

Caracterização morfológica de bactérias isoladas do habitat de larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 do município de Coari, AM

Rocha EM¹, Katak RM², Oliveira MR¹, Gama AM¹, Souza AQL², Tadei WP³

¹ Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM, ²Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, ³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM. Email: elerson.matos@hotmail.com

Resumo

A diversidade microbiana associada com larvas de insetos vetores de doenças é fundamental para um bom funcionamento do habitat, pois estão relacionados com alimentação, desenvolvimento e reprodução desses insetos. Conhecer a microbiota associadas às larvas de mosquitos é importante, considerando que dependendo de suas funções, esses seres microscópicos podem até serem utilizados para o controle de insetos vetores de doenças, como a malária que na região amazônica é transmitida, principalmente, pelo mosquito *Anopheles darlingi* Root, 1926. Este inseto se procria em lagos situados, principalmente perto de áreas Peri-urbanas. Este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar morfológicamente bactérias associadas ao habitat larval de *A. darlingi* do Município de Coari no Estado do Amazonas. Foram obtidas 84 colônias isoladas de amostras de água, as quais foram caracterizadas de acordo com as formas, cor, textura, Gram positivas e negativas. A diversidade encontrada corresponde a 32 possíveis gêneros, entre bacilos Gram- com sete representantes, bacilos Gram+ com quatro, cocos Gram- com dezesseis e cocos Gram+ com 5 representantes.

Palavras-chave: Bioprospecção, malária, microbiota aquática.

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 *Anopheles* Meigen, 1818, considerado vetor nessas

condições. A espécie de vetor mais prevalente na região Amazônica é *A. darlingi* Root, 1926 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A malária é 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 da Organização Mundial da Saúde, em 2013 cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, situadas em regiões tropicais do planeta. 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 90% de todas as mortes por malária no mundo, sendo que as crianças com idade menores de 5 anos representam 78% de desse total (WHO, 2014).

Na Amazônia, as condições tropicais e o ciclo hidrológico da região favorecem a formação de inúmeros criadouros propiciando a proliferação de mosquitos. Em decorrência das alterações ocasionadas por estes fatores ambientais, o aumento na densidade populacional dos vetores provoca a disseminação da malária, por toda a região (TADEI et al., 2010). Além disso, outros fatores que contribuem sobre maneira para os altos índices de malária na região tais como o limitado número de estratégias de controle disponíveis, as condições ambientais que favorecem a proliferação do vetor, suporte técnico limitado na implementação das ações de controle, a presença e a densidade de vetores, áreas que apresentam vetores com resistência aos inseticidas, dentre outros, Neste sentido, novos métodos de combate à doença são urgentemente necessários (RIEHLE et al., 2007).

Nos últimos anos, vários experimentos realizados validaram a ideia de que microrganismos presentes em mosquitos vetores da malária podem ser geneticamente modificados, para inibirem o desenvolvimento do plasmódio e tornarem os vetores refratários à transmissão da malária (SMITH et al., 2013). Porém, a microbiota bacteriana do habitat larval dos vetores da malária é pouco conhecida, como também não existem estudos sobre a diversidade bacteriana para o nicho destes vetores (LINDH et al., 2005).

O isolamento de bactérias presentes no habitat aquático de larvas de *A. darlingi* possibilitará identificar espécies simbiotes do inseto disseminador da malária na região amazônica. O primeiro passo é isolar e caracterizar bioquimicamente estas espécies,

neste contexto, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar morfologicamente bactérias associadas ao habitat larval de *A. darlingi* do Município de Coari-AM.

Metodologia

As amostras de água foram coletadas no município de Coari no Estado do Amazonas, tendo em vista que é uma área de registros de casos de malária pelo SIVEP malária do Ministério da Saúde nos últimos anos. Foi selecionado um lago que apresenta alto índice de procriação larval de *A. darlingi*, sendo estabelecidos quatro pontos de coletas no lago. Foi utilizado um tubo falcon esterilizado para coletar 50 mL de água em cada ponto. Após a coleta, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo para o laboratório de controle biológico e biotecnologia da dengue e malária do INPA em Manaus-AM, onde foram feitos os devidos procedimentos.

Para este trabalho apenas o ponto 1 do lago de Coari foi analisado. Os meios de cultivo utilizados para o isolamento bacteriano foram: Nutriente Agar (NA), Lúria Bertani (LB) e Agar Tripitona de Soja (TSA). Para cada meio de cultivo foram preparadas 3 placas de Petri acrescido de 20 mg/mL de fluconazol e adicionado 50 µL da amostra e mais 3 placas controle. Em seguida, as placas de Petri foram etiquetadas com informações sobre a origem e armazenadas em uma estufa incubadora B.O.D a 26,4°C. Após 24 horas de crescimento foi feita a seleção das colônias presentes nas placas para o isolamento das bactérias. Para o isolamento da bactéria utilizou-se a técnica do esgotamento por estrias cruzadas a partir de uma única colônia. Após o isolamento, as bactérias 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 de Petri foram colocadas na B.O.D por 24 horas, para o crescimento bacteriano. Após o isolamento foi feito a caracterização morfológica, determinação da coloração de Gram e a contagem do número total de cada isolado obtido. As bactérias foram preservadas nos seus respectivos meios de cultivo na forma líquida com a adição de glicerol a 20% e estocadas em freezer a -20 °C. Os isolados encontram-se preservados no Laboratório de controle biológico e biotecnologia da dengue e malária do INPA em Manaus-AM e onde foi feitas as análises moleculares.

Resultados

Um total de 26 colônias foi isolado em meio de cultivo, sendo que estas foram agrupadas de acordo com a semelhança morfológica e coloração de Gram em 10 possíveis gêneros bacterianos codificados de G1 a G10. O grupo de G1, G10 e G4 apresenta o maior número de isolados com sete, quatro e três respectivamente, enquanto aos outros grupos G2, G5, G7, G8 e G9 apresentaram dois isolados e G3 e G6 com apenas um isolado para cada um.

Um total de 29 isolado foi obtido em meio de cultivo LB sendo que os isolados foram agrupados de acordo com suas semelhanças morfológicas e coloração de Gram em 9 possíveis gêneros bacterianos (G1 a G9). Os grupos G2, G5, G6 apresentaram quatro isolados para cada grupo. Enquanto que G4 é composto de cinco isolados, e os grupos G1 e G3 com três isolados cada um, e os demais G7, G8 e G9 com dois isolados para cada grupo.

Em meio de cultivo TSA, houve crescimento de 29 isolados, que foram agrupados em 13 possíveis gêneros bacterianos (G1 a G13). Destes, G3 e G9 representados com o maior número de isolados cada um com cinco. Enquanto que G1, G2 e G6, estão representados com três isolados cada. Os grupos G5, G7 e G11 também com dois isolados cada e os demais grupos G4, G8, G10 e G12 representados cada um com um único isolado.

A diversidade encontrada corresponde 84 isoladas bacterianos obtido de amostras de água, que foi caracterizado morfolologicamente em 32 possíveis gêneros, entre bacilos Gram - com sete representantes, bacilos Gram + com quatro isolados, cocos Gram - com dezesseis isolados e cocos Gram + com 5 isolados. Estes isolados serão identificados por métodos moleculares, além de ser feita análises estatísticas para determinação das espécies simbiotes de *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 novas técnicas desenvolvidas com aplicação de engenharia genética e biologia molecular, visando elucidar como as comunidades bacterianas podem estar associadas ao inseto no

processo imunológicos à infecções ocasionadas por protozoários do gênero *Plasmodium* que são os agentes etiológicos da malária (BOISSIÈRE, 2012; CHAVSHIN, et al., 2012; NGO, et al 2015; RANI, et al 2009).

No trabalho de Ngo, et al (2015) amostras de mosquitos adultos do gênero *Anopheles* capturados no Vietnam mostra um número expressivo de bactérias associadas. Apesar das bactérias serem de amostras diferentes, tanto as obtidas por estes autores como as isoladas nesta pesquisa, indica que não se pode descartar a hipótese de que a maior parte de bactérias, encontradas no intestino médio de adultos, é oriunda dos habitats aquáticos em que se desenvolvem as larvas do inseto (BOISSIÈRE, 2012).

Em outro estudo realizado por Costa (2012) com bactérias associadas a esponjas isoladas da água no município de Manaus, as características morfológicas das bactérias são semelhantes as das isoladas no presente trabalho. Embora a microbiota bacteriana tenha sido isolada de organismos diferentes, no entanto o ecossistema aquático é da região Amazônica. No entanto, estudos da microbiota aquática associadas a larvas de insetos vetores de doenças na região Amazônica ainda são escassos na literatura.

Conclusão

Um total de 84 isolados bacterianos foi obtido de amostras de água no município de Coari, AM. A diversidade encontrada corresponde a 32 possíveis gêneros, entre bacilos Gram- com sete representantes, bacilos Gram+ com quatro, cocos Gram- com dezesseis e cocos Gram+ com 5 representantes.

Referências Bibliográficas

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): e 1002742. doi:10.1371/journal.ppat.1002742, 2012.

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.

COSTA, G.C.M. Microbiota Bacteriana associada às esponjas de água doce da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Manaus: UEA, 2012.

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.

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.

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.

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

SMITH, RYAN C; CHRISTOPHER KIZITO; JASON L. RASGON; MARCELO JACOBS-LORENA. 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.

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.

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