naturais no Quênia, por meio do pirosequenciamento da região *16S* rDNA. Seus resultados mostraram que amostras de água tiveram uma maior diversidade de espécies apresentando um maior número de OTUs quando comparados com as amostras dos diferentes estágios de vida do *A. gambiae*. Os filos *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* juntos constituíram 99,9% das comunidades bacterianas identificadas em todas OTUs analisadas independente da origem da amostra.

Quanto ao filo *Verrucomicrobia*, foi encontrado o trabalho realizado por Duguma et al. (2013) identificaram a presença deste filo no habitat natural de larvas de *Culex tarsalis*. Entretanto, este filo é frequentemente encontrados em bibliotecas de genes de *16S* rDNA de amostras ambientais por meio da análise metagenômica, a partir de uma variedade de ecossistemas, incluindo principalmente ambientes terrestres e aquáticos (DERRIEN, et al., 2008; VAN-PASSEL et al., 2011) o que confere com o encontrado neste trabalho, cujas as amostras eram de origem aquática ou associada as larvas, enquanto que foi detectada uma única amostra nas placas de cultura, indicando o difícil cultivo destas.

Segundo Zwart et al. (1998) e Nishimura & Nagata, (2007), bactérias do filo *Verrucomicrobia* são predominantemente encontrados em ambientes de água doce. Além disso, também vale ressaltar que os filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*

também são predominantes em habitats de água doce (TANAKA et al., 2009; OKAFOR, 2011). Fato este, que justifica a presença abundante destes filos tanto nas amostras de água quanto nas amostras de larvas analisadas por esse trabalho.

Minard et al. (2013), salientam que deve-se considerar os fatores ambientais os quais afetam diretamente a carga e composição de bactérias nos insetos. Sobretudo, a complexidade de tal ecossistema que em parte, explica algumas das conclusões dos poucos estudos existentes sobre o papel dos fatores ambientais na modulação da composição bacteriana em larvas de mosquitos conforme Rani et al. (2009). Desta forma, neste estudo, examinamos a microbiota bacteriana associada às larvas de *A. darlingi* e o seu habitat na Região Amazônica.

A partir dos resultados das análises taxonômicas a nível de gênero, das OTUs mais representativas encontradas neste trabalho, foram identificados 11 diferentes gêneros bacterianos, sendo eles, *Burkholderia*, *Serratia*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Polynucleobacter*, *Undibacterium*, *Sphingobacterium*, *Curvibacter*, *Freshwater group*, *Hgcl clade* e *Limnohabitans*.

Dentre os gêneros identificados, destacam-se os gêneros *Paenibacillus* e *Serratia* que foram encontrados no intestino médio de diferentes vetores da malária no mundo, tais como *A. arabiensis* em um estudo realizado na Zâmbia (CIRIMOTICH et al., 2011), *A. stephensi* em estudos na Índia (RANI et al., 2009), *A. albimanus* no México (GONZALEZ-CERON et al., 2003), *A. gambiae* no Quênia (LINDH et al., 2005) e em *A. darlingi* no Brasil (TERENIUS, et al., 2008). Salienta-se que segundo Geetha et al. (2010), Minard et al. (2013) e Wang & Jacobs-Lorena, (2013), esses dois gêneros apresentam um alto potencial como agentes de controle biológico de diferentes populações de mosquitos.

Sharma et al. (2008), identificaram 36 gêneros bacterianos presentes tanto nas glândulas salivares como no sistema digestivo do *A. culicifacies*, o qual verificou que o gênero *Methylobacterium* foi predominante em ambas as amostras.

Bactérias do gênero *Sphingobacterium* são isoladas geralmente a partir de diferentes ambientes, principalmente em amostras de solos e fontes de água (AYDO et al., 2006). Entretanto, Lindh et al. (2007), isolaram o gênero *Sphingobacterium* de amostras de mosquitos adultos de *A. gambiae*.

O gênero *Burkholderia* foi identificado por Boissière et al. (2012), no intestino médio de mosquitos selvagens de *A. gambiae*. Este gênero destaca-se por ser um simbiote benéfico que protege o inseto de fungos entomopatogênicos (SANTOS et al., 2004; KIKUCHI et al., 2007). Além disso, segundo Minard et al. (2013), alguns estudos demonstraram uma ligação entre a presença deste gênero em insetos hospedeiros e sua capacidade de degradar algumas

moléculas de inseticidas. Este gênero também foi um dos mais abundantes, encontrados em todas as bibliotecas analisadas, sendo o quinto mais frequente neste trabalho 4,9% (26.882 sequências). A presença no ambiente aquático e nas larvas sugere uma colonização horizontal, que deve ser melhor investigada para saber se existe a perduração desta, em todo o ciclo de vida do *A. darlingi*.

Dada et al. (2014) observaram que o gênero *Polynucleobacter* foi encontrado em maior abundância em amostras de água de criadouros de *Aedes aegypti* do que em amostras de larvas de 4º estágio na Tailândia.. Eles inferem que esse resultado foi devido, ao fato da flora bacteriana larval ser estabelecida principalmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento larval através da alimentação. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Dada et al. (2014), no qual este gênero foi identificado em quase todas as amostras aquáticas (19.660 sequências) por nós analisadas, nove relacionadas a apenas um pool das larvas e três das placas de cultivo. Porém discordamos que esta baixa frequência seja devido ao fato que a flora bacteriana é estabelecida nos estágios iniciais do desenvolvimento larval, pois se assim fosse, esse gênero seria frequente também no 4º estágio larval, por isso inferimos que deve haver um mecanismo de defesa das larvas que impedem a colonização por este gênero, além delas serem provavelmente de difícil cultivo.

Os gêneros *HgcI clade* e *Limnohabitans*, abundantes em amostras de água doce, são considerados gêneros não cultiváveis (SUN et al., 2014) o que confere com os dados obtidos nesta pesquisa, onde quase 100 % das amostras aquática tinha os dois grupos e *HgcI clade* não estava presente nos pools de larvas. Kasalicky et al. (2013), sugeriram que *Limnohabitans* têm um papel de destaque nas comunidades de bacterioplâncton de água doce, por causa de suas altas taxas de absorção de substrato e crescimento associado às algas, vale ressaltar que esta bactéria foi encontrada nas amostras de membranas de 0,22 µM, o que indica que ela é de vida livre.

Undibacterium e *Curvibacter* são gêneros que foram descritos recentemente como predominantes em ambientes de água doce (DING & YOKOTA, 2010; KAMPFER et al., 2007) e por apresentarem espécies de difícil cultivo. Porém estes foram encontrados em todas as bibliotecas analisadas neste trabalho, sendo o último, o gênero que apresentou o maior número de sequências das 20 OTUs mais frequentes 21,6% (com 117.384 sequências). Entretanto, não foi encontrada na literatura pesquisada qualquer associação destes gêneros com Anofelinos ou ao seu habitat aquático, sendo este dado inédito em estudos com o enfoque de identificar as bactérias associadas a mosquitos do gênero *Anopheles* e ao seu habitat aquático.

Desta forma, considerando os dados publicados sobre a microbiota bacteriana associada a mosquitos com os dados encontrados neste trabalho, corroboram com a afirmação que de que a diversidade bacteriana presente nos diferentes estágios de vida dos mosquitos é abundante e estas são adquiridas principalmente a partir do habitat aquático, durante a fase imatura pela alimentação larval por meio de filtração.

Vale ressaltar que a elaboração de um perfil taxonômico de amostras ambientais não é uma tarefa fácil, pois apesar dos grandes avanços obtidos no número de sequências genômicas completas, disponíveis nos bancos de dados utilizados para caracterização e afiliação taxonômica das sequências, tais como o NCBI (BLAST) e o RDP (*classifier*), mostram-se, ainda, insuficientes na cobertura total da diversidade procariótica de ambientes naturais inexplorados como a região Amazônica.

CONCLUSÕES

A partir das análises dos resultados obtidos conclui-se que:

- As larvas de *Anopheles darlingi* e seu habitat aquático abrigam uma rica biodiversidade bacteriana. O sequenciamento da região 16S rRNA de 37 amostras provenientes de larvas de 4º estágio e de água de criadouros de *Anopheles darlingi*, gerou 827.842 sequências que foram agrupadas em 6.714 OTUs bacterianas.
- As análises taxonômicas das 20 OTUs mais representativas, possibilitaram a identificação de 11 gêneros, 11 famílias, 8 ordens, 7 classes pertencentes aos filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Proteobacteria*, sendo este último o mais predominante, estando presente em 80% das OTUs analisadas.
- Das 20 OTUs mais frequentes encontradas neste estudo quatro OTUs estão ausentes nas amostras de larvas.

REFERÊNCIAS

- AYDOA.N.M; YUMUK, Z; DÜNDAR, V; ARISOY, E.S. *Sphingobacterium multivorum* septicemia in an infant: Report of a case and review of the literature. *Türk Mikrobiyol*, v. 36, n.345, p.36-44, 2006.
- BOISSIÈRE, A; TCHIOFFO, M.T; BACHAR, D; ABATE, L; MARIE, A; NSANGO, S.E; SHAHBAZKIA, H.R; AWONO-AMBENE, P.H; LEVASHINA, E.A; CHRISTEN, R;

- MORLAIS, I. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. ***PLoS Pathoge***, v. 8, n.8, p.1-11, 2012.
- CIRIMOTICH, C.M; DONG, Y; CLAYTON, A.M; SANDIFORD, S.L SOUZA-NETO, J.A; MULENGA, M; DIMOPOULOS, G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. ***Science***, v.332, n.321, p. 855-858, 2011.
- COLE, J. R., B; CHAI, R. J; FARRIS, Q; WANG, S. A; KULAM, D. M; MCGARRELL, G. M; GARRITY, J. M; TIEDJE. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high throughput rRNA analysis. ***Nucleic Acids Research***, v. 33, n. 96, p.1-18, 2005.
- CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R. L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 228p.1994.
- DADA, N; JUMAS-BILAK, J; MANGUIN, S; SEIDU, R; STENSTRÖM, T.A; OVERGAARD, H.J. Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. ***Parasites & Vectors***, v.7, n.319, p. 1-12, 2014.
- DERRIEN, M. M. C; COLLADO, K; BEN-AMOR, S; SALMINEN, W. M. The mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. ***Applied Environmental Microbiology***, v.78, n.74, p.1646–1648, 2008.
- DING, L.X; YOKOTA, A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water. ***The Journal of General and Applied Microbiology***, v.56, n.32, p. 267–271, 2010
- DONG, Y; S. A; KULAM, D. M; MCGARRELL, G. M; GARRITY. Engineered anopheles immunity to *Plasmodium* infection. ***PLoS Pathoge***. v.3, n.5, p.1-12, 2014.
- DUGUMA, G.; RUGMAN-JONES, P; KAUFMAN, M.G; HALL, M.W; NEUFELD, J.D; WALTON, W.E. Bacterial Communities Associated with *Culex* Mosquito Larvae and Two Emergent Aquatic Plants of Bioremediation Importance. ***Plos One***, v.8, n.8, p. 1-11, 2013.
- ENGEL, P; MORAN, N.A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. ***FEMS Microbiology Reviews***, v.37, n.1, p. 699-735, 2013.
- FARAN, M. E. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. ***Contributions of the American Entomological Institute***, v.15, n.7, p.1–215, 1980.
- FARAN, M. E.; LINTHICUM, K. J. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). ***Mosquito Systematics***, v.13, n.1, p. 1-81, 1981.
- FAVIA, G; RICCI, I; DAMIANI, C; RADDADI, N; CROTTI, E; MARZORATI, M. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v.104, n.21, p.23- 34, 2007.
- GARRITY G M, BELL J A, LILBURN T G. Taxonomic Outline of Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Rel. 5.0. Springer-Verlag. 2004.

GEETHA, I., MANONMANI, A.M., PAILY, K.P. Identification and characterization of a mosquito pupicidal metabolite of a *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, n.23, p. 1737–1744, 2010.

GIMONNEAU, G; TCHIOFFO, M.T; ABATE, L; BOISSIÈRE, A; AWONO-AMBÉNÉ, P.H; NSANGO, S.E; CHRISTEN, R; MORLAIS, S. Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. *Infection, Genetics and Evolution*, v.28, n.28, p.715-724, 2014.

GONZALEZ-CERON L, SANTILLAN F, RODRIGUEZ MH, MENDEZ D, HERNANDEZ-AVILA JE. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *Journal of Medical Entomology*, v.3, n.1, p. 371-374. 2003.

GOOD, I. J. **The population frequencies of species and the estimation of population parameters.** Biometrika, 1953.

HANDELSMAN, J; RONDON, M.R; BRADY, S.F; CLARDY, J; GOODMAN, R.M. Molecular Biological Access to the Chemistry of Unknown Soil Microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, v. 5, n. 1, p. 245-249.1998.

ITURBE-ORMAETXE, I; WALKER, T; O' NEILL, S.L. Wolbachia and the Biological Control of Mosquito-Borne Disease. *EMBO Reports*, v. 12, n. 6, p. 508–518. 2011.

KAMPFER, P; ROSSELLO, R; HERMANSSON, M; PERSSON, M; HUBER, B; FALSEN, E; JU, A.H; BUSSE, R. *Undibacterium pigrum* gen. nov., sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, n.2, p. 1510-1515, 2007.

KASALICKY, V; JEZBERA, J; HAHN, M.W; SIMEK, K.S. The Diversity of the *Limnohabitans* Genus, an Important Group of Freshwater Bacterioplankton, by Characterization of 35 Isolated Strains. *Plos One* , v.8, n.3, p.1-13, 2013.

KIKUCHI Y, HOSOKAWA T, FUKATSU T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, n. 1, p. 4308–4316, 2007.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175. 1991.

LINDH, J.M; TERENIUS, O; FAYE, I. 16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* Sensu Lato and *A. funestus* Mosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 7217–7223. 2005.

LINDH, J.M; TERENIUS, O; FAYE, I. The tsetse fly *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossina) harbours a surprising diversity of bacteria other than symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 7217–7223. 2007.

MINARD, G; MAVINGUI, P; MORO, C.V. Diversidade e Função da Microbiota Bacteriana no Holobiont Mosquito. *Parasitas e Vetores*, v, 6, n. 146, p. 2-12. 2013.

OKAFOR, N. Ecology of microorganisms in freshwater. *Environ Microbiol Aquatic Wastes Systems*, v.12, p. 111-122, 2011.

PIDIYAR, V.J; JANGID, K; PATOLE, M.S; SHOUCHE, Y.S. Studies on Cultured and Uncultured Microbiota of Wild Culex *Quinque fasciatus* Mosquito Midgut Based on 16s Ribosomal RNA Gene Analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 14, p. 597–603. 2004.

RANI A; SHARMA A; RAJAGOPAL R; ADAK T; BHATNAGAR R. K. Bacterial Diversity Analysis of Larvae and Adult Midgut Microflora Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods in Lab-Reared and Field-Collected *Anopheles stephensi* - an Asian Malarial Vector. *BMC Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 96-106. 2009.

RAPPÉ MS, GIOVANNONI SJ. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 369–394. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.

SANTOS, A.V; DILLON, R.J; DILLON, V.M; REYNOLDS, S.E; SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia sp.* in colonies of the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, n.123, p. 319–323, 2004.

SHARMA, P; SHARMA, S; MAURYA, R.P; DE, T.D; THOMAS, T; LATA, S; SINGH, N; PANDEY, K.D; VALECHA, K; DIXIT, R. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 235, p. 1-7, 2014.

SMITH, R.C; CHRISTOPHER K; JASON L. R; JACOBS-LORENA, M. Transgenic Mosquitoes Expressing a Phospholipase A₂ Gene Have a Fitness Advantage When Fed *Plasmodium falciparum*-Infected Blood. *PLoS One*, v.8, n.10, p.1-11, 2013.

STEMMER, W.P.C; et al. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, v. 370, n. 6488, p. 389-391, 1994.

SUN, J; LI, G; WANG, C; JING, Y; ZHU, Y; ZHANG, W.Z; LIU, Y. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary Reservoir. *Scientific Reports*, v.4, n. 6966, p. 1-14, 2014.

TADEI, W. P.; DUTARY-THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 42, n.23, p.894- 913, 2000.

TADEI, W. P; THATCHER, B. D; SANTOS, J. M; SCARPASSA, V. M; RODRIGUES, I. B; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian

Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.59, n.1, p.325-335, 1998.

TANAKA, Y; TAMAKI, W; MATSUZAWA, H; NIGAYA, M; MORI, K; KAMAGATA, Y. Microbial Community Analysis in the Roots of Aquatic Plants and Isolation of Novel Microbes Including an Organism of the Candidate Phylum OP10. *Microbes and Environments*, v. 27, n 2, p.149–157, 2009.

TERENIUS, O; OLIVEIRA, C.D; PINHEIRO, W.D; TADEI, W.P; JAMES, A.A; MARINOTTI, O. 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, v.45, n.2, p.172–175, 2008.

TURNER, S; PRYER, K.M; MIAO, V.P.W; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n.1, p.327–338, 1999.

VAN PASSEL, M. W. J., et al. The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS One*, v.6, n.2, p.1343-1364, 2011.

WANG, S; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnol*, v. 31, n.1, p. 185-193, 2013.

WANG, Y; GILBREATH, T.M; KUKUTLA, P; YAN, G; XU, J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS ONE*, v.6, n.6, p.135-145, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World malaria report 2014*. In, World Health Organization. 78p. 2014.

WHITE, T.J; et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, v. 18, p. 315-322, 1990.

ZOUACHE, K; RAHARIMALALA, F.N; RAQUIN, V; TRAN-VAN, V; RAVELOSON, L.H.R; RAVELONANDRO, P; MAVINGUI, P. Bacterial diversity of field caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *BMC Microbiology*, v.75, n. 11, p. 377-389. 2011.

ZWART A, G; HUISMANS, R; AGTERVELD, M.P.V; PEER, Y.V; RIJK, P.D; EENHOORN, H; MUYZER, G; HANNEN, E.V; GONS, W.J; LAANBROEK, H.J. Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 25, n.153, p.159-169, 1998.

ANEXOS

Tabela 05

Distribuição das sequências obtidas das 20 OTUs selecionadas nas amostras das 4 bibliotecas analisadas.

Dados das 20 OTU'S que apresentaram maior número de sequências																					
<i>Biblioteca_1</i>																					
Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de Seq.
<i>Port1_0,22</i>	3343	11311	3	14.354	3684	3	9006	12203	966	0	3654	116	1	0	3	1428	0	0	65	2293	62.433
<i>Port1_0,45</i>	90	12068	0	1	3707	0	58	0	75	0	946	884	2814	328	1976	43	0	333	0	0	23323
<i>Port1_pf</i>	9	10542	0	0	7620	4	5	42	35	5	101	94	102	136	29	47	0	151	12	3	18937
<i>Port2_0,22</i>	4	2	0	5062	0	0	4264	4	1	0	0	2284	0	3950	0	0	1	4529	7	0	20108
<i>Port2_0,45</i>	26	5817	0	16	2308	0	5	60	0	0	353	464	366	994	653	0	0	293	11	1	11367
<i>Port2_pf</i>	2	10587	0	1	5969	1	1	1	24	0	62	69	74	183	17	0	0	115	2	0	17108
<i>Port3_0,22</i>	522	1	0	0	0	0	0	1572	0	0	1	1148	0	1159	1373	0	0	494	1	0	6271
<i>Port3_0,45</i>	497	1542	0	0	78	0	178	0	392	0	87	1755	2830	0	4793	0	0	0	0	0	12152
<i>Port3_pf</i>	2140	4716	0	4545	111	3	2364	4653	4060	1009	1	5252	754	277	66	0	0	1201	0	0	31152
<i>Port4_0,22</i>	0	2373	0	119	620	1	14	110	229	0	404	3271	232	6524	798	0	0	6192	0	0	20887
<i>Port4_0,45</i>	1	4172	1	1	1458	1	0	23	268	0	630	1701	1438	1086	936	8	0	244	0	0	11968
<i>Port4_pf</i>	78	10699	0	146	3489	1	0	743	123	1	303	740	714	1447	66	108	0	36	0	1	18695
Total	6712	73.830	4	24245	29044	14	15895	19411	6173	1015	6542	17778	9325	16084	10710	1634	1	13588	98	2298	254.401
<i>Biblioteca_2</i>																					
Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de Seq.
<i>Bras1_0,22</i>	8	10405	3944	0	7922	3	0	1	37	4	135	179	42	354	30	24	43	110	13	0	23254
<i>Bras1_0,45</i>	43	1160	13617	0	747	0	0	0	0	0	284	279	417	0	385	0	0	154	0	0	17086
<i>Bras1_pf</i>	0	532	3593	0	339	0	0	0	1	0	72	85	0	72	28	16	0	71	12	3	4824
<i>Bras2_0,22</i>	3	15.534	8120	3	10619	0	5	0	45	0	117	147	58	267	39	0	0	173	36	0	35.166

<i>Bras2_0,45</i>	2	6001	9277	0	2764	2	1	0	0	0	356	552	206	909	496	2	0	68	15	0	20651
<i>Bras2_pf</i>	1	0	4192	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	104	0	0	4298
<i>Bras3_0,22</i>	0	149	1723	0	19	0	0	0	0	0	0	143	2	22	27	0	0	45	6	0	2136
<i>Bras3_0,45</i>	3	110	6911	0	12	0	1	0	0	0	0	48	1	35	454	0	0	10	40	5	7630
<i>Bras3_pf</i>	0	0	2438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	3	0	0	30	0	0	2554
<i>Bras4_0,22</i>	1	2474	2518	0	749	0	1	0	3	0	45	131	13	76	14	7	0	54	5	0	6091
<i>Bras4_0,45</i>	0	271	1999	1	207	0	0	0	0	0	80	273	101	233	90	1	0	122	6	0	3384
<i>Bras4_pf</i>	2	12	2860	0	1	16	0	0	0	0	37	45	0	104	44	0	0	94	10	1	3226
Total	63	36648	61.192	4	23379	21	9	1	86	4	1126	1882	840	2155	1610	50	43	1035	143	9	130.300


Biblioteca_3


Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de Seq.	
<i>Bras_1</i>	30	732	0	0	2	12	1	1	1	956	3161	0	1	1	0	1	7459	0	2952	1565	16875	
<i>Bras_2</i>	872	5	1	1	0	48	1	1	22	0	633	0	0	0	0	31	2402	0	9488	6003	19508	
<i>Bras_3</i>	1019	489	2	0	1	20	6	22	2	20.358	48	1	1	0	0	0	0	0	545	40	22.554	
<i>Bras_4</i>	0	1	0	0	0	549	0	0	0	79	12	0	0	0	0	0	40	0	569	383	1633	
<i>Bras_5</i>	20	0	0	0	0	4534	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	4564	
<i>Bras_6</i>	5	0	1	0	0	3856	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3869	
<i>Bras_7</i>	78	869	0	0	134	1309	14	5	2	1	423	0	0	0	4	0	0	0	47	38	2924	
<i>Bras_8</i>	21	267	0	1	3	318	2	2	6036	956	731	1	0	0	0	0	564	1	5799	2378	17080	
<i>Bras_9</i>	5	4412	3	4	4	0	8	8	0	0	11045	1	0	0	0	303	0	0	693	18	16504	
<i>Bras_10</i>	332	15	0	0	0	1609	23	0	6	3	1088	0	0	0	1	1	0	0	671	235	3984	
<i>Bras_11</i>	318	0	0	2033	0	0	0	3140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5492
Total	2700	6790	7	2039	144	12255	68	3180	6069	22.353	17141	3	2	1	5	336	10466	1	20765	10662	114.987	


Biblioteca_4

Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de Seq.
<i>Bras_L_1</i>	231	114	0	0	4	1602	1	0	2	0	5	9	113	94	1	8468	7	0	91	22	10764
<i>Bras_L_2</i>	4	1	0	5432	0	0	10.663	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	16.102
Total	235	115	0	5432	4	1602	10.664	0	3	0	5	9	114	94	1	8468	7	0	91	22	26.866

Total de Sequências das 20 OTU's = 542.959

(Legenda:  OTU com mais sequência por amostras de cada biblioteca.

 OTU com mais sequência por biblioteca.

 Amostras com mais sequências por biblioteca.


 Número total de sequências por Biblioteca.

Tabela 06

Classificação taxonômica das 20 OTUs analisadas.

Classificação Taxonômica das 20 OTU's						
Nome da OTU	Quantidades de Sequências	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
OTU_0	16.599	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	-	-	-
OTU_5	117.384	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter
OTU_8	61.203	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
OTU_9	36.577	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-
OTU_13	52.571	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Undibacterium
OTU_15	13.893	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia
OTU_17	26.882	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
OTU_21	24.882	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium
OTU_24	14.451	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	-	-
OTU_31	23.372	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	-
OTU_35	24.815	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	-
OTU_47	19.672	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Polynucleobacter
OTU_65	10.281	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	-
OTU_69	18.334	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	FukuN18	Freshwater group
OTU_84	12.326	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Limnohabitans
OTU_113	10.488	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-
OTU_114	10.517	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium
OTU_115	14.624	Actinobacteria	Actinobacteria (class)	Frankiales	Sporichthyaceae	Hgci clade
OTU_1962	21.097	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	-	-	-
OTU_5982	12.991	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-

(Legenda: - refere-se a nível taxonômico Não Identificado ou Não classificado).

Tabela 07

Distribuição das 20 OTUs por todas as amostras analisadas.

Quantidades de OTUs por amostras

Biblioteca_1

Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de OTUs por amostras.
<i>Port1_0,22</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	16
<i>Port1_0,45</i>	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	13
<i>Port1_pf</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	17
<i>Port2_0,22</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	11
<i>Port2_0,45</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	14
<i>Port2_pf</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	15
<i>Port3_0,22</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	9
<i>Port3_0,45</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	9
<i>Port3_pf</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	15
<i>Port4_0,22</i>	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	13
<i>Port4_0,45</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	15
<i>Port4_pf</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	16
Total	11	12	3	8	10	7	11	8	10	6	8	12	10	10	11	5	1	10	6	4	163

Biblioteca_2

Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de OTUs por amostras.
<i>Bras1_0,22</i>	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	17
<i>Bras1_0,45</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	9
<i>Bras1_pf</i>	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	12
<i>Bras2_0,22</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	14
<i>Bras2_0,45</i>	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	14

<i>Bras2_pf</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
<i>Bras3_0,22</i>	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	9
<i>Bras3_0,45</i>	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	12
<i>Bras3_pf</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	4
<i>Bras4_0,22</i>	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	14
<i>Bras4_0,45</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	12
<i>Bras4_pf</i>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	12
Total	8	10	11	2	10	3	5	1	4	1	8	10	7	10	11	7	1	12	9	3	144

Biblioteca_3

Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de OTU por amostras
<i>Bras_1</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	15
<i>Bras_2</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	13
<i>Bras_3</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	14
<i>Bras_4</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	7
<i>Bras_5</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5
<i>Bras_6</i>	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Bras_7</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	12
<i>Bras_8</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	15
<i>Bras_9</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	12
<i>Bras_10</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	11
<i>Bras_11</i>	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4
Total	10	8	2	5	6	9	9	8	6	6	8	3	2	1	2	4	5	1	9	9	133

Biblioteca_4

Amostras	OTU_0	OTU_5	OTU_8	OTU_9	OTU_13	OTU_15	OTU_17	OTU_21	OTU_24	OTU_31	OTU_35	OTU_47	OTU_65	OTU_69	OTU_84	OTU_113	OTU_114	OTU_115	OTU_1962	OTU_5982	Total de OTU por amostras
<i>Bras_L_1</i>	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	15
<i>Bras_L_2</i>	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6
Total	2	2	0	1	1	1	2	0	2	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	21