

Espécies de bactérias associadas a larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926, em seu ambiente aquático.

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

¹ Universidade Estadual do Amazonas (UEA), ² Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
³ Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), ⁴ University of California, Irvine (UCI),
omarinotti@gmail.com, ⁵ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA),
E-mail: martabiotec@yahoo.com.br ; auri_matos@yahoo.com.br

Resumo

A malária é uma doença parasitária responsável por milhares de mortes no mundo. No Brasil o principal vetor da malária é o *Anopheles darlingi*. Este vetor encontra-se associados a uma diversidade de micro-organismos, dentre os quais se destacam as bactérias, que têm se tornado parte integrante dos programas de controle de vetores. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar isolados bacterianos associados a larvas de *A. darlingi* em seu ambiente aquático, no estado do Amazonas. Foram coletadas amostras de água dos criadouros naturais de *A. darlingi* no estado de Amazonas. As bactérias foram isoladas a partir dessas amostras, em seguida foram realizadas as extrações de DNA e identificação por meio da amplificação e sequenciamento do rDNA. Foram identificadas nove espécies bacterianas, pertencentes a três filos, sete famílias e nove gêneros diferentes. Sequências de seis isolados não foram encontradas no NCBI. Desta forma demonstrou-se que o habitat aquático das larvas de *A. darlingi* abrigam uma rica diversidade bacteriana.

Palavras chaves: *Anopheles darlingi*, Malária, Microbiota Bacteriana.

Introdução

A malária é uma doença infecciosa, considerada como um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, sendo estimados cerca de 250 milhões de casos anualmente em mais de 109 países (WHO, 2009), sobretudo nos países em

desenvolvimento e sub-desenvolvidos. Sua transmissão é dada pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Sendo o *A. darlingi* Root, 1926, o seu principal vetor na região Amazônica, onde ocorrem a maioria dos casos no Brasil (Tadei *et al.*, 1998).

Considerando-se o desafio de longo prazo da erradicação da malária, é essencial aumentar o conhecimento sobre a ecologia, biologia e o comportamento de seus vetores (Hiwat e Bretas, 2011) em especial na sua fase imatura. Sabe-se que várias espécies de larvas de mosquitos se alimentam de partículas orgânicas suspensas na água e de micro-organismos, principalmente bactérias (Forattini, 1996), sendo essas muitas vezes sua única fonte de alimento (Merritt *et al.*, 1992). Várias espécies bacterianas têm sido identificadas no intestino de mosquitos adultos através de diferentes técnicas mediadas por cultura convencional (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011) e estas foram adquiridas a partir do seu ambiente aquático, durante o desenvolvimento larval. Entretanto, vale ressaltar que estudos sobre a biodiversidade microbiana associada ao ambiente aquático desses insetos vetores permanecem escassos.

Portanto, pesquisas que buscam conhecer a microbiota associada a insetos vetores, são de grande relevância para implementação de políticas com estratégias mais eficazes de controle da malária no mundo. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar isolados bacterianos associados ao ambiente aquático de larvas de *A. darlingi* no estado do Amazonas.

Material e Método

A coleta do material foi realizada no lago do Puraquequara (S 03° 03. 230' W 059° 53. 533') no município de Manaus-AM, de onde foram coletadas amostras de água de quatro pontos equidistantes (cinco metros cada um). As amostras foram recolhidas de criadouros específicos de *A. darlingi*, previamente identificados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde. Em tubos Falcon de 50 mL estéreis foram recolhidas amostras de água da superfície e mantidas a 4 °C até a chegada ao laboratório de Genética, da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas- ESA/UEA.

Para cada amostra adquirida foram espalhados 100 µL em placas de Petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB) e Agar Nutriente (NA) contendo de 100 µg/mL de fluconazol. As placas foram incubadas a 18, 26 e 40° C por oito dias, a partir de 24 h

iniciou-se o isolamento das colônias pela técnica do esgotamento por estrias cruzadas em seguida a realização da técnica de coloração de Gram.

Posteriormente foi realizada a identificação molecular com as seguintes etapas: lise celular por choque térmico, descrito por Stemmer (1994) com modificações para obtenção do DNA molde, em seguida realizou-se a amplificação do gene *16S* do *rDNA* com os iniciadores: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3') (White et al., 1990), utilizando o protocolo de PCR descrito por Boichenko et al, (2000), a verificação da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1 % coradas com GelRed®, após a corrida o gel foi fotodocumentado em transluminador de luz UV.

Os fragmentos de *rDNA* amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando a enzima ExoSAP®(Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota do DNA purificado foi usado para as reações de sequenciamento, com o kit de sequenciamento BidDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 0,5 µM do mesmo oligonucleotídeo foi utilizado para a reação de sequenciamento no sequenciador 3.500 da Applied Biosystems. A identificação das bactérias foi feita através da comparação das sequências de nucleotídeos obtidas com as depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>) a fim de comparar as sequências das amostras deste trabalho com as depositadas no GenBank. A partir de todas as 19 sequências *16S rRNA* obtidas neste estudo, realizou-se a construção do dendograma utilizando o programa MEGA, versão 4 (Tamura et al., 2007). O alinhamento das sequências foi feita pelo programa Clustral W e o dendograma foi gerado pelo método Neighbor-Joining, com Bootstrap de 1000.

Resultados

A partir das quatro amostras de água coletadas do criadouro do *A. darlingi*, foram isolados 180 bactérias, destas foram selecionadas 19 diferentes tipos com características morfológicas bem distintas (representando a diversidade encontrada), para a realização do sequenciamento do gene *16S rRNA*. Por meio das análises de bioinformática das sequências obtidas foram identificadas nove espécies bacterianas (*Aeromonas jandaei*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, *Pseudomonas* sp e *Serratia marcescens* e de seis amostras não foram possíveis realizar

a identificação taxonômica, uma vez que as sequências obtidas não foram encontradas nos bancos de dados do NCBI sendo consideradas como organismos incultos.

Foram identificados um total de três filos (*Actinobactérias*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*), sete famílias (*Aeromonadaceae*, *Bacillaceae*, *Brevibacteriaceae*, *epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae* e *Pseudomonadaceae*) e nove gêneros (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* e *Serratia*).

O Dendograma com todas as 19 sequências *16S rRNA* obtidas, mostra a grande diversidade das diferentes espécies bacterianas encontradas nesta pesquisa (Figura 1).

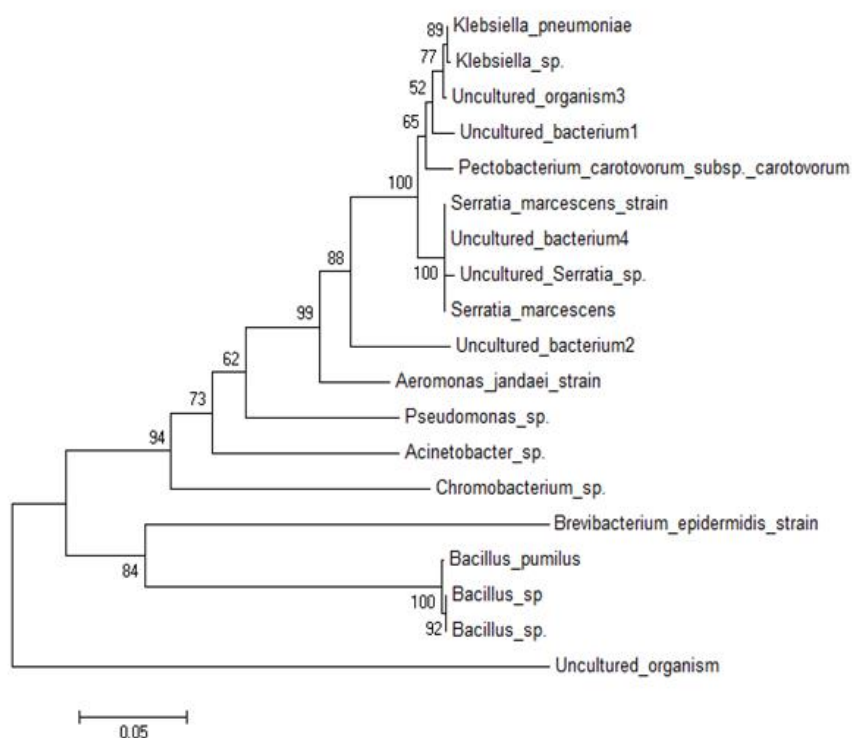


Figura 1 - Dendrograma resultante da análise Bayesiana com sequências do marcador 16S do rDNA sequenciadas neste estudo.

Discussão

As análises dos dados demonstraram que as diferentes espécies bacterianas encontradas no habitat natural das larvas dos mosquitos estão intimamente ligadas a diferentes estágios de vida do gênero *Anopheles*, como descritos por diversos autores. Os gêneros *Bacillus*, *Serratia* e *Pseudomonas* foram encontrados no intestino médio de diferentes vetores da malária no mundo, tais como *A. arabiensis* em estudo realizado na

Zâmbia (Cirimotich *et al.*, 2011), *A. stephensi* na Índia (Rani *et al.*, 2009) além do *A. gambiae* (Lindh *et al.*, 2005). A família com maior predominância neste trabalho foi a *Enterobacteriaceae* que segundo Cirimotich *et al.* (2011) e Pumpuni *et al.* (1993) são capazes de inibir o desenvolvimento de espécies *Plasmodium* no intestino médio do *A. albimanus* e *A. stephensi*.

Dos três filos encontrados destaca-se o filo *Firmicutes* que apresentam espécies de *Bacillus* que tem alto potencial como agentes de controle biológico de diferentes populações de mosquitos (Minard *et al.*, 2013; Geetha *et al.*, 2010).

As sequências 16S do rRNA de cinco bactérias não identificadas nos bancos de dados do NCBI potencialmente são novas espécies ainda não descritas, uma vez que as mesmas foram isoladas de amostras amazônicas, que apresenta uma das maiores biodiversidade do planeta e poucos são os estudos com essa ênfase na região. Ressaltando que ainda permanecem escassos os dados sobre a microbiota bacteriana e seus potenciais genéticos relacionados ao habitat naturais dos Anofelinos em seus diferentes estágios de vida.

Conclusão

Foram identificadas nove espécies bacterianas, pertencentes a três filos, sete famílias e nove gêneros diferentes. As sequências de seis isolados não foram encontradas no NCBI. Desta forma, conclui-se que os isolados bacterianos presente no ambiente aquático das larvas de *A. darlingi* apresentam uma rica diversidade.

Referências

Boichenko LV, Boichenko DMV, Vinokurrova NG (2000) Use of Polymerase Chain Reaction for Searching for Products of Ergot Alkaloids From Among Fungi. *Microbiology* 70(12):360-368.

Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford AL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos, G (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* 322: 855-858.

Forattini OP (2002) *Culicidologia Médica*, v. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

Forattini OP (1996) *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. Ed. EDUSP.

Geetha I, Manonmani AM, Paily KP (2010) Identification and characterization of a mosquito pupicidal metabolite of a *Bacillus subtilis subsp. subtilis strain*. *Appl Microbiol Biotechnology* 86:1737-1744.

Hiwat H, Bretas G (2011) Ecologia de *Anopheles darlingi* Root em Relação ao Vetor Importância: uma revisão. *Parasitas e Vetores* 4:145-154.

Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O' Neill SL (2011) Wolbachia and the Biological Control of Mosquito-Borne Disease. *EMBO Reports* 12(6):508–518.

Lindh JM, Terenius O, Faye I (2005) 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. *Appl Environ Microbiol* 71:7217-7223.

Mcmeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SC (2009) Stable Introduction of a Life-Shortening Wolbachia Infection Into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323(5920):141-144.

Merritt RW, Dadd RH, Walker ED (1992) Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annu Rev Entomol.*37:349-76.

Minard G, Mavingui P, Moro CV (2013) Diversidade e Função da Microbiota Bacteriana no Holobiont Mosquito. *Parasitas e Vetores* 6:146-158.

Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR (1993) *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gramnegative bacteria. *Exp Parasitol* 77(2):195-199.

Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK (2009) 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* 9:96-118.

Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Stemmer WPC (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370(6488):389-391.

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS (1998) Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brasilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 59(2):325-35

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24(8):1596–1599.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322.

World Health Organization (WHO) (2009) *World malaria report 2009*. In, World Health Organization. 78p.