

## Uso de microrganismos de efluente industrial no controle biológico de vetores

*Use of industrial effluent microorganisms in biological vector control*

*Uso de microorganismos de efluentes industriais en el control biológico de vectores*

<https://doi.org/10.17058/jeic.v10i2.14229>

Recebido em: 27/09/2019

Aceito em: 12/05/2020

Disponível online: 05/06/2020

**Autor Correspondente:**

Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
michel.passarini@unila.edu.br

Av. Tarquínio Joslin dos Santos, 1000. Jardim  
Universitário, Foz do Iguaçu - PR, Brasil.

Rafaela Alberton Favato<sup>1</sup> 

Nathalia Luana Cecchet<sup>1</sup> 

Cléber Cardeal<sup>2</sup> 

Sandro Roberto Galvão<sup>3</sup> 

Jean Avemir Rios<sup>3</sup> 

André de Souza Leandro<sup>3</sup> 

Júlia Ronzella Ottoni<sup>2</sup> 

Michel Rodrigo Zambrano Passarini<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), Brasil.

<sup>2</sup> Centro Universitário Dinâmica das Cataratas (UDC), Brasil.

<sup>3</sup> Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Brasil.

### RESUMO

**Justificativa e Objetivos:** a utilização de microrganismos como controle biológico de vetores sanitários pode ser considerada uma prática menos agressiva ao ambiente, em comparação com os produtos químicos utilizados. O presente estudo avaliou a eficiência de suspensões celulares de fungos e bactérias isolados de efluentes industriais têxteis no controle sanitário dos vetores naturais *Aedes aegypti* e *Dermacentor nitens* como alternativa sustentável de controle biológico. **Métodos:** foram avaliadas sete linhagens de fungos e seis de bactérias. Os isolados foram cultivados em caldo nutriente e caldo de batata, para bactérias e fungos, respectivamente. Alíquotas de 2 mL de cada suspensão microbiana foram adicionadas diretamente nas larvas dos mosquitos e nos carrapatos adultos. Foram analisadas alterações de movimentação e paralisação dos vetores em diferentes tempos de exposição entre zero e 20 minutos e três e 24 horas. **Resultados:** duas bactérias e um fungo promoveram uma desaceleração dos movimentos e/ou um aumento da movimentação dos ectoparasitas logo após a administração. Dois isolados bacterianos promoveram a paralisação dos movimentos de uma larva do mosquito *Aedes aegypti* em seu primeiro estágio de desenvolvimento, enquanto que um fungo provocou aumento da movimentação das larvas em seu estágio de desenvolvimento mais avançado. **Conclusão:** os microrganismos mostraram potencial uso no controle de vetores sanitários. Testes subsequentes de atividade dos possíveis metabólitos secundários produzidos e das formas de administração das culturas microbianas serão executados. Os resultados encontrados encorajam futuros estudos de otimização e caracterização dos extratos celulares, os quais poderão ser utilizados como ferramenta sustentável no controle biológico.

**Descritores:** Biocontrole; Efluentes Industriais; *Aedes aegypti*; Carrapato.

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** the use of microorganisms as biological control of health vectors can be considered a less aggressive practice to the environment, in comparison with the chemicals used. The present study evaluated the efficiency of cell suspensions of fungi and bacteria isolated from industrial textile effluents in the sanitary control of

the natural vectors *Aedes aegypti* and *Dermacentor nitens* as a sustainable alternative for biological control. **Methods:** seven fungi and six bacteria strains were evaluated. The isolates were grown in nutrient broth and potato broth, for bacteria and fungi, respectively. 2 mL aliquots of each microbial suspension were added directly to mosquito larvae and adult ticks. Changes in movement and paralysis of vectors at different exposure times between zero and 20 minutes and three and 24 hours were analyzed. **Results:** two bacteria and a fungus promoted a slowdown in movement and / or an increase in the movement of ectoparasites shortly after administration. Two bacterial isolates caused the movement of a larva of the *Aedes aegypti* mosquito to stop in its first stage of development, while a fungus caused increased movement of the larvae in their most advanced stage of development. **Conclusion:** the microorganisms showed potential use in the control of health vectors. Subsequent activity tests of the possible secondary metabolites produced and the ways of administering the microbial cultures will be performed. The results found encourage future studies of optimization and characterization of cell extracts, which can be used as a sustainable tool in biological control.

**Descriptors:** Biocontrol; Industrial effluents; *Aedes aegypti*; Tick.

## RESUMEN

**Justificación y objetivos:** el uso de microorganismos como control biológico de vectores sanitarios puede considerarse una práctica menos agresiva para el medio ambiente en comparación con los productos químicos utilizados. El presente estudio evaluó la eficiencia de las suspensiones de células fúngicas y bacterianas de efluentes industriales textiles en el control sanitario de los vectores *Aedes aegypti* y *Dermacentor nitens* como una alternativa sostenible para el control biológico. **Métodos:** evaluaron siete hongos y seis de bacterias. Los aislamientos se cultivaron en medio de cultivo, caldo nutrientes y de papa para bacterias y hongos, respectivamente. Se agregaron alícuotas de 2 mL de cada suspensión microbiana directamente a las larvas de mosquito y las garrapatas adultas. Analizaron los cambios en el movimiento y la parálisis de los vectores a diferentes tiempos de exposición entre cero y 20 minutos y tres y 24 horas. **Resultados:** dos bacterias y un hongo causaron una reducción del movimiento y/o aumentó el movimiento del ectoparásito poco después de la administración. Dos bacterias paralizaron los movimientos de las larvas de un mosquito en su primera etapa de desarrollo y un hongo causó un mayor movimiento de las larvas en su etapa posterior de desarrollo. **Conclusión:** los microorganismos mostraron uso potencial como control de vectores sanitarios. Se realizarán pruebas de actividad de los posibles metabolitos secundarios producidos y las formas de administración de los cultivos microbianos. Los resultados fomentan más estudios de optimización y caracterización de extractos celulares, que pueden utilizarse como herramienta sostenible en el control biológico.

**Descriptor:** Biocontrol; Efluentes Industriales; *Aedes aegypti*; Garrapatas.

## INTRODUÇÃO

O controle sanitário de doenças transmitidas por vetores representa um problema para a humanidade, sendo uma das principais causas de morbidades na população. Diversos fatores podem interferir na exposição de um indivíduo a estes vetores, como a distribuição geográfica, social e cultural, os níveis educacionais da população e até mesmo as características climáticas da região.<sup>1</sup> Dentre os vetores de maior importância econômica para o Brasil, encontram-se os mosquitos do gênero *Aedes* (principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) e carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma dubitatum* e *Dermacentor nitens*.

O *Aedes aegypti* é uma das espécies de maior importância epidemiológica na transmissão de arboviroses graves, como Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela nos ambientes urbanos.<sup>2</sup> As arboviroses transmitidas pelo *Aedes aegypti* não apenas atingiram a população brasileira, mas também têm demonstrado crescimento gradual ao longo dos anos. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, entre 2018 e 2019 foram confirmados 596.381 casos de Dengue, dos quais 366 resultaram em óbitos, e 38.022 casos de

Chikungunya, que resultaram em 15 óbitos, sendo registrados 1.127.244 casos prováveis de dengue no Brasil. Em comparação ao mesmo período de 2018, 170.628 casos prováveis foram registrados, um aumento de 85% de 2018 para 2019. No estado do Paraná, foram confirmados 25 casos de Dengue (2 óbitos) no ano de 2018, enquanto que, no ano de 2019, foram confirmados 351 casos (21 óbitos), mostrando um aumento expressivo de 92,9% nos casos da doença no período de um ano.<sup>3</sup>

Espécies de carrapatos podem transmitir o mesmo número ou até mais patógenos do que qualquer outro grupo de artrópodes, os quais se alimentam de sangue de humanos e animais.<sup>4</sup> Espécies de *Dermacentor nitens* (carrapato-da-orelha-do-cavalo) se caracterizam por acometer principalmente os equinos, podendo, ocasionalmente, parasitar outros animais como bovinos e ovinos.<sup>5</sup> Esses vetores carregam consigo bactérias da espécie *Babesia caballi*, agente causador da Babesiose equina. Essa enfermidade ocasiona, nos equinos, febre, anemia, icterícia, hepatomegalia e perda de peso, levando à queda no desempenho dos animais e ocasionando prejuízo econômico aos criadores.<sup>6,7</sup> No que diz respeito à saúde pública, infestações humanas por espécies de *Dermacentor nitens* são incomuns; entretanto, já foi

relatada a presença de bactérias patogênicas, como *Rickettsia rickettsii* (causadora da febre maculosa) e *Borrelia burgdorferi* (causadora da Doença de Lyme em humanos), nessa espécie de carrapato, sendo que *Borrelia burgdorferi* foi encontrada em espécies de *Dermacentor nitens* no estado do Paraná.<sup>8</sup>

As metodologias empregadas no controle dos mosquitos transmissores dessas doenças de importância sanitária, geralmente, são químicas, através de inseticidas e larvicidas, mas também podem ser mediadas por controle mecânico, onde as principais atividades envolvem a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros, a drenagem de reservatórios, bem como a instalação de telas em portas e janelas. Por ser um país em desenvolvimento e com clima predominantemente tropical, a multiplicação e propagação dos insetos é favorecida, e os métodos comuns de controle sanitário possuem baixa sustentabilidade, principalmente em longo prazo.<sup>9</sup> Assim como para controle de mosquitos, o método mais empregado no combate aos carrapatos que acometem os equídeos é o uso de produtos químicos. Entretanto, devido às particularidades de cada espécie de carrapato, deve-se dar atenção aos diferentes métodos de controle e períodos de tratamento.<sup>7</sup>

Métodos de controle biológicos utilizam predadores ou patógenos com potencial para reduzir a população vetorial.<sup>10</sup> Entre as alternativas disponíveis de patógenos, são utilizadas bactérias, fungos, ou parasitas, que podem liberar toxinas, como no caso do *Bacillus thuringiensis*, que possui ação larvicida.<sup>9</sup> Esse isolado bacteriano, por mais que consiga uma ação eficaz na redução do número de *Aedes* imaturos nos recipientes tratados em curto prazo, não teve sua ação efetivamente comprovada na redução da morbidade da dengue em longo prazo.<sup>9,11</sup> Trabalhos na literatura vêm demonstrando um grande potencial no controle de vetores utilizando microrganismos. A eficácia de bactérias das espécies *Xenorhabdus indica*, *X. stockiae* e *Photorhabdus hainanensis* no controle de mosquitos *Aedes aegypti* foi provada através da morte das larvas proporcionada pela exposição às bactérias.<sup>12</sup> No mesmo contexto, pesquisadores avaliaram o efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* em larvas do mosquito *Aedes aegypti* em seu segundo estágio larval (L2), com mortalidade variando de 10 a 100%.<sup>13</sup>

No controle biológico empregado contra carrapatos, linhagens de fungos entomopatogênicos podem ser avaliadas quanto à capacidade de provocar interrupção no ciclo de vida de diversos insetos e aracnídeos.<sup>14</sup> Autores demonstraram a patogenicidade dos fungos *Beauveria bassiana* contra ácaros da espécie *Tetranychus urticae*.<sup>15</sup> De maneira similar, resultados positivos de fungos da espécie *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* já foram demonstrados no controle de carrapatos da espécie *Dermacentor nitens*.<sup>14</sup>

Nesse sentido, a busca por novos compostos para uso como biocontrole se faz necessária. Assim, ambientes, como efluentes de estações de tratamento de Indústria Têxtil, podem ser considerados ambientes

promissores na busca por esses compostos, visto que apresentam características únicas, como grande quantidade de sólidos suspensos, alta demanda de oxigênio e compostos orgânicos, gerando um ambiente de temperatura elevada e propício para proliferação de uma grande carga microbiana adaptada a essas condições extremas.<sup>16,17</sup> Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o potencial biotecnológico de suspensões celulares de fungos e bactérias isoladas de efluente industrial têxtil quanto à capacidade de serem utilizadas como fermentas biológicas sustentáveis no controle de vetores de importância sanitária.

## MÉTODOS

Os carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* foram fornecidos, gentilmente, pelo médico veterinário Cléber Cardeal (UDC) proveniente de equinos de uma propriedade privada. Os ovos da postura de *Aedes aegypti* foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Foz do Iguaçu, coletados em armadilhas estratégicas "ovitrap"<sup>18</sup> dispostas pelo município, produzidas com palhetas de madeira Eucatex, às quais os ovos ficam presos.

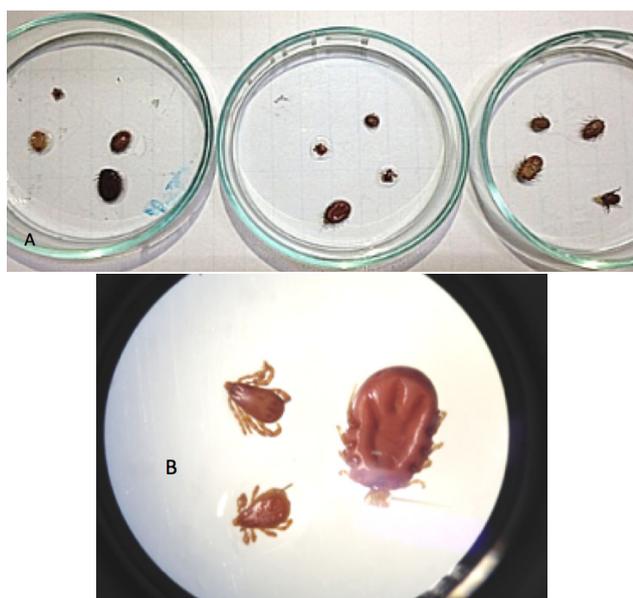
Os microrganismos preservados em glicerol 20% a -20°C, previamente isolados de resíduos da Indústria Têxtil, foram reativados em placas de Petri com os meios de cultivo: a) reativação de bactérias: nutriente ágar (NA) adaptado, composto por 2 g L<sup>-1</sup> de peptona de carne, 3 g L<sup>-1</sup> de peptona e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico; b) reativação de fungos: batata dextrose ágar (BDA), composto por 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, 200 g de batatas cortadas previamente fervidas e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar. Os mesmos meios de cultivos em caldo foram utilizados para o crescimento microbiano em frascos Erlenmeyer de 50 mL para realização dos testes de atividade frente aos vetores. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C (bactérias por 2 dias) e a 28°C (fungos por 7 dias). Os meios líquidos foram incubados sob as mesmas temperaturas, a 150 rpm em *shaker*.

Para avaliação dos efeitos das culturas microbianas em larvas em primeiro estágio de desenvolvimento (L1), foi realizada a eclosão dos ovos de maneira monitorada para sincronização dos testes. Para isso, palhetas de Eucatex contendo os ovos do mosquito foram dispostas em béquer de 500 mL contendo água comum, de maneira que a palheta ficasse em pé e os ovos completamente imersos em água. Após 3 a 4 horas, os ovos eclodiram, e foi possível visualizar a olho nu pequenas larvas se movimentando na água, se acumulando no fundo do béquer (Figura 1). Após a liberação das larvas, foram adicionados farelos de ração animal ao mesmo béquer, com a finalidade de fornecer nutrição às larvas durante os períodos de teste, eliminando o viés de morte por falta de alimento. Para que se evitasse a evasão de mosquitos que, ocasionalmente, pudessem evoluir de larvas até estágios adultos, foi elaborado um sistema de contenção dos mosquitos composto de uma caixa de plástico com tela na tampa.



**Figura 1.** Eclosão de ovos de *Aedes aegypti* através da imersão de palheta de Eucatex contendo posturas em água. As larvas se acumulam no fundo do béquer.

Os experimentos de exposição das culturas celulares aos vetores foram realizados de acordo com Vitta *et al.*, 2018,<sup>12</sup> com modificações. Os vetores foram transferidos para placas de Petri de vidro, separadamente, sendo quatro carrapatos de *Dermacentor nitens* (Figura 2) e 5 larvas de *Aedes aegypti* em primeiro estágio (L1) (cerca de 1 mL da água onde os ovos eclodiram foi adicionado à placa de Petri). Foram adicionados 2 mL de cada suspensão microbiana sobre os vetores. Foram analisadas alterações de movimentação dos vetores sob os tempos de exposição: zero minuto, 20 minutos, 3 e 24 horas. Um teste adicional foi realizado, expondo larvas de *Aedes*



**Figura 2.** A) carrapatos em placas de Petri antes da adição da suspensão microbiana; B) carrapatos eleitos para os testes. Imagens visualizadas em estereomicroscópio.

*aegypti* em estágio mais avançado (L4). Placas de Petri contendo o mesmo número de vetores e água destilada foram utilizadas como controles. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

## RESULTADOS

Os resultados encontrados após avaliação da atividade biocida utilizando isolados microbianos contra carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados de testes de exposição de carrapatos *Dermacentor nitens* a culturas microbianas.

Cultura microbiana	0 minutos	20 minutos	3 horas	24 horas
<b>BACTÉRIAS</b>				
ITB 04	I	I	VIII	VIII
ITB 05	II	V	VIII	VIII
ITB 01	IV	VI	VIII	VIII
ITB 12	VIII	VIII	VIII	VIII
ITB 16	VIII	VIII	VIII	VIII
<b>FUNGOS</b>				
ITF 17	VIII	VIII	VIII	VIII
ITF 04	III	VI	VIII	VIII
ITF 02	III	VI	VIII	VIII
ITF 03	III *	V	VIII	VIII

*I* Sem alterações. Os carrapatos continuaram com o mesmo movimento com relação ao controle;

*II* Desaceleração dos movimentos dos carrapatos no momento da aplicação da cultura;

*III* Breve aumento de movimentação dos carrapatos quando em contato com a cultura;

*IV* Notável aumento da movimentação dos carrapatos quando em contato com a cultura;

*V* Os carrapatos apresentaram movimentação menor do que a apresentada no tempo anterior e menor que o controle;

*VI* Diminuição acentuada dos movimentos. Os carrapatos praticamente tornaram-se imóveis frente ao tempo anterior, e ao controle;

*VII* Os carrapatos permaneceram com a mesma intensidade de movimentação do tempo anterior, sendo semelhantes ao controle;

*VIII* Todos os carrapatos permaneceram imóveis;

\*as células do fungo em cultura, visivelmente, se aderiram às patas dos carrapatos.

Os experimentos de atividade carrapaticida frente às suspensões microbianas testadas foram positivos (com exceção dos isolados ITB 12, ITB 16 e ITF 17), pois os carrapatos ficaram imóveis durante todo o experimento. Os melhores resultados observados foram os extratos celulares de duas bactérias (ITB 01 e ITB 05), pois, logo após a aplicação da suspensão microbiana, houve uma mudança abrupta no movimento dos carrapatos, sendo que o extrato ITB 01 promoveu um notável aumento da movimentação e o extrato ITB 05 promoveu uma desaceleração dos movimentos dos carrapatos. Logo em seguida, houve paralisação completa dos movimentos de todos os carrapatos. Os extratos ITF 02 (*Penicillium* sp.), ITF 03 e ITF 04 também mostraram resultados relevantes, com um breve aumento da movimentação logo após a aplicação da suspensão. Por outro lado, ao observar a suspensão ITF 03, notou-se que células do fungo se aderiram às patas dos carrapatos. Para os demais isolados, os resultados foram considerados negativos. Os carrapatos submetidos a teste controle com água destilada não apresentaram alteração de movimentação até o tem-

po “20 minutos”, e a partir do tempo “3 horas”, houve diminuição elevada das movimentações, diminuindo progressivamente até o tempo de 24 horas. Após 24 horas, a maioria (90%) dos carrapatos deixaram de se movimentar, e aqueles que sobreviveram apresentaram drástica redução da movimentação.

Os resultados dos testes de exposição de larvas de *Aedes aegypti* em primeiro estágio de desenvolvimento (L1) e estágio tardio (L4) frente às culturas microbianas se encontram na tabela 2. Foi avaliada a diminuição ou aumento da movimentação larval, em comparação com a placa controle contendo água destilada, a qual foi analisada como comparativo para cada tempo.

**Tabela 2.** Resultados de testes de exposição de larvas de *Aedes aegypti* a culturas microbianas.

<b><i>Aedes aegypti</i> (estágio inicial de desenvolvimento) – L1</b>				
<b>Cultura microbiana</b>	<b>0 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>3 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>BACTÉRIAS</b>				
ITB 12	I	II	III	IV
ITB 12	I	III	III	III
ITB 15	I	V	VI	VI
ITB 15	I	II	III	V
ITB 16	I	VII	VII	II
ITB 16	I	III	III	II
<b>FUNGOS</b>				
ITF 17	VIII	IX	III	IX
ITF 17	I	IX	III	II
<b><i>Aedes aegypti</i> (3 dias de eclosão dos ovos) – L4</b>				
<b>Cultura microbiana</b>	<b>0 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>3 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>BACTÉRIAS</b>				
ITB 01	I	II	III	III
ITB 01	I	II	III	III
<b>FUNGOS</b>				
ITF 02	I	II	III	III
ITF 02	I	II	III	III
ITF 03	I	II	III	III
ITF 03	I	II	III	III
ITF 34	VIII	X	III	II
ITF 34	VIII	X	III	II

I Sem alterações. As larvas continuaram em mesmo movimento com relação ao controle;

II As larvas apresentaram diminuição da movimentação, sendo ligeiramente menor do que a apresentada no tempo anterior e no controle;

III As larvas mantiveram a intensidade de movimentação do tempo anterior;

IV 01 larva apresentou paralisação dos movimentos. As demais mantiveram a mesma intensidade de movimentação do tempo anterior;

V 01 larva tornou-se praticamente imóvel. As demais mantiveram a mesma movimentação apresentada no tempo anterior;

VI 01 larva apresentou paralisação dos movimentos. As demais apresentaram breve diminuição da movimentação, sendo menor que a apresentada no tempo anterior e ligeiramente menor que o controle;

VII 02 larvas diminuíram significativamente seus movimentos, em comparação ao controle. As demais mantiveram a mesma movimentação apresentada no tempo anterior;

VIII As larvas apresentaram aumento da intensidade de movimentação, comparadas ao controle;

IX As larvas diminuíram a intensidade de movimentação quando comparadas ao tempo anterior, sendo semelhantes ao controle;

X As larvas mantiveram a intensidade de movimentação do tempo anterior, sendo maior do que o controle para este tempo.

Os experimentos de atividade larvicida, avaliados frente às suspensões microbianas testadas, foram positivos, tendo em vista que todos os isolados avaliados

apresentaram atividades frente às larvas de *Aedes aegypti*. Os melhores resultados foram observados com as suspensões dos isolados ITB 12 e ITF 15, que promoveram paralisação da movimentação de ao menos uma larva (20%), em comparação com o controle (água), a partir de 20 minutos de teste. A suspensão do isolado ITB 16 promoveu diminuição significativa dos movimentos de duas larvas (40%) após 20 minutos e 3 horas de avaliação. Já a suspensão do isolado ITF 17, provocou aumento da velocidade de movimentação das larvas, observada imediatamente após a administração da suspensão microbiana.

Suspensões microbianas foram testadas contra larvas de *Aedes aegypti* em estágio mais avançado (após 3 dias de eclosão dos ovos), possivelmente em estágio L4 de desenvolvimento larval, com características morfológicas mais desenvolvidas. Nesse estágio, estruturas de cabeça, tórax e abdômen são mais visíveis e é possível notar o sifão responsável pela respiração na superfície aquosa.<sup>20</sup> Os resultados mostraram um aumento da intensidade de movimentação das larvas logo após a adição da suspensão microbiana do isolado ITF 34 (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Relatos na literatura têm demonstrado o potencial da utilização de microrganismos, como bactérias e fungos, como agentes produtores de compostos que interferem no ciclo de vida de mosquitos, incluindo da espécie *Aedes aegypti*,<sup>19</sup> bem como utilização microbiana contra espécies de carrapatos de importância epidemiológica, como os causadores de febre maculosa.<sup>20</sup> Entretanto, relatos com a utilização de agentes microbianos isolados de efluentes industriais, com potencial utilização contra carrapatos de importância econômica para a criação de cavalos de recreação e/ou atividades esportivas como os da espécie *Dermacentor nitens*, são bem raros. Por outro lado, o uso de microrganismos recuperados de amostras de efluentes industriais têxteis, os quais podem estar adaptados às condições relativamente estressantes, como ferramentas biológicas para o controle de vetores sanitários (*Aedes aegypti* e *Dermacentor nitens*), ainda é inédito.

O efeito das culturas fúngicas sobre os carrapatos pode ter sido proporcionado pela adesão e desenvolvimento de hifas dos fungos no tegumento, de maneira semelhante à atuação de fungos entomopatogênicos.<sup>21</sup> Neste trabalho, os autores reportaram que o fungo invadiu o hospedeiro por colonização difusa, não apresentando uma preferência por tecidos específicos do hospedeiro, com rompimento da parede intestinal e vazamento do conteúdo para a hemocele. No mesmo trabalho, a morte do hospedeiro foi detectada entre 4 e 5 dias de infecção. Três bactérias (ITB 01, 04 e 05) e três fungos (ITF 02, 03 e 04) foram capazes de paralisar totalmente os quatro carrapatos após 3 horas de exposição às suspensões microbianas, demonstrando o potencial desses microrganismos para o controle de vetores como carrapatos, entre eles, os da espécie *Dermacentor nitens*.

Os testes com os isolados ITB 12, ITB 16 e ITF 17 foram realizados com um lote de carrapatos que já apre-

sentavam velocidade de movimentação reduzida, o que, possivelmente, influenciou os resultados. Desta forma, para esses isolados microbianos, os resultados foram desconsiderados, uma vez que os aracnídeos estavam possivelmente estressados devido aos processos de coleta e acondicionamento até o momento do teste.

Resultados laboratoriais indicam que bactérias podem apresentar ferramentas de patogenia contra carrapatos. Entretanto, seu modo de ação e seu valor como potenciais agentes de biocontrole ainda precisam ser determinados.<sup>22</sup> Assim, nossos resultados encorajam novos estudos com a utilização de bactérias ambientais e seus metabólitos no controle de carrapatos de importância sanitária, epidemiológica e econômica, principalmente após os promissores resultados alcançados com as linhagens bacterianas, que apresentaram ação carrapaticida após 3 horas de contato dos vetores.

A ação carrapaticida pode ter ocorrido tanto pelo contato dos compostos produzidos pelos microrganismos e secretados no meio quanto pela ação direta das células microbianas no metabolismo dos carrapatos. Assim, novos experimentos são necessários para determinar se os isolados microbianos são produtores de metabólitos secundários com ação carrapaticida ou se as próprias células microbianas produzem efeito contra esses aracnídeos, para, então, definir qual a melhor estratégia na utilização desses microrganismos como agentes candidatos para controle biológico contra espécies de carrapatos.

Foi demonstrado que existem alternativas sustentáveis para o controle biológico de vetores responsáveis por doenças de grande impacto epidemiológico e que acometem milhares de pessoas no Brasil, como a Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela. A ação larvicida das suspensões microbianas sobre as larvas do mosquito *Aedes aegypti* foi observada pela redução da velocidade de movimentação dos vetores ao entrarem em contato com as suspensões, que, possivelmente, contêm compostos de ação tóxica para os vetores. Essa toxicidade pode ser causada, principalmente, por via oral em estágios imaturos das larvas, mecanismo também reportado em 2018,<sup>12</sup> o qual foi denominado como toxicidade oral por ingestão; neste caso, realizado pela ingestão das células microbianas pelas larvas do mosquito *Aedes aegypti* e não pelo contato de um composto químico. Outra possível ação seria a interferência das reações químicas normais do sistema nervoso, incapacitando a movimentação normal do vetor, representando um mecanismo de ação semelhante a compostos das classes dos organofosforados, carbamatos e piretróides.<sup>11</sup> Esta hipótese poderia explicar o motivo pelo qual algumas suspensões microbianas testadas provocaram aumento da movimentação do vetor após o contato, sugerindo que houve um desequilíbrio químico no sistema nervoso do vetor pelo aumento de descargas elétricas.<sup>23</sup> Assim, é possível inferir que o composto presente na suspensão microbiana pode retardar seu desenvolvimento, impedindo que essas venham a se tornar vetores ativos.

As triagens realizadas mostraram o potencial de extratos celulares microbianos para o controle biológico de

vetores de interesse epidemiológico. Estudos adicionais devem ser realizados objetivando definir a temperatura de atividade, a efetividade no controle dos ectoparasitas em outros estágios do ciclo celular das larvas e dos carrapatos e as formas de administração dos extratos microbianos com maior eficiência no combate aos vetores estudados. Deste modo, os microrganismos avaliados no presente estudo se mostraram potenciais candidatos para utilização em um futuro próximo como ferramentas biológicas no controle de vetores de importância sanitária. Os resultados encontrados em nosso trabalho mostram que microrganismos derivados de efluentes industriais possuem grande potencial para serem utilizados como agentes para o combate a vetores de importância sanitária, incluindo mosquitos e carrapatos, como alternativa sustentável ao uso de compostos químicos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Prefeitura de Foz de Iguaçu por conceder a autorização para a realização das pesquisas com larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*; ao Centro de Controle de Zoonoses, pela captura e doação dos ovos dos mosquitos *Aedes aegypti*; e à UNILA, pela aprovação do edital PRPPG 031/2018 concedido como IC modalidade voluntário e ao edital.

## REFERÊNCIAS

1. Golding N, Wilson AL, Moyes CL, et al. Integrating vector control across diseases. *BMC Medicine* 2015;13:249. <http://dx.doi.org/doi:10.1186/s12916-015-0491-4>
2. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica* 2017;166:155-163. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.020
3. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 23 de 2019;50(13):1-18. <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>
4. Pavela R, Canale A, Mehlhorn, et al. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: A review. *Research in Veterinary Science* 2016; 109:1-9. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.09.001
5. Rodrigues VS, Koller WW, Garcia MV, et al. Carrapatos em cavalo: *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*. In: Andreotti R, Garcia MV, Koller WW, (editores). Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos: Embrapa, Brasília, DF, 2019, p.29-45. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/194269/1/Carrapatos-em-cavalos-Amblyomma-sculptum.pdf>
6. Martins TF, Teixeira RHF, Labruna MB. Ocorrência de carrapatos em animais silvestres recebidos e atendidos pelo Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2015;52(4):319-324. doi: 10.11606/issn.1678-4456.

- v52i4p319-324
7. Botteon PTL, Botteon RCCM, Reis TP, et al. Babesiose em cavalos atletas portadores. *Ciência Rural* 2005; 35(5):1136-1140. doi: 10.1590/S0103-84782005000500023
  8. Gonçalves DD, Carreira T, Nunes M, et al. First record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Paraná (Brazil). *Brazilian Journal of Microbiology* 2013;44(3):883-887. doi: 10.1590/S1517-83822013000300035
  9. Zara ALSA, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol Serv Saude*. Brasília 2016;25(2):391-404. doi: 10.5123/s1679-49742016000200017
  10. Huang YJS, Higgs S, Vanlandingham, DL. Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. *Insects* 2017;8(1):21. <https://dx.doi.org/10.3390/insects8010021>
  11. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saude* Brasília 2007;16(4):179-293. doi: 10.5123/S1679-49742007000400006
  12. Vitta A, Thimpoo P, Meesil W, et al. Larvicidal Activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Bacteria against *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2018;8(1):31-36. doi: 10.4103/2221-1691.221134
  13. Silva R, Silva H, Luz C. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista De Patologia Tropical* 2008;33(2):207-216. doi: 10.5216/rpt.v33i2.3446
  14. Cafarchia C, Immediato D, Iatta R, et al. Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Parasites & Vectors* 2015;8:80. doi: 10.1186/s13071-015-0693-9
  15. Ullah MS, Lim UT. Synergism of *Beauveria bassiana* and *Phytoseiulus persimilis* in control of *Tetranychus urticae* on bean plants. *Systematic & Applied Acarology* 2017;22(11):1924-1935. doi: 10.11158/saa.22.11.11
  16. Ferreira I, Sanchez O. Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: How far have we come? *Biotechnology Advance* 2016;34(5):790-802. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.04.003
  17. Beserra, EM, Freitas EM, Souza JT, et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia Ser Zool* 2009;99(3):281-5. doi: 10.1590/S0073-47212009000300008
  18. Silva CE, Limongi JE. Avaliação comparativa da eficiência de armadilhas para a captura e coleta de *Aedes aegypti* em condições de campo. *Cad Saúde Colet* 2018;26(3):241-248. doi: 10.1590/1414-462X201800030045
  19. Bashir F, Aslam S, Ahmed R, et al. Larvicidal Activity of *Bacillus laterosporus* Against Mosquitoes. *Pakistan J Zool* 2016;48(1):281-284. <https://pdfs.semanticscholar.org/958f/4221b9f56fcb5e8b2733ad1ffd8aa68e888.pdf>
  20. Rocha LFN, Inglis PW, Humber RA, et al. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. *J Basic Microbiol* 2013;53(3):251-259. doi: 10.1002/jobm.201100482
  21. Garcia MV, Monteiro AC, Szabó MPJ. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Ciência Rural* 2004;34(5):1513-1518. doi: 10.1590/S0103-84782004000500029
  22. Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S389-403. doi: 10.1017/s0031182004005219
  23. Ware GW. Effects of pesticides on nontarget organisms. In Gunther FA, Gunther JD. Editors. *Residue Reviews*. Springer, New York, NY, 1980. doi: 10.1007/978-1-4612-6107-0\_9

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

**Rafaela Alberton Favato, Nathalia Luana Cecchet, Júlia Ronzella Ottoni:** contribuíram para a concepção, análise, redação e revisão do artigo;

**Cléber Cardeal · Sandro Roberto Galvão · Jean Avemir Rios · André de Souza Leandro:**

contribuíram para o delineamento do artigo.

**Michel Rodrigo Zambrano Passarini:** contribuiu para o planejamento e delineamento do artigo, análise, redação e revisão final do artigo.

Todos os autores aprovaram a versão final a ser publicada e são responsáveis por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade.