



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS SÃO JOÃO DO PIAUÍ
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA DA CONCEIÇÃO RODRIGUES COELHO

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS DO
SUDESTE DO PIAUÍ COM AÇÃO LARVICIDA PARA *Aedes aegypti*

SÃO JOÃO DO PIAUÍ

2024

MARIA DA CONCEIÇÃO RODRIGUES COELHO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS DO
SUDESTE DO PIAUÍ COM AÇÃO LARVICIDA PARA *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso (artigo científico)
apresentado como exigência parcial para obtenção
do diploma do Curso de Ciências Biológicas do
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Piauí, Campus São João do Piauí.

Orientadora: Profa. Dra. Danyelle Andrade Mota
Coorientador: Prof. Me. Marcelo Leite Dias

SÃO JOÃO DO PIAUÍ

2024

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS DO SUDESTE DO PIAUÍ COM AÇÃO LARVICIDA PARA *Aedes aegypti*

Maria Conceição Rodrigues Coelho¹

Danyelle Andrade Mota²

Marcelo Leite Dias³

RESUMO

O *Aedes aegypti* é atualmente um grande problema de saúde pública, sendo responsável pela disseminação de doenças infecciosas que têm causado epidemias em todo o mundo. Neste contexto, o controle biológico desse vetor surge como uma alternativa eficiente e ambientalmente sustentável em comparação às rotas químicas, e apresenta algumas vantagens ambientais, como biodegradabilidade e baixa ou nenhuma toxicidade ao meio ambiente. Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm apresentado resultados satisfatórios no controle de dípteros, devido à produção de proteínas denominadas Cry e Cyt. Sendo assim, este estudo teve como objetivo isolar, caracterizar e testar a atividade de bactérias Bt de solos do estado do Piauí sobre larvas do *Aedes aegypti*. Os isolados foram obtidos de amostras de solo de nove municípios do sudeste do Piauí e a caracterização e identificação das colônias de *B. thuringiensis* foi baseada em características morfológicas. Bioensaios foram realizados para avaliar a patogenicidade e toxicidade das diferentes cepas de *B. thuringiensis* contra larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti*. As amostras de solos dos 9 municípios da região submetidas ao isolamento de bactérias geraram 421 colônias de bactérias com morfologia macroscópica típica de Bt. Desse total das amostras, 13% das colônias apresentaram a morfologia microscópica semelhante ao Bt e apenas a cepa, oriunda do solo de Ribeira do Piauí, mostrou-se positiva contra a larva do *Aedes aegypti*, com 100% das larvas mortas no período de 32 minutos, com Concentração Letal de 0,035mL. Sendo assim, esses resultados indicam que *Bacillus thuringiensis* é uma alternativa viável e com grande potencial biotecnológico, para o controle de vetores de doenças de importância na saúde pública. No entanto, são necessários estudos, incluindo o sequenciamento genético, para analisar os genes responsáveis pela produção da proteína Cry, o que permitirá uma melhor compreensão do potencial tóxico dessas cepas.

Palavras-chave: dengue, *Bacilo thuringiensis*, controle biológico.

¹ Discente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI - São João do Piauí/PI. casjp.20201s02.15.28@aluno.ifpi.edu.br

² Docente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI - São João do Piauí/PI. danyelle.mota@ifpi.edu.br

³ Docente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI - São João do Piauí/PI. marcelo.dias@ifpi.edu.br

ABSTRACT

Aedes aegypti is currently a major public health problem, being responsible for the spread of infectious diseases that have been causing epidemics worldwide. In this context, the biological control of this vector is an efficient and more sustainable alternative compared to chemical routes, and presents some environmental advantages, such as biodegradability and low or no toxicity to the environment. Bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) have shown satisfactory results in the control of Diptera, due to the production of proteins called Cry and Cyt. Therefore, this study aimed to isolate, characterize and test the activity of *Bt* bacteria from soils in the state of Piauí on *Aedes aegypti* larvae. The isolates were obtained from soil samples from nine municipalities in southeast Piauí, and the characterization and identification of *B. thuringiensis* colonies was based on morphological characteristics. Bioassays were performed to evaluate the pathogenicity and toxicity of the different strains of *B. thuringiensis* against third-instar larvae of *A. aegypti*. The soil samples from the 9 municipalities in the region subjected to bacterial isolation generated 421 bacterial colonies with macroscopic morphology typical of *Bt*. Of the total samples, 13% of the colonies presented microscopic morphology similar to *Bt* and only the strain, originating from the soil of Ribeira do Piauí, was positive against the *Aedes aegypti* larvae, with 100% of the larvae dead within 32 minutes, with a Lethal Concentration of 0.035 mL. Therefore, *Bacillus thuringiensis* is a viable alternative, with biotechnological potential, for controlling vectors of diseases of importance to public health. However, further studies and new experiments are important, including genetic sequencing to analyze the gene responsible for the production of the Cry protein.

Keywords: dengue, *Bacillus thuringiensis*, biological control.

Data de aprovação: 09/09/2024

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, conhecido por abrigar uma das maiores biodiversidades do planeta, (Joly *et al.*, 2019), enfrenta desafios crescentes devido à ocorrência de eventos climáticos extremos, como secas e inundações. Essas mudanças ambientais não apenas reduzem a variedade de espécies, mas também criam condições propícias para a propagação de doenças transmitidas por vetores como *Aedes aegypti* (Barcellos *et al.*, 2024; Lowe *et al.*, 2021; Swei *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um dos principais vetores responsáveis pela transmissão de arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) causadores de doenças como febre amarela urbana, chikungunya, febre Zika, dengue, entre outras, que infectam milhares de pessoas em todo o mundo (Delrieu *et al.*, 2023), representando uma preocupação significativa para a saúde pública no Brasil. Entre essas doenças, a dengue continua sendo a mais alarmante devido à sua alta incidência e capacidade de causar surtos recorrentes.

A dengue é endêmica em mais de 100 países, principalmente nas regiões tropicais, onde as condições climáticas favorecem a proliferação desses mosquitos (OMS, 2012). No Brasil, conforme o Painel de Arboviroses do Ministério da Saúde (2024), até 27 de junho de 2024 foram registrados 6.148.161 casos prováveis de dengue e 4.207 óbitos. No estado do Piauí, de acordo com o boletim epidemiológico da Secretaria de Estado da Saúde do Piauí (Sesapi, 2024), relativo às semanas epidemiológicas 1 a 25 de 2024, incidência de dengue aumentou 105,9% em relação ao mesmo período do ano interior, o que ressalta a necessidade de ações contínuas e efetivas para o controle do vetor.

O vírus da dengue (DENV), transmitido pela picada da fêmea do mosquito *A. aegypti*, é um vírus de RNA pertencente à família Flaviviridae (gênero Flavivirus) que causa a infecção por dengue (Bursali; Simsek, 2023). Possui quatro sorotipos principais (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), que podem causar tanto a forma clássica da doença quanto suas manifestações mais graves (Katzelnick; Bos; Harris, 2020). A maioria das pessoas contaminadas pelo vírus se recupera, porém, parte deles podem progredir para formas graves, inclusive virem a óbito. Fatores econômicos e sociais, como a expansão contínua do desenvolvimento urbano não planejado e movimentos populacionais, contribuíram para a propagação da dengue nos últimos anos.

Nessa perspectiva, o controle químico por meio de inseticidas tem sido amplamente utilizado para reduzir a população de mosquitos, consequentemente, prevenir a disseminação da dengue (Pliego-Pliego *et al.*, 2020). No entanto, devido à sua aplicação contínua desses produtos, que são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, tem levado sérios problemas ambientais, como a poluição ambiental, contaminação de alimentos, mortalidade de organismos não-alvo e seleção de insetos naturalmente resistentes (Rocha *et al.*, 2021). Dadas essas desvantagens, há uma clara necessidade de investigação de métodos mais eficazes e ecologicamente seguros para o controle desses vetores.

Neste contexto, entre as alternativas mais sustentáveis, biodegradáveis e que minimizem danos ao ambiente e a saúde humana, destacam-se o uso de óleos essenciais (Santos *et al.*, 2020) e/ou microrganismos (Katak *et al.*, 2023; Šunjka; Mechora, 2022). O controle biológico deste vetor é uma alternativa eficiente e mais sustentável em comparação às rotas químicas. A identificação, isolamento e caracterização de microrganismos ambientais, juntamente com seus metabólitos que apresentam atividades entomopatogênicas, têm emergido como opções promissoras. Estes microrganismos podem incluir fungos, protozoários e bactérias, cada um com mecanismos específicos para o controle eficaz de pragas (Katak *et al.*, 2023; Šunjka; Mechora, 2022).

Ainda que centenas de cepas bacterianas possam afetar insetos, apenas algumas podem ser usadas de forma efetiva no controle biológico dos vetores que causam doenças tropicais. Dentre os microrganismos entomopatogênicos, utilizados como princípio ativo na produção de bioinseticidas, destaca-se a bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt), pertencente à

família Bacillaceae (Fatima *et al.*, 2023; Vargas *et al.*, 2022). Essa bactéria tem a capacidade de produzir, durante o processo de esporulação, inclusões de cristais inseticidas, na forma de protoxinas, que são formadas por uma variedade de proteínas inseticidas chamadas toxinas Cry ou Cyt. Diferentes variedades dessa espécie produzem diferentes tipos de cristais, altamente específicos para diferentes ordens de insetos. Essas toxinas apresentam ação larvívora para certos ordens de insetos, incluindo Diptera, à qual pertence o *Aedes aegypti*. (Zafar *et al.*, 2022; Jurat-fuentes; Crickmore, 2017).

O modo de ação do *Bacillus thuringiensis* (Bt) ocorre quando a célula-mãe se rompe, liberando o esporo e as inclusões proteicas no ambiente. Se ingeridas por um inseto suscetível, as proteínas Cry e/ou Cyt são solubilizadas e ativadas pelas proteases alcalinas presentes no intestino do inseto. As proteínas Cry se ligam a receptores específicos na membrana apical do intestino médio, enquanto a proteína Cyt interage diretamente com os fosfolípidios insaturados da membrana. A atuação conjunta dessas proteínas resulta na formação de poros e na destabilização da membrana intestinal, causando a morte do inseto por inanição devido à destruição do epitélio intestinal (Šolinc, Anderluh & Podobnik, 2023).

Ademais, em diferentes regiões do mundo, estudos de *B. thuringiensis* têm buscado novas cepas com potencialidades diferentes daquelas atualmente conhecidas para novos genes cry com diferentes efeitos inseticidas (Cunha *et al.*, 2024; Abu El-Ghiet *et al.*, 2023; Bukhari *et al.*, 2022; Aynalem *et al.*, 2021). A grande extensão do Brasil, que possui diferentes regiões com climas distintos, bem como uma grande diversidade de insetos, permite o isolamento de novas linhagens de bactérias entomopatogênicas (De Oliveira *et al.*, 2024; Soares-da-Silva *et al.*, 2022).

Nessa conjuntura, a biodiversidade do estado do Piauí apresenta uma oportunidade promissora para o isolamento de cepas de *B. thuringiensis* destinadas ao biocontrole do *Aedes aegypti*. O estado apresenta diferentes formações florestais, entre as quais se destacam o Cerrado e a Caatinga. O bioma Caatinga abriga uma grande biodiversidade, onde parte dela apresenta espécies endêmicas e pouco conhecida por grande parte da população (Gariglio *et al.*, 2010; de Queiroz *et al.*, 2018). Em adição, apresenta condições climáticas extremas, como solos áridos, alta incidência de radiação solar e temperaturas elevadas (Lima *et al.*, 2020). Esses fatores são selecionados por espécies com adaptações específicas, como bactérias resistentes a ambientes adversos. Logo, as cepas de Bt isoladas nessa região podem conter combinações de toxinas do gene Cry diferentes daquelas atualmente conhecidas.

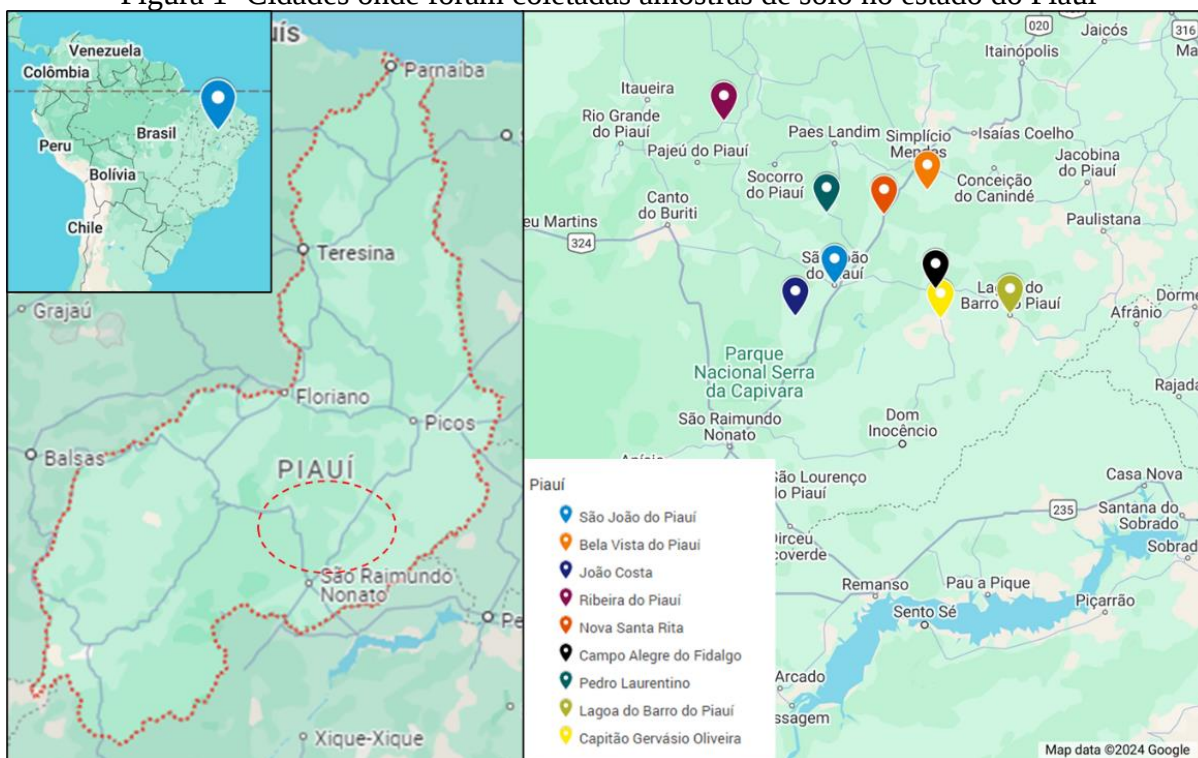
Embora já existam estudos na literatura científica sobre biocontrole de *A. aegypti* com Bt, estes ainda não exploram a diversidade biológica do sudeste do Piauí, que possui um potencial substancial. A busca por novos isolados, principalmente em ambiente biologicamente diverso fornecido, é essencial para a produção de novas combinações de toxinas inseticidas, derivadas dos genes cry e cyt, para o controle de larvas de mosquitos vetores. Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar, caracterizar e testar a atividade de bactérias Bt isoladas de solos do estado do Piauí sobre larvas do *Aedes aegypti*.

2 METODOLOGIA

2.1 LOCAL E COLETA DE SOLO

O georreferenciamento dos locais de coleta de solo foi feito via GPS (*Global Positioning System*) e escolhido entre em nove cidades do sudeste do Estado do Piauí: Campo Alegre do Fidalgo, Capitão Gervásio Oliveira, João Costa, Lagoa do Barro do Piauí, Nova Santa Rita, Pedro Laurentino, Ribeira do Piauí e São João do Piauí (Figura 1). De forma geral, os municípios apresentam um clima semiárido quente, com características de seca e chuvas irregulares. A porção sudeste do estado está sob o domínio da Caatinga, vegetação típica do sertão nordestino.

Figura 1- Cidades onde foram coletadas amostras de solo no estado do Piauí



Fonte: My Maps Google - Autoria própria (2022).

Todas as coletas foram provenientes de solos da caatinga, um bioma que se caracteriza por suas condições ambientais extremas, incluindo um clima semiárido. A coleta foi realizada com o auxílio de uma espátula previamente esterilizada (Figura 2). Inicialmente, removeu-se uma camada de solo de 5 a 10 cm da superfície, seguida pela coleta de uma porção da camada entre 10 a 20 cm. A amostra foi acondicionada em um tubo Falcon de 50 ml esterilizado. Posteriormente, foi transportada em uma caixa de isopor resfriada para o Laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia – Campus de São João do Piauí (IFPI-CASJP), para realização da parte experimental. No laboratório, as amostras de solos foram mantidas a uma temperatura de 4°C até sua utilização.

Figura 2- Coleta de solo



Fonte: Autoria própria (2022).

Nove amostras de solo foram selecionadas para o isolamento de bactérias para representar todas as diferentes áreas de acordo com as características do solo e distribuição de amostragem (Tabela 1).

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de solo, em 2024.

Amostra	Local	Latitude	Longitude	Descrição de Origem do Solo
1	São João do Piauí	8°21'42.2"S	42°15'11.1"W	Plantação de banana-IFPI-CASJP
2	Bela Vista do Piauí	7°58'35.5"S	41°57'31.5"W	Plantação capim-elefante
3	João Costa do Piauí	8°30'39.0"S	42°24'50.0"W	Vegetação nativa
4	Ribeira do Piauí	8°09'13.9"S	42°29'56.4"W	Solo orgânico
5	Capitão Gervásio de Oliveira do Piauí	8°29'03.3"S	41°49'13.8"W	Vegetação nativa
6	Nova Santa Rita do Piauí	8°06'30.6"S	42°03'24.4"W	Vegetação nativa-Rod. Pres. Juscelino Kubitschek
7	Campo Alegre do Fidalgo do Piauí	8°22'50.7"S	41°50'25.5"W	Vegetação nativa- PI-459
8	Pedro Laurentino do Piauí	8°04'05.4"S	42°17'11.0"W	Solo orgânico
9	Lagoa do Barro do Piauí	8°28'15.3"S	41°31'40.6"W	Vegetação nativa- PI-459

Fonte: Autoria própria (2024).

2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DE BACTÉRIA

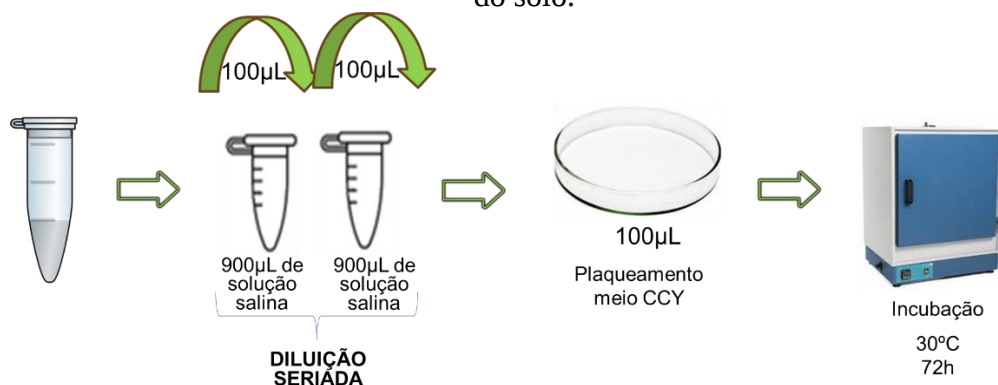
O isolamento das bactérias foi realizado conforme as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1985) e Polanczyk (2004), com adaptações. Inicialmente, 1g de cada amostras de solo selecionado foi adicionada à 10 ml de solução salina (autoclavada 0,85%). A mistura foi submetida a agitação por 40 minutos em incubadora do tipo Shaker com rotação de 200 rpm. Após a agitação, a mistura heterogênea foi submetida a choque térmico em banho-maria a 80°C por 12 minutos, seguida por 5 minutos em banho de gelo a 5 °C, um procedimento para eliminar bactérias não alvo em estado vegetativo (Figura 3).

Figura 3- Representação da etapa inicial para o isolamento e cultivo da bactéria do solo.



Em seguida, realizou-se a diluição seriada onde 100µL da amostra foram adicionadas a 900µL de solução salina em tubos Eppendorf de 2 ml, formando uma amostra diluída em 10^{-2} . A solução diluída foi distribuída em placas de Petri grandes contendo 70 ml de meio CCY (Caseína–Caseína–Levedura) sólido, contendo tampão Fosfato, nutriente Stock, sais CCY, o qual é específico para induzir a esporulação da bactéria *B. thuringiensis*. O procedimento ocorreu em uma bancada esterilizada, próxima à chama de fogo para evitar contaminação. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em uma estufa por 72 horas a 30°C (Figura 4). Vale destacar que as colônias selecionadas como típicas de *Bt* da cultura inicial a partir das características macroscópicas, foram inoculadas em uma nova placa de Petri contendo meio de cultura CCY, até que colônias puras para fossem obtidas a caracterização microscópica.

Figura 4- Representação da diluição seriada, plaqueamento e incubação da bactéria oriunda do solo.



2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Os testes morfológicos, com caracterização macroscópica e microscópica foram realizados para reduzir a quantidade de bactérias para o teste de toxicidade.

2.3.1 Caracterização Macroscópica

Inicialmente, foi realizada caracterização macroscópica para analisar a morfologia das colônias cultivadas em meio de cultura específico para *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), seguido a descrição apresentada por Muniady *et al.* (2011). A partir dessa análise, as bactérias foram selecionadas para a caracterização microscópica e testes de toxicidade.

Na análise macroscópica foram analisadas as seguintes características das colônias: tamanho, forma, borda, transparência, brilho, cor, textura, elevação e consistência. O número de colônias foi estimado com base nas características típicas de *Bt*: que incluem formato arredondado, bordas irregulares, opacidade e coloração esbranquiçada. As colônias identificadas como típicas de *Bt* foram isoladas em uma nova placa de Petri contendo meio sólido CCY, utilizando-se o método de estriamento simples. O processo foi repetido até que colônias puras fossem obtidas, permitindo, então, a realização da caracterização microscópica.

2.3.2 Caracterização Microscópica

A caracterização microscópica da morfologia celular das amostras de bactérias foi realizada como suporte para a identificação de bactérias entomopatogênicas. A mesma permite a análise de características típicas de *Bt* como forma, tamanho e arranjo celular, que podem ser distintivas na identificação e assegurar a eficácia no controle biológico de pragas.

Cada amostra isolada foi cultivada em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura CCY líquido composto por nutrientes stock, tampão fosfato e sais. Em seguida foi submetida a uma incubadora do tipo Shaker por 24 horas, a 30°C, com agitação a 200rpm, para realização do teste Gram e visualização das células vegetativas, para identificação da morfologia e coloração Gram-positiva ou Gram-negativa. Em adição foi realizada a incubação por 72 horas para observação de esporos, com a mesma temperatura e agitação.

Após esse período de crescimento (24 h), uma alíquota do caldo bacteriano foi transferida para a lâmina de microscopia e corada utilizando a técnica de coloração Gram para identificar se a amostra apresenta a estrutura típica de Gram-positivos. A análise microscópica foi realizada com aumento de 100x, observando-se o formato das células, a formação de cadeias celulares, a reação com coloração de Gram e a presença de ultraestruturas celulares existentes (esporos) após as 72 h. Isolados que apresentaram células em forma de bastonete, corados como Gram positivos, positivos para esporos e com a presença ou não de cristais larvicidas foram selecionados para triagem posterior (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

2.4 BANCO DE BACTÉRIAS

Todas as cepas bacterianas isoladas em estado de esporo, com ou sem presença de cristais larvicidas, foram preservadas para a construção de um banco de bactérias no Laboratório de Biologia IFPI-CASJP, com o objetivo de serem utilizadas em pesquisas futuras e/ou em aulas práticas. Para a preservação, pequenas tiras de papel filtro estéreis (12 por tubo) foram utilizados em tubos específicos. Em cada tubo, foi pipetada uma alíquota de 100 µl de cada cepa sobre as tiras de papel filtro. Em seguida, os tubos foram fechados, identificados e estocados (Figura 5).

Figura 5- Estoque de bactérias para a construção de um banco de bactérias no Laboratório de Biologia IFPI-CASJP.



Fonte: Autoria própria (2024).

2.5 BIOENSAIO SELETIVO

O bioensaio seletivo, ou discriminante, foi realizado para determinar quais estirpes apresentavam atividade enteropatogênica com ação larvicida contra o *A. aegypti*, entre os 58 bacilos isolados oriundos das diferentes amostras de solos. As larvas utilizadas nos testes foram obtidas no insetário do Laboratório de Controle Biológico de Pragas na Universidade Federal do Tocantins - Campus de Gurupi, no qual foram realizados os bioensaios. A patogenicidade

dos isolados foi avaliada contra larvas L₃ (3º instar larval), conforme descrito em protocolo pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), com adaptações. Para o teste, 15 larvas foram transferidas para copos de plásticos identificados individualmente, contendo 100 mL de água destilada. Em seguida, foi inoculado 1 mL do caldo bacteriano para determinar a mortalidade das larvas (Figura 6). Os recipientes contendo as larvas foram mantidos em um ambiente seco e arejado, sem interferência direta de correntes de ar provida de qualquer natureza, e seguro de quedas para que se mantenha a integridade das amostras durante o período de testes.

Figura 6: Tratamentos avaliados: bioensaios em triplicata,



Fonte: Autoria própria (2024).

A verificação de mortalidade foi realizada após 24h de exposição das larvas ao tratamento. O tratamento que resultou 100% de mortalidade foi considerada como positivo para análises mais detalhadas. Os bioensaios foram realizados em triplicata, avaliando os isolados dos 9 pontos de coleta. O controle foi realizado com a mesma quantidade de larvas e volume de água, exceto pelo tratamento, que recebeu o caldo bacteriano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS

As amostras de solos dos 9 municípios da região submetidas ao isolamento de bactérias geraram 421 colônias de bactérias com morfologia macroscópica típica de *Bacillus thuringiensis*, com maior quantidade em São João do Piauí (18,5%; n=79). Desse total das amostras, 13% (n=58) das colônias apresentaram a morfologia microscópica semelhante ao *Bt*, sendo que os municípios de Lagoa do Barro, Ribeira e Nova Santa Rita apresentaram a maior quantidade entre 10-14 isolados (Tabela 2). Vale ressaltar que, o protocolo designado usa tratamentos térmicos, nos quais elimina seletivamente todas as bactérias não formadoras de esporos e as células vegetativas (Muniady *et al.*, 2011).

Ademais, o índice de *Bt* pode apresentar variação em várias regiões do mundo, devido à vários fatores como as condições climáticas e as propriedades do solo, um ambiente complexo onde muitos fatores podem afetar a diversidade e a densidade da população microbiana (Polanczyk *et al.*, 2004). Entretanto, ainda é limitado os estudos de isolamento de *Bt* que também caracterizaram as propriedades do solo, o que dificulta uma comparação mais completa de fatores que podem estar diretamente associados à presença dessa bactéria.

Tabela 2: Quantidade de colônias e isolados com morfologia de *Bacillus*, oriundos dos solos dos diferentes municípios.

AMOSTRAS	MUNICÍPIO DE COLETA	COLÔNIAS COM MORFOLOGIA MACROSCÓPICA DE <i>Bacillus</i>	ISOLADOS COM MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE <i>Bacillus</i>
1	São João do Piauí	78	8
2	Bela Vista do Piauí	50	4
3	João Costa	50	8
4	Ribeira do Piauí	50	11
5	Capitão Gervásio de Oliveira	50	5
6	Nova Santa Rita	50	10
7	Campo Alegre do Fidalgo	50	9
8	Pedro Laurentino	44	8
9	Lagoa do Barro	50	14
TOTAL		421	58

3.2 – CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS

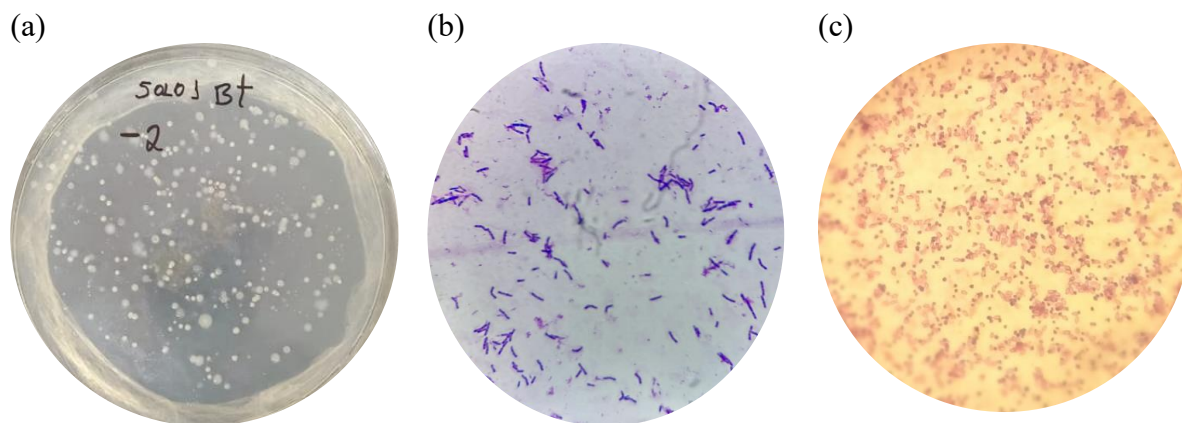
A partir da análise da morfologia macroscópica da colônia foram selecionadas as bactérias com características de *Bacillus thuringiensis*, onde se considerou as colônias de forma arredondadas, de bordas levemente onduladas e coloração branca opaca (Figura 7a). Nenhuma colônia selecionada apresentou elevação. Algumas apresentaram aspecto transparente, e outras com coloração amarelada ou rosa. Entretanto, estas diferenças morfológicas não influenciaram na esporulação e na produção de cristais quando analisado as lâminas, não sendo critério de descarte para seleção das amostras.

Os resultados da morfologia microscópica com a coloração de Gram mostraram que as cepas bacterianas isoladas tinham formato de bastonete e bacilos gram-positivos, sugerindo que as estirpes pertencessem à espécie *B. thuringiensis*. Como o gênero *Bacillus* consiste em bactérias em forma de bastonete e Gram-positivas confirmadas, a coloração de Gram foi conduzida para eliminar todas as outras bactérias que não têm essas duas características. Além disso, foi possível verificar a fase de crescimento do *Bacillus*, onde com 24h de crescimento se verificou a presença de células no estado de vegetativo de multiplicação (Figura 7b). Para a realização da coloração Gram, as estirpes deveriam estar ainda na fase vegetativa, sendo possível analisar a estrutura de suas células antes do momento da esporulação.

Após 72h de crescimento foi verificado que as células passaram do estado vegetativo de crescimento para o estado de esporo (Figura 7c). As amostras viáveis apresentaram esporos. No caso de *Bacillus thuringiensis* foi considerada também a presença de cristais. Caso a amostra apresente células vegetativas, esporângios ou ausência de esporos e cristais foi considerada não viável, pois ao final de 72 horas, todas devem apresentar estas características. A caracterização da morfologia microscópica foi importante, já que sob certas condições restritivas do

crescimento observadas durante a fase estacionária, esta bactéria entra em processo de esporulação e, no início desta fase, sintetiza um cristal de natureza proteica que é responsável pela atividade larvívora do *Bt* (Bravo *et al.*, 2011).

Figura 7: Colônias com características típicas de *Bt* (a); Coloração de Gram das cepas bacterianas (b); Microscopia com visualização do estado de esporo (c).



Fonte: Autoria própria (2024).

3.3 – BIOENSAIOS

O bioensaio seletivo permitiu identificar a cepa potencialmente capaz de secretar metabólitos tóxicos contra as larvas de *Aedes aegypti*. Apenas a cepa 4.8, isolada do solo de Ribeira do Piauí, mostrou-se positiva, resultando em 100% de mortalidade das larvas em 32 minutos após a inoculação de 1mL do caldo bacteriano. Esses resultados indicam que o isolamento de *Bacillus* com potencial tóxico, ocorre numa proporção relativamente pequena, considerando-se o total de 58 isolados, dos quais apenas uma cepa (0,58%) apresentou toxicidade significativa.

Estudos prévios realizados por Lobo *et al.* (2018), investigaram as cepas de *Bt*, de amostras de solo coletado na região do Cerrado do Maranhão, resultando em três cepas que ocasionaram 100% de mortalidade em 24h. Vale ressaltar que, no estudo citado foram analisadas 45 amostras de solo de 17 municípios e obtidas 1225 colônias bacterianas. Logo, levando em consideração o quantitativo de amostras, o presente trabalho apresentando apenas uma cepa com ação contra o *A. aegypti* mostra-se promissor.

Embora apenas uma cepa tenha demonstrado atividade larvívora, já que as toxinas Cry apresentam especificidade para determinado grupo de insetos, e no presente trabalho o teste foi realizado apenas com uma espécie. Esta particularidade ocorre devido aos receptores presentes nas células dos organismos que se associam a determinada proteína (Brobowski *et al.*, 2003). A especificidade para insetos é amplamente determinada pela ligação específica das toxinas Cry a proteínas de superfície localizadas nas microvilosidades das células do intestino médio das larvas (Bravo *et al.*, 2011). A literatura sugere que o mecanismo de resistência desenvolvido no inseto está relacionado com a redução de solubilidade e proteases envolvidas, devido às diferenças presentes no intestino dos insetos (Aronson *et al.*, 1991).

Vale ressaltar que, para ocorrer a atividade tóxica do *Bt* faz-se necessário uma série de eventos que se inicia com a ingestão das inclusões cristalinas pelas larvas dos insetos alvo. As proteínas Cry, quando ingeridas pelo inseto, são solubilizadas pelo pH alcalino no intestino da larva e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por serino-proteases, formando toxinas

ativas que se ligam a receptores das microvilosidades intestinais. Após a ligação, as toxinas formam poros celulares, com aumento da permeabilidade da membrana e consequente lise celular ao produzir um choque osmótico, levando a morte do inseto (Bravo *et al.*, 2011). Segundo Knowles (1994), se o intestino médio dos insetos apresentasse o pH elevado evitaria a germinação dos esporos ingeridos do *Bt*.

Nesse contexto, é importante enfatizar que a relação entre toxicidade e conteúdo de genes dos isolados de *B. thuringiensis* são fatores importantes e sugere atuação conjunta das toxinas no controle de *A. aegypti*. As proteínas Cry são codificadas pelos genes Cry localizados em maior parte nos plasmídeos e, em pequenas quantidades, nos cromossomos são responsáveis pela produção das toxinas (Vilas-Bôas & Castro-Gómez, 2012).

Costa et al. (2010) estudaram 1073 isolados de *B. thuringiensis* oriundos de diversas regiões brasileiras e por meio de bioensaios seletivos e quantitativos e análises genéticas, correlacionaram o efeito das diferentes combinações gênicas com a eficiência dos isolados na mortalidade das larvas do mosquito. Como resultados, os isolados que carregam três ou mais genes díptero-específicos (cry e cyt) foram efetivos nos testes dos bioensaios seletivos, ocasionando mortalidade de 100%. Logo, novos isolados com genes que apresentam diferentes modos de atuação poderão ser utilizados para o desenvolvimento de bioinseticidas com maior toxicidade e menores chances de o inseto tornar-se resistente.

3 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o *Bacillus thuringiensis* é uma alternativa promissora, com grande potencial biotecnológico, para o controle de vetores de doenças que representam um importante desafio à saúde pública. No presente trabalho foi possível isolar e caracterizar estirpes de *Bt*, bem como confirmar a presença de esporos e cristais de proteicos, permitindo a criação de um banco de cepas de *Bt* com potencial larvicida. Esses achados reforçam a viabilidade do uso de *Bt* como uma ferramenta eficaz no biocontrol de vetores, como o *Aedes aegypti*.

Além disso, o uso do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) no controle de vetores é uma estratégia que se destaca por sua eficácia em reduzir a necessidade de inseticidas químicos, minimizando os impactos ambientais negativos e os riscos à saúde humana associados a esses produtos. No entanto, a implementação do biocontrole em larga escala enfrenta desafios importantes, como a falta de regulamentação adequada, a resistência por parte de alguns setores da agricultura e a necessidade de maior conscientização sobre seus benefícios. Apesar dessas dificuldades, o uso de biotecnologias como o *Bt* está alinhado com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), promovendo a saúde pública e contribuindo para a proteção da biodiversidade. Essa abordagem oferece uma alternativa sustentável e eficaz para o controle de vetores, essencial no combate a doenças transmitidas por insetos.

Entretanto, como perspectivas futuras, a pesquisa deve ter continuidade com novos experimentos, incluindo o bioensaio de dose e o sequenciamento genético detalhado, para a análise do gene responsável pela produção da proteína Cry, pois prediz o perfil de sua atividade tóxica e irá otimizar o direcionamento de novos bioensaios, tornando possível avaliar o potencial de controle real exercido contra um inseto-alvo específico, contribuindo para o aprimoramento das estratégias de controle biológico de vetores.

REFERÊNCIAS

- ABU EL-GHIET, U. M. *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils in the Jazan region of Saudi Arabia, and their efficacy against *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* larvae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 30, n. 8, 2023.
- ARONSON, A.I, HAN, E., MCGAUGHEY, W. & JOHNSON, D. The solubility if the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is depend upon protoxin composition and is a factoring toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology* 57:981–986. 1991.
- AYNALEM, B. *et al.* Isolation, molecular characterization and pathogenicity of native *Bacillus thuringiensis*, from Ethiopia, against the tomato leafminer, *Tuta absoluta*: Detection of a new high lethal phylogenetic group. *Microbiological Research*, v. 250, 2021.
- BARCELLOS, C. *et al.* Climate change, thermal anomalies, and the recent progression of dengue in Brazil. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 2024.
- BOBROWSKI, V. L. *et al.* Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, v. 34, p. 843-850, 2003.
- BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v 41, 7, 2011
- BUKHARI, D. A. *et al.* The potential mosquitocidal activity of cry4A toxic region crystal protein gene from local isolates of *Bacillus thuringiensis* against *Aedes aegypti*. *Journal of King Saud University - Science*, v. 34, n. 6, 2022.
- BURSALI, F.; SIMSEK, F. M. Effects of different feeding methods and hosts on the fecundity and blood-feeding behavior of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Biologia*, v. 79, 2023.
- CUNHA, T. *et al.* *Bacillus thuringiensis* translocation in citrus scion/rootstock combinations and binding of cry toxins with the Asian citrus psyllid gut receptors. *Crop Protection*, v. 179, 2024.
- DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Bacteria isolated from *Aedes aegypti* with potential vector control applications. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 204, 2024.
- DELRIEU, M. *et al.* Temperature and transmission of chikungunya, dengue, and Zika viruses: A systematic review of experimental studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases*, vol. 4, 2023.
- FATIMA, N. *et al.* Biotoxicity comparison of *Bacillus thuringiensis* to control vector borne diseases against mosquito fauna. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 30, n. 4, 2023.
- GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA P. (Org.). *Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga*. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010.
- JOLY, C. A. *et al.* Bacteria isolated from *Aedes aegypti* with potential vector control applications. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 204, 2024.
- JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 142, 2017.

KATAK, R. DE M. *et al.* Biotechnological Potential of Microorganisms for Mosquito Population Control and Reduction in Vector Competence. *Insects*, v. 14, 2023.

KATZELNICK, L. C.; BOS, S.; HARRIS, E. Protective and enhancing interactions among dengue viruses 1-4 and Zika virus. *Current Opinion in Virology*, 2020.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal deltaendotoxins. *Adv. Insect Physiol.*, v. 2, p. 257-262, 1994.

LIMA, M. G. DE *et al.* *Climas do Piauí: interações com o Ambiente*. Teresina: Edufpi, 2020.

LOWE, R. *et al.* Combined effects of hydrometeorological hazards and urbanisation on dengue risk in Brazil: a spatiotemporal modelling study. *The Lancet Planetary Health*, v. 5, n. 4, 2021.

MCLAUGHLIN, R. E. *et al.* US standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. *Bulletin of the ESA*, v. 30, n. 1, p. 26-29, 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento das Arboviroses. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em: 28 de junho de 2024.

MUNIADY, S.; RATHINAM, X.; SUBRAMANIAM, S. Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from 39 chicken manure samples. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, p. 3131-3137, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Estratégia Global para Prevenção e Controle da Dengue 2012–2020*. Genebra, 2012. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75303/9789241504034_eng.pdf. Acesso em: 28 de junho de 2024.

PLIEGO-PLIEGO, E. *et al.* Control strategies for a population dynamics model of *Aedes aegypti* with seasonal variability and their effects on dengue incidence. *Applied Mathematical Modelling*, v. 81, 2020.

POLANCZYK, RA. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* berliner a partir de amostras de solo e sua patogenecidade para *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae) Piracicaba: Escola Superior de Agronomia, Universidade de São Paulo. 158 p. Tese de Doutorado em Fitotecnia, 2004.

ROCHA, D. DE A. *et al.* Methods for detecting insecticide resistance in sand flies: A systematic review. *Acta Tropica*, v. 213, 2021.

SANTOS, A. J. *et al.* Clay/PVP nanocomposites enriched with *Syzygium aromaticum* essential oil as a safe formulation against *Aedes aegypti* larvae. *Applied Clay Science*, v. 185, 2020

SECRETARIA DE SAÚDE DO PIAUÍ. Informe Epidemiológico PI, 25ª S.E. 2024. Disponível em:

https://www.saude.pi.gov.br/uploads/warning_document/file/1060/Informe_Epidemiol%C3%B3gico_PI_25%C2%AA_S.E._2024.pdf. Acesso em: 28 de junho de 2024.

SILVA-WERNECK, J; MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p. 4.

- SOARES -DA- SILVA, J. *et al.* Cyt1Aa toxin gene frequency in *Bacillus thuringiensis* isolates and its relation with pathogenicity for vector mosquitoes. *Acta Tropica*, v. 233, 2022.
- ŠOLINC, G.; ANDERLUH, G.; PODOBNIK, M. *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa forms filamentous oligomers when exposed to lipid membranes or detergents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 674, 2023.
- ŠUNJKA, D.; MECHORA, Š. An Alternative Source of Biopesticides and Improvement in Their Formulation—Recent Advances. *Plants*, v. 11, 2022.
- SWEI, A. *et al.* Patterns, Drivers, and Challenges of Vector-Borne Disease Emergence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 20, 2020.
- VARGAS, L. D. L. *et al.* Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 21, n. 1, 2022.
- VILAS-BÔAS, G.T.; ALVAREZ, R.C.; DOS SANTOS, C.A.; VILAS-BOAS, L.A. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. *EntomoBrasilis*, v. 5, p. 1-10, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: UNDP/World Bank/WHO 1985.p. 24.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Geneva: WHO, 2005. P. 39.
- ZAFAR, M. M. *et al.* Heterologous expression of cry3Bb1 and cry3 genes for enhanced resistance against insect pests in cotton. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, 2022.