

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE BACTÉRIAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DO CARRAPATO *Amblyomma sculptum* (ACARI: IXODIDAE)

Lais Cristina **Torres**<sup>1</sup>; Elianai Ribeiro de **Souza**<sup>2</sup>; Isabella Barboza de **Almeida**<sup>3</sup>; Fernanda Calvo **Duarte**<sup>4</sup>; Marcia Cristina **Mendes**<sup>5</sup>; Ana Maria Cristina Rebello Pinto da Fonseca **Martins**<sup>6</sup>;

Nº 24816

**RESUMO** – O carrapato *Amblyomma sculptum*, conhecido como carrapato-estrela, é amplamente distribuído nas Américas e é vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira. Seus principais hospedeiros são cavalos, capivaras e antas, mas ele também pode parasitar humanos devido à sua baixa especificidade. Por representar riscos à saúde animal e pública, o *A. sculptum* é alvo de pesquisas para seu controle. Este estudo avaliou a eficácia de bactérias entomopatogênicas do banco de microrganismos da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Instituto Biológico, Campinas, como agentes de controle biológico contra o *A. sculptum*. Testes *in vitro* foram realizados com imersão de dez ninfas e dez adultos do carrapato em 1 mL de 10 suspensões bacterianas por 5 minutos. A taxa de mortalidade foi avaliada após 5, 10 e 15 dias, calculando-se a média da porcentagem de patogenicidade. Os resultados mostraram que as bactérias mais virulentas nas ninfas foram *Pseudomonas protogens* (60% de mortalidade), *Priestia aryabhattai* e *Chromobacterium subtsugae* (ambas com 55% de mortalidade). Para os adultos, as suspensões mais eficazes foram *Bacillus subtilis* (42% de mortalidade), *P. protogens* (38%) e *P. aryabhattai* (35%). Assim, as bactérias *P. protogens* e *P. aryabhattai* se destacaram como potencialmente patogênicas para *A. sculptum* em diferentes fases de vida. Esses resultados sugerem que essas bactérias entomopatogênicas podem ser viáveis para o controle biológico de *A. sculptum*, proporcionando uma alternativa para a redução dos riscos relacionados a este carrapato.

**Palavras-chaves:** Controle biológico, carrapato-estrela, bactérias entomopatogênicas, parasitologia.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, USJT, São Paulo-SP; lais.torres1511@gmail.com

2 Mestre, Pós-Graduação: Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico, São Paulo-SP.

3 Doutoranda, Pós-Graduação: Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, Instituto Biológico, São Paulo-SP.

4 Pesquisador do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

5 Coorientador: Pesquisador do Instituto Biológico, São Paulo-SP.

6 Orientador: Assistente de Pesquisa Tecnológica e Científica do Instituto Biológico, São Paulo-SP; ana.martins@sp.gov.br

**ABSTRACT** – The tick *Amblyomma sculptum*, known as the Cayenne tick, is widely distributed in the Americas and serves as a vector for the bacterium *Rickettsia rickettsii*, which causes Brazilian Rocky Mountain spotted fever. Its main hosts are horses, capybaras, and tapirs, but it can also parasitize humans due to its low host specificity. Given its risks to animal and public health, *A. sculptum* is the subject of research for its control. This study evaluated the efficacy of entomopathogenic bacteria from the microorganism bank of the Laboratory Unit of Reference in Biological Control at the Biological Institute, Campinas, as biological control agents against *A. sculptum*. In vitro tests were conducted by immersing ten nymphs and ten adults of the tick in 1 mL of ten bacterial suspensions for 5 minutes. Mortality rates were assessed after 5, 10, and 15 days, with the average percentage of pathogenicity calculated. The results showed that the most virulent bacteria against nymphs were *Pseudomonas protegens* (60% mortality), *Priestia aryabhattai* and *Chromobacterium subtsugae* (both with 55% mortality). For adults, the most effective suspensions were *Bacillus subtilis* (42% mortality), *P. protegens* (38%), and *P. aryabhattai* (35%). Thus, *P. protegens* and *P. aryabhattai* stood out as potentially pathogenic to *A. sculptum* at different life stages. These results suggest that these entomopathogenic bacteria could be viable for the biological control of *A. sculptum*, providing an alternative for reducing the risks associated with this tick.

**Keywords:** Biological control, Cayenne tick, entomopathogenic bacteria, parasitology.

## 1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Amblyomma sculptum* é um ectoparasita hematófago obrigatório encontrado em todos os continentes, parasitando animais e humanos. Anteriormente classificado era como *Amblyomma cajennense*, entretanto, o mesmo passou a ser um complexo composto por seis espécies distintas, sendo o *A. sculptum* uma delas.

Conhecido popularmente como carrapato-do-cavalo, rodoleiro, micuim ou carrapato-estrela, possui um ciclo de vida trioxeno anual, necessitando de três hospedeiros para completar uma geração. Seus principais hospedeiros são capivaras, cavalos e antas. O *A. sculptum* é o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira, o que representa grandes riscos para a saúde pública.

Este carrapato é um alvo importante de programas de controle devido aos danos causados à saúde pública e animal, com o uso de carrapaticidas químicos sendo o método mais comum, embora esses compostos possam causar impactos ambientais negativos e gerar mutações,

selecionando populações multiresistentes. Novas metodologias de controle com agentes biológicos estão sendo estudadas, como fungos, nematoides e bactérias entomopatogênicas.

São escassos os estudos sobre o uso de bactérias para o controle biológico do *A. sculptum*, mas estudos com outras espécies de carrapatos, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Dermacentor nitens*, mostraram resultados promissores. Baseado nesses dados, o presente trabalho propõe uma avaliação inicial da eficácia de diferentes espécies de bactérias no controle biológico do carrapato *A. sculptum*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *Amblyomma sculptum* foram coletadas no Centro Avançado de Pesquisa em Engenharia e Automação do I.A.C. em Jundiaí, utilizando armadilhas de CO<sub>2</sub> adaptadas. As suspensões bacterianas foram cedidas pela da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico/IB de Campinas. Dez espécies de bactérias foram selecionadas e cultivadas: *Priestia megaterium*, *Priestia aryabhattai*, *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas protegens*, *Azospirillum brasilense* e *Chromobacterium subtsugae*. As suspensões bacterianas foram avaliadas segundo seu grau de turbidez utilizando a escala nefelométrica de Mc Farland.

**Tabela 1.** Identificação das suspensões bacterianas e seu grau de turbidez, segundo a fórmula nefelométrica de Mc Farland.

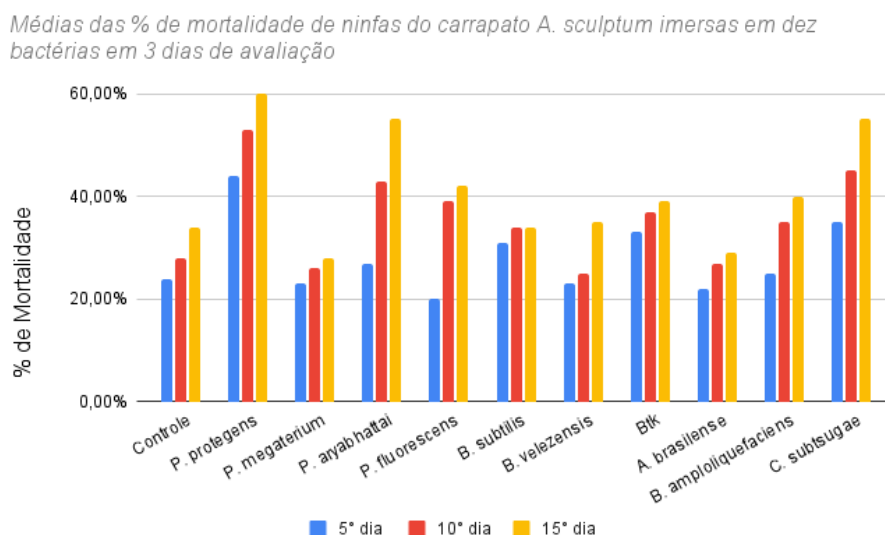
Suspensão bacteriana	Tubo n°	N° aproximado de bactérias (x10 <sup>8</sup> )
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	9	27
<i>Priestia megaterium</i>	10	30
<i>Priestia aryabhattai</i>	10	30
<i>Bacillus subtilis</i>	6	18
<i>Bacillus velezensis</i>	1	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	10	30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	30
<i>Pseudomonas protegens</i>	10	30
<i>Azospirillum brasilense</i>	9	27
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	10	30

Para o teste *in vitro* de imersão, dez replicas contendo dez ninfas e dez adultos, cada, de *A. sculptum* foram expostos às suspensões bacterianas por cinco minutos e, em seguida,

acondicionados em condições controladas. A mortalidade foi avaliada nos dias 5, 10 e 15. Como controle, foi utilizado o meio de cultura Nutrient Broth. Como resultado foram analisadas as médias de mortalidade de ninfas e adultos. A análise dos dados foi realizada utilizando ANOVA, com significância adotada em  $p < 0,05$  e empregando as correções de Dunnett e Tukey para comparações estatísticas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes *in vitro* com ninfas de carrapatos *Amblyomma sculptum* mostraram que o grupo controle teve uma mortalidade de 34% até o 15º dia. No 5º dia, a maior mortalidade no grupo tratado foi de 44%, causada pela bactéria *Pseudomonas protegens*, enquanto a menor foi de 20% com *Pseudomonas fluorescens*. No 10º dia, *P. protegens* novamente apresentou a maior mortalidade (53%), com as menores taxas de mortalidade observadas em *Bacillus velezensis* (25%) e *Priestia megaterium* (26%). No 15º dia, *P. protegens* atingiu 60% de mortalidade, seguida por *Chromobacterium subtsugae* e *Priestia aryabhatai* (ambas com 55%). As bactérias *P. fluorescens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis kurstaki* e *B. velezensis* apresentaram mortalidades de 42%, 40%, 39% e 35%, respectivamente. E as menores taxas foram observadas com *Bacillus subtilis* (34%), *Azospirillum brasilense* (29%) e *P. megaterium* (28%). Dados demonstrados na figura abaixo.

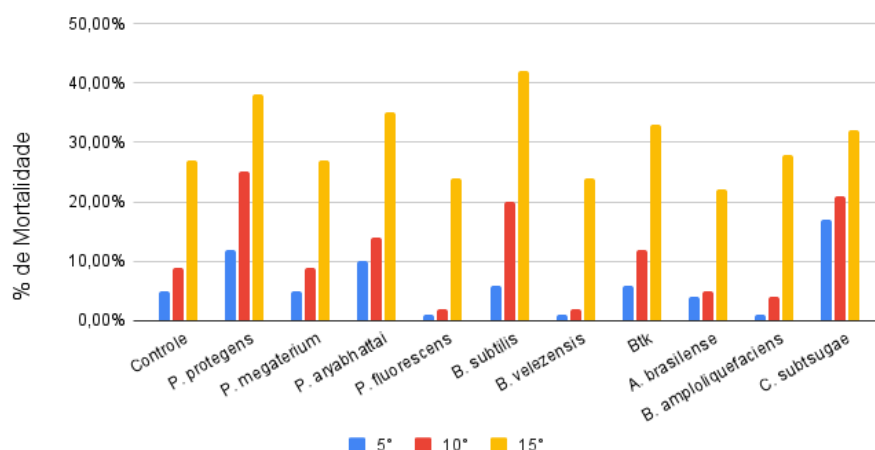


**Figura 1.** Média da porcentagem de mortalidade acumulada nos dias 5, 10 e 15 após aplicação *in vitro* das bactérias já descritas sobre a forma de ninfa do carrapato *A. sculptum*.

No experimento *in vitro* com carrapatos adultos de *Amblyomma sculptum*, o ápice de mortalidade foi observado no 15º dia. O grupo controle apresentou mortalidade de 27%. No grupo

tratado, a maior taxa de mortalidade foi causada por *Bacillus subtilis* (42%), seguida por *Pseudomonas protegens* (38%) e *Priestia aryabhattai* (35%). Em seguida, *Bacillus thuringiensis kurstaki* (33%), *Chromobacterium subtsugae* (32%) e *Bacillus amyloliquefaciens* (28%). E as menores taxas de mortalidade foram causadas por *Azospirillum brasilense* com 22%, *Bacillus velezensis* e *Pseudomonas fluorescens* com 24%, e *Priestia megaterium* com 27%. Dados exibidos na figura 2.

Médias das % de mortalidade de adultos do carrapato *A. sculptum* imersas em dez bactérias em 3 dias de avaliação



**Figura 1.** Média da porcentagem de mortalidade acumulada nos dias 5, 10 e 15 após aplicação *in vitro* das bactérias já descritas sobre a forma de adulto do carrapato *A. sculptum*.

Hassanain *et al.* (1997) avaliaram a eficácia dos esporos de três subespécies de *Bacillus thuringiensis* (*kurstaki*, *israeliensis* e *thuringiensis*) na pulverização contra dois tipos de carrapatos: o carrapato de corpo mole *Argas persicus* e o carrapato duro *Hyalomma dromedarii*. As subespécies de *B. thuringiensis* conseguiram alcançar 100% de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *A. persicus*. No entanto, para *H. dromedarii*, nenhuma das subespécies resultou em 100% de mortalidade, mesmo com doses elevadas, indicando uma maior dificuldade na ação tóxica das bactérias contra carrapatos da família Ixodidae, à qual o *A. sculptum* também pertence.

No estudo, a mortalidade média dos carrapatos no grupo controle foi de 34% para ninfas e 27% para adultos, sugerindo que o meio de cultura pode ter contribuído para a mortalidade observada.

Os resultados de mortalidade variaram entre ninfas e adultos de *A. sculptum*. Para os adultos, não houve diferença estatisticamente significativa nos tratamentos comparados aos controles e entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Em contraste, para as ninfas, três tratamentos com as bactérias *P. protegens*, *P. aryabhattai* e *C. subtsugae* mostraram diferenças significativas em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). Em conjuntura, alguns grupos tratados quando comparados entre si também demonstraram diferenças significativas. Resultados expressos na tabela 2.

**Tabela 2.** Dados de análise de variância de dois fatores (ANOVA) das médias de mortalidade dos três dias de experimento e suas diferenças significativas entre os tratamentos.

Comparação entre tratamentos com significância estatística	Significância (p)
<i>P. protogens</i> vs. <i>P. megaterium</i>	****
<i>P. protogens</i> vs. <i>P. aryabhattai</i>	****
<i>P. protogens</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	****
<i>P. protogens</i> vs. <i>B. subtilis</i>	****
<i>P. protogens</i> vs. <i>B. velezensis</i>	****
<i>P. protogens</i> vs. BTK	****
<i>P. protogens</i> vs. <i>A. brasilense</i>	****
<i>P. protogens</i> vs. <i>B. amyloliquefaciens</i>	****
<i>P. aryabhattai</i> vs. <i>P. megaterium</i>	****
<i>P. aryabhattai</i> vs. <i>B. velezensis</i>	****
<i>P. aryabhattai</i> vs. <i>A. brasilense</i>	****
<i>C. subtsugae</i> vs. <i>P. fluorescens</i> vs.	*
<i>C. subtsugae</i> vs. <i>B. subtilis</i>	**
<i>C. subtsugae</i> vs. <i>B. velezensis</i>	****
<i>C. subtsugae</i> vs. <i>A. brasilense</i>	****
<i>C. subtsugae</i> vs. <i>P. megaterium</i>	****
<i>C. subtsugae</i> vs. <i>B. amyloliquefaciens</i>	**
BTK vs. <i>A. brasilense</i>	*
BTK vs. <i>P. megaterium</i>	*

As comparações entre cada par de grupos estão listadas na primeira coluna, seguidas pelos resultados estatísticos, para a significância: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,001$ .

As bactérias com maior virulência sobre o carrapato *A. sculptum* na fase de ninfa foram as suspensões bacterianas de *P. protogens* (60% de mortalidade), seguidas por *P. aryabhattai* e *C. subtsugae* (55% de mortalidade cada). Para os adultos, as mais eficazes foram *B. subtilis* (42% de mortalidade), *P. protogens* (38%) e *P. aryabhattai* (35%). Assim, *P. protogens* e *P. aryabhattai* se mostraram patogênicas para *A. sculptum* em ambas as fases de vida.

Powers *et al.* (2015) identificaram que a bactéria *P. protogens* produz um composto antibiótico e antifúngico, sugerindo que esse composto pode atuar contra o carrapato. A ingestão de *P. protogens* pode causar antagonismo microbiano com a microbiota presente no próprio artrópode. Wilson *et al.* (2023) avaliou o potencial antimicrobiano e larvicida da bactéria *P. aryabhattai* contra larvas de *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*. Como resultado constatou que *P. aryabhattai* tem potente atividade larvicida, provocando mortalidades de 67,8% e 57,8% nas larvas, respectivamente, indicando uma ação inseticida similar à observada neste estudo.



#### 4. CONCLUSÃO

- Das dez suspensões bacterianas testadas em ninfas de *A. sculptum*, três apresentaram eficácia superior a 50% (*P. protogens*, *P. aryabhatai* e *C. subtsugae*);
- Entre as dez suspensões testadas em adultos de *A. sculptum*, três alcançaram eficácia maior que 35%: *B. subtilis*, *P. protogens* e *P. aryabhatai*.
- O maior nível de mortalidade foi observado no 15º dia dos testes.
- Comparando os testes de imersão em ninfas e adultos, o experimento com ninfas teve maior eficácia, com 60% de mortalidade.
- As bactérias *P. protogens* e *P. aryabhatai* mostraram o maior potencial para o controle de *A. sculptum*.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa que possibilitou a realização deste estudo. E agradeço também as minhas orientadoras, Ana Maria Cristina Rebello Pinto da Fonseca Martins e Márcia Cristina Mendes, pela confiança e pela oportunidade de realizar o presente trabalho.

#### 6. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. Infectious Disease Clinics of North America, 2008.
- ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C. M.; DUARTE, R. M. R.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; SANTOS, F. C. P.; LEITE, R. M.; KATZ, G.; SILVA, L. J. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, 2012. p. 345-347.
- BRUM, J. G. W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecia lapagei* (Grimont et al. 1981): etiopatogenia e sazonalidade. 1988. 95 f. **Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 1988.
- COSTA, J.; BOTELHO, J. Parasitologia Humana. In: NEVES, D.; MELO, A.; LINARDI, P.; VÍTOR, R. (Eds.). [s.l.]: **Atheneu**, 2011.
- FAVATO, R. A.; CECCHET, N. L.; CARDEAL, C.; RIOS, J. A.; RONZELLA OTTONI, J.; PASSARINI, M. R. Z.; LEANDRO, A. DE S.; GALVÃO, S. R. Uso de microrganismos de efluente industrial no controle biológico de vetores. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 10, n. 2, 5 abr. 2020.
- GRAY, N. F. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, ph and nematode density on distribution. **Soil Biology and Biochemistry**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 499-507, Jan. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90017-3](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(85)90017-3).
- HASSANAIN, M.; GARHY, M.; ABDEL-GHAFFAR, F.; SHARABY, A.; ABDEL-MEGEED, K. Estudos de controle biológico de carrapatos moles e duros no Egito. I. O efeito das variedades *Bacillus thuringiensis* em carrapatos moles e duros (Ixodidae). **Pesquisa em Parasitologia**, v. 83, p. 209-213, 1997.

KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Illustrated Key to Nymphs of the Tick Genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) Found in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 389-495, 1998.

KOCH, C. L. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. **Archive fur Naturgeschichte**, v. 10, p. 217-239, 1844.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 1–14, 2001.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, Apr. 2014. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.004. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24556273.

POWERS, M. J.; SANABRIA-VALENTÍN, E.; BOWERS, A. A.; SHANK, E. A. Inhibition of Cell Differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, 2015. <https://doi.org/10.1128/jb.02535-14>.

RODRIGUES, V. DA S.; PINA, F. T. B.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. 132. ed. Brasília: **Embrapa Gado de Corte**, 2015. 10 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1030760/carrapato-estrela-amblyomma-sculptum-ecologia-biologia-controle-e-importancia>. Acesso em: 24 jan. 2024.

RUVALCABA, M. F.; CHORA, G. P.; MARTÍNEZ, A. R.; VELÁZQUEZ, V. H.; PARRA, A. DE LA B.; ROSA, D. P. Avaliação da patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* para uma cepa do carrapato, *Rhipicephalus microplus*, resistente a produtos químicos pesticidas. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, p. 186, 2010. <https://doi.org/10.1673/031.010.14146>.

VARGAS, G. P.; FIORIO, M. S.; WORTMANN, B. B.; OLIVEIRA, L. R. S. DE; ROSA, R. L. DA; SOUZA, E. M.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; TURETA, E. F. Métodos alternativos e sustentáveis de controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. **Revista Liberato**, v. 21, n. 35, p. 27–38, 2020.

VENTURINI, F. P. Efeitos da exposição à lambda-cialotrina no teleósteo *Brycon amazonicus*: metabolismo antioxidante, parâmetros histológicos e hematológicos. 2014. 125 f. **Tese (Doutorado) - Curso de Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2014.

WILSON, J. J.; HARIMURALIKRISHNAA, T.; SIVAKUMAR, T.; MAHENDRAN, S.; PONMANICKAM, P.; THANGARAJ, R.; SEVARKODIYONE, S.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; VENKIDASAMY, B. Síntese biogênica de nanopartículas de prata usando *Pantoea stewartii* e *Priestia aryabhatai* e seu potencial antimicrobiano, larvicida, histopatológico e de biotoxicidade. **Bioengineering**, v. 10, p. 248, 2023. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020248>.