

DESCRIÇÃO DE UM NOVO ISOLADO DE *LYSINIBACILLUS SPHAERICUS* DE PERNAMBUCO COM ÊNFASE NA SUA ATIVIDADE ENTOMOPATOGENICA CONTRA *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

LUDMILA DUDA VICENTE FERREIRA; ANTÔNIO PEREIRA NEVES; KARINA SARAIVA; CLÁUDIA MARIA FONTES DE OLIVEIRA; TATIANY PATRÍCIA ROMÃO

RESUMO

Lysinibacillus sphaericus (Ls) é uma espécie de bactéria gram-positiva, aeróbia e esporulante. Considerada destaque no controle biológico de mosquitos, seu espectro de ação engloba os gêneros *Culex* e *Anopheles*, sobretudo na fase larval. A ação larvicida desta espécie se justifica pela produção de toxinas de fase esporulante, sendo a toxina binária o principal fator tóxico das cepas comerciais. A toxina binária, composta por duas subunidades apresentada na forma de cristal, age nas células intestinais dos mosquitos, provocando efeitos citopáticos que levam a morte destes indivíduos por inanição. Apesar da importância do Ls, são poucos os trabalhos focados na bioprospecção de novas linhagens para o controle de mosquitos. O objetivo deste trabalho é investigar um novo isolado de Ls obtido no estado de Pernambuco, enfatizando-se na sua ação entomopatogênica em *Culex*. O isolado Ls I20A39 foi obtido em amostras de valeta da Região Metropolitana do Recife e cultivado em meio Bti para esporulação. O isolado foi testado em bioensaios de suscetibilidade contra larvas L3 de *Culex quinquefasciatus* e caracterizado morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O isolado I20A39 apresentou, respectivamente, CL50 de 0,003 e CL90 de 0,009 mg/mL em larvas de *C. quinquefasciatus*, possuindo boa atividade entomopatogênica quando comparado com a cepa de referência 2362 (CL50 = 0,002 e CL90 = 0,008). A análise citomorfológica da cepa através de MEV revelou a presença de cristais de natureza proteica e potencial entomopatogênico. Os resultados são relevantes para o entendimento da ação larvicida da cepa. Espera-se que estes resultados possam ser utilizados nas estratégias de enfrentamento de espécies de mosquitos de importância médica.

Palavras-chave: *Bacillus*; Biolarvicidas; Controle biológico; Entomopatogenicidade; Mosquitos;

1 INTRODUÇÃO

Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) é uma espécie de mosquito de importância médica devido a sua atividade como vetor de arboviroses e, principalmente, por ser o transmissor do nemátodo *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática (BHATTACHARYA; BASU, 2016). Os mosquitos da família Culicidae, aos quais *C. quinquefasciatus* pertence, são comumente conhecidos por seu hábito antropofílico e endofílico, presentes dentro das residências humanas e realizando o repasto sanguíneo em vertebrados (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O repasto sanguíneo, necessário para a maturação dos ovos nas fêmeas, representa um momento importante para a dispersão das arboviroses, protozoários e nemátodos associados, justificando a importância desta espécie para a saúde coletiva (NATAL; UENO, 2004, BHATTACHARYA; BASU, 2016).

Lysinibacillus sphaericus (Ls) por outro lado é uma espécie de bactéria gram-positiva,

aeróbia e formadora de esporos (LACEY, 2007). Esta bactéria, pertencente à família Bacillaceae, possui relevância no que se refere ao controle vetorial de mosquitos devido a sua ação larvicida (PEÑA-MONTENEGRO; DUSSÁN, 2013). A atividade larvicida de Ls se deve sobretudo pela ação da toxina binária (bin), presente exclusivamente nas cepas de ação entomopatogênica que agem nos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Ochlerotatus* e *Psorophora* (LACEY, 2007). A toxina bin, composta pelas subunidades BinA e BinB, atua nas células do epitélio intestinal das larvas de mosquito, provocando efeitos citopáticos evidentes neste tecido (BAUMANN; BAUMANN, 1989).

A toxina bin do cristal inicia a sua atividade larvicida ao ser ingerida pelas larvas de mosquito por filtração, seguindo para o lúmen intestinal e sendo solubilizada em pH alcalino e clivada pelas proteases ali presentes que permitem sua ativação (BROADWELL; BAUMANN, 1987, BROADWELL *et al.*, 1990). A subunidade BinB (51 kDa) é responsável pela interação do heterodímero com os receptores intestinais, utilizando sua região N-terminal para a interação com receptores específicos (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988, ELANGO VAN *et al.*, 2000). A subunidade BinA, de 42 kDa, é responsável pela atividade patogênica, provocando efeitos citotóxicos como vacuolização citoplasmática, rupturas nas membranas plasmática e mitocondrial e destruição das microvilosidades intestinais (SILVA-FILHA *et al.*, 2014).

Apesar da alta eficácia de Ls no controle vetorial de mosquitos, principalmente do gênero *Culex*, alguns obstáculos são reconhecidos para a sua implementação a longo prazo nos programas de controle vetorial a nível nacional e mundial. Em primeiro lugar, o controle químico de mosquitos por meio de inseticidas ainda é o método mais utilizado em continentes menos favorecidos economicamente, como o continente Africano e o Oriente Médio (LOPES; LIMA; MARTINS, 2019, MARIAPPAN; TYAGI, 2018). No Brasil, o Ministério da Saúde já recomenda o uso de Ls para o controle de *Culex*, sendo a cepa comercial 2362 a mais utilizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar da sua utilização, a cepa 2362 não é uma cepa nacional visto que foi isolada na Nigéria em 1981, registrada e obtida posteriormente pelos Estados Unidos em 1991 (US EPA, 2014).

Diante deste contexto, a obtenção de novos isolados em território nacional representa uma maneira de contemplar a biodiversidade local e permitir a independência comercial frente esta situação. O objetivo deste projeto é descrever um novo isolado de *Lysinibacillus sphaericus* obtido na Região Metropolitana do Recife, com ênfase na sua atividade entomopatogênica contra *Culex*, estimando a sua utilização nos programas de controle vetorial no Brasil.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e reativação dos cultivos

O isolado I20A39 foi obtido em amostras de valetas na Região Metropolitana do Recife, armazenado a -80 °C e reativado em meio específico para *Bacillus thuringiensis* (KH₂PO₄; MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄; Fe₂(SO₄)₃, H₂SO₄; CaCl₂) suplementado com glicose 30%. A amostra foi incubada em agitador orbital nas condições de 30 °C a 200 rpm por uma semana para induzir a esporulação. Após o referido período o isolado foi levado a centrifuga a fim de se obter os sedimentos esporulados. Os sedimentos foram ressuspensos em NaCl 1 M/EDTA 10 mM, centrifugados e ressuspensos mais duas vezes em EDTA 10 mM. A biomassa obtida foi seca em estufa à 37 °C para obtenção de uma massa seca que foi macerada a fim de se obter o pó seco para testes.

2.2 Bioensaios seletivos

Os bioensaios seletivos foram conduzidos em larvas L3 de *Culex quinquefasciatus* da colônia CqSLab, mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ). A colônia CqSLab é uma colônia de referência composta por larvas suscetíveis a cepa 2362 de Ls. A colônia foi estabelecida a partir de ovos coletadas na Região Metropolitana do Recife, mantida a mais de 10 anos no insetário.

Alíquotas de 5 mg/ml do isolado I20A39 foram diluídas em concentrações crescentes e testadas em grupos de larvas da colônia CqSLab. Para cada concentração foram testadas em triplicatas com 20 larvas, mantidas em copos com 100 mL de água acrescidas da solução bacteriana. Após o período de 48 h foi realizada a leitura da mortalidade. Os valores de concentração letal de 50% (CL50) e 90% (CL90) foram obtidos por meio de análise de probit pelo SPSS versão 23 para windows. Cada bioensaio foi replicado ao menos três vezes.

2.3 Análise citomorfológica dos isolados

Alíquotas de 8 µl do isolado, obtidas a partir da ressuspensão dos sedimentos esporulados em centrifuga, foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído 0,1 M em cacodilato de sódio. Após a fixação e lavagem do fixador, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 1,6% e lavados em PBS. Em seguida as amostras foram centrifugadas e desidratadas em concentrações crescentes de acetona. Após a desidratação, as alíquotas foram embebidas em resina Epon e acetona, levadas a estufa de secagem, cortadas em ultramicrótomo e contrastadas com chumbo e uranila para serem visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (NPT-IAM/PE).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 BIOENSAIOS SELETIVOS

O isolado I20A39 apresentou atividade entomopatogênica para larvas L3 de *Culex quinquefasciatus*, colônia CqSLAB (Tabela 1). De modo geral, as larvas da colônia CqSLAB apresentaram suscetibilidade semelhante aos novos isolados quando comparadas com a cepa de referência Ls 2362, com os limites de confiança para a CL50 e CL90 bastante próximos à referência. Destaca-se também o fato da atividade larvicida do isolado I20A39 possuir valores de CL50 e CL90 próximos à 2362, com limites de confiança contemplados pela referência. Numa perspectiva ambiental, a utilização de larvicidas biológicos como uma alternativa aos químicos representa uma forma viável no manejo destes vetores, visto que são reconhecidos casos de resistência na literatura aos inseticidas químicos como organoclorados, organofosforados e carbamatos (GONZÁLEZ *et al.*, 1999, BECKER *et al.*, 2010).

Tabela 1. Atividade larvicida do isolado Ls I20A39 contra larvas suscetíveis de *Culex quinquefasciatus*.

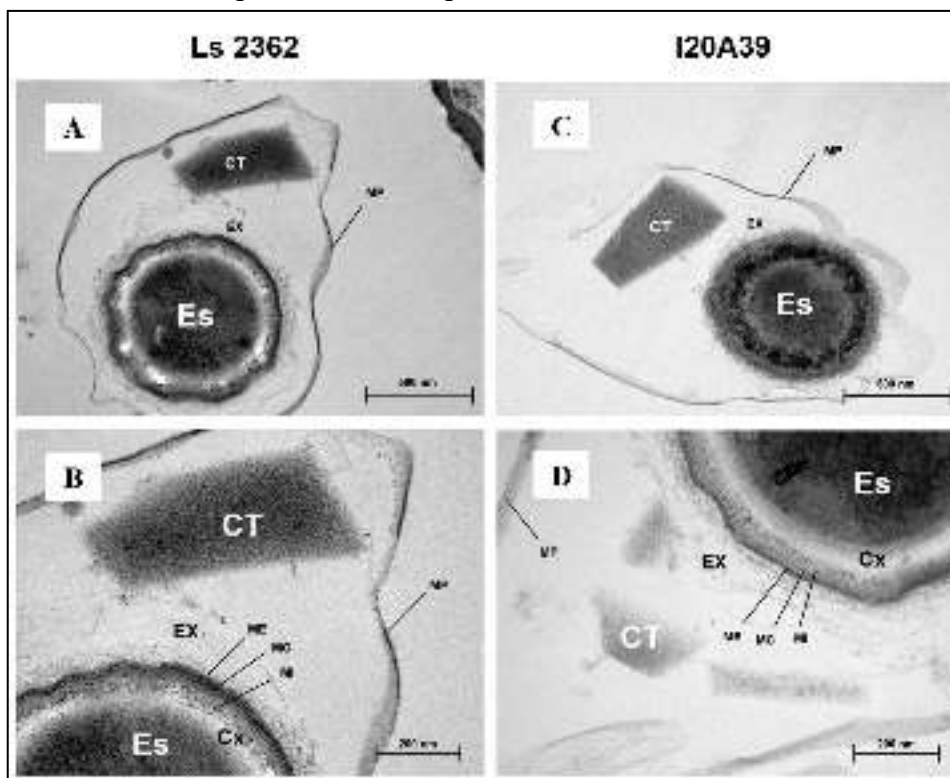
Cepa	Nº larvas	CL50 (mg/mL)	CL90 (mg/mL)
Ls 2362	540	0,002 (0,002-0,002)	0,008 (0,006-0,01)
I20A39	540	0,003 (0,002-0,003)	0,009 (0,007-0,012)

3.2 ANÁLISE CITOMORFOLÓGICA DOS NOVOS ISOLADOS

Em comparação as células esporuladas da cepa 2362, os esporos do isolado I20A39 apresentaram as mesmas estruturas citomorfológicas que a referência (Figura 1). Os esporos do novo isolado possuem diâmetro de aproximadamente 1,0 µm e largura variando de 4,5 a 5,0

µm. Seus esporos possuem morfologia cilíndrica e possuem cristais proteicos na região parasporal, de morfologia típica para o gênero *Lysinibacillus* (ROCHA et al., 2023). Os cristais presentes nas cepas clássicas, tais como a cepa 2362, são compostos principalmente pela toxina binária, considerado o principal fator de atividade entomopatogênica para a espécie (BAUMANN et al., 1988).

Figura 1. Análise ultraestrutural dos isolados Ls 2362 e I20A39. Legenda: Ls 2362: A-B; Ls I20A39: C-D. ES = Esporo; Ex = Exospório; CT = Cristal tóxico; MP = Membrana



plasmática; ME = Membrana externa; MC = Membranas corticais; MI = Membrana interna; Cx = Córtex. Barra de 200 a 500 µm.

4 CONCLUSÃO

Lysinibacillus sphaericus é uma espécie importante para o controle populacional de mosquitos vetores de arbovírus. As ações de bioprospecção, baseadas na obtenção de novos isolados em campo, são ações necessárias para ampliar ou aprimorar as estratégias já existentes no controle de mosquitos. O isolado I20A39, descrito neste trabalho, apresenta atividade comprovada contra *Culex quinquefasciatus*, sendo uma alternativa biológica viável em relação aos métodos tradicionais como o químico, por exemplo. As características citomorfológicas deste isolado se encontram conservadas em relação à cepa de referência. Espera-se que estes resultados possam ser usados nos programas de controle populacional de mosquitos, auxiliando os métodos já existentes.

REFERÊNCIAS

BAUMANN, L. I. N. D. A.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. A. U. L. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9- kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2045-2050. 1988.

BAUMANN, L. I. N. D. A.; BAUMANN, P. A. U. L. Expression in *Bacillus subtilis* of the 51- and 42-kilodalton mosquitocidal toxin genes of *Bacillus sphaericus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 1, p. 252-253. 1989.

BECKER, N., *et al.* Mosquitoes and their control. **Springer Science & Business Media**. 2010.
BHATTACHARYA, S.; BASU, P.; BHATTACHARYA, S. C. The southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. **J Entomol Zool Stud**, v. 4, n. 2, p. 73-81. 2016.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. A. U. L. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied and environmental microbiology**, v. 5, n. 6, p. 1333-1337. 1987.

BROADWELL, A. H.; CLARK, M. A.; BAUMANN, L.; BAUMANN, P. Construction by site-directed mutagenesis of a 39-kilodalton mosquitocidal protein similar to the larva-processed toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 7, 4032-4036. 1990.

CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, R. L. D. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Editora Fiocruz**. 1994.

ELANGOVAN, G., *et al.* Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 276, n. 3, p. 1048-1055. 2000.

GONZÁLEZ, T. *et al.* Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 121-122. 1999.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, p. 133-163. 2007.

MARIAPPAN, T.; TYAGI, B. K. Chemical control of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), the principal vector of bancroftian filariasis, with emphasis on resistance development against insecticides in India. **Lymphatic Filariasis: Epidemiology, Treatment and Prevention. The Indian Perspective**, p. 293-306. 2018.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância do *Culex quinquefasciatus* Série A. **Normas e Manuais Técnicos, Brasília, Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica**, 2011.

NATAL, D.; UENO, H. M. Vírus do Nilo Ocidental: características da transmissão e implicações vetorais. **Entomologia y Vectores**, v. 11, n. 3, p. 417-433. 2004

PEÑA-MONTENEGRO, T. D.; DUSSÁN, J. Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b. 31. **Standards in genomic sciences**, v. 9, n. 1, p. 42-56. 2013.

ROCHA, G. T. *et al.* Morphological and biochemical characterization of bacterial species of *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Brevibacillus*. **Revista Ceres**, v. 70, p. 91-104. 2023.

SILVA-FILHA, M. S.; BERRY, C.; REGIS, L. Insects Midgut and Insecticidal Proteins.
Advances in Insect Physiology, v. 1, p. 89-176. 2014

US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. Fact Sheet *Bacillus sphaericus* 2362, serotype H5a5b, strain ABTS 1743 (PC Code 119803), p. 1-4, 2014.