



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

ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVÁVEL
ASSOCIADA À *Anopheles darlingi* Root, 1926, E SEU HÁBITAT

ELERSON MATOS ROCHA

MANAUS
2015

ELERSON MATOS ROCHA

**ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVÁVEL
ASSOCIADA À *Anopheles darlingi* Root, 1926, E SEU HÁBITAT**

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

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

Coorientadora: Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

**MANAUS
2015**

ELERSON MATOS ROCHA

**ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVÁVEL
ASSOCIADA À *Anopheles darlingi* Root, 1926, E SEU HÁBITAT**

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

Data da aprovação 29 / 05 / 2015

Banca Examinadora:

Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Ademir Castro e Silva
Universidade do Estado do Amazonas

Marcos César Fernandes Pessoa
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2015**

R672 Rocha, Elerson Matos

Estudo comparativo da microbiota bacteriana cultivável associada à *Anopheles darlingi* Root, 1926, e seu hábitat. / Elerson Matos Rocha -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2015.

60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

1. Microbiota bacteriana 2. *Anopheles darlingi* 3. Malária - Amazonas I. Título.

CDU:616.936(811.3)(043)

Dedicatória.

Aos meus pais Maria de Matos Nunes e Jairo da Silva Rocha.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA pela oportunidade que me deram na realização de um dos maiores sonhos da minha vida.

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

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, pela paciência, conhecimento e oportunidade de ter realizado este trabalho.

À minha coorientadora Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza pela paciência e dedicação nos ensinamentos teóricos e laboratoriais.

À todos os meus irmãos; Jairo Filho, Jainer, Jaison, Jarenilson, Emerson, Elizandra, Silviane, Silvana, Rizonete e Rejane, que sempre me deram forças em minha carreira.

Aos meus amigos; Marta Oliveira, Auricélia Gama, Leandro França e em especial ao Ricardo Katak pela valiosíssima contribuição nos procedimentos de laboratório e por ter me ajudado a vencer todos os desafios que surgiram durante esta empreitada.

Ao professor Dr. Adolfo Mota, pelo acolhimento em seu laboratório e ensinamentos que foram de suma importância para execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório da Malária e Dengue do INPA; Dona Maria do Desterro, Dra. Iléia Brandão, Dr. João Zequi, Willian; Ediane, pelo acolhimento e descontração nos momentos vividos nos intervalos de trabalho.

Ao meu cunhado Ivan Rabelo, Dona Lena, Seu Tenório, Dona Marly e Dona Maria Francisca pelo acolhimento durante o período de minha estadia na cidade de Manaus. Sem dúvida serei grato por toda minha vida a vocês. Muito obrigado.

À minha namorada Elen Oliveira, pelo companheirismo, paciência e por sempre estar do meu lado em todos os momentos me apoiando e me fazendo muito feliz. Sinto-me completo ao seu lado e sei que venceremos juntos. Te amo.

A todos, que direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

A malária é uma doença responsável por milhares de mortes no mundo a cada ano. Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium* que são transmitidos pela fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*, considerada vetor nessas condições. Apesar de várias medidas serem empregadas para o controle da malária e também de diversos programas internacionais de controle sendo implantados, com o foco sempre voltado aos mosquitos vetores, que a cada década apresentam acentuadas resistências aos inseticidas convencionais, a doença continua a ser muito frequente e apresenta milhares de casos, fato este que acarreta na busca de novos métodos de controle do mosquito vetor. Pesquisas com base em controle biológico, utilizando micro-organismos, vêm se tornando alternativas para o controle desses vetores de forma mais frequente. Pouco se conhece a respeito de comunidades microbianas que convivem em simbiose com as larvas de anofelinos. Conhecer e entender as funções da diversidade de bactérias que vivem associadas ao vetor da malária, possibilitará entender como as relações entre bactérias, insetos e protozoário acontecem e inúmeras pesquisas poderão se utilizar dessas informações para futuros trabalhos com a finalidade de controlar esta doença no mundo. Metodologias moleculares contribuem para esse desenvolvimento de análises da diversidade microbiana e podem revelar um cenário da distribuição de bactérias no habitat natural de procriação larval do vetor da malária. Este estudo teve por objetivo fazer uma análise comparativa de grupos bacterianos cultiváveis associados a larvas e pupa de *Anopheles darlingi* e seu habitat no Município de Coari e Manaus no Estado do Amazonas. Foram realizadas coletas no município de Coari e Manaus. As bactérias foram inoculadas e purificadas em meios seletivos. Foram realizadas extrações de DNA e a identificação foi realizada a partir da amplificação e sequenciamento do fragmento do rDNA 16S. Neste estudo, foram isoladas 1.845 bactérias do Município de Coari e Manaus. Foram identificadas entre as amostras de água, larva de 3^o e 4^o estágio e pupa de *A. darlingi*, 46 diferentes espécies de bactérias de 23 gêneros pertencentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, e Bacteroidetes. As espécies *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas* sp apresentaram a maior porcentagem dos isolados obtidos. Foi obtida uma coleção que se torna o passo inicial para um estudo promissor de controle da malária envolvendo bactérias associadas a *A. darlingi* e seu habitat na Região Amazônica Brasileira. O próximo passo será utilizar os isolados identificados neste estudo em trabalhos que visam compreender a relação das bactérias com o parasita da malária no intestino médio do mosquito *A. darlingi*.

Palavras-chave: Microbiota bacteriana - *Anopheles darlingi* – malária – Amazônia.

ABSTRACT

Malaria is a disease responsible for thousands of deaths worldwide every year. The etiologic agents are protozoa of the genus *Plasmodium* that are transmitted by female *Anopheles* mosquitos, considered vector in these conditions. Despite several measures are employed to control malaria and also of many international control programs being implemented, with the focus always returned to mosquito vectors, which each decade exhibit marked resistance to conventional insecticides, the disease remains very common and It presents thousands of cases, a fact that leads to the search for new vector mosquito control methods. Research based on biological control using micro-organisms, are becoming alternatives for controlling these most frequent form of vectors. Little is known about microbial communities that live in symbiosis with the larvae of *Anopheles*. Know and understand the functions of the diversity of bacteria that live associated with the malaria vector, will allow to understand how the relationship between bacteria, insects and protozoa happen and extensive research may be used such information for future work in order to control this disease in the world. Molecular methodologies contribute to this development analysis of microbial diversity and can reveal a scenario of the distribution of bacteria in the natural habitat of larval breeding of the malaria vector. This study aimed to make a comparative analysis of cultivable bacterial groups associated with larvae and pupae of *Anopheles darlingi* and their habitat in the city of Coari and Manaus in Amazonas state. Sampling was carried out in the city of Coari and Manaus. Bacteria were inoculated and purified in selective media. DNA extractions were performed and the identification was carried out from the amplification and sequencing of the 16S rDNA fragment. In this study, 1,845 were isolated bacteria from the city of Coari and Manaus. They were identified from water samples, 3rd and 4th larval and pupal stages of *A. darlingi*, 46 different species of bacteria belonging to 23 genera phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. The species *Bacillus sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus thuringiensis* and *Pseudomonas sp* had the highest percentage of isolates obtained. It was obtained a collection that makes the first step towards a promising control study involving malaria bacteria associated with *A. darlingi* and their habitat in the Brazilian Amazon region. The next step will be to use the isolates identified in this study work aimed at understanding the relationship of bacteria with the malaria parasite in the midgut of the mosquito *A. darlingi*.

Keywords: Bacterial microbiota - *Anopheles darlingi* - Malaria - Amazon.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Números de isolados e grupos bacterianos do ponto 1 e 2 de água, larvas de 3^o e 4^o estágio e pupa do Município de Coari e Manaus.....31
- Tabela 2:** Gêneros e espécies de bactérias identificadas nas amostras de Água, L3, L4 e Pupa de *A. darlingi* dos Municípios de Coari e Manaus.31
- Tabela 3:** Frequência dos gêneros bacterianos presentes nas amostras identificadas de 182 grupos dos Municípios de Coari e Manaus.33
- Tabela 4:** Comparação dos isolados obtidos em todos os pontos das amostras de Água, L3, L4 e Pupa de *A. darlingi* dos Municípios de Coari e Manaus.34
- Tabela 5:** As análises das sequências dos isolados bacterianos, oriundos de cada ponto das amostras de água, L3, L4 e pupa de *A. darlingi* do Município de Coari e Manaus36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ovos de <i>A. darlingi</i>	15
Figura 2: Larvas de <i>A. darlingi</i>	16
Figura 3: Pupas de <i>A. darlingi</i>	16
Figura 4: Adulto <i>A. darlingi</i>	17
Figura 5: Protozoários do gênero <i>Plasmodium</i> Machiafava e Celli, 1983.....	18
Figura 6: Frequência dos filis bacterianos identificados nas amostras de Água, L3, L4 e Pupa de <i>A. darlingi</i> dos Municípios de Coari e Manaus.	33
Figura 7: Comparação de Gêneros bacterianos encontrados nos Municípios de Coari e Manaus.	34
Figura 8: Localização dos locais de coleta, Município de Coari e Manaus no Estado do Amazonas.	44
Figura 9: Triagem das larvas e pupa de <i>A. darlingi</i>	46
Figura 10: Isolamento de bactérias das amostras de água.....	46
Figura 11: Géis de quantificação de DNA extraído.	49
Figura 12: Géis de PCR apresentando fragmentos de DNA com 1500 pb. Marcador molecular de 250 pb.	51

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA	15
Ciclo de vida do <i>Anopheles darlingi</i>	15
Agente etiológico da malária.....	18
Características gerais das bactérias.....	20
Diversidade de bactérias e seu potencial metabólico associado aos insetos.	21
Estudo da região rDNA 16S de procariotos	23
OBJETIVOS.....	24
Geral	24
Específicos.....	24
CAPÍTULO	25
INTRODUÇÃO.....	27
MÉTODOS.....	29
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	40
METODOLOGIA DETALHADA DO ESTUDO	44
CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Machiafava e Celli, 1983, transmitida ao homem pela picada da fêmea contaminada do mosquito do gênero *Anopheles* Meigen, 1818, considerada vetor nessas condições (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Trata-se de uma doença que causa grandes impactos negativos à saúde pública e à economia, em suas áreas de ocorrência. De acordo com o relatório mundial da malária de 2014 da Organização Mundial da Saúde, cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, situadas em regiões tropicais do planeta em 2013 e estima-se que 198 milhões de casos de malária ocorreram no mundo com um número de 584.000 óbitos e que essa enfermidade prevalece em 104 países, dos quais 35 estão no Continente Africano, que apresenta o maior número de casos correspondendo por cerca de 90% de todas as mortes por malária no mundo, onde as crianças com idade menores de 5 anos representam 78% de desse total (WHO, 2014).

No Brasil, atualmente, a malária ocorre com maior incidência na Região Amazônica, onde residem cerca de 19 milhões de pessoas, o que corresponde a 12% da população do país. A dispersão desta doença nesta região assumiu maior importância epidemiológica a partir da década de 60, quando foram construídas importantes rodovias interligando a região norte a outras regiões do país (TADEI et al., 1998).

Na Amazônia as condições tropicais da região favorecem a formação de inúmeros criadouros, propiciando a proliferação de mosquitos. Além disso, o ciclo hidrológico da região, no qual se identificam os períodos do pulso das enchentes e da vazante, apresenta fatores que potencializam as condições de reprodução de mosquitos vetores de doenças. Em decorrência das alterações provocadas por estes fatores ambientais, além do aumento na densidade populacional dos vetores, os números registrados de malária insistentemente persistem por toda a região (TADEI et al., 1998, 2010; WOLFARTH, 2011).

Em relação aos anofelinos na região amazônica, *Anopheles darlingi* Root, 1926, do subgênero *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902, se destaca como o principal vetor da malária. Esta espécie de mosquito é de grande ocorrência no norte do país. Outros anofelinos também são vetores desta doença na região, os quais podem apresentar maior

ou menor importância no processo de transmissão. Cita-se, por exemplo, *Anopheles albitarsis* l.s. Lynch-Arribalzaga, 1878, que mostra, também, uma ampla distribuição na Amazônia (TADEI et al., 1998, 2007).

Apesar de várias medidas serem empregadas para o controle da malária e também de diversos programas internacionais de controle sendo implantados a cada ano, com o foco sempre voltado aos mosquitos vetores, que a cada década apresentam acentuadas resistências aos inseticidas convencionais, a doença continua a ser muito frequente e apresenta muitos casos na Região Amazônica do Brasil a cada ano, fato este que acarreta na busca de novos métodos de combate a esta enfermidade (HILL et al., 2005; RIEHLE et al., 2007; COUTINHO-ABREU et al., 2009). (WHO 2014).

Nos últimos anos, vários experimentos realizados validaram a ideia de que micro-organismos presentes em mosquitos vetores da malária podem ser geneticamente modificados para inibirem o desenvolvimento do plasmódio e tornarem-se vetores refratários à transmissão da malária (ITO et al., 2002; RIEHLE et al., 2007; SMITH et al., 2013).

Estes experimentos referem-se à paratransgenesis, que consiste na transformação genética de uma bactéria, tipicamente um endossimbionte do vetor, visando produzir moléculas antiparasitárias, de forma a inibir o desenvolvimento de protozoários responsáveis pelas mais variadas doenças que acometem o ser humano (CONTE, 1997; BEARD et al., 2002; WANG, S. 2012).

Kampfer et. al (2006), detectaram uma nova espécie de bactéria no intestino médio de larvas de *Anopheles arabiensis* e constataram que ela é prevalente em várias espécies do gênero *Anopheles* vivendo, tanto no intestino médio de larvas quanto nos de adultos e que esta pertence ao gênero *Thorsellia* cuja espécie é *Thorsellia anopheles*.

Briones et. al (2008) estudando a região central do Quênia, em lagos rasos que cultivam plantações de arroz, onde as larvas de anofelinos eram encontradas, também detectaram *T. anophelis* e por meio de caracterizações fisiológicas constataram, também, que ela está bem adaptada ao intestino médio de fêmeas de *Anopheles gambiae*, utilizando o sangue como forma de tolerar as condições alcalinas neste ambiente e persistindo por toda a metamorfose do mosquito.

Uma outra linha de pesquisa, que está voltada para o estudo da interação entre bactérias endossimbiontes do mosquito e os plasmódios também vem se tornando

promissora para o controle da malária no mundo. Dong et al (2009) examinaram a influência da flora bacteriana do intestino médio do mosquito sobre parasita da malária por meio de uma série de ensaios de infecção em conjunto com análises de genômica funcional e detectaram que a microbióta está diretamente relacionada na competência vetorial exercendo um papel protetor contra os parasitas da malária, reduzindo, significativamente, o número de oocistos no intestino médio de fêmeas dos anofelinos testados.

Técnicas moleculares, que envolvem a amplificação por PCR da região DNA 16S com posterior clonagem e sequenciamento, são fundamentais para a identificação dessa diversidade de bactérias que vivem associadas aos mosquitos vetores da malária na Região Amazônica do Brasil (LINDH et al., 2005; PEIXOTO, 2009).

No entanto, a microbiota do habitat aquático e larval dos vetores da malária é pouco conhecida e poucos estudos têm sido realizados sobre o assunto (PUMPUNI et al., 1996; GONZALEZ-CERON et al., 2003; LINDH et al., 2005; FAVIA et al., 2007).

Portanto, este estudo teve por objetivo identificar grupos de bactérias cultiváveis associadas à *Anopheles darlingi* Root, 1926, e seu hábitat nos municípios de Coari e Manaus do Estado do Amazonas.

REVISÃO DA LITERATURA

Ciclo de vida do *Anopheles darlingi*

São insetos holometábolos, isto é, apresentam metamorfose completa em seu ciclo evolutivo. Desse modo apresentam, como qualquer culicídeo, duas fases no seu ciclo de vida: a aquática, que inclui três estágios de desenvolvimento: ovo, larva (quatro instar larvais), pupa e a terrestre, que corresponde ao mosquito adulto (CONSOLI-OLIVEIRA, 1994).

Ovo

Os ovos de *A. darlingi* possuem aspecto alongado e simetria bilateral. Seus flutuadores laterais permitem que os mesmos se desloquem para as margens do ambiente aquático onde são postos na lâmina d'água (CONSOLI-OLIVEIRA, 1994). O número de ovos depositados em cada postura varia em média de 75 a 150 ovos. O tempo de eclosão varia de 2 a 3 dias, dependendo da temperatura (FORATTINI, 1973; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1992).



Figura 1: Ovos de *A. darlingi*
Fonte: planetainvertebrados.com.br

Larva

As larvas de *A. darlingi* possuem o abdome semicilíndrico com oito segmentos (CONSOLI-OLIVEIRA, 1994; FLEMING, 1992). Em geral, elas precisam de sete a dez dias para o desenvolvimento, mas isso pode variar por fatores abióticos como temperatura, luz e salinidade, e bióticos como os vegetais, os predadores e a

disponibilidade de alimentos (CONSOLI-OLIVEIRA, 1994). Possuem um aparelho espiracular localizado dorsalmente, a placa respiratória (FORATTINI, 2002). As larvas são facilmente reconhecidas por sua posição de repouso, paralela à superfície da água (FLEMING, 1992). Seus habitats são variados e as espécies neotropicais usam água de lagos e margens de corpos d'água (FLEMING, 1992; FORATTINI, 2002; FORATTINI, 1973).



Figura 2: Larvas de *A. darlingi*
Fonte: planetainvertebrados.com.br

Pupa

A fase de pupa pode durar de 1 a 3 dias, as pupas não se alimentam e precisam entrar em contato com a superfície da água para respirarem devido à posição das trombetas respiratórias, que se projetam para cima a partir do tórax (CONSOLI-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; FORATTINI, 1973). Das pupas emergem os adultos e nesta fase é que ocorre o maior processo de metamorfose, quando deixam de ser aquáticas para se tornarem aladas. As pupas dos machos são um pouco menores que as das fêmeas e os machos adultos emergem antes que as fêmeas (FLEMING, 1992).



Figura 3: Pupas de *A. darlingi*
Fonte: planetainvertebrados.com.br

Adulto

O corpo dos adultos é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos, as antenas e os palpos. No tórax estão os apêndices especializados na locomoção, isto é, as pernas e as asas. O abdome abriga a maior parte dos órgãos internos, como o aparelho reprodutor, digestivo e excretor (FORATTINI, 2002). Machos e fêmeas se alimentam de néctar e frutos danificados, mas só a fêmea se alimenta de sangue animal para fornecer proteínas para os seus ovos. O macho é atraído pela fêmea utilizando suas antenas que atuam como receptores de som e o reconhecimento espécie-específico se dá pelo bater de asas e acasala normalmente durante o voo. Após a cópula, a fêmea alça voo à procura de sangue através de estímulos sensoriais, tais como odor e o dióxido de carbono. Após a realização do repasto sanguíneo, ela então procura um lugar de repouso que pode ser próximo ao local do repasto ou distante, podendo apresentar comportamento endófilo (repousam dentro das casas após hematofagia) ou exófilo (repousam fora das casas após a hematofagia). As proteínas presentes no sangue auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos. A oviposição geralmente ocorre no período noturno (FORATTINI, 2002).



Figura 4: Adulto *A. darlingi*
Fonte: planetainvertebrados.com.br

O hábitat aquático juntamente com pupas os estádios larvais 3^o e 4^o de *A. darlingi* foram utilizados para a realização desse estudo.

Agente etiológico da malária

Os parasitas causadores da malária são protozoários do gênero *Plasmodium* spp. pertencentes à classe Sporozoa do filo Apicomplexa. Realizam seu ciclo assexuado em hepatócitos e hemácias de vertebrados (intrínseco), e parte do ciclo sexuado nos anofelinos (extrínseco) (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Nos mosquitos, as fases do ciclo de desenvolvimento do plasmódio envolvem etapas críticas dentro do intestino, um ambiente que partilha com bactérias onde os ambientes físicos (membranas, receptores), bioquímicos (proteases, quitinases) e fisiológicos (fatores imunológicos), funcionam como barreiras que protegem o inseto contra o parasita (SINDEN, 2002).

Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium* que podem infectar várias espécies de animais diferentes, mas somente cinco espécies são reconhecidas com capacidade de contaminar seres humanos na natureza. *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, é encontrado em todo mundo em áreas tropicais e subtropicais, o *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890 é encontrado principalmente na Ásia, América Latina e em algumas partes da África, o *Plasmodium ovale* Stephens, 1922, é encontrado principalmente na África (África Ocidental), o *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, 1889, encontrado em todo o mundo e *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan, 1932, que provoca a malária em primatas, geralmente observado no Sudeste Asiático (REY, 2001; FERREIRA et al., 2003; CDC, 2010).

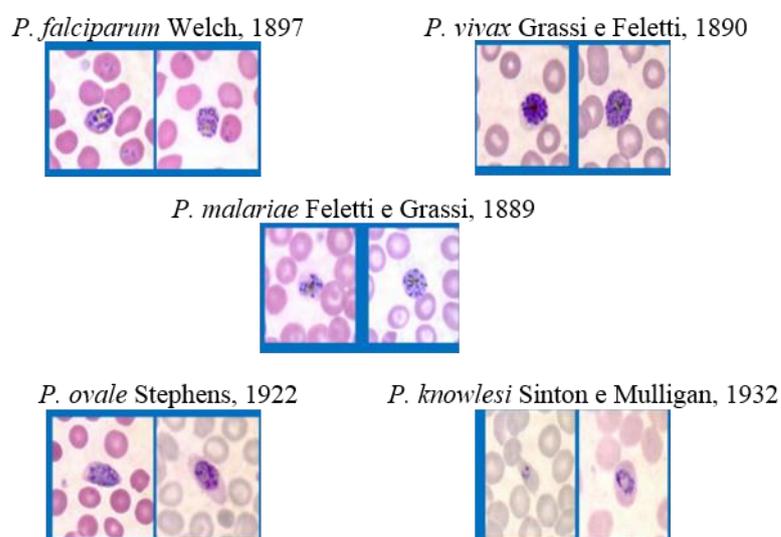


Figura 5: Protozoários do gênero *Plasmodium* Machiafava e Celli, 1983

Ross (1898) publicou a primeira descrição da esporogonia de plasmódios que lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1902. GRASSI et. al (1899), descreveram o ciclo esporogônico de *P. falciparum* que, como as demais espécies de plasmódios humanos, realiza sua esporogonia em mosquitos do gênero *Anopheles* (FERREIRA et al., 2003).

As espécies de *Plasmodium* possuem um ciclo de vida complexo. Ao picar uma pessoa, a fêmea infectada do mosquito inocula, juntamente com sua saliva, as formas infectantes do *Plasmodium*, isto é, os esporozoítas. Para sugar o sangue, os insetos buscam com a extremidade de suas peças bucais o interior de um vaso, então os parasitos são injetados diretamente na corrente sanguínea do vertebrado e em cerca de 30 minutos invadem os hepatócitos. Após esse tempo já não há mais esporozoítas na corrente sanguínea. Os esquizontes que se formam no fígado dão lugar a milhares de elementos filhos, os merozoítas. A esquizogonia pré-eritrocítica dura cerca de seis dias no caso de *P. falciparum*, cerca de oito dias no caso de *P. vivax*, de nove dias para *P. ovale* e de 12 a 16 dias para a evolução de *P. malariae*. As células parasitadas do fígado ficam muito distendidas e alteradas, acabando por romper-se, liberando os merozoítas na corrente sanguínea. Muitos destes são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer, outros sobrevivem, invadem as hemácias e dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios, o ciclo hemático ou ciclo eritrocítico. A duração deste estágio eritrocítico depende da espécie do parasita, sendo de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e de 72 horas para *P. malariae* (REY, 2001; CDC, 2010).

O desenvolvimento intraeritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com consequente formação de merozoítas, que se multiplica por divisão binária, até serem liberados na corrente sanguínea após ruptura do eritrócito, para em seguida invadirem novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítas sanguíneos, algumas formas se diferenciam em estágios sexuais, os gametócitos, que não mais se dividem, mas seguem o seu desenvolvimento no mosquito vetor (BRASIL, 2001).

Os microgametócitos e macrogametócitos masculinos e femininos, respectivamente, permanecem na corrente sanguínea até serem ingeridos por uma fêmea do mosquito, durante um repasto sanguíneo. Dentro do intestino delgado do mosquito, os gametócitos sofrem rápida divisão celular, um processo conhecido como exflagelação, que resulta na formação de oito gametas masculinos ou microgametas.

Os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas. A fusão dos microgametas e macrogametas resulta na formação do ovo ou zigoto. Em poucas horas, o zigoto transforma-se em um estágio móvel alongado chamado oocineto, que atravessa a parede do intestino e origina cistos em sua parede exterior, o oocisto. No interior do oocisto, ocorre uma divisão meiótica seguida de várias divisões mitóticas, resultando na formação de milhares de esporozoítos haplóides. Ao final deste processo, o oocisto se rompe e os esporozoítos migram para as glândulas salivares dos mosquitos. Durante os próximos repastos sanguíneos, eles serão injetados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. O ciclo esporogônico no mosquito dura entre 10 e 17 dias (FERREIRA et al. 2003, CDC, 2010).

Características gerais das bactérias

As bactérias são um grande grupo de micro-organismos procariotos, constituindo os menores seres vivos e os mais simples estruturalmente, embora complexos e diversificados do ponto de vista bioquímico e metabólico. Apresentam-se, na natureza, em formas variadas (cocos, bacilos, espirilos, vibriões entre outros) e são cosmopolitas, predominantes em habitats diferenciados, contribuindo, principalmente, para reciclagem de compostos orgânicos, sendo consideradas como parte chave na maioria dos ecossistemas naturais (CARVALHO, 2008; MALAJOVICH, 2009).

Grande parte das bactérias se reproduz de forma assexuada, por um processo chamado divisão binária, também conhecida como cissiparidade ou bipartição. Em condições adequadas, uma bactéria pode se dividir em até 30 minutos. Após 15 horas, o número de bactérias pode chegar a 15 milhões sendo considerada uma reprodução extremamente rápida. Alguns gêneros de bactérias se reproduzem de forma sexuada. Por meio de um processo conhecido como conjugação bacteriana, as bactérias são capazes de trocar material genético. Neste processo, uma bactéria doadora passa uma pequena quantidade de DNA para uma bactéria receptora através de um orifício. Outra forma de ocorrência de variação no material genético é através da mutação gênica (HAWKER et al., 1960; MALAJOVICH, 2009).

Por meio de suas atividades, controlam e influenciam todos os aspectos do funcionamento da biosfera. Possuem uma grande variedade de vias metabólicas

compreendendo organismos heterotróficos e organotróficos, degradadores de compostos orgânicos; quimiotróficos e litotróficos que usam compostos inorgânicos como fonte de energia; e ainda os fototróficos que utilizam a luz como fonte de energia no metabolismo (CANHOS et al., 1999).

Nos ambientes onde estão inseridas, as bactérias mantêm relações simbióticas com os mais variados seres vivos, contribuindo para a harmonia ecológica do local e trazendo, na maioria das vezes, benefícios, incluindo a suplementação de nutrientes, aperfeiçoamento dos mecanismos digestivos, tolerância de perturbações ambientais e proteção contra parasitas (WEISS & AKSOY, 2011; ENGEL & MORAN, 2013; NARTEY, et al. 2013).

Milhares de bactérias vivem associadas a larvas e adultos de insetos vetores de doenças, como a malária, onde a maioria das funções dessa relação ainda são desconhecidas pela comunidade científica e são alvos de estudos inovadores que visam bloquear o desenvolvimento de *Plasmodium* no interior do intestino médio de mosquitos. (VILLEGAS & PIMENTA, 2014).

Estudos recentes relatam que insetos abrigam um surpreendente número de microrganismos bacterianos simbiotes, vivendo no trato intestinal de larvas e de adultos, onde apresentam impactos significativos em sua fisiologia (BACKHED et al., 2005; LINDH et al., 2005; GUSMÃO et al., 2010; ITURBE-ORMAETXE et al., 2011; CONTI et al., 2012; CHAVSHIN et al., 2012).

Diversidade de bactérias e seu potencial metabólico associado aos insetos.

O estudo da biodiversidade genética microbiana tem proporcionado novos conhecimentos sobre a composição de comunidades e suas interações ecológicas o que permite também a compreensão do funcionamento dos mais variados ecossistemas a prospecção de novos genes para a pesquisa aplicada (CARDOSO et al., 2011; CARDOSO et al., 2010).

Relações simbióticas entre insetos e bactérias intestinais têm sido extensivamente estudadas para tentar elucidar os mecanismos referentes às relações de associação entre estes indivíduos. A diversidade de microrganismos que habitam o intestino desses artrópodes é ampla, devido à grande variedade de grupos de insetos,

resultando em diferentes estruturas e funções do intestino. No intestino ocorre grande incidência de organismos simbiotes, provavelmente por ser um ambiente rico em nutrientes, e possibilitar a ocupação e colonização por diversos grupos de microrganismos (Rani et al., 2009).

Um número limitado de bactérias que habitam corpos de insetos consegue estabelecer níveis de relações mutualísticas, elas desenvolvem uma multiplicidade de estratégias para invadir o hospedeiro, para superar suas respostas imunes, para infectar e mata-lo. Estes mecanismos que levam a estas interações vêm de origem antiga e passam por um desenvolvimento ao longo de um processo de co-evolução (VILCINSKAS, 2010).

Levando em conta esses aspectos, variedades de toxinas inseticidas são produzidas pelo processo de esporulação das bactérias entomopatogênicas. Neste sentido, toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) formadas em corpos de inclusões paraesporais, são normalmente muito específicas a uma gama de organismos alvos, enquanto em outros casos, outras bactérias produzem metabólitos que mostram um espectro inseticida mais amplo (DE MAAGD et al., 2003).

O domínio das bactérias entomopatogênicas tem tradicionalmente sido representadas por membros da família Bacillaceae, tais como *B. thuringiensis*, *Lysinibacillus laterosporus* Laubach. Assim como os entomopatógenos pertencentes à classe Gammaproteobacteria que inclui os entomopatógenos simbiotes de nematóides *Photorhabdus* spp. e *Xenorhabdus* spp. Novas espécies de Betaproteobacteria mostram propriedades de largo espectro inseticida. Este grupo inclui cepas específicas de *Burkholderia* spp. e *Chromobacterium* spp. Por fim, certas espécies de Actinobacteria ganharam interesse científico e comercial elevado em relação à produção de uma variedade de metabólitos que atuam como potentes inseticidas. Este é caso de várias espécies de *Streptomyces* e de *Saccharopolyspora*. Como resultado das atividades de triagens industriais e acadêmicas contínuas, a descoberta de novas espécies de bactérias e metabólitos inseticidas é esperado no futuro próximo (LACEY et al., 2001; GLARE et al., 2012).

Segundo Cirimotich et al., 2011, a microbiota intestinal pode fornecer mecanismos de defesa para o mosquito contra agentes patogênicos invasores de forma

natural, isto pode ser feito por meio de aumento da sua resposta imune impedindo o desenvolvimento de parasitas.

Experimentalmente, a biotecnologia pode ser empregada na genética de microrganismos para expressar moléculas efetoras que inibem o crescimento e desenvolvimento do parasita utilizando bactérias por exemplo (CIRIMOTICH et al., 2011).

A disseminação de micro-organismos por insetos representa o meio por onde possíveis bactérias geneticamente modificadas se espalharão nos ambientes de criação de anofelinos. Considerando que os mesmos sejam vetores passivos que podem transmitir microrganismos por três interações específicas: transporte no corpo, regurgitação e defecação. Isso permite que se estudem os mecanismos que garantem a persistência e a transmissão desses microrganismos, podendo permitir o desenvolvimento de estratégias de interações patógeno-hospedeiro para prevenção de doenças infecciosas. (RAHME et al., 1997; ABALLAY & CAUSUBEL 2002)

Estudo da região rDNA 16S de procariotos

Por meio do estudo da molécula de rDNA 16S pode-se conhecer e analisar uma intensa diversidade microbiana de habitats diferentes. Esta molécula possui regiões extremamente conservadas entre grupos filogeneticamente relacionados, tem um comprimento de cerca de 1.500 nucleotídeos, o que facilita o seu manuseio e deriva de um ancestral comum (COENYE et al., 2005).

Uma vez extraído o DNA de bactérias isoladas, amplificando as regiões conservadas de interesse no estudo por meio de PCR, utilizando iniciadores específicos para a sequência de rDNA 16S e feito o sequenciamento, podem ser realizadas análises por meio de bioinformática. A classificação taxonômica é obtida alinhando-se e comparando-se com sequências depositadas em bancos de dados genéticos, como o “GeneBank” utilizando a ferramenta BLAST do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI) e também podem ser comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project”(RDP).

OBJETIVOS

Geral

Fazer uma análise comparativa de grupos bacterianos cultiváveis associados à larvas e pupa de *A. darlingi* e seu habitat no Município de Coari e Manaus no Estado do Amazonas.

Específicos

- Isolar e purificar grupos de bactérias associadas ao habitat aquático, às larvas de 3º e 4º estádios e pupa de *A. darlingi*;
- Sequenciar o gene 16s rDNA dos grupos de isolados bacterianos associados ao habitat aquático, às larvas e pupa de *A. darlingi*;
- Comparar por meio de análises estatísticas os grupos bacterianos identificados nos locais de estudo;
- Estabelecer coleção de bactérias associadas ao habitat aquático, larvas e pupa de *A. darlingi*.

CAPÍTULO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS
PRESENTES EM LARVAS DE *Anopheles darlingi* E SEU HABITAT
AQUÁTICO**

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS PRESENTES
EM LARVAS DE *Anopheles darlingi* E SEU HABITAT AQUÁTICO

ROCHA, E. M^{1,4*}; KATAK, R. M^{2,4}; OLIVEIRA, M, R^{1,4}; SOUZA, A. Q. L²;
TERENIUS, O³; MARINOTTI, O³; MOTA, A. J² & TADEI, W. P^{4*}.

Correspondência: elesron.matos@hotmail.com; wptadei@gmail.com

¹Universidade Estadual do Amazonas (UEA)

²Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

³Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala,
Sweden

⁴Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA)

RESUMO

A importância da identificação de bactérias simbiotas a mosquitos vetores de doenças se deve aos fatos de que as mesmas controlam a proliferação de parasitas no intestino médio do inseto e poder ser submetidas à paratransgenesis, uma alternativa promissora que pode ser utilizada contra a malária. O principal vetor da malária na Região Norte do Brasil, *Anopheles darlingi* Root, 1926, apresenta uma microbiota bacteriana simbiota a ser elucidada. Este trabalho teve por objetivo obter um perfil de bactérias associadas a *A. darlingi* com potenciais para a paratransgenesis. Foram realizadas coletas no município de Coari e Manaus. As bactérias foram inoculadas e purificadas em meios seletivos. Foram realizadas extrações de DNA e a identificação foi realizada a partir da amplificação e sequenciamento do fragmento do rDNA 16S. Neste estudo, foram isoladas 1.845 bactérias do Município de Coari e Manaus. Foram identificadas entre as amostras de água, larva de 3º e 4º estágio e pupa de *A. darlingi*, 46 diferentes espécies de bactérias de 23 gêneros pertencentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, e Bacteroidetes. As espécies *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas* sp apresentaram a maior porcentagem dos isolados obtidos. Obteve-se uma visão do percentual de bactérias cultiváveis presentes em larvas de *A. darlingi* e seu habitat aquático, com ênfase sobre as espécies do gênero *Chromobacterium* e *Pseudomonas*. O próximo passo será utilizar estas cepas bacterianas em trabalhos que visam novas abordagens como a paratransgenesis que visa o bloqueio da malária via intestino médio do vetor utilizando microrganismos simbiotas.

Palavras-chave: Microbiota bacteriana, *Anopheles darlingi*, Malária, Amazônia, Paratransgenesis

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que causa grandes impactos negativos à saúde pública em suas áreas de ocorrência. Cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, situadas em regiões tropicais do planeta e estima-se que 198 milhões de casos de malária ocorreram no mundo com um número registrado de 584.000 óbitos e que essa enfermidade prevalece em 104 países [1,2].

As condições tropicais do Norte do Brasil favorecem a formação de inúmeros criadouros, propiciando a proliferação de milhares de mosquitos incluindo *Anopheles darlingi* Root, 1926 pertencente ao subgênero *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902, e se destaca como o principal vetor da malária nesta região. [3].

Não existe vacina para prevenir a malária. Seu controle vem sendo direcionado ao vetor utilizando mosquiteiros impregnados e principalmente o uso de inseticidas. No entanto o excesso na utilização desses compostos químicos vem exercendo seleção de insetos resultando no surgimento de raças resistentes a inseticidas. Neste contexto existe uma grande necessidade de desenvolver novas abordagens para controlar a malária [4, 5, 6].

A introdução de bactérias geneticamente modificadas no intestino médio de mosquitos causadores de doenças vem se tornando uma das novas alternativas para bloquear a transmissão da malária. Esta nova abordagem é denominada paratransgenesis [7, 8, 9].

Wang, S et al. [9] introduziram *Pantoea agglomerans* geneticamente modificadas no intestino médio de *Anopheles gambiae*. Estas bactérias produziram uma variedade de moléculas anti-*Plasmodium* o que resultou em 98% de redução na população de *Plasmodium falciparum* dentro do intestino médio do mosquito. Neste caso *P. agglomerans* foi isolada a partir do intestino médio de *An. gambiae* cuja a geração e espécie foram as mesmas utilizadas nos bioensaios, o que justifica o sucesso deste trabalho.

Para que uma bactéria seja adequada na execução da paratransgenesis é preciso avaliar alguns critérios importantes, onde o candidato deve ser simbiote e ser encontrado em todas as fases de desenvolvimento do inseto vetor. [10, 11, 12]. Aqui temos

uma das justificativas desse trabalho, conhecer a microbióta bacteriana associadas a anofelinos e seu hábitat aquático.

Além desta abordagem utilizando paratransgenesis, pode ser avaliado também o potencial natural antimicrobiano de bactérias endossimbiontes de anofelinos. Para se desenvolver no intestino médio de mosquitos vetores da malária, os parasitas do gênero *Plasmodium* enfrentam, além da resposta inata do mosquito, a ação de bactérias endossimbiontes que criam mecanismos de inibição parasitária, contribuindo para a diminuição considerável no número de parasitos sobreviventes [13], no entanto, esses mecanismos de inibição do parasita ainda não foram elucidados [14; 15]. Com tudo, certas bactérias podem estar atuando na defesa contra diversos parasitas no intestino médio de larvas e adultos de insetos.

Cirimothe, C.M [16], identificaram uma bactéria *Enterobacter* isolada a partir de populações de mosquitos selvagens em Zâmbia que foi capaz de interferir no desenvolvimento de *P. falciparum* antes de invasão do epitélio do intestino médio. Por meio da análise fenotípica foi detectado que o mecanismo anti-*Plasmodium* necessita de pequenas populações de bactérias replicantes e que é mediada através de uma interação independente dos mosquitos com o parasita da malária. Concluindo que o efeito anti-*Plasmodium* é em grande parte causada pela geração de bactérias de espécies reativas de oxigênio.

A composição e aquisição bacteriana, bem como suas funções dentro do principal vetor da malária no Brasil, permanecem em grande parte sem resposta. O que se conhece a respeito destas relações simbióticas é que as bactérias podem estar contribuindo para o equilíbrio ecológico do ambiente aquático trazendo, na maioria das vezes, benefícios para os insetos hospedeiros, incluindo a suplementação de nutrientes, aperfeiçoamento dos mecanismos digestivos, tolerância às perturbações ambientais e proteção contra parasitas (17). Nesse contexto vários estudos encontram-se em desenvolvimento e em número cada vez crescente com intuito de oferecer novas formas de controle para a malária utilizando bactérias endossimbiontes de mosquitos.

Portanto, este estudo teve por objetivo identificar, por meio do rDNA 16S, grupos de bactérias cultiváveis associadas a larvas de *An. darlingi* e seu hábitat nos municípios de Coari e Manaus do Estado do Amazonas para serem utilizadas em trabalhos futuros visando novas abordagens de bloqueio da malária.

MÉTODOS

Local de estudo e coleta das amostras

A área de estudo, situada no Estado do Amazonas, compreende os municípios de Coari, localizados na região central do Estado (S 04°06'43.04 W 63°09'27.98) e (S 03°02'46.90 W 59°52'55.41) respectivamente. As amostras foram coletadas no mês de abril de 2013 em Manaus e julho de 2014 em Coari, em dois lagos caracterizados por apresentarem grandes procriações de anofelinos.

A água foi coletada por meio de uma tela de malha de aço inoxidável medindo 400 cm², com um tamanho de malha de 1,25 e 0,36 milímetro de diâmetro [18]. As larvas do mosquito foram coletadas por um tempo de 5 minutos em cada ponto, utilizando uma concha entomológica padrão, de capacidade volumétrica de 350 mL, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de um metro. Em seguida as larvas foram transferidas para depósitos de plásticos esterilizados e armazenados em isopor com gelo.

Todas as amostras coletadas foram transportadas, em caixas de isopor com gelo, para o laboratório, onde as larvas passaram por assepsia e identificação individual em microscópio estereoscópico, utilizando-se as chaves de identificação de [19, 20]. Além da água, apenas larvas de 3° e 4° estádios e pupa de *A. darlingi* foram utilizadas neste estudo.

Isolamento bacteriano a partir das amostras de água, larvas de 3° e 4° estádios e pupa de *A. darlingi*.

As amostras foram isoladas utilizando a técnica do esgotamento por estrias cruzadas em placas de Petri contendo os meios de cultivo Tryptone Soy Agar (TSA), Nutrient Agar (NA) e Luria bertani (LB).

As larvas de 3°, 4° estádios e pupa foram lavadas por imersão em água estéril e centrifugadas por 3 minutos a 8.000 rpm. Em seguida, o Pellet foi ressuscitado em 200 µL de Tween 80% diluído a 0,02%, agitado vigorosamente em vórtex e centrifugado por 3 minutos a 8.000 rpm, onde 50 µL do sobrenadante foram retirados e utilizados no isolamento bacteriano. Os isolados encontram-se estocados em freezer -

80°C em microtubos de 2 mL contendo caldo dos meios descritos anteriormente com glicerol a 20% (v/v).

Extração de DNA genômico, PCR e sequenciamento do gene 16S rDNA

A extração de DNA das culturas foi realizada de acordo com [21], onde a quantidade ajustada para a reação de PCR foi de 1-10 ng/μl.

As reações de amplificação do gene 16S consistiram em um volume final de 25 μL (1,5 μL MgCl₂; 2,5 μL Tampão 10X; 0,5 μL dNTP; 0,125 μL Taq polimerase; 18,375 μL H₂O milli-Q; 1 μL DNA e 0,5 μL de cada Primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3')) e realizadas em termociclador Thermal Cycler[®]. O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 94°C por 25 seg, pareamento dos iniciadores a 62°C por 25 seg e extensão a 72°C por 1 min e 25 seg. Ao final, um ciclo de extensão a 72°C por 5 min. [22]. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) e corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), onde o registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

Os fragmentos de rDNA 16S amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando kit QIAquick[™] PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 200ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit de sequenciamento BidDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 0,5μM do mesmo oligonucleotídeo utilizado para a reação de PCR. As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento ANI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências. As sequências foram analisadas com os programas PHRED/CAP3 disponíveis no site do Laboratório de Biologia Molecular da UNB.

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

RESULTADOS

Neste estudo, foram isoladas 1.845 bactérias do Município de Coari e Manaus, reunidas em grupos, de acordo com as semelhanças de suas características morfológicas, que consistiram na cor da colônia, textura, forma e coloração de Gram, somando um total de 323 grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Números de isolados e grupos bacterianos do ponto 1 e 2 de água, larvas de 3º e 4º estágio e pupa do Município de Coari e Manaus.

	Coari	Manaus	Coari	Manaus	Coari	Manaus	Coari	Manaus	Coari	Manaus	Total
	Água		Larva 3º estágio		Larva 4º estágio		Pupa		Total de isolados		
Ponto 1	145	243	76	143	77	86	59	61			
Ponto 2	186	179	111	115	83	109	74	98			
Total	331	422	187	258	160	195	133	159	811	1.034	1.845
Grupos	53	61	32	48	39	34	25	31			323

Do Município de Coari, os isolados somaram um número de 149 grupos e os de Manaus 174. Foram identificados 182 grupos a partir da amplificação e sequenciamento do fragmento do rDNA 16S, onde 89 corresponderam a Coari e 93 a Manaus. Essa identificação encontrou, entre as amostras de água, larva de 3º e 4º estágio e pupa de *A. darlingi*, 46 diferentes espécies de bactérias de 23 gêneros pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, e *Bacteroidetes*. As espécies *Bacillus sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas sp.* apresentaram a maior porcentagem dos isolados obtidos (Tabela 2).

Tabela 2: Gêneros e espécies de bactérias identificadas nas amostras de Coari e Manaus.

Filo	Gênero/Espécie	Água	L3	L4	Pupa	Total	%
Proteobacteria	<i>Acinetobacter nosocomiales</i>	1	2		1	4	2,2
	<i>Acinetobacter oleivorans</i>				2	2	1,1
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1				1	0,5
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		1			1	0,5
	<i>Brevundimonas</i>				1	1	0,5
	<i>Chromobacterium sp</i>	5	4	3	1	13	7,1
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	4	2	3	3	12	6,6
	<i>Enterobacter sp</i>	3	2		1	6	3,3
	<i>Klebsiella sp</i>	2		1		3	1,6

	<i>Pseudomonas sp</i>	3	4	2	1	10	5,5
	<i>Pseudomonas geniculata</i>		2	1		3	1,5
	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>		2		2	4	2,2
	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	3	1	1	1	6	3,3
	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>				1	1	0,5
	<i>Serratia marcescens</i>	2	2		2	6	3,3
	<i>Stenotrophomonas matophilia</i>			1		1	0,5
	<i>Tatumella citrea</i>		1		1	2	1,1
	<i>Tatumella punctata</i>		1	2	1	4	2,2
Actinobacteria	<i>Arthrobacter sp.</i>			3		3	1,5
	<i>Arthrobacter protophormiae</i>		1	1	1	3	1,5
	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>		2		2	4	2,2
	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>		1	1		2	1,1
	<i>Brevibacterium iodium</i>		3	2	1	6	3,3
	<i>Brevibacterium linens</i>	2	1		3	6	3,3
	<i>Kocuria marina</i>			1		1	0,5
	<i>Microbacterium sp.</i>		1		3	4	2,2
	<i>Tsukamurella paurometabola</i>			2	1	3	1,5
	<i>Tsukamurella spumae</i>	2			1	3	1,5
Firmicutes	<i>Bacillus sp;</i>	6	1	2	4	13	7,1
	<i>Bacillus anthracis</i>	1				1	0,5
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1				1	0,5
	<i>Bacillus altitudinis</i>		1		1	2	1,1
	<i>Bacillus aquimaris</i>		2			2	1,1
	<i>Bacillus licheniformis</i>			2		2	1,1
	<i>Bacillus megabacterium</i>	1	3	2	1	7	3,8
	<i>Bacillus pumilus</i>		1		1	2	1,1
	<i>Bacillus safensis</i>		1			1	0,5
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	4		6	11	6,0
	<i>Enterococcus sp</i>	5	2	1		8	4,4
	<i>Exiguobacterium sp</i>		2			2	1,1
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	2		1		3	1,5
	<i>Paenibacillus sp.</i>			1		1	0,5
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>				1	1	0,5
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6			2	8	4,4
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium sp</i>			1		1	0,5
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1				1	0,5
Total		52	50	35	45	182	100

O filo bacteriano que apresentou maior porcentagem entre todas as amostras identificadas neste trabalho foi o Proteobacteria que somou 39% do total, seguido do Firmicutes com 35% (Figura 1).

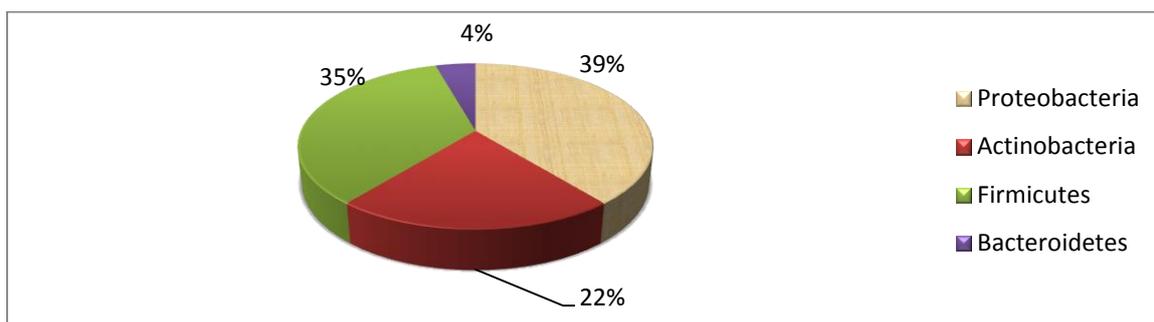


Figura 6: Frequência dos filos bacterianos identificados nas amostras de Água, L3, L4 e Pupa de *A. darlingi* dos Municípios de Coari e Manaus.

Entre os 23 gêneros bacterianos identificados nos grupos, o *Bacillus* foi dominante e presente em 21,7% das amostras seguido por *Acinetobacter* e *Pseudomonas* com 8,7% cada (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência dos gêneros bacterianos presentes nas amostras identificadas de 182 grupos dos Municípios de Coari e Manaus.

Gênero	Quantidade	%
<i>Acinetobacter</i>	4	8,7
<i>Arthrobacter</i>	2	4,3
<i>Bacillus</i>	10	21,7
<i>Brachybacterium</i>	2	4,3
<i>Brevibacterium</i>	2	4,3
<i>Brevundimonas</i>	1	2,2
<i>Chromobacterium</i>	2	4,3
<i>Chryseobacterium</i>	2	4,3
<i>Enterobacter</i>	1	2,2
<i>Enterococcus</i>	1	2,2
<i>Exiguobacterium</i>	1	2,2
<i>Geobacillus</i>	1	2,2
<i>Klebsiella</i>	1	2,2
<i>Kocuria</i>	1	2,2
<i>Microbacterium</i>	1	2,2
<i>Paenibacillus</i>	2	4,3
<i>Pseudomonas</i>	4	8,7
<i>Rubrivivax</i>	1	2,2
<i>Serratia</i>	1	2,2
<i>Staphylococcus</i>	1	2,2
<i>Stenotrophomonas</i>	1	2,2
<i>Tatumella</i>	2	4,3
<i>Tsukamurella</i>	2	4,3
Total	46	100

As espécies bacterianas, encontradas compartilhando os dois locais de estudo, somaram um número de 46 e corresponderam a 8 gêneros; *Acinetobacter*; *Bacillus*; *Chromobacterium*; *Chryseobacterium*; *Exiguobacterium*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Tsukamurella*. (Figura 2).

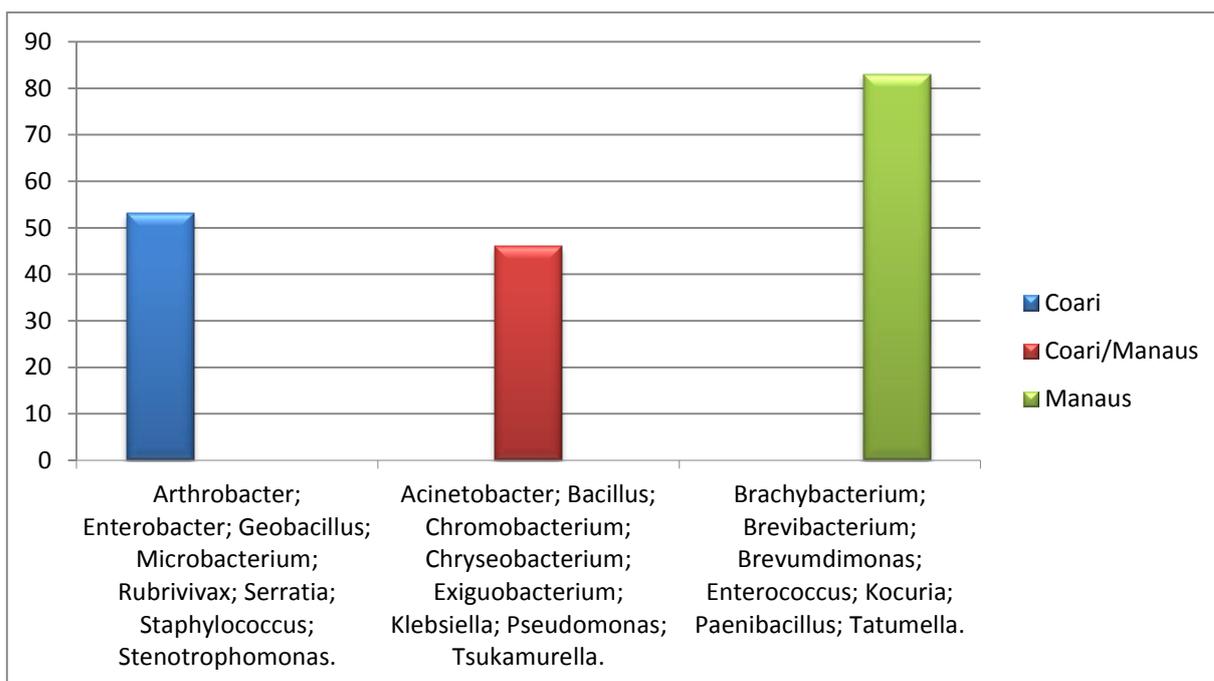


Figura 7: Comparação de Gêneros bacterianos encontrados nos Municípios de Coari e Manaus.

Os isolados obtidos em cada ponto não apresentaram diferença significativa quando comparados estatisticamente. O maior número correspondeu ao Ponto 1 das amostras de água do Município de Coari que apresentou 19 isolados identificados (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação dos isolados obtidos em todos os pontos das amostras de Água, L3, L4 e Pupa de *A. darlingi* dos Municípios de Coari e Manaus.

Espécies bacterianas	Coari								Manaus								Total		
	Água		L3		L4		Pupa		Água		L3		L4		Pupa				
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2			
<i>Acinetobacter nosocomiales</i>	1		1								1						1	4	
<i>Acinetobacter oleivorans</i>																	1	1	2
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			1																1
<i>Acinetobacter baumannii</i>												1							1
<i>Brevundimonas</i>														1					1
<i>Chromobacterium sp</i>	2	1		2		1			2		2		1	1			1		13

<i>Chromobacterium violaceum</i>	2		1		2		1		2		1		1	2	12		
<i>Enterobacter sp</i>	2	1		2	1										6		
<i>Klebsiella sp</i>	1								1				1		3		
<i>Pseudomonas sp</i>	1	1		2			1		1	1	1		2		10		
<i>Pseudomonas geniculata</i>				1					1				1		3		
<i>Pseudomonas hibiscicola</i>				1	1									2	4		
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	1						1		2		1		1		6		
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>											1				1		
<i>Serratia marcescens</i>	2		2				1	1							6		
<i>Stenotrophomonas matophilia</i>					1										1		
<i>Tatumella citrea</i>										1				1	2		
<i>Tatumella punctata</i>										1		2		1	4		
<i>Arthrobacter sp.</i>					2	1									3		
<i>Arthrobacter protophormiae</i>					1	1	1								3		
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>										2				1	1	4	
<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>											1	1			2		
<i>Brevibacterium iodium</i>										2	1		2		1	6	
<i>Brevibacterium linens</i>									2		1		1	2	6		
<i>Kocuria marina</i>													1		1		
<i>Microbacterium sp.</i>				1			1	2							4		
<i>Tsukamurella paurometabola</i>					1	1								1	3		
<i>Tsukamurella spumae</i>	1						1		1						3		
<i>Bacillus sp;</i>	1	2			1		1	1	2	1		1	1		2	13	
<i>Bacillus anthracis</i>									1						1		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1														1		
<i>Bacillus altitudinis</i>				1											1	2	
<i>Bacillus aquimaris</i>				1							1				2		
<i>Bacillus licheniformis</i>					1								1		2		
<i>Bacillus megabacterium</i>	1			1	1					2		1		1	7		
<i>Bacillus pumilus</i>				1										1	2		
<i>Bacillus safensis</i>												1			1		
<i>Bacillus thuringiensis</i>			2				1	2	1		1	1		3	11		
<i>Enterococcus sp</i>									1	4		2		1	8		
<i>Exiguobacterium sp</i>					1						1				2		
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	2					1									3		
<i>Paenibacillus sp.</i>														1	1		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>															1	1	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		6					1	1							8		
<i>Chryseobacterium sp</i>													1		1		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1														1		
Total	19	12	11	10	11	6	7	10	10	12	14	13	10	11	14	12	182

As sequências resultantes do gene 16S rDNA foram comparadas com sequências bacterianas depositadas na base de dados do NCBI. Os grupos referentes ao Município

de Coari estão codificados com a letra C precedido da numeração e os de Manaus com a letra M (Tabela 4).

Tabela 5: As análises das sequências dos isolados bacterianos, oriundos de cada ponto das amostras de água, L3, L4 e pupa de *A. darlingi* do Município de Coari e Manaus

Contig	Identificação	Cobertura	Valor E	Identidade
M49, M67	Acinetobacter nosocomiales Acinetobacter oleivorans	100%	0.0	98%
M53, M34, M28, M37	Kocuria marina	100%	0.0	99%
M55, M59	Brevibacterium iodium Brevibacterium linens		0.0	99%
M68, M50	Brachybacterium conglomeratum Brachybacterium paraconglomeratum		0.0	99%
M70, M29, M36, M60, M62, M43, M66, M51, M45 M69, M63, M61, M33, M23, M38	Klebsiella sp	100%	0.0	97%
M80, M84, M79, M96, M85, M86, M81, M74, M87, M76, M93, M25, M13, M31, M4, C25, C10, C48, C24	Bacillus pumilus Bacillus megabacterium		0.0	99%
M95, M35, M64	Bacillus safensis	100%	0.0	99%
M10, M46, M30	Chryseobacterium sp		0.0	97%
M11, M65, M17, M88, M41, M58, M65	Chromobacterium sp		0.0	99%
M32, M3, M69 M60, M62, M61, M63, M9	Tatumella citrea Tatumella punctata	99%	0.0	97%
M34, M24, M28, M55	Tsukamurella paurometabola Tsukamurella spumae	100%	0.0	99%
M39, M14, M54, M77, M89, M91, M90, M2, M83, M56, M78 M82, M75, C64, C1, C3, C89, C20, C38, C7,	Bacillus anthracis Bacillus thuringiensis	98%	0.0	97%
M48, M40, M49, M67, C8, C21, C45	Acinetobacter calcoaceticus Acinetobacter baumannii	100%	0.0	100%
M81, M26, M95, M86, M80, M79, M92, M87, M73, M85, M76, M84, M96, M74, M89, M56, M54, M38, M75, M31, M90, M91, M82, M83, M77, M78	Bacillus licheniformis Bacillus amyloliquefaciens	99%	0.0	98%
M38	Pseudomonas sp	66%	0.0	90%
M52	Paenibacillus sp.	85%	0.0	87%
M57	Exiguobacterium sp	77%	0.0	91%
M71	Bacillus sp;	77%	0.0	96%
M72	Enterococcus sp	76%	0.0	94%
M88	Brevumdimonas	84%	0.0	97%
M94	Paenibacillus polymyxa	84%	0.0	97%
C14	Bacillus aquimaris	100%	0;0	99%
C16	Chryseobacterium indologenes	100%	0;0	99%
C18, C37	Tsukamurella paurometabola	100%	0.0	98%
C19, C2, C35, C17, C44, C36, C54, C63, C40,	Serratia marcescens	100%	0.0	99%

C13, C29,				
C23, C41	<i>Pseudomonas genculata</i>	100%	0.0	99%
	<i>Pseudomonas maltophilia</i>			
C25, C48	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99%	0.0	98%
C26, C83, C39, C47, C49, C22, C49,	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	0.0	100%
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>			
	<i>Bacillus altitudinis</i>			
C27, C55, C42, C51	<i>Arthrobacter</i> sp.	100%	0.0	98%
	<i>Arthrobacter protophormiae</i>			
C33, C61, C60	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	100%	0.0	99%
C53, C31, C12, C62, C4	<i>Chromobacterium violoaceum</i>	100%	0.0	99%
C55, C18, C32, C59, C57, C28	<i>Microbacterium</i> sp.	100%	0.0	97%
C56, C5, C11, C9, C43, C29	<i>Enterobacter</i> sp	100%	0.0	98%
C23	<i>Stenotrophomonas matophilia</i>	78%	0.0	93%
	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>			
C30	<i>Klebsiella</i> sp.	75%	0.0	94%
C6	<i>Exiguobacterium</i> sp	85%	0.0	93%

Alguns grupos, destacados em negrito na tabela acima, apresentam-se em mais de um contig por obter sequência similar com outras linhagens bacterianas do banco de dados, porém foi adotado o critério da maior similaridade em relação aos do banco, onde 100% e 99% foram utilizados na identificação final os isolados.

Todos os isolados bacterianos identificados neste trabalho encontram-se armazenados em freezer em temperatura de -80°C no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Esta coleção será utilizada em outros estudos que visam compreender a relação de bactérias com o parasita da malária no intestino médio do mosquito *A. darlingi*.

DISCUSSÃO

Recentes estudos têm sido realizados para investigar as espécies bacterianas associadas a mosquitos do gênero *Anopheles*, a fim de entender as relações entre ambos e utilizar estas bactérias como alternativas de controle, por meio de técnicas recém descobertas que envolvem a engenharia genética e biologia molecular, além de tentar entender como essas comunidades bacterianas ajudam o inseto no processo

imunológicos à infecções ocasionadas por protozoários do gênero *Plasmodium* que são os agentes etiológicos da malária [23, 24; 25; 26].

No presente trabalho, 46 bactérias pertencentes a 23 gêneros e 4 filos foram identificadas nas amostras de água, L3, L4 e Pupa de *A. darlingi* isoladas dos municípios de Coari e Manaus no Estado do Amazonas Brasil. Os filos encontrados neste estudo foram Proteobacteria com 39% seguido por Firmicutes com 35%, Actinobacteria com 22%, e Bacteroidetes 4%. Um trabalho realizado por [25] identificou em amostras de mosquitos adultos do gênero *Anopheles* capturados no Vietnam um número de filos similar ao detectado neste trabalho, também com predomínio do Proteobacteria que somou 73% dos identificados. Apesar da prospecção das bactérias serem de amostras diferentes nos dois trabalhos, não se pode descartar a hipótese de que a maior parte de bactérias, encontradas no intestino médio de adultos, é oriunda dos habitats aquáticos onde se desenvolveram as larvas do inseto [23].

Entre os 23 gêneros bacterianos identificados nos grupos, o que teve maior frequência foi o *Bacillus* com 21,7%. Muitos estudos enfatizam a forte presença de *Bacillus* viventes nos mais variados habitats e utilizam-no como uma alternativa de controle biológico, uma vez que muitas espécies de *Bacillus* produzem cristais que são entomopatogênicos. [27].

Dentro do filo Proteobacteria encontrado destaca-se *Pseudomonas* e *Acinetobacter* que foram os gêneros com frequência intermediária neste trabalho. [24] detectaram *Pseudomonas* em larvas e adultos de todos os pontos de amostragem de *Anopheles culicifacies* s.l, provenientes de diferentes habitats do Iran, o que poderia sugerir que essas bactérias estão adaptadas para *Anopheles* nesta região [28] detectaram a prevalência de *Pseudomonas* no intestino médio de adultos de *A. darlingi* no Município de Manaus. *Acinetobacter* foi descrito em vários estudos como sendo um gênero comum em espécies de *Anopheles* [23,24,25]. Não foram encontrados estudos voltados à microbiota bacteriana associada ao habitat aquático de *A. darlingi* na Região Amazônica Brasileira.

Dentre os gêneros com menor frequência, encontrados neste trabalho, destacam-se *Arthrobacter*; *Brachybacterium*; *Brevibacterium*; *Brevumdimonas*; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Chromobacterium*; *Enterococcus*; *Exiguobacterium*;

Geobacillus; Klebsiella; Kocuria; Microbacterium; Paenibacillus; Rubrivivax; Serratia; Staphylococcus; Stenotrophomonas; Tatumella e Tsukamurella.

Ngo, C. T et al. [25] detectaram uma alta prevalência de *Brachybacterium, Enterobacter, Microbacterium, Serratia* e *Stenotrophomonas* em seu trabalho de identificação bacteriana associada a mosquitos do gênero *Anopheles* no Vietnam. *Klebsiella* foi também relatada por Straf, S. C et al. [27] no Quênia e Mali como bactérias endossimbiontes em *Anopheles gambiae*. Os gêneros *Enterobacter* e *Serratia* foram considerados como influentes no ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* em mosquitos *Anopheles*. [16, 29].

Chromobacterium sp e *Bacillus* sp foram as espécies mais prevalentes nos resultados deste trabalho, cada um com frequência de 7,1% do total de isolados identificados. Recentemente uma espécie do gênero *Chromobacterium* (Csp_P), que foi isolada a partir do intestino médio de *Aedes aegypti* capturados em campo no Panamá, apresentou o potencial de colonizar o intestino médio do mosquito do gênero *Anopheles* quando introduzida por meio de um refeição artificial, de inibição do crescimento de outros membros da microbiota do intestino médio, reforçando as respostas imunológicas do mosquito, além de reduzir significativamente a susceptibilidade a *Plasmodium falciparum*, comprometendo a competência vetorial do mosquito [30].

Levando em conta as condições favoráveis para a proliferação de *A. darlingi* na região amazônica do Brasil, os estudos para identificar bactérias simbiotes deste vetor ganham grande relevância, pois visam ser utilizadas em novas abordagens para o bloqueio da malária via intestino médio do mosquito.

CONCLUSÃO

O perfil de bactérias detectas em *A. darlingi* neste estudo revela um cenário promissor para uma possível seleção de candidatos à paratransgenesis.

Este é o primeiro estudo sobre a microbiota bacteriana em *A. darlingi*, um importante vector da malária na Região Norte do Brasil. Mais estudos são necessárias sobre as características biológicas das bactérias e interações entre a microbiota intestinal e o hospedeiro. O fato de que as bactérias *Bacillus* sp, *Chromobacterium* sp, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas* sp, detectadas na

maior parte das amostras, poderia sugerir que estas espécies se adaptaram para uma vida simbiótica em *A. darlingi* e podem ser possíveis candidatos para paratransgenesis.

Interesses competitivos

Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

Contribuições dos autores

EMR, RMK, MRO, WPT e AQLS projetaram o estudo. EMR, coletou as amostras, realizou os procedimentos de laboratório, analisou os resultados e escreveu o projeto do manuscrito. AQLS, RMK, MRO e MAJ participaram na identificação das espécies de bactérias. WPT facilitou o trabalho de campo. MAJ e RMK realizaram a análise filogenética. AQLS, WPT e RMK supervisionaram o projeto e finalizaram o manuscrito. Todos os autores leram o manuscrito e aprovaram o seu conteúdo.

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pela CAPES.

REFERÊNCIAS

- 1- WHO. World Health Organization World. 2013. **World Malaria Report 2013**: Global malaria programme. Geneva. 284pp.
- 2- WHO – World Health Organization. 2014. **World Malaria Report**, Geneva. 242 pp.
- 3- TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. 2010. **Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle**. Pesquisa Científica e Tecnologia em Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. Cap. MCT-INPA. p.112-125.
- 4- READ, A.F. LYNCH, P.A. THOMAS, M.B. **How to make evolution-proof insecticides for malaria control**. PLoS biology. 2009;7(4):e1000058.
- 5- ENAYATI, A. & HEMINGWAY, J. **Malaria management: past, present, and future**. *Annual review of entomology*. 2010; 55:569-591.
- 6- RAGHAVENDRA, K. BARIK, T.K. REDDY, B.P.N. SHARMA, P. DASH, A.P. **Malaria vector control: from past to future**. *Parasitology research*. 2011;108(4):757– 779.

- 7- CONTE JE. (1997). **A novel approach to preventing insect borne diseases.** N Engl J Med 337: 785–786.
- 8- BEARD C. B, CORDON-ROSALES C, DURVASULA R. V. (2002). **Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.** Annu Rev Entomol.
- 9- 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. 2012;109(31):12734–12739.
- 10- ITO, J; GHOSH, A; MOREIRA, L.A; WIMMER, E.A; JACOBS-LORENA, M. (2002). **Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite.** Nature 417, 452–455.
- 11- RIEHLE M. A., MOREIRA C. K., LAMPE D., LAUZON C., AND JACOBS-LORENA M. (2007). **Using bacteria to express and display anti-Plasmodium molecules in the mosquito midgut.** International Journal of Parasitology. 37(6). 595-603.
- 12- 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.** Published: October 01, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076097.
- 13- GONZALEZ-CERON, L., SANTILLAN, F., RODRIGUEZ, M.H., MENDEZ, D., HERNANDEZ-AVILA, J.E., 2003. **Bacteria in midguts of field-collected Anopheles albimanus block Plasmodium vivax sporogonic development.** J. Med. Entomol.
- 14- DONG, Y. MANFREDINI, F. DIMOPOULOS, G. (2009) **Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites.** PLoS Pathog 5(5): e1000423. doi:10.1371/journal.ppat.1000423.
- 15- KUMAR, S. MOLINA-CRUZ, A. GUPTA, L. RODRIGUES, J. BARILLAS-MURY, C. **A Peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in Anopheles gambiae.** Science. 2010 Mar 26;327(5973):1644-8. doi: 10.1126/science.1184008. Epub 2010 Mar 11.
- 16- CIRIMOTICH, C.M; DONG Y; CLAYTON, A.M; SANDIFORD, S.L; SOUZA NETO, J.A; MULENGA M, et al. **Natural micróbio mediada por refratariedade ao Plasmodium infecção em Anopheles gambiae.** Science. 2011; 332: 855-858. doi: 10.1126/science.1201618. PMID: 21566196.
- 17- FALCON, L. A. 1971. **Use of bacteria for microbial control.** Microbial Control of Insects and Mites. New Iork, Academic Press, 67-95p.

- 18- AGOGUE H, CASAMAYOR EO, JOUX F, OBERNOSTERER I, DUPUY C, LANTOINE F et al. (2004). **Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer.** *Limnol Oceanogr Meth* 2: 213–225.
- 19- FARAN, M. E. & LINTHICUM, K. J. A **handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae).** *Mosquito Systematics*, 13 (1): 01-81. 1981.
- 20- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Editora FIOCRUZ, 228p. 1994.
- 21- STEELE, D. B; STOWERS, M. D. **Techniques for selection of industrially important microorganisms.** *Annual Review of Microbiology*, v. 45, p. 89-106, 1991.
- 22- BOICHENKO, V.A. KLIMOV, V. V. MIYASHITA, H. and MIYACHI, S (2000). **Functional characteristics of chlorophyll *d*-predominant photosynthetic apparatus in intact cells of *Acaryochloris marina*.** *Photosynth. Res.* 65: 269-277.
- 23- BOISSIÈRE A, TCHIOFFO M. T, BACHAR D, ABATE L, MARIE A. **Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection.** *PLoS Pathog* 8(5): e1002742. doi:10.1371/journal.ppat.1002742, 2012.
- 24- CHAVSHIN, A.R; OSHAGHI MA, V.H; POURMAND, M.R; RAEISI A, 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.
- 25- NGO, C. T; AUJOULAT, F; VEAS, F; JUMAS-BILAK, E; & MANGUIN, S. (2015). **Bacterial Diversity Associated with Wild Caught *Anopheles* Mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam Using Culture and DNA Fingerprint.** *PLoS ONE*,10(3), e0118634. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0118634>.
- 26- 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 Microbiol.* 2009; 9: 96. doi: 10,1186 / 1471-2180-9-96. PMID: 19450290.
- 27- STRAIF, S. C; MBOGO, C.N; TOURE, A. M; WALKER, E. D; KAUFMAN, M; TOURE, Y. T., et al. **Bacteria in the midgut *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali.** *J. Med Entomol.* 1998; 35: 222-226. PMID: 9615538 doi: 10.1093 / jmedent / 35.3.222.

- 28- TERENIUS O, DE OLIVEIRA CD, PINHEIRO WD, TADEI WP, JAMES AA, MARINOTTI O. **16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes.** J Med Entomol, 2008 Jan; 45 (1): 172-5.
- 29- BANDO H, K OKADO, GUELBEOGO WM, BADOLO A, AONUMA H, NELSON B, et al. **Diversidade específica Intra-de *Serratia marcescens* em *Anopheles* intestino médio do mosquito define *Plasmodium* capacidade de transmissão.** Sci Rep 2013; 3: 1641. doi: 10.1038 / srep01641. PMID: 23571408.
- 30- RAMIREZ JL, SHORT SM, BAHIA AC, SARAIVA RG, DONG Y, ET AL. (2014) ***Chromobacterium* Csp_P Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities.** PLoS Pathog 10(10): e1004398. doi:10.1371/journal.ppat.1004398.

METODOLOGIA DETALHADA DO ESTUDO

Área de coleta

A área de estudo está situada no Estado do Amazonas compreendendo os municípios de Coari, que fica localizado na região central do Estado (S 04°06'43.04 W 63°09'27.98) e Manaus, que está situado na porção mais a leste (S 03°02'46.90 W 59°52'55.41). Estas localidades foram selecionadas em função dos constantes casos de malária registrados pelo Ministério da Saúde nos últimos anos (Figura).

As amostras foram coletadas, no mês de abril de 2013 em Manaus e julho de 2014 em Coari, em dois lagos caracterizados por apresentarem grandes procriações de anofelinos.

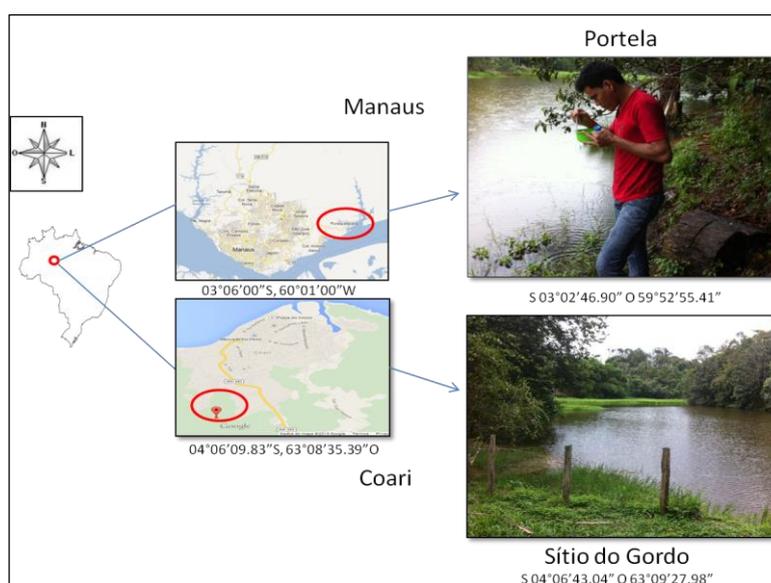


Figura 8: Localização dos locais de coleta, Município de Coari e Manaus no Estado do Amazonas.

Foto: Autor/Googlemaps/maps/place/Amazonas

Esterilização dos meios e materiais

Os meios de cultivo, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 a 30 min. dependendo da natureza do material.

Coleta das amostras: Água, larvas e pupas de *A. darlingi*

O primeiro procedimento foi espacializar o lago em dois pontos equidistantes, aproximadamente, dez metros cada um e, em cada ponto, foram coletadas amostras de água, larvas e pupa de *A. darlingi*.

A água foi coletada por meio de uma tela de malha de aço inoxidável medindo 400 cm², com um tamanho de malha de 1,25 e 0,36 milímetros de diâmetro (AGOGUE et al., 2004). A amostragem coletada foi transferida para tubos falcon de 50 mL devidamente esterilizados. Em seguida esses tubos foram armazenados em caixa de isopor com gelo numa temperatura de aproximadamente 4°C.

As larvas de anofelinos foram coletadas, por um tempo de 5 minutos em cada ponto, utilizando uma concha entomológica padrão, de capacidade volumétrica de 350 mL, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de um metro, sendo empregada a técnica de imersão (SERVICE, 1993). Uma triagem preliminar foi realizada *in locu* com apoio de um técnico especialista em identificação de larvas de *A. darlingi* do Laboratório de Controle biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Em seguida foram transferidas para depósitos de plásticos esterilizados e armazenados em isopor com gelo. Em seguida passaram por triagem, identificação das larvas, assepsia e plaqueamento.

Triagem das larvas e pupa de *A. darlingi*

Larvas de 3^o e 4^o instar de *A. darlingi* foram utilizadas neste estudo e foram identificadas taxonomicamente individualmente, em microscópio estereoscópico, utilizando-se as chaves de identificação de FARAN-LINTHICUM (1981) e CONSOLIVEIRA (1994).



Figura 9: Triagem das larvas e pupa de *A. darlingi*.

Foto: Autor

Isolamento bacteriano a partir da água coletada no habitat das larvas de *A. darlingi* nos municípios de Manaus e Coari.

As amostras de água foram inoculadas em placas de petri com os meios de cultivo Triptona soja Agar (TSA), Nutriente Agar (NA) e Lúria bertani (LB), acrescido de 20 mg/mL de fluconazol para impedir o crescimento de fungos. Todos em triplicata.

Em câmara de segurança biológica, as amostras de água foram espalhadas em placas de petri contendo meio de cultivo com o auxílio de uma alça de drigalsk, vedadas com filme de PVC, identificadas de acordo com a origem e armazenadas em uma estufa incubadora B.O.D a 26,4°C, mantidas por um período de 24 horas. Após essa etapa foi feita a seleção das colônias, para o isolamento das bactérias.

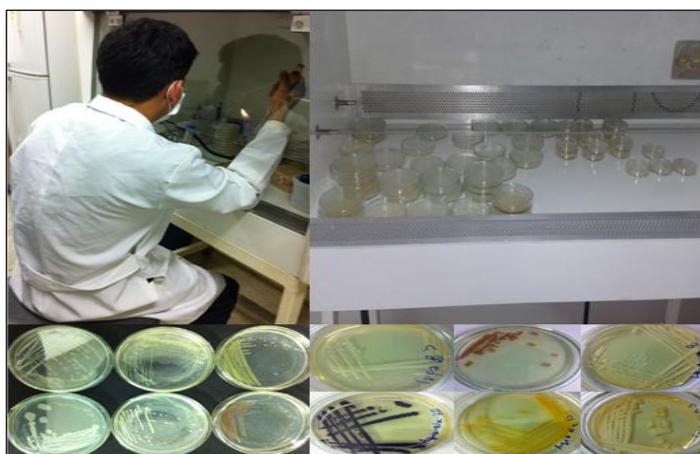


Figura 10: Isolamento de bactérias das amostras de água.

Foto: Autor

Isolamento das bactérias a partir das larvas e pupa de *A. darlingi*

As larvas de 3^o, 4^o instares e pupas foram lavadas por imersão em água estéril e centrifugadas por 3 minutos a 8.000 rpm. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de tween 80% diluído a 0,02%, agitado vigorosamente em vortex e centrifugado por 3 minutos a 8.000 rpm, onde 50 µL do sobrenadante foram retirados e utilizados no isolamento bacteriano. Os meios de cultivos foram TSA, NA e LB com fluconazol.

Cultivo das bactérias

Após o crescimento das bactérias obtidas a partir das amostras de água, larvas e pupa foi realizada a contagem das colônias e a seleção para o isolamento em placas de Petri pequenas, contendo os mesmos meios de cultivo citados, sem antibiótico.

Purificação dos isolados

O isolamento das colônias foi realizado utilizando a técnica do esgotamento por estrias cruzadas a partir de uma única colônia.

Após o isolamento, as bactérias crescidas foram purificadas pela mesma técnica de esgotamento com auxílio de uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada em chama no bico de Bunsen. Foram utilizados meios de cultivo apropriado para cada tipo de isolamento. Em seguida, as placas foram colocadas na B.O.D por 24 horas, para o crescimento bacteriano.

Preservação dos isolados

Os isolados foram preservados nos mesmos meios de cultura do isolamento, na forma líquida, com a adição de 20% de glicerol (v/v) em microtubos de 2 mL e se encontram estocados em freezer -20°C, para futuras utilizações.

Caracterização morfológica das bactérias

As colônias crescidas foram caracterizadas de acordo com a cor, consistência e forma e em seguida foi feita a coloração de Gram seguindo o método abaixo.

- Coloração Gram

Em câmara de segurança biológica, foi adicionada uma gota de 10 μ L de água deionizada em lâminas de vidro esterilizadas, em seguida, com auxílio de uma alça bacteriológica flambada em bico de Bunsen foi retirada uma colônia bacteriana de culturas pupas crescidas em placa de Petri e, em seguida, cada colônia foi friccionada para homogeneização sobre as lâminas, individualmente. Posteriormente, foi feita a fixação do material na própria câmara por 10 minutos numa temperatura de $\pm 45^{\circ}$ C.

Após a fixação do material em lâmina foi feito o procedimento de coloração de Gram. Inicialmente cada lâmina foi coberta com o reagente cristal violeta de genciana por 1 minuto, em seguida imersas rapidamente em água corrente; na segunda etapa do processo as lâminas foram novamente cobertas com o reagente lugol por 1 minuto, o qual foi removido adicionando sobre a lâmina um descolorante de solução álcool-acetona, por aproximadamente 15 segundos seguido de lavagens em água corrente. Após o processo de descoloração, foi adicionada solução de fuccina sobre as lâminas durante 30 segundos. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar em posição vertical, em temperatura ambiente. Após secas, as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico.

Identificação molecular bacteriana

Na identificação molecular bacteriana o procedimento consistiu nas seguintes etapas: Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos, amplificação por PCR da região 16S do rDNA, sequenciamento e comparação das sequências obtidas com banco de dados de nucleotídeos públicos.

Extração de DNA genômico.

Em tubos de 1 ml, foram adicionados, para cada um, 100 μ L de tampão (Tris, EDTA, Dextrose), 5 μ L de lisozima 20 mg/mL e uma pequena massa bacteriana com auxílio de um palito autoclavado a partir das amostras previamente isoladas, purificadas e caracterizadas pela coloração de Gram. Em seguida, foram levados ao banho seco a 37 °C por 30 min. Após esse período, foram adicionados 10 μ L de (Disulfato de sódio) SDS a 10% e novamente levados ao banho seco a 55 °C por 15 min. Posteriormente foram adicionados 90 μ L de Acetato de potássio e em seguida levados ao congelador -20 °C por 30 min. Após esse período foram centrifugados em *Centrífuga Eppendorf Mini plus* 12.000 RCF por 15 min. Em seguida, foram retirados 200 μ L do sobrenadante e transferidos para outros tubos de 1 mL esterilizados contendo 200 μ L de Isopropanol a 100% e em seguida levados ao congelador -20° C por 10 min. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 16.000 RCF por 15 min. Em seguida o sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet ressuspensionado em 500 μ L de Etanol P.A a 70% onde, em seguida, foram centrifugado a 16.000 RCF por 5 min. O sobrenadante foi descartado e todos tubos foram levados a câmara de fluxo onde para total evaporação do etanol. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 30 μ L de TE a 10 mM Ph 7,5 contendo RNase 10 mg/mL. Em seguida os tubos foram novamente levados ao banho seco a 37 °C por 5 min. Por fim, foram, armazenados em congelador -20 °C onde 1 μ L, de cada amostra, foi usado para a PCR (SANTOS et al. 2008).

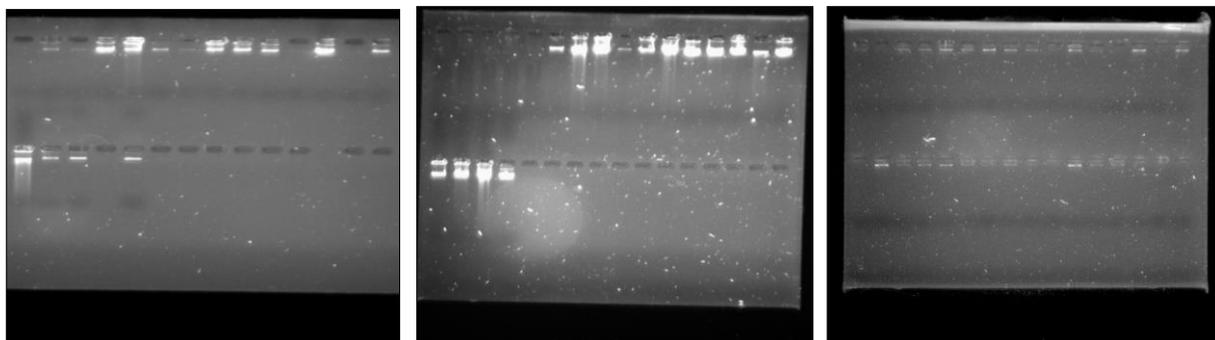


Figura 11: Géis de quantificação de DNA extraído.

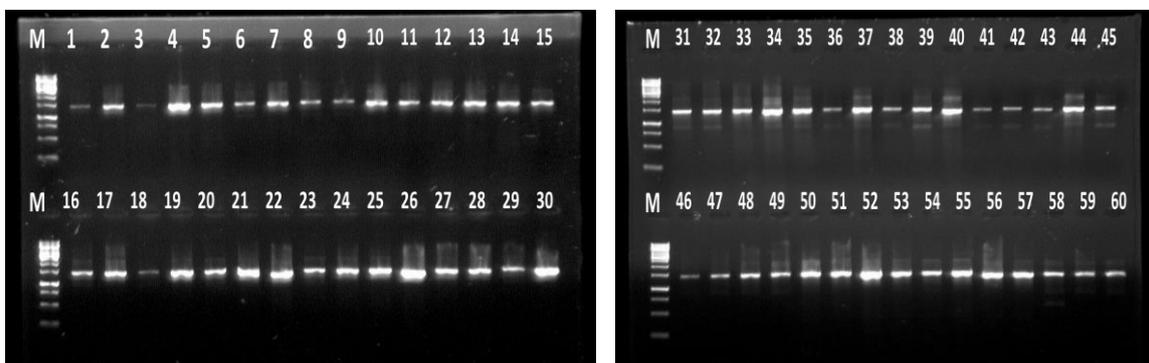
Reação em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação da região 16S rDNA

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

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

Eletroforese em gel de agarose

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



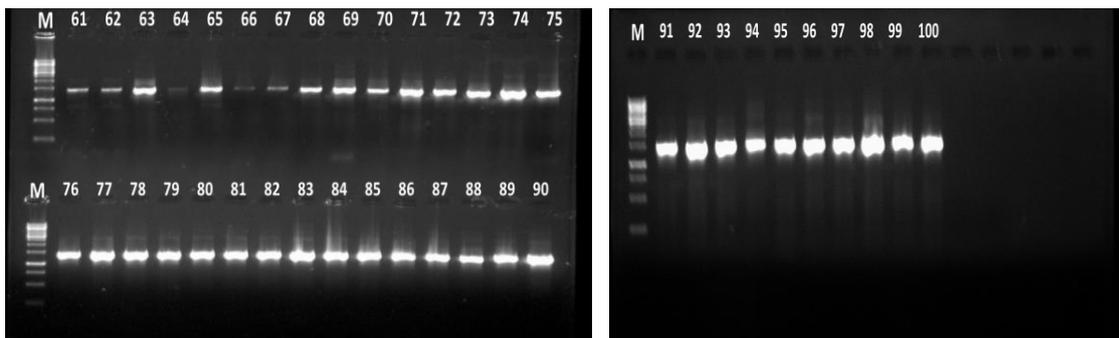


Figura 12: Géis de PCR apresentando fragmentos de DNA com 1500 pb. Marcador molecular de 250 pb.

Purificação das amostras

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

Sequenciamento do gene rDNA 16S

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

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

CONCLUSÕES

Neste estudo foi feita uma análise comparativa de grupos bacterianos cultiváveis associados à larvas e pupa de *A. darlingi* e seu habitat no Município de Coari e Manaus no Estado do Amazonas.

Foi possível, por meio dos métodos adequados, isolar e purificar 1.845 isolados bacterianos associados à larvas e pupa de *A. darlingi* e seu habitat;

Por meio da extração de DNA dos isolados bacterianos foi possível o sequenciamento de 182 grupos bacterianos pelo gene 16 rDNA;

Análises das sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA de bactérias isoladas das amostras de água, larva de 3° e 4° instar e pupa de *A. darlingi*, possibilitaram a identificação de, 46 diferentes espécies de bactérias de 23 gêneros pertencentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, e Bacteroidetes.

Dentre os 23 gêneros bacterianos, o *Bacillus* foi dominante e apresentou 21,7% das amostras seguido por *Acinetobacter* e *Pseudomonas* com 8,7% cada um.

As espécies *Bacillus* sp 7,1%, *Chromobacterium* sp 7,1%, *Chromobacterium violaceum* 6,6%, *Bacillus thuringiensis* 6,0% e *Pseudomonas* sp com 5,5% apresentaram o maior predomínio encontrado neste trabalho.

Toda esta identificação de bactérias que vivem em associação com larvas de *A. darlingi* em seu habitat permitiu criar uma coleção inicial para ser utilizados em trabalhos posteriores que visam compreender a relação de bactérias com o parasita da malária no intestino médio do mosquito *A. darlingi* na Região Amazônica Brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALLAY, A. & AUSUBEL, F.M. *Caenorhabditis elegans* as a host the study of host-pathogen interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 97-101. 2002.

AGOGUE H, CASAMAYOR EO, JOUX F, OBERNOSTERER I, DUPUY C, LANTOINE F et al. (2004). **Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer.** *Limnol Oceanogr Meth* 2: 213–225.

AKSOY, S., WEISS, B., ATTARDO, G., 2008. **Paratransgenesis applied for control of tsetse transmitted sleeping sickness.** *Adv. Exp. Med. Biol.*

AMANN, R. I.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.** *Microbiological Reviews*, v. 59, p. 143-169, 1995.

BACKHED F, LEY RE, SONNENBURG JL, PETERSON DA, GORDON JI., 2005 **Host-bacterial mutualism in the human intestine.** *Science* 307: 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816. PubMed: 15790844.

BANDO H, K OKADO, GUELBEOGO WM, BADOLO A, AONUMA H, NELSON B, et al. **Diversidade específica Intra-de *Serratia marcescens* em *Anopheles* intestino médio do mosquito define *Plasmodium* capacidade de transmissão.** *Sci Rep* 2013; 3: 1641. doi: 10.1038 / srep01641. PMID: 23571408.

BEARD C. B, CORDON-ROSALES C, DURVASULA R. V. (2002). **Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.** *Annu Rev Entomol.*

BOICHENKO, V.A. KLIMOV, V. V. MIYASHITA, H. and MIYACHI, S (2000). **Functional characteristics of chlorophyll *d*-predominant photosynthetic apparatus in intact cells of *Acaryochloris marina*.** *Photosynth. Res.* 65: 269-277

BOISSIÈRE A, TCHIOFFO M. T, BACHAR D, ABATE L, MARIE A. **Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection.** *PLoS Pathog* 8(5): e1002742. doi:10.1371/journal.ppat.1002742, 2012.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil- Volume 44 N° 1 - 2013

BORNEMAN, JAMES; TRIPLETT, ERIC W. 1997. **Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation.** *Brock Institute for Environmental Microbiology and the Department of Agronomy, University of Wisconsin-Madison, Madison.* 63: 2647-2653 pp.

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. The ISME Journal (2008) 2, 74–82.

BRUNA RAQUEL WOLFARTH, **Análise epidemiológica espacial, temporal e suas relações com as variáveis ambientais sobre a incidência da malária no período de 2003 a 2009 em 4 municípios do estado do Amazonas, Brasil.** Dissertação de mestrado (INPA). Manaus: [s.n.], 2011.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Biology parasites.** Aboutt Malaria (2010).

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.

CARDOSO, A.M; CLEMENTINO, M.M; VIEIRA, R.P; CALVACANTE, J.J.V, ALBANO, R.M; MARTINS, O.B. 2010. **Archaeal Metagenomics: Bioprospecting Novel genes and Exploring New Concepts.** In: MARCO, D. (Org). Metagenomics: Theory, Methods, and Applications. Wymondham: Caister Academic Press, v.1, p. 159-169.

CARDOSO, A.M et al. 2012. **Gut Bacterial Communities in the Giant Land Snail *Achatina fulica* and their Modification by Sugarcane-Based.** Diet. PLoS ONE. 7: e33440.

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.

CHAVSHIN, A.R; OSHAGHI MA, V.H; POURMAND, M.R; RAEISI A, 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.

CIRIMOTICH, C.M, DONG Y, CLAYTON, A.M, SANDIFORD, S.L, SOUZA NETO, J.A, MULENGA M, et al. **Natural micróbio mediada por refratariedade ao *Plasmodium* infecção em *Anopheles gambiae*.** Science. 2011; 332: 855-858. doi: 10.1126/science.1201618. PMID: 21566196.

COENYE, T. GEVERS, D. VANS DE PEER, Y. VANDAMME, P. SWINGS, J. **Towards a prokaryotic genomic taxonomy.** FEMS Microbiology Reviews. 29: 147-167. 2005

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

- CONTE JE. (1997). **A novel approach to preventing insect borne diseases.** N Engl J Med 337: 785–786.
- CONTI, R; GUIMARÃES, D.O; PUPO, M. T. **Aprendendo com as Interações da Natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos.** *Ciência e Cultura*,v.64, n.3. São Paulo.2012.
- COSTA, E.L.N., LUCH, O.P.R., FRITZ, L.L., FIUZA, L.M., 2009/2010. **Artrópodes e Bactérias Entomopatogênicas, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** Brasília/DF.
- COUTINHO-ABREU, I.V., ZHU, K.Y., RAMALHO-ORTIGAO, M., 2009. **Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges.** Parasitol. Int. 59, 1–8.
- DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. **Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria.** *Annu. Rev. Genet.* **2003**, 37, 409–433.
- DILLON, R. J., DILLON, V. M., 2004. **The gut bacteria of insects: non-pathogenic interactions.** *Annu. Rev. Entomol.*
- DONG, Y. MANFREDINI, F. DIMOPOULOS, G. (2009) **Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites.** PLoS Pathog 5(5): e1000423. doi:10.1371/journal.ppat.1000423.
- ENAYATI, A. & HEMINGWAY, J. **Malaria management: past, present, and future.** *Annual review of entomology.* 2010; 55:569-591.
- ENGEL P, KWONG W. K & MORAN N. A. (2013) ***Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honey bee, *Apis mellifera*.** Int J Syst Evol Microbiol, doi: Epub ahead of print.
- FAVIA, G. RICCI, I. DAMIANI, C., RADDADI, N., CROTTI, E., MARZORATI, M., RIZZI, A., URSO, R., BRUSETTI, L., BORIN, S., MORA, D., SCUPPA, P., PASQUALINI, L., CLEMENTI, E., GENCHI, M., CORONA, S., NEGRI, I., GRANDI, G., ALMA, A., KRAMER, L., ESPOSITO, F., BANDI, C., SACCHI, L., DAFFONCHIO, D., 2007. **Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 9047–9051.
- FALCON, L. A. 1971. **Use of bacteria for microbial control.** Microbial Control of Insects and Mites. New York, Academic Press, 67-95p.
- FARAN, M. E. & LINTHICUM, K. J. **A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae).** *Mosquito Systematics*, 13 (1): 01-81. 1981.

- FERREIRA, M. U. FORRONDA, A. S. SCHUMAKER, T. T. S. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. Editora Manole. Barueri – SP, 2003.
- FLEMING, G., 1992. **Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas**. in: Washington, D.O.P.d.I.S., 1986. (Eds.).
- FORATTINI, O.P, 2002. **Culicidologia Médica**. São Paulo.
- FORATTINI, O. P., 1973. **Entomologia médica**, São Paulo.
- FORST S, DOWDS B, BOEMARE NE, STACKEBRANDT E: ***Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs**. *Annu Rev Microbiol* 1997, 51:47-72.
- GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KOHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. **Have biopesticides come of age?** *Trends Biotechnol.* **2012**, 30, 250–258
- GRASSI, B.; BIGNAMI, A.; BASTIANELLI, G.; **Ulteriore ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani sul corpo del zanzarone**. *Atti Reale Accad Lincei*. v. 8: p. 21-28, 1899.
- GONZALEZ-CERON, L., SANTILLAN, F., RODRIGUEZ, M.H., MENDEZ, D., HERNANDEZ-AVILA, J.E., 2003. **Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development**. *J. Med. Entomol.*
- GUSMÃO, D.S; SANTOS, A.V; MARINI, D.C; BACCI M, J.R; BERBERT-MOLINA, M.A; LEMOS, F.J.A. **Culture-Dependent And Culture-Independent Characterization of Microorganisms Associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and Dynamics of Bacterial Colonization in the Midgut**. *Acta Tropical*. v.115, n.15, p.275–281. 2010.
- HAWKER, L. E.; LINTON, A. H.; FOLKES, B. F.; CARLILE, M. J. **An introduction to the biology of micro-organisms**. London, 1960.
- HILL, C.A., KAFATOS, F.C., STANSFIELD, S.K., COLLINS, F.H., 2005. **Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era**. *Nat. Rev. Microbiol.* 3
- HILLIS, DAVID M.; BULL, JAMES J. 1993. **An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis**. *Systematic Biology*, 42 (2): 182-192.
- HOYLE, D. C.; HIGGS, P. G. 2003. **Factors Affecting the Errors in the Estimation of Evolutionary Distances Between Sequences**. *Molecular Biology Evolution*, 20 (1):1-9.

ITO, J; GHOSH, A; MOREIRA, L.A; WIMMER, E.A; JACOBS-LORENA, M. (2002). **Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite.** *Nature* 417, 452–455.

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., 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.**" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2006) 56:335-338. Published online 23 September 2005. doi:10.1099/ijs.0.63999-0

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

KUMAR, S. MOLINA-CRUZ, A. GUPTA, L. RODRIGUES, J. BARILLAS-MURY, C. **A Peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*.** *Science*. 2010 Mar 26;327(5973):1644-8. doi: 10.1126/science.1184008. Epub 2010 Mar 11.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAIL, P. **Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?** *Biol. Control* 2001, 21, 230–248.

LACEY, L.A., 2007. ***Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control.** *J Am Mosq Control Assoc* 23, 133-163.

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.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia: Fundamentos.** Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, Rio de Janeiro, 2009. *Appl. Environ. Microbiol.*

MERRITT, R. W; DADD, R. H; WALKER, E. D. **Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes.** *Annual Review of Entomology*, v. 37, n.7, p. 349 – 376. 1992.

NARTEY, R; OWUSU-DABO, E; KRUPPA, T; BAFFOUR-AWUAH, S; ANNAN, A; OPPONG, S; BECKER, N; OBIRI-DANSO, K. (2013). **Use of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* as a viable option in an Integrated Malaria Vector Control Programme in the Kumasi Metropolis, Ghana.** *Parasit Vectors* 6: 116.

NGO, C. T., AUJOULAT, F., VEAS, F., JUMAS-BILAK, E., & MANGUIN, S. (2015). **Bacterial Diversity Associated with Wild Caught *Anopheles* Mosquitoes**

from Dak Nong Province, Vietnam Using Culture and DNA Fingerprint. *PLoS ONE*,10(3), e0118634. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0118634>.

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.

OLIVEIRA-FERREIRA, J., NAKAIE, C. R., DANIEL-RIBEIRO, C., 1992. **Low frequency of anti-*Plasmodium falciparum* circumsporozoite repeat antibodies and rate of high malaria transmission in endemic areas of Rondonia State in northwestern Brazil**. *Am J Trop Med Hyg*.

PEIXOTO, J.C.C. (2009). **Análise da diversidade bacteriana de rios Negro e Solimões pela abordagem metagenômica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas.

PUMPUNI, C.B. DEMAIO, J. KENT, M. DAVIS, J.R. BEIER, J.C. (1996). **Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development**. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.

RAGHAVENDRA, K. BARIK, T.K. REDDY, B.P.N. SHARMA, P. DASH, A.P. **Malaria vector control: from past to future**. *Parasitology research*. 2011;108(4):757–779.

RAHME, L.G et al. **Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors**. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 94, 13245-13250. 1997.

RAMIREZ JL, SHORT SM, BAHIA AC, SARAIVA RG, DONG Y, ET AL. (2014) ***Chromobacterium Csp_P* Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities**. *PLoS Pathog* 10(10): e1004398. doi:10.1371/journal.ppat.1004398.

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 Microbiol*. 2009; 9: 96. doi: 10,1186 / 1471-2180-9-96. PMID: 19450290.

READ, A.F. LYNCH, P.A. THOMAS, M.B. **How to make evolution-proof insecticides for malaria control**. *PLoS biology*. 2009;7(4):e1000058.

REY, LUIS. **Parasitologia**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. p. 335-347, 2001.

RIEHLE M. A., MOREIRA C. K., LAMPE D., LAUZON C., AND JACOBS-LORENA M. (2007). **Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut**. *International Journal of Parasitology*. 37(6). 595-603.

ROSS, R. **The role of the mosquito in the evolution of the malaria parasite.** v. ii: p. 489, 1898.

RUIU, L; SATTA, A; FLORIS, I. **Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management.** *Bull. Insectol.* **2013**, *66*, 181–186.

SANTOS, S; AS, D; BASTOS, E; GUEDES-PINTO, H; GUT, I; GARTNER, F; CHAVES, R. (2008). **An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues.** *Res Vet Sci.*

SINDEN, R. E., 2002. **Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors.** *Cell. Microbiol.* *4*, 713–724.

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.** Published: October 01, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076097.

STEELE, D. B; STOWERS, M. D. **Techniques for selection of industrially important microorganisms.** *Annual Review of Microbiology*, v. 45, p. 89-106, 1991.

STRAIF, S. C; MBOGO, C.N; TOURE, A. M; WALKER, E. D; KAUFMAN, M; TOURE, Y. T., et al. **Bacteria in the midgut *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali.** *J. Med Entomol.* 1998; *35*: 222-226. PMID: 9615538 doi: 10.1093 / jmedent / 35.3.222.

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

TADEI, W. P. 2001. **Controle da Malária e Dinâmica dos vetores na Amazônia.** 7° Reunião especial em Manaus – SBPC.

TADEI, W. P.; PASSOS, R. A.; RODRIGUES, I. B.; SANTOS, J. M. M.; RAFAEL, M. S. 2007. **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.

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

TERENIUS O, DE OLIVEIRA CD, PINHEIRO WD, TADEI WP, JAMES AA, MARINOTTI O. **16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult**

Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. J Med Entomol, 2008 Jan; 45 (1): 172-5.

VILCINSKAS, A. **Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects.** *Virulence* 2010, 1, 206–214

VILLEGAS L.M; PIMENTA, P.F. **Metagenomics, paratransgenesis and the Anopheles microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014

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. 2012;109(31):12734–12739.

WEISS, B. AKSOY, S. (2011). **Microbiome influences on insect host vector competence.** Trends Parasitol 27: 514-522.

YOSEF SCHLEIN AND GÜNTER C MÜLLER; **Decrease of larval and subsequent adult Anopheles sergentii populations following feeding of adult mosquitoes from Bacillus sphaericus-containing attractive sugar baits.** *Parasites & Vectors* 2015, 8:244. DOI 10.1186/s13071-015-0845-y

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

WHO – World Health Organization. 2014. **World Malaria Report,** Geneva. 242 pp.

WOLFARTH, B. R. **Análise epidemiológica espacial, temporal e suas relações com as variáveis ambientais sobre a incidência da malária no período de 2003 a 2009 em 4 municípios do estado do Amazonas, Brasil.** Manaus (2011). 116 f. Dissertação (mestrado)- INPA.