

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias
associadas a insetos**

Luís Gustavo de Almeida

Tese apresentada para obtenção do título Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2018**

Luís Gustavo de Almeida
Engenheiro Agrônomo

**Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias
associadas a insetos**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUIS CÔNSOLI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Almeida, Luís Gustavo de

Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos / Luís Gustavo de Almeida. -- Piracicaba, 2018.

111 p.

Tese (Doutorado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Simbionte 2. Microbiota 3. Inseticida 4. Bioatividade 5. Biotecnologia I. Título

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Natalia, à minha querida filha Lívia e aos meus queridos pais, Luiz Carlos e Maria Lúcia, pelo amor, apoio, incentivo, segurança e compreensão durante meus estudos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cònsoli pela oportunidade, orientação, amizade, confiança e por todos os valiosos conhecimentos compartilhados, que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Ana Flávia Canovas Martinez pela grande parceria, amizade, ensinamentos e contribuição nos resultados multidisciplinares deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada à Química de Produtos Naturais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelas análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS).

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos pela amizade, companhia e que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Capes e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP (processo 2011/50877-0) pelo financiamento de parte dessa pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. PARTICIPAÇÃO DE SIMBIONTES NA SOBREVIVÊNCIA E APTIDÃO BIOLÓGICA DE INSETOS EXPOSTOS A INSETICIDAS.....	13
Resumo	13
Abstract.....	13
2.1. Introdução.....	14
2.2. Conclusões.....	15
Referências	16
3. BIOACUMULAÇÃO DE INSETICIDAS POR SIMBIONTES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ECOLOGIA DO HOSPEDEIRO	19
Resumo	19
Abstract.....	19
3.1. Introdução.....	20
3.2. Conclusões.....	22
Referências	22
4. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DA FORMIGA CORTADEIRA <i>Acromyrmex coronatus</i> (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E O SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A DESCOBERTA DE MOLÉCULAS INSETICIDAS	25
Resumo	25
Abstract.....	25
4.1. Introdução.....	26
4.2. Conclusões.....	27
Referências	27
5. IIL-ASP77, UM SIMBIONTE DE <i>Acromyrmex coronatus</i> , FONTE DE DOIS COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE INSETICIDA ÀS LAGARTAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	30
Resumo	30
Abstract.....	30
5.1. Introdução.....	31
5.2. Conclusões.....	32
Referências	33

RESUMO

Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos

Os insetos são o grupo de organismos multicelulares mais abundantes e diversos, habitando os mais variados ambientes. Muitas de suas adaptações a condições adversas podem estar relacionadas à sua associação a bactérias. O conhecimento da diversidade dessa associação pode elucidar a importância desses microrganismos nas respostas de insetos a fatores bióticos e abióticos. Bactérias também são o principal alvo de exploração para o desenvolvimento de produtos de interesse biotecnológico. Dada à sua diversidade e interações com o ambiente, insetos representam um novo nicho para a exploração de microrganismos com potencial biotecnológico. A longa história de associação dos insetos com bactérias e os dados recentes da participação da microbiota a eles associada na degradação de moléculas orgânicas, naturais e/ou sintéticas, indicam o potencial desses microrganismos de interferir na resposta do inseto a inseticidas. Adicionalmente, simbioses bacterianas associadas aos insetos também podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos. A descoberta de novos compostos naturais vem decaindo, surgindo a necessidade de exploração de novos nichos de microrganismos e o uso de novas tecnologias para superar o número reduzido de novas moléculas identificadas. Assim, este trabalho buscou explorar simbioses de insetos para o estudo da sua participação na metabolização de xenobióticos pelo hospedeiro e a identificação de novos compostos inseticidas, tendo como objetivos investigar i) os mecanismos envolvidos na degradação de inseticidas e sua contribuição na capacidade de sobrevivência do hospedeiro, e ii) a diversidade biológica na busca de novas moléculas inseticidas. Bactérias com potencial de degradação de xenobióticos isoladas da microbiota intestinal de insetos resistentes a inseticidas foram utilizadas para a colonização do trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível à inseticidas e investigação da sua participação na sobrevivência do hospedeiro quando exposto a inseticidas, assim como a existência de custo adaptativo da associação a bactérias com capacidade de metabolização de inseticidas. O isolado IIL-C129 *Leclercia adecarboxylata* foi capaz de contribuir para a sobrevivência de lagartas expostas a chlorpirifos ethyl, passando a exigir uma CL₅₀ cerca de 2 vezes superior àquela de lagartas aposimbiontes. Estudo de biologia comparada entre a linhagem aposimbionte e aquela associadas ao isolado IIL-C129 demonstrou a existência de custo adaptativo para essa associação, quando na ausência da pressão de seleção do inseticida. A investigação dos mecanismos envolvidos na metabolização de inseticidas por bactérias simbioses de *S. frugiperda* resistente ao organofosforado chlorpirifos ethyl, aos piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, a espinosina spinosad e a benzoilureia lufenuron revelou, por meio de análises químicas, que essas bactérias são capazes de metabolizar e bioacumular inseticidas interferindo ativamente na atividade de xenobióticos no hospedeiro. O isolado IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens* foi selecionado para a realização de estudos mais aprofundados para a identificação de produtos de degradação e comprovação do mecanismo de bioacumulação de lufenuron. O potencial de simbioses de insetos para o isolamento de bioinseticidas foi avaliado em estudos da diversidade de bactérias cultiváveis associadas a *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae). Foram identificados 46 isolados pertencentes a *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* associados a essa formiga e estudos da atividade inseticida *in vivo* e *in vitro* de extratos orgânicos de metabólitos mostraram grande variação nos resultados de atividade. Ensaio *in vivo* com lagartas de 1º instar de *S. frugiperda* mostraram-se mais adequados, e o isolado Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* foi selecionado para a identificação de moléculas ativas com efeito inseticida. Dois compostos bioativos com atividade inseticida foram identificados e a atividade inseticida atribuída para duas classes químicas diferentes: um composto pirrolobenzodiazepino e um alcaloide. Nossos resultados comprovam a hipótese de que simbioses participam da metabolização de xenobióticos em insetos, ao mesmo tempo que possuem potencial para exploração de novos compostos inseticidas.

Palavras-chave: Simbionte; Microbiota; Inseticida; Bioatividade; Biotecnologia

ABSTRACT

Metabolization of xenobiotics and bioinsecticide production by insect-associated bacteria

The insects are the most diverse and abundant group of multicellular organisms, inhabiting a range of environments. Many of their adaptations to restricting conditions are related to their association with bacteria. The knowledge of the diversity of insect associations with bacteria can elucidate their role in insect response to biotic and abiotic factors. Bacteria are also the main target of exploitation for the development of biotechnological products. Insect's diversity and interactions with the environment turn insects a new niche for the exploration of microorganisms with biotechnological potential. The long history of association of insects with bacteria and the participation of insect-associated bacteria in the degradation of natural and/or synthetic organic molecules indicate the potential of these microorganisms to interfere with insect response to insecticides. Additionally, bacterial symbionts associated with insects may also be a promising source of bioactive compounds. The discovery of new natural compounds has been declining, requiring the exploration of new niches of microorganisms and the use of new technologies to overcome the reduced number of molecules discovered. This work aimed to investigate the role of insect-associated bacteria in the metabolism of xenobiotics in the host and their potential to synthesize insecticidal compounds. Our objectives were to demonstrate i) the mechanisms involved in insecticide degradation by selected microbial symbionts, and to determine their contribution to host survival when exposed to insecticides, and ii) the biological and metabolic diversity of the microbiota associated with a leaf cutting ant. Bacteria that are able to degrade xenobiotics isolated from the gut microbiota of insecticide-resistant insects were used for the colonization of the gut of a susceptible strain of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Comparisons of larval survival after insecticide exposure and the existence of adaptive costs of the association were done by using an aposymbiotic and infected susceptible lines. Susceptible larvae infected with IIL-C129 *Leclercia adecarboxylata* require twice the dose of chlorpyrifos ethyl to kill 50% of the larvae (LC₅₀) when compared to the aposymbiotic larvae. But the association with IIL-C129 was shown costly to *S. frugiperda*, particularly affecting female fecundity. However, no fitness costs were detected to infected larvae in the presence of the selection pressure (insecticide). GC-MS and LC-MS-MS analyses of the bacteria isolated from resistant larvae of *S. frugiperda* to organophosphate (chlorpyrifos ethyl), pyrethroid (lambda-cyhalothrin and deltamethrin), spinosyn (spinosad) and benzoylurea (lufenuron) revealed they are able to hydrolyze, metabolize and bioaccumulate insecticides, showing they can actively interfere with the efficacy of insecticides against the host. These processes were better characterized for the isolate IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens*. The species and metabolic diversity of culturable bacteria associated with *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) were investigated to demonstrate their potential to produce bioinsecticides. A total of 46 isolates belonging to *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* were identified. *In vivo* and *in vitro* assays to detect insecticide activity in organic extracts of fermentates indicated a great number of active extracts. *In vivo* assays with 1st instars of *S. frugiperda* were more adequate in detecting toxic molecules to insects, and the isolate Asp77 *Streptomyces drozdowiczii* was selected for the identification of active molecules with insecticidal effect. Two bioactive compounds with insecticidal activity were identified and the insecticidal activity attributed to two different chemical classes: pyrrolobenzodiazepine and alkaloid. Our results support the hypothesis that symbionts participate in the metabolization of xenobiotics in insects, at the same time that they have potential for exploration of new insecticides.

Keywords: Symbiont; Microbiota; Insecticide; Bioactivity; Biotechnology

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dois bilhões de anos, a simbiose com microrganismos foi um processo chave que moldou a evolução de diversos organismos. As associações de mutualismo estiveram envolvidas em significativas fases de transições evolutivas, incluindo as origens das mitocôndrias e o estabelecimento da fotossíntese em eucariotos. Além disso, os simbiossiontes são cada vez mais reconhecidos por terem um papel importante em muitos aspectos da biologia de eucariontes, como, por exemplo, no desenvolvimento, reprodução, imunidade e nutrição [1].

Com relação aos insetos, vários traços de sua aptidão são fortemente influenciados por sua microbiota associada. Essa associação é muito importante para a evolução das características ecológicas e os hábitos alimentares dos insetos [2-4]. As bactérias simbiossiontes de insetos podem apresentar associações facultativas ou obrigatórias, habitando o espaço endocelular, a cavidade hemocélica, o lúmen intestinal ou a superfície do tegumento de insetos [5]. Apesar dos insetos estarem associados a uma variedade de microrganismos, as associações com bactérias são mais comuns, e quanto mais investiga-se o papel de associações de bactérias com insetos, mais se aprende sobre a diversidade de sua contribuição aos insetos [6].

Embora a contribuição de bactérias primárias e obrigatórias associadas aos insetos esteja basicamente relacionada ao fornecimento de nutrientes ao hospedeiro, bactérias secundárias, facultativamente associadas a insetos, colaboram para um sistema com elevada diversidade microbiana e para a existência de mecanismos de interação fundamentais ao entendimento de processos bioecológicos de insetos [7]. O papel de simbiossiontes secundários é bastante estudado, incluindo sua contribuição na melhora da resposta imunológica do hospedeiro contra entomófagos [8-10] e entomopatógenos [11-13], nas interações inseto-planta [14], na proteção contra estresse térmico [15] e no processo de desintoxicação de metabólitos produzidos na defesa de plantas contra herbivoria [16-18] ou de moléculas orgânicas empregadas no controle de pragas [19-21].

O papel diverso e a influência dos simbiossiontes na aptidão biológica dos insetos ganham novas perspectivas para a exploração biotecnológica. Desta forma, os simbiossiontes de insetos estão sendo investigados i) para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas e de doenças disseminadas por insetos vetores [22-24] e ii) como fonte de moléculas para aplicações biotecnológicas [25-27], enzimas para conversão de biomassa [28,29] e moléculas antimicrobianas, inseticidas [30-32] e para manipulação do comportamento de insetos [33,34].

As relações inseto-simbiossiontes e suas implicações ecológicas já relatadas são promissoras em muitas áreas da pesquisa em biotecnologia [35]. Simbiossiontes de insetos podem

constituir fontes promissoras e inexploradas para aplicações na medicina, agricultura e processos industriais. Contudo, existem muitas associações inseto-simbiontes ainda desconhecidas, completamente inexploradas e que podem ser verdadeiras fontes de biodiversidade com potencial de aplicação em processos biotecnológicos [25]. A exploração de simbiontes de insetos ainda pode apresentar uma grande vantagem em relação à exploração de microrganismos de vida livre comumente isolados, uma vez que a eficiência dos metabólitos e das enzimas produzidas por simbiontes pode ter sido otimizada por mais de milhões de anos devido à seleção natural, aumentando as chances de aplicações bem-sucedidas [25]. Assim, o isolamento de bactérias simbiontes de insetos pode ser um grande passo para o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização eficaz na agricultura, proteção ambiental e saúde humana e animal [35].

Em nosso laboratório, diversas linhagens de bactérias simbiontes de insetos foram isoladas de diferentes hospedeiros, incluindo simbiontes de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a inseticidas com capacidade de biorremediação, assim como simbiontes de *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) com capacidade de produção de compostos bioativos contra insetos-praga. Esse trabalho tem por objetivos i) caracterizar a contribuição de bactérias na metabolização de xenobióticos, ii) avaliar sua contribuição na resposta do inseto ao inseticida, verificando a existência de custos adaptativos associados e iii) explorar o potencial de produção de compostos bioativos por bactérias para o isolamento de moléculas com atividade inseticida para utilização na agricultura.

Referências

1. Henry L, Maiden M, Ferrari J, Godfray H. Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. *Ecology Letters*. 2015;18(6):516-525.
2. Harris HL, Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. *Symbiosis*. 2010;51:37-53.
3. Leigh E. The evolution of mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*. 2010;23(12):2507-2528.
4. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*. 2011;36:533-543.
5. Douglas A. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*. 2015;60(1):17-34.

6. Almeida LG, Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. *Plos One*. 2017;12(3):e0174754.
7. Douglas A. Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host & Microbe*. 2011; 10(4):359-367.
8. Oliver KM, Moran NA, Hunter MS. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102:12795-12800.
9. Hansen AK, Jeong G, Paine TD, Stouthamer R. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73:7531-7535.
10. Vorburger C, Gehrler L, Rodriguez P. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters*. 2009;6:109-111.
11. Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*. 2005;310:1781-1781.
12. Brownlie JC, Johnson KN. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiology*. 2009;17:348-354.
13. Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ. Adaptation via symbiosis: recent spread of a drosophila defensive symbiont. *Science*. 2010;329:212-215.
14. Frago E, Dicke M, Godfray HCJ. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*. 2012;27:705-711.
15. Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*. 2002;27:189-195.
16. Dowd PF. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG. *Microbial mediation of plant-herbivore interactions*. New York: Wiley; 1991. p. 411-440.
17. Ibanez S, Gallet C, Desprès L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. *Toxins*. 2012;4:228-243.
18. Hammer TJ, Bowers MD. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia*. 2015;179:1-14.
19. Boush GM, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. *Journal of Economic Entomology*. 1967;60:918-920.
20. Dowd PF, Shen SK. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricornis*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1990;56:241-248.

21. Dowd PF. In situ production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic yeasts in the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Economic Entomology*. 1989;82:396-400.
22. Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal for Parasitology*. 2001;31:621-627.
23. Sanchez-Contreras M, Vlisidou I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2008;25:203-244.
24. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476:454-457.
25. Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;100:1567-1577.
26. Chaves S, Neto M, Tenreiro R. Insect-symbiont systems: from complex relationships to biotechnological applications. *Biotechnology Journal*. 2009;4:1753-1765.
27. Ramadhar TR, Beemelmans C, Currie CR, Clardy J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. *The Journal of Antibiotics*. 2013;67:53-58.
28. Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*. 2010;55:609-632.
29. Vilanova C, Marco G, Domínguez-Escribà L, Genovés S, Sentandreu V, Bataller E et al. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: potential sources of extreme cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*. 2012;45:288-294.
30. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*. 2009;26:338-362.
31. Zucchi TD, Almeida LG, Dossi FCA, Cônsoli FL. Secondary metabolites produced by *Propionicimonas* sp. (ENT-18) induce histological abnormalities in the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *BioControl*. 2010;55:811-819.
32. Martinez AFC, Almeida LG, Moraes LAB, Cônsoli FL. Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. *BMC Microbiology*. 2017;17(1):143.
33. Boone CK, Six DL, Zheng Y, Raffa KF. Parasitoids and dipteran predators exploit volatiles from microbial symbionts to locate bark beetles. *Environmental Entomology*. 2008;37:150-161.
34. van Houte S, Ros VI, van Oers MM. Walking with insects: molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. *Molecular Ecology*. 2013;22:3458-3475.

35. Ahmad I, Khan MSA, Aqil F, Singh M. Microbial applications in agriculture and the environment: a broad perspective. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. New York: Springer, 2011. p. 1-28.

2. PARTICIPAÇÃO DE SIMBIOTES NA SOBREVIVÊNCIA E APTIDÃO BIOLÓGICA DE INSETOS EXPOSTOS A INSETICIDAS

Resumo

A microbiota intestinal de insetos possui grande participação em diversos aspectos biológicos do hospedeiro, na ecologia nutricional, capacidade de resposta do sistema imunológico, adaptação ao meio ambiente, nas interações tróficas e na dinâmica populacional. Entretanto, o seu papel na metabolização de xenobióticos raramente é relatado, existindo poucos exemplos nos quais simbiotes associados aos insetos foram demonstrados como responsáveis pela desintoxicação do hospedeiro, parcial ou total, quando os mesmos são expostos aos estressores químicos naturais e sintéticos, como os inseticidas. Desta forma, investigamos a participação de bactérias intestinais na sobrevivência do hospedeiro quando exposto a inseticidas, assim como a existência de custo adaptativo da associação a bactérias com capacidade de metabolização de inseticidas. A colonização induzida do trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por bactérias simbiotes foi eficiente para os isolados IIL-C129 *Leclercia adecarboxylata* e IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, as quais possuem capacidade de degradação de chlorpyrifos ethyl e spinosad, respectivamente. Entretanto, apenas o isolado IIL-C129 foi capaz de contribuir para a sobrevivência do hospedeiro, exigindo concentração de chlorpyrifos ethyl duas vezes maior para matar 50% das lagartas (CL₅₀) quando comparada àquela de lagartas aposimbiontes. O estudo da biologia comparada de linhagens aposimbionte de *S. frugiperda* ou infectada com IIL-C129 mostrou a existência de custo adaptativo na ausência da pressão de seleção pelo inseticida. Demonstramos que o simbiote intestinal IIL-C129 participa da metabolização e interfere na disponibilidade de chlorpyrifos ethyl, podendo interferir na eficiência do produto no controle de lagartas de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Bactérias; Colonização; Hospedeiro; Suscetibilidade; Custo adaptativo

Abstract

The gut microbiota of insects interferes with several host traits, affecting the host nutritional ecology, immune response, adaptation to the environment, trophic interactions, and population dynamics. However, the role of bacterial symbionts in the metabolization of xenobiotics is rarely reported. There are few examples in which insect-associated symbionts were shown to participate in the process of detoxification of hosts exposed to natural and synthetic chemical stressors, such as insecticides. Thus, we investigated the participation of the gut bacteria in host survival after host exposure to insecticides. We also assessed the existence of fitness costs to hosts associated with such bacteria. We successfully colonized the gut of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with the isolates IIL-C129 *Leclercia adecarboxylata* and IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans*, which can degrade chlorpyrifos ethyl and spinosad, respectively. Nevertheless, only the isolate IIL-C129 improved the survival of hosts exposed to chlorpyrifos ethyl. IIL-C129 infected larvae required a two-fold higher concentration of chlorpyrifos ethyl to kill 50% of the larvae (LC₅₀) when compared to the aposymbiotic larvae. Comparative analysis of biological traits of symbiont-associated and aposymbiotic lines of *S. frugiperda* demonstrated the existence of fitness costs in the absence of the selection pressure (insecticide). We demonstrated that the gut symbiont

III-CI29 interferes with the availability of chlorpyrifos ethyl, indicating insecticide efficacy to control *S. frugiperda* larvae may be compromised in larvae carrying such symbiont.

Keywords: Bacteria; Colonization; Host; Susceptibility; Fitness cost

2.1. Introdução

Com mais de 500 mil espécies conhecidas, insetos herbívoros correspondem à quase um quarto de toda a biodiversidade macroscópica terrestre. Essa extraordinária diversificação de insetos pode ser atribuída a sua íntima associação com plantas terrestres, consideradas grandes responsáveis por sua especiação. As complexas relações tróficas entre plantas hospedeiras e herbívoros e seus inimigos naturais têm despertado grande interesse desde o desenvolvimento da agricultura [1,2].

Ao longo de sua evolução, as plantas desenvolveram inúmeros mecanismos de defesa ao ataque de herbívoros. Estes mecanismos de defesa envolvem a utilização dos mais variados tipos de metabólitos secundários, os quais podem desempenhar funções variadas da repelência à toxicidade ao herbívoro. Nesta corrida evolucionária, insetos herbívoros também desenvolveram mecanismos de adaptação à presença de compostos nocivos ao seu desenvolvimento em seu substrato alimentar [3]. Apesar de muitos dos processos de desintoxicação pela ingestão de toxinas associadas à planta hospedeira ter sua origem em processos metabólicos de insetos [4], em vários casos a sua microbiota intestinal apresenta papel fundamental nesse processo [4-9].

Simbiontes de insetos compartilham uma longa associação que envolveu processos de seleção e adaptação, principalmente no que se refere ao processo de seleção e utilização do substrato alimentar [7]. A microbiota associada a insetos também responde às pressões de seleção do ambiente, como, por exemplo, às moléculas inseticidas, visto as mudanças qualitativas e quantitativas na composição da microbiota de populações resistentes, quando comparadas a de populações suscetíveis [10,11]. Tais diferenças também sugerem que populações de insetos expostas a diferentes pressões de seleção em condições naturais podem apresentar microbiota diversificada. Além disso, a ocorrência das mesmas espécies microbianas na maioria das linhagens resistentes e suscetíveis de insetos, mas com potencial diferente para explorar os inseticidas testados como recursos nutricionais, demonstra que a microbiota intestinal também é submetida à seleção pela exposição contínua a inseticidas [11].

As bactérias que estão expostas à pressão de seleção direcionada são de grande interesse devido a sua maquinaria genética ser selecionada para responder a fonte de estresse

[12]. No caso de insetos resistentes, as bactérias devem ser capazes de metabolizar os inseticidas para sobreviver, uma vez que vários desses compostos também podem ter atividade antimicrobiana [13,14]. Porém, a microbiota intestinal pode ser bastante resiliente aos fatores de estresse que podem alterar sua composição. Por isso, os fatores nutricionais têm sido objeto de intensa investigação, produzindo evidências claras sobre o papel que a fonte de alimentos, a genética do hospedeiro e outros fatores desempenham na formação da microbiota intestinal [15,16], incluindo a dos insetos [7,10,17].

O papel dos simbiossitos de insetos na metabolização de xenobióticos raramente é relatado [18-20]. As investigações são concentradas na contribuição do simbiossito à ecologia nutricional [21], ao sistema imunológico [22,23] e à adaptação do hospedeiro ao meio ambiente [24], às interações tróficas [25] e à dinâmica da população do hospedeiro [26]. Assim, existem poucos exemplos nos quais os simbiossitos de insetos foram demonstrados como responsáveis pela resistência ou tolerância do hospedeiro aos xenobióticos naturais e sintéticos, incluindo inseticidas. O potencial dessa capacidade de contribuição levanta hipóteses sobre o papel dos simbiossitos em processos de evolução da resistência de insetos à inseticidas [27-29].

Desta forma, verificamos a participação de bactérias intestinais com comprovada capacidade de metabolização de inseticidas, na sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) expostas a inseticidas, e determinamos a existência de custo adaptativo da associação a essas bactérias ao hospedeiro. Pretendemos com esses experimentos demonstrar a participação da microbiota intestinal na metabolização de inseticidas em insetos e a importância de se considerar a associação de insetos a bactérias intestinais no desenvolvimento e uso de estratégias de manejo de pragas.

2.2. Conclusões

- O isolado IIL-Dm05 *A. nicotinovorans* se mostrou patogênico quanto utilizado na colonização induzida do trato intestinal de linhagem suscetível de *S. frugiperda*;
- O isolado IIL-Sp19 *P. psychrotolerans* não altera a sobrevivência de lagartas suscetíveis de *S. frugiperda* quando tratadas com spinosad;
- O isolado IIL-CI29 *L. adecarboxylata* aumenta a sobrevivência de lagartas suscetíveis de *S. frugiperda* expostas ao chlorpyrifos ethyl, exigindo o dobro da concentração letal mediana quando comparada às lagartas suscetíveis livres do simbiossito;

- Há custo adaptativo nas associações de *S. frugiperda* com os isolados IIL-Sp19 *P. psychrotolerans* e IIL-C129 *L. adecarboxylata*, na ausência da pressão de seleção;
- Na presença de pressão de seleção (inseticida), o simbionte IIL-C129 *L. adecarboxylata* melhora o desempenho biológico de *S. frugiperda*.

Referências

1. Kergoat GJ, Meseguer AS, Jouselin E. Evolution of plant–insect interactions: insights from macroevolutionary approaches in plants and herbivorous insects. *Advances in botanical research*. Academic Press, 2017;81:25-53.
2. Winer K, Rank N. Evolutionary dynamics of interactions between plants and their enemies: comparison of herbivorous insects and pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;1408(1):46-60.
3. Després L, David JP, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*. 2007;22:298-307.
4. Douglas A. Multiorganismal Insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*. 2015;60(1):17-34.
5. Oliver K, Martinez A. How resident microbes modulate ecologically-important traits of insects. *Current Opinion in Insect Science*. 2014;4:1-7.
6. Dowd PF. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG. *Microbial mediation of plant-herbivore interactions*. New York: Wiley; 1991. p. 411-440.
7. Hansen, AK, Moran, NA. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*. 2013;23:1473-1496.
8. Hammer T, Bowers M. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia*. 2015;179(1):1-14.
9. van den Bosch T, Welte C. Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. *Microbial Biotechnology*. 2016;10(3):531-540.
10. Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kim G, Saravanan V et al. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutriti. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103(6):2664-2675.

11. Almeida LG, Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, C nsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *Plos One*. 2017;12(3):e0174754.
12. Rockne KJ, Reddy KR. Bioremediation of contaminated sites. In: Invited theme paper, international e-conference on modern trends in foundation engineering: geotechnical challenges and solutions. Indian Institute of Technology, Madras; 2003.
13. Bartha R, Lanzilotta RP, Pramer D. Stability and effects of some pesticides in soil. *Applied microbiology*. 1967;15:67-75.
14. Tu CM. Influence of five pyrethroid insecticides on microbial populations and activities in soil. *Microbial Ecology*. 1980;5:321-327.
15. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105:2117- 2122.
16. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13:260-270.
17. Hayashi A, Aoyagi H, Kinjyo K, Yoshimura T, Tanaka H. Development of an efficient method for screening microorganisms by using symbiotic association between *Nasutitermes takasagoensis* and intestinal microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;75:1437-1446.
18. Boush GM, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. *Journal of Economic Entomology*. 1967;60:918-920.
19. Dowd PF, Shen SK. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1990;56:241-248.
20. Bartha R, Lanzilotta RP, Pramer D. Stability and effects of some pesticides in soil. *Applied Microbiology*. 1967;15:67-75.
21. Douglas AE. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*. 2009;23:38-47.
22. Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science*. 2010;329:212-215.
23. Haine ER. Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008;275:353-361.
24. Wernegreen JJ. Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. *Current Opinion in Microbiology*. 2012;15:255-262.

25. Ibanez S, Gallet C, Desprêts L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. *Toxins*. 2012;4:228-243.
26. Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*. 2008;42:165-190.
27. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109:8618-8622.
28. Ghanim M, Kontsedalov S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science*. 2009;65:939-942.
29. Su Q, Zhou X, Zhang Y. Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative & Integrative Biology*. 2013;6:e23804-e23804-7.

3. BIOACUMULAÇÃO DE INSETICIDAS POR SIMBIONTES DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA ECOLOGIA DO HOSPEDEIRO

Resumo

Embora a microbiota intestinal de lagartas de linhagens de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a inseticidas ter se mostrado um nicho adequado para a seleção direcionada de microrganismos com capacidade de metabolização e de interferência na eficácia de inseticidas no controle do hospedeiro, o(s) mecanismo(s) de metabolização envolvido(s) na resposta do hospedeiro a inseticidas necessita(m) de investigação mais detalhada para sua caracterização. Desta forma, o presente estudo investigou os mecanismos que estão envolvidos na metabolização de inseticidas por bactérias simbiotes de *S. frugiperda* resistente ao organofosforado clorpirifos ethyl, aos piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, a espinosina spinosad e a benzoilureia lufenuron. Amostras controle, do sobrenadante e do conteúdo intracelular foram obtidas após cultivo dos isolados em meio M9 acrescido do inseticida correspondente como única fonte de carbono por 5 dias. A quantificação das amostras por análise cromatográfica revelou a capacidade dessas bactérias em metabolizar e bioacumular inseticidas, sendo que apenas o isolado IIL-Sp19 não foi capaz de bioacumular spinosad em quantidade significativa. Experimentos de íons precursores e redes de interações moleculares comprovaram a capacidade do isolado IIL-Luf14 em bioacumular lufenuron, estando presente em sua forma íntegra no conteúdo intracelular dessa bactéria. Essa comprovação também foi observada em ensaio *in vivo*, onde amostras do conteúdo intracelular foram capazes de causar mortalidade em *S. frugiperda*. O estudo de produtos da degradação de lufenuron pelo isolado IIL-Luf14 mostrou que essa bactéria é capaz de acumular o grupo N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) e degradar fluorobenzoato, ambos compostos resultante da degradação de lufenuron. A análise também permitiu identificar lisofosfolípeos presentes em amostras do conteúdo intracelular de *M. arborescens*, mostrando ser um mecanismo de interação entre a célula microbiana e lufenuron. Assim, bactérias simbiotes de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas são capazes de bioacumular inseticidas e interferir ativamente na atividade de xenobióticos no hospedeiro.

Palavras-chave: Bactéria; Degradação; Metabolização; Bioacumulação; Intracelular

Abstract

Although the gut microbiota of insecticide resistant *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae has proved to be a suitable niche for targeted selection of microorganisms that can metabolize insecticides and even interfere with the insecticide efficacy, the mechanism(s) by which these bacteria metabolize insecticides are unknown. Thus, we investigated the mechanisms that are involved in the metabolization of insecticides by symbiotic bacteria previously isolated from resistant lines of *S. frugiperda*. These bacteria were shown to degrade the organophosphate chlorpyrifos ethyl, the pyrethroids lambda-cyhalothrin and deltamethrin, the spinosyn spinosad and the benzoylurea lufenuron. Experiments under controlled cultured conditions and the chemical analyses of the culture media and the bacterial cell lysate obtained after culturing the isolates for 5 days in M9 medium added with each one of the insecticides as the sole carbon source. GC-MS and LC-MS-MS analyses allowed the

quantification of the capacity of the tested bacteria to metabolize and bioaccumulate insecticides. Only the isolate IIL-Sp19 did not bioaccumulate spinosad in a significant amount. Precursor ion experiments and networks of molecular interactions demonstrated the isolate IIL-Luf14 interfered with the efficacy of lufenuron against *S. frugiperda* larvae by affecting the availability of the insecticide in medium due to bioaccumulation. Lysates of IIL-Luf14 were demonstrated to cause mortality of *S. frugiperda* proving the accumulation of large quantities of lufenuron in the cultured cells. Analyses of the metabolites produced from the degradation of lufenuron by the isolate IIL-Luf14 identified the bioaccumulation of lufenuron and the metabolite N-((2,5-Dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl)carbamoyl) and the degradation of the metabolite fluorobenzoate, both compounds resulting from the degradation of lufenuron. Lysophospholipids were also identified in the intracellular content of IIL-Luf14, pointing their participation in process of bioaccumulation of lufenuron. Thus, gut bacteria from insecticide-resistant *S. frugiperda* larvae degrade and bioaccumulate insecticides and can actively interfere with the activity of insecticides in the host.

Keywords: Bacteria; Degradation; Metabolization; Accumulation; Intracellular

3.1. Introdução

Microrganismos são amplamente utilizados para a descontaminação ambiental e são comumente selecionados em áreas agrícolas contaminadas por pesticidas, ambiente em que são expostos à pressão de seleção por esses produtos pelo seu uso inadequado e/ou excessivo [1-3]. O uso intensivo e contínuo de pesticidas orgânicos produz também outros efeitos indesejáveis, pois conduz à evolução da resistência de insetos a inseticidas [4,5] e resulta em efeitos colaterais a organismos não-alvo e ao ambiente [6,7]. O uso dessas moléculas está cada vez mais restrito, pois existe grande pressão da sociedade para a implementação de técnicas alternativas de controle mais seguras e práticas agrícolas mais sustentáveis, abrindo perspectivas para o uso de microrganismos com capacidade de biodegradação de tais pesticidas [8].

Insetos compartilham uma longa história de associação com bactérias e grande parte de suas adaptações a condições adversas ou inadequadas podem estar relacionadas a essa associação [9,10]. A microbiota intestinal de insetos pode representar um recurso valioso ao contribuir para a ecologia nutricional do hospedeiro, participando de processos envolvidos na utilização de alimentos (digestão, desintoxicação) e ciclagem e provisionamento de nutrientes, interferindo, ainda, nas interações multitróficas do hospedeiro [10-12]. Além disso, há uma série de indicações de que a microbiota de insetos pode participar na degradação de moléculas orgânicas naturais e sintéticas [13-16].

A relevância da contribuição da microbiota intestinal para as reações enzimáticas que ocorrem no lúmen do intestino do hospedeiro pode ser demonstrada pela existência de enzimas microbianas que auxiliam na digestão do alimento devido à sua insensibilidade aos inibidores

enzimáticos produzidos pelas plantas em que o inseto hospedeiro se alimenta [17-19]. Diversos processos de desintoxicação de xenobióticos ocorrem no lúmen intestinal dos insetos pela sua natureza óxido-redutora e pela atuação de um complexo de enzimas (monoxigenases, esterases, hidrolases, transferases) capaz de hidrolisar ou modificar o xenobiótico, reduzindo sua toxicidade e favorecendo sua excreção [20,21]. Há indicações ainda de que a contribuição enzimática microbiana no lúmen intestinal também pode auxiliar na degradação de inseticidas ingeridos pelo hospedeiro, com a hidrólise destes compostos para originar nutrientes para o crescimento da própria microbiota [22]. Assim, a diversidade e as diferenças entre enzimas produzidas por procariotos e eucariotos indicam que as enzimas microbianas podem contribuir fortemente para a metabolização de inseticidas em insetos [23,24].

Apesar de todas as evidências da existência de mecanismos comuns de defesa de insetos a compostos secundários de plantas e moléculas sintéticas, e da participação da microbiota associada a insetos em processos de degradação destes compostos, pouco se conhece a respeito da participação da microbiota no desenvolvimento de mecanismos de resistência de insetos a inseticidas. No entanto, a participação da microbiota associada a insetos na degradação de xenobióticos, incluindo os compostos orgânicos sintéticos geralmente utilizados para o controle de pragas, levanta questões importantes. A primeira seria relacionada à possibilidade de explorar insetos para selecionar bactérias capazes de degradar xenobióticos para posterior aplicação na biorremediação [8]. Em segundo lugar, o papel da microbiota na eficiência de inseticidas no controle de pragas agrícolas [8,23,25,26].

A exploração de bactérias simbiotes de insetos resistente a inseticidas como um novo nicho com potencial de degradação de xenobióticos mostrou que a microbiota intestinal é suscetível às mudanças em sua comunidade em resposta a pesticidas e à evolução da resistência do hospedeiro [8]. Assim, a microbiota intestinal de insetos resistentes a inseticidas pode ser um recurso valioso para o isolamento de bactérias capazes de degradar inseticidas e uma ferramenta promissora para a exploração biotecnológica em programas de biorremediação [8]. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de metabolização de pesticidas envolvidos na degradação de inseticidas por bactérias simbiotes de insetos resistentes e seus impactos na evolução da resistência do hospedeiro.

Desta forma, esse trabalho teve por objetivo estudar os mecanismos envolvidos na metabolização de inseticidas pelas bactérias IIL-C129 *Leclercia adecarboxylata*, IIL-Lc09 *Pseudomonas stutzeri*, IIL-Dm05 *Arthrobacter nicotinovorans*, IIL-Sp19 *Pseudomonas psychrotolerans* e IIL-Luf14 *Microbacterium arborescens* isoladas da microbiota intestinal de linhagens de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes ao

organofosforado chlorpirifos ethyl, aos piretroides lambda-cyhalothrin e deltamethrin, a espinosina spinosad e a benzoilureia lufenuron.

3.2. Conclusões

- *Leclercia adecarboxylata*, *P. stutzeri*, *A. nicotinovorans* e *M. arborescens* hidrolisam e bioacumulam, respectivamente, chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin, deltamethrin e lufenuron;
- *Pseudomonas psychrotolerans* hidrolisa spinosad, mas não bioacumula este inseticida;
- *Microbacterium arborescens* bioacumula o grupo N-((2,5-Dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil)carbamoil) resultante da degradação do lufenuron.

Referências

1. Scott C, Pandey G, Hartley CJ, Jackson CJ, Cheesman MJ, Taylor MC, et al. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*. 2008;48:65-79.
2. Ahmad I, Khan MSA, Aqil F, Singh M. Microbial applications in agriculture and the environment: a broad perspective. In: Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. New York: Springer, 2011. p. 1-28
3. Chen M, Xu P, Zeng G, Yang C, Huang D, Zhang J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*. 2015;33:745-755.
4. Stark JD, Banks JE. Selective Pesticides: are they less hazardous to the environment?. *BioScience*. 2001;51:980.
5. Gill HK, Garg H. Pesticide: environmental impacts and management strategies. *Pesticides-Toxic Effects*. 2014;188-230.
6. Theiling KM, Croft BA. Pesticide side-effects on arthropod natural enemies: a database summary. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 1988;21:191-218.
7. Devine GJ, Furlong MJ. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*. 2007;24:281-306.
8. Almeida LG, Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. *Plos One*. 2017;12(3):e0174754.

9. Ishikawa H. Insect symbiosis: an introduction. In: Bourtzis K, Miller A. Insect symbiosis. Florida: CRC Press; 2003. p. 368
10. Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annual Reviews in Entomology. 2004;49:71-92.
11. Douglas A. The microbial dimension in insect nutritional ecology. Functional Ecology. 2009;23(1):38-47.
12. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecological Entomology. 2011;36(5):533-543.
13. Dowd PF. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG. Microbial mediation of plant-herbivore interactions. New York: Wiley; 1991. p. 411-440.
14. Boush GM, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. Journal of Economic Entomology. 1967;60:918-920.
15. Daughton CG, Hsieh DP. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. Applied and Environmental Microbiology. 1977;34:175-184.
16. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T. Symbiont-mediated insecticide resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109:8618-8622.
17. Ghanim M, Kontsedalov S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. Pest Management Science. 2009;65:939-942.
18. Chu CC, Spencer JL, Curzi MJ, Zavala JA, Seufferheld MJ. Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2013;110:11917-11922.
19. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects diversity in structure and function. FEMS Microbiology Reviews. 2013;37:699-735.
20. Desprêts L, David JP, Gallet C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. Trends in Ecology & Evolution. 2007;22:298-307.
21. Smagghe G, Tirry L. Insect midgut as a site for insecticide detoxification and resistance. In: Ishaaya I. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Berlin: Springer; 2001. p. 293-321.
22. Zhang C, Bennett GN. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 2005;67:600-618

23. Russell RJ, Scott C, Jackson CJ, Pandey R, Pandey G, Taylor MC, et al. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*. 2011;4:225-248.
24. Roe RM, Hodgson E, Rose RL, Thompson DM, Devorshak C, Anspaugh DD, et al. Basic principles and rationale for the use of insect genes in bioremediation: esterase, phosphotriesterase, cytochrome P 450 and epoxide hydrolase. *Reviews in Toxicology*. 1998;2:169-178.
25. Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;59:143-152.
26. Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2007;25:113-113.

4. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DA FORMIGA CORTADEIRA *Acromyrmex coronatus* (FABRICIUS, 1804) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E O SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A DESCOBERTA DE MOLÉCULAS INSETICIDAS

Resumo

Apesar das divergências quanto à sua origem e funções, a relação de formigas com simbioses, suas implicações ecológicas e potencial biotecnológico para descoberta de moléculas bioativas despertam grande interesse na comunidade científica, uma vez que os simbioses de formigas estão envolvidos em muitos processos essenciais para a sobrevivência de seus hospedeiros, principalmente quando relacionados à nutrição e defesa. Assim, no presente trabalho, investigou-se a diversidade de bactérias cultiváveis associadas à formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), bem como a diversidade de metabólitos produzidos e o seu potencial para descoberta de compostos inseticidas. Foram identificados 46 filotipos pertencentes a *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. *Acromyrmex coronatus* mostrou ser um nicho adequado para a seleção direcionada de microrganismos com capacidade de produção de compostos com atividade inseticida, se revelando uma alternativa à busca por maior diversidade de microrganismos e novos compostos bioativos. Além disso, diferenças expressivas na atividade inseticida entre extratos orgânicos produzidos com diferentes solventes e entre isolados do mesmo filotipo demonstram o grande potencial dos microrganismos associados a esses insetos em contribuir com compostos bioativos de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Inseto; Microbiota; Metabólitos; Bioatividade; Biotecnologia

Abstract

Despite the divergences regarding their origin and functions, the interaction of ants with symbionts, the ecological implications and biotechnological potential of ant-associated symbionts for the discovery of bioactive molecules has been of great interest to the scientific community. Ant symbionts are involved in many processes essential for the survival of their hosts, especially when related to nutrition and defense. We investigated the diversity of culturable bacteria associated with the cuticle of the ant *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), and determined the diversity of metabolites produced and their potential for the discovery of insecticidal compounds. Forty-six phylotypes were identified associated with the cuticle of *A. coronatus* distributed in *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. These phylotypes produced a large variety of metabolites and bioassays demonstrated several of these isolates produced molecules with insecticide activity against *S. frugiperda*. *Acromyrmex coronatus* was a suitable source for the selection of microorganisms with the capacity to produce compounds with insecticidal activity. We also demonstrated significant differences in insecticidal activity when using organic extracts produced with different solvents and between isolates of the same phylotype, highlighting the great potential of ant-associated microorganisms to contribute with bioactive compounds of biotechnological interest.

Keywords: Insect; Microbiota; Metabolites; Bioactivity; Biotechnology

4.1. Introdução

A história da vida na Terra tem sido moldada principalmente por microrganismos. O mais antigo relato da existência de vida, há 3,5 bilhões de anos, evidencia um microrganismo como o ancestral comum que originou as mais diversas formas de vida do planeta, sendo posteriormente fundamental em processos que ajudaram a biosfera a ser mais hospitaleira para novas formas de vida [1,2]. Neste período, com origem há cerca de 420 milhões de anos, os insetos se tornaram o grupo mais diverso e abundante de animais na Terra, habitando quase todos os nichos existentes [3]. Grande parte deste sucesso evolutivo se deu pela associação com microrganismos. Essas associações evoluíram em relações bastante específicas com seus hospedeiros, as quais também foram fundamentais para sua especiação [4-6].

Estima-se que a microbiota possa ser responsável por 1-10% da biomassa do inseto, implicando que o inseto pode ser considerado um multiorganismo [7]. Devido a existência de estilos de vida e comportamentos alimentares especializados, os insetos são frequentemente propensos a contaminação por microrganismos. Na vida em grandes comunidades, como a de insetos sociais, em particular, o fornecimento de nutrientes para a prole e a construção de câmaras de incubação são ameaçadas por espécies invasoras e predatórias. Como resposta a essas ameaças, muitos insetos desenvolveram estratégias defensivas, incluindo defesa mecânica e comportamental, sistemas imunológicos complexos e o uso de metabólitos secundários bioativos produzidos por mutualistas [8-11].

O mutualismo entre formigas e microrganismos é um exemplo clássico da complexidade das relações resultantes da simbiose. As formigas vivem em mutualismo com fungos, os quais são cultivados como sua fonte de alimento. Porém, esse bem estabelecido mutualismo pode ser ameaçado por fungos parasitas especializados, que atacam o fungo alimento das formigas. Para defender sua fonte de nutrientes contra a infecção por fungos parasitas, as formigas estão associadas a bactérias que produzem antibióticos e inibem o parasita invasor [12]. A relação de formigas com bactérias simbiontes e as implicações ecológicas dessas interações despertam grande interesse na comunidade científica, já que essa associação pode afetar substancialmente diversos processos essenciais para a sobrevivência de seus hospedeiros, especialmente quando relacionados à nutrição e defesa [13,14], ou como fonte de novas moléculas com potencial biotecnológico [15-17].

Apesar dos produtos naturais representarem os casos mais bem-sucedidos na descoberta de moléculas inovadoras para agricultura [18,19], muitas pesquisas diminuíram a prospecção por compostos bioativos nas últimas décadas devido a crescente redução no número

de compostos bioativos descobertos [20]. Como alternativa, as pesquisas se concentraram intensamente na exploração de microrganismos associados a novos habitats como fonte de recursos com potencial biotecnológico [20-24].

A diversidade de microrganismos associada a insetos, juntamente com a pressão de seleção existente nesta relação devido à variedade de ambientes habitados, desperta grande interesse da comunidade científica na avaliação de simbioses como um recurso inexplorado para aplicações biotecnológicas, incluindo o próprio controle de pragas [24-26]. Assim, nesse trabalho avaliamos a diversidade da microbiota cultivável associada ao tegumento da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) e o potencial inseticida de grupos selecionados voltado à descoberta de moléculas bioativas, utilizando-se de sistemas *in vivo* e *in vitro* de avaliação.

4.2. Conclusões

- *Acromyrmex coronatus* se mostrou um nicho adequado para prospecção de bactérias que produzem metabólitos com atividade inseticida;
- A microbiota associada ao tegumento de *Acromyrmex coronatus* é formada por *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, sendo *Actinobacteria* o mais diverso e abundante;
- O ensaio *in vivo* se mostrou mais eficiente na bioprospecção de compostos com atividade inseticida do que o ensaio *in vitro*.

Referências

1. Margulis L, Symbiosis in cell evolution: life and its environment on the early earth. San Francisco, W. H. Freeman and Co. 1981, p. 419.
2. Westall F. Life on the early earth: a sedimentary view. Science. 2005;308(5720):366-367.
3. Glenner H, Thomsen P, Hebsgaard M, Sorensen M, Willerslev E. The origin of insects. Science. 2006;314(5807):1883-1884.
4. Moran N, McCutcheon J, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annual Review of Genetics. 2008;42(1):165-190.

5. Feldhaar H, Gross R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2009;299(1):1-8.
6. Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*. 2011;36(5):533-543.
7. Douglas A. Multiorganismal Insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*. 2015;60(1):17-34.
8. Brownlie J, Johnson K. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiology*. 2009;17(8):348-354.
9. Kaltenpoth M. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?. *Trends in Microbiology*. 2009;17(12):529-535.
10. Douglas A. Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host & Microbe*. 2011;10(4):359-367.
11. Kuhlisch C, Pohnert G. Metabolomics in chemical ecology. *Natural Product Reports*. 2015;32(7):937-955.
12. Little A, Currie C. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. *Biology Letters*. 2007;3(5):501-504.
13. Boursaux-Eude C, Gross R. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Microbiological Research*. 2000;151(7):513-519.
14. Zhang MM, Poulsen M, Currie CR. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *The ISME journal*. 2007;1(4):313-320.
15. Ramadhar T, Beemelmans C, Currie C, Clardy J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. *The Journal of Antibiotics*. 2013;67(1):53-58.
16. Zucchi TD, Almeida LG, Moraes LAB, Consoli FL. Albocycline, the main bioactive compound from *Propionicimonas* sp. ENT-18 against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Industrial Crops and Products*. 2014;52:264-268.
17. Martinez AFC, de Almeida LG, Moraes LAB, Cônsoli FL. Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. *BMC Microbiology*. 2017;17(1):143
18. Dayan F, Cantrell C, Duke S. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009;17(12):4022-4034.
19. Cantrell C, Dayan F, Duke S. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*. 2012;75(6):1231-1242.
20. Beemelmans C, Guo H, Rischer M, Poulsen M. Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2016;12:314-327.

21. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*. 2009;26(3):338-362.
22. Pye C, Bertin M, Lokey R, Gerwick W, Linington R. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(22):5601-5606.
23. Traxler M, Kolter R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Natural Product Reports*. 2015;32(7):956-970.
24. Crawford JM, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products. *Chemical Communications*. 2011;47(27):7559-66.
25. Brachmann AO, Bode HB. Identification and bioanalysis of natural products from insect symbionts and pathogens. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 2013;135:123-55.
26. Douglas AE. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends in Biotechnology*. 2013;25(8):338-42.

5. IIL-ASP77, UM SIMBIONTE DE *Acromyrmex coronatus*, FONTE DE DOIS COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE INSETICIDA ÀS LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

Cerca de 15% da safra de alimentos do mundo é perdida por causa do ataque por insetos, cujo controle tem sido feito, predominantemente, com uso de defensivos químicos. Esses produtos são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, com consequências graves ao homem e ambiente. O uso contínuo e inadequado desses produtos também facilita a seleção de insetos resistentes, levando a falhas nas táticas de manejo de pragas. A utilização de inseticidas sintéticos de amplo espectro se torna cada vez mais restrita, pois existe hoje uma grande pressão da sociedade para técnicas alternativas de controle de pragas que sejam mais seguras aos organismos não-alvo e ao ambiente. Nesse contexto, o uso de novos compostos bioativos naturais tem se tornado uma alternativa ecologicamente viável. Plantas e microrganismos são fontes reconhecidas de moléculas naturais que podem ter aplicação biotecnológica. No presente estudo, foi investigado o potencial biotecnológico de um simbiote isolado da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) para a identificação de moléculas naturais com potencial para o controle de insetos-pragas. O estudo da atividade inseticida do extrato orgânico do fermentado produzido pelo isolado IIL-Asp77, putativamente identificado como *Streptomyces drozdowiczii*, resultou na descoberta de duas frações que resultaram em alta mortalidade de lagartas de 1º instar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em testes de ingestão. As duas frações ativas foram isoladas e a atividade inseticida foi atribuída para duas classes químicas diferentes: um composto pirrolobenzodiazepino ($CL_{50} = 62,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e um alcaloide ($CL_{50} = 170,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Hipóteses do modo de ação dessas substâncias são oferecidas na discussão, juntamente com sua caracterização química. O desenvolvimento de estudos adicionais para a caracterização do modo de ação dessas moléculas contribuirão para análises do seu potencial inseticida a outras espécies de insetos-pragas e a possibilidade de sua utilização em escala comercial, especialmente no combate de insetos mastigadores.

Palavras-chave: Bioprospecção; Caracterização; Pirrolobenzodiazepino; Alcaloide; Manejo

Abstract

Nearly 15% of the world's food production is lost because of attack by insect pests. Insect pests are predominantly controlled by chemical pesticides. Pesticides are highly toxic and most have a broad spectrum of action, with serious consequences for humans and the environment. The continuous and inappropriate use of these products also facilitates the selection of insecticide resistant pests, leading to failures in pest management tactics. The use of broad-spectrum synthetic insecticides is becoming increasingly restricted, as there is strong social pressure for the use of alternative pest control techniques that are safer to non-target organisms and the environment. In this context, the use of new natural bioactive compounds has become an ecologically viable alternative. Plants and microorganisms are recognized sources of natural molecules that may have biotechnological applications. In here we investigated the biotechnological potential of a bacterial isolate from the ant *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae) for the identification of natural

molecules with potential for insect-pest control. Assays of the insecticidal activity of the organic extract of the fermentation products of the isolate IIL-Asp77, putatively identified as *Streptomyces drozdowiczii*, resulted in the discovery of two fractions that resulted in high mortality of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera : Noctuidae). These fractions were isolated and the insecticidal activity was assigned to two different chemical classes: a pyrrolobenzodiazepine compound ($LC_{50} = 62.73 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) and an alkaloid ($LC_{50} = 170.56 \mu\text{g} / \text{cm}^2$). Hypotheses of the mode of action of these substances are offered along with their chemical characterization. The development of additional studies to characterize the mode of action of these molecules will contribute to the analysis of their insecticidal potential to other species of insect pests and the possibility of their use at a commercial scale, especially in the fight against chewing insects.

Keywords: Bioprospecting; Characterization; Pyrrolobenzodiazepine; Alkaloid; Management

5.1. Introdução

O crescimento contínuo da população humana tem exigido cada vez mais o desenvolvimento de estratégias inovadoras ou de novas pesquisas que venham a auxiliar na aplicação de técnicas sustentáveis de produção agrícola. O atendimento da demanda crescente de alimentos tem levado à prática de sistemas intensivos de cultivo agrícola, sendo que o uso de novas tecnologias tem permitido a prática agrícola de modo a atender às necessidades de produção. Mas ao mesmo tempo em que a produção aumenta, surgem problemas associados ao manejo de pragas que podem ter consequências sociais e ambientais indesejadas. Assim, abordagens multissistêmicas e multidisciplinares são importantes para a geração de novas informações e para a produção de novas tecnologias que venham a permitir a prática de uma agricultura moderna sustentável [1-4].

Os organismos nocivos, principalmente insetos e fitopatógenos, são as principais ameaças à produção de alimentos e estabilidade dos agroecossistemas. Com a intensificação da produção agrícola nas últimas décadas, a dependência de defensivos agrícolas aumentou. No entanto, a maior utilização de defensivos tem causado efeitos indesejáveis, como a evolução da resistência nos organismos-alvo e os efeitos nocivos causados ao homem e ambiente, entre outros. Além disso, o custo crescente de defensivos e a demanda de consumidores por alimentos isentos de agentes tóxicos têm levado à busca de alternativas para o combate aos organismos nocivos por meio da descoberta de novas moléculas bioativas na natureza [5-9].

Os insetos são o grupo mais diversificado de organismos multicelulares que habita uma variedade de habitats e abriga uma série de associações com simbioses microbianos [10,11]. A rica diversidade da microbiota associada a insetos se mostra como uma fonte promissora de novos compostos bioativos, dado o potencial que bactérias apresentam em produzir substâncias

com atividade biológica de interesse ao homem [12]. Apesar da grande diversidade de microrganismos, a demanda por novas moléculas naturais vem sofrendo com o declínio na descoberta de novas moléculas desde 1970 [13]. Para solucionar a redundância de moléculas existentes na exploração de microrganismos, pesquisadores se voltaram para a exploração de microrganismos associados a novos nichos, em casos extremos, como as profundezas dos oceanos, e a microbiota associada aos artrópodes, principalmente os insetos [14,15]. Actinobactérias têm sido intensamente exploradas na busca por compostos naturais bioativos [16-21], sendo que dos quase 23.000 metabólitos secundários conhecidos até o momento, cerca de 10.000 deles é produzida por actinobactérias [22]. Estima-se ainda, que só o gênero *Streptomyces* seja responsável pela produção de mais da metade das moléculas bioativas descritas, sendo responsável por quase 60% dos compostos isolados de actinobactérias [21, 23]. Os compostos naturais bioativos isolados desses microrganismos são utilizados para as mais diversas finalidades, apresentando propriedades enzimáticas, inseticidas, fungicidas, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, entre outras [24-27]. Além disso, de todas as moléculas com propriedades de interesse biotecnológico conhecidas, quase a metade são produzidas por espécies pertencentes a Actinobacteria [21].

Actinobactérias também são associados comuns de formigas cortadeiras [28-30]. Diversos isolados de actinobactéria foram obtidos do tegumento da formiga cortadeira *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), assim como apresentado no capítulo anterior. Uma dessas linhagens, a IIL-Asp77, putativamente identificada como sendo *Streptomyces drozdowiczii*, não apresenta qualquer relato sobre o potencial biotecnológico de seus metabólitos, incluindo a atividade inseticida. Assim, dado potencial de produção de metabólitos bioativos por actinobactérias, a sua diversidade em associação a *A. coronatus* e o potencial que insetos apresentam como um novo nicho de exploração de microrganismos e/ou de novos compostos, buscamos avaliar o potencial do isolado IIL-Asp77 para a produção de moléculas inseticidas utilizando *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) como modelo de estudo.

5.2. Conclusões

- Os metabólitos do simbionte de *Acromyrmex coronatus*, a actinobactéria IIL-Asp77 *S. drozdowiczii*, apresentam atividade inseticida a lagartas de *Spodoptera frugiperda*;

- Usabamicina e um novo análogo foram identificados como metabólitos do isolado IIL-Asp77 *S. drozdowiczii* de *Acromyrmex coronatus* com atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*;
- Perlolirina foi identificada como metabólito do isolado IIL-Asp77 *S. drozdowiczii* de *Acromyrmex coronatus* com atividade inseticida a lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*;
- Nova atividade biológica foi identificada para usabamicinas e perlolirinas – a atividade inseticida.

Referências

1. Altieri MA. Agroecology: the science of sustainable agriculture. CRC Press, 2018. p. 448.
2. Ramankutty N, Mehrabi Z, Waha K, Jarvis L, Kremen C, Herrero M et al. Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. Annual Review of Plant Biology. 2018;69(1):789-815.
3. Commoner, B. The closing circle: nature, man, and technology. New York: Knopf; 1971.
4. Davis K, Gephart J, Emery K, Leach A, Galloway J, D’Odorico P. Meeting future food demand with current agricultural resources. Global Environmental Change. 2016;39:125-132.
5. Cook R. Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology. 2000;38(1):95-116.
6. Stark, J.D., Banks, J.E. 2001. "Selective" pesticides: are they less hazardous to the environment. *Bioscience*, 51:980-982.
7. Pretty J, Bharucha Z. Sustainable intensification in agricultural systems. Annals of Botany. 2014;114(8):1571-1596.
8. Damalas, CA. Safe food production with minimum and judicious use of pesticides. In: Food Safety. Cham: Springer; 2016. p. 43-55.
9. Praça L, Batista A, Martins E, Siqueira C, Dias D, Gomes A et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2004;39(1):11-16.
10. Moran N. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104:8627-8633.

11. Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jung MJ, Kim KS, Park DS et al. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(17):5254-5264.
12. Poulsen M, Oh DC, Clardy J, Currie CR. Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *Plos One*. 2011;6(2):e16763.
13. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 2007;70(3):461-477.
14. Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*. 2009;26(3):338-362.
15. Challinor VL, Bode HB. Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1354(1):82-97.
16. Ōmura S, Crump A. The life and times of ivermectin - a success story. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(12):984-989.
17. von Bubnoff A. Seeking new antibiotics in nature's backyard. *Cell*. 2006;127(5):867-869.
18. Clardy, J, Fishback, MA, Walsh, CT. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*. 2006;24:1541-1550.
19. Guimarães L, Peixoto-Nogueira S, Michelin M, Rizzatti A, Sandrim V, Zanoelo F et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37(4):474-480.
20. Van Wezel G, Krabben P, Traag B, Keijser B, Kerste R, Vijgenboom E et al. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(10):6863-6863.
21. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 2005;58(1):1-26.
22. Sharma M. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3:801-32.
23. Anderson A, Wellington E. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(3):797-814.
24. Kaur T, Vasudev A, Sohal S, Manhas R. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *BMC Microbiology*. 2014;14(1):227-235.
25. Alvarez A, Saez J, Davila Costa J, Colin V, Fuentes M, Cuozzo S et al. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*. 2017;166:41-62.

26. Zucchi TD, Almeida LG, Moraes LAB, Consoli FL. Albocycline, the main bioactive compound from *Propionicimonas* sp ENT-18 against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Industrial Crops and Products*. 2014;52:264-268.
27. Martinez AFM, Almeida LGA, Moraes LAB, Cõnsoli FL. Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. *BMC Microbiology*. 2017;17(1):143.
28. Zhang MM, Poulsen M, Currie CR. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *The ISME Journal*. 2007;1(4):313.
29. Barke J, Seipke RF, Grüşchow S, Heavens D, Drou N, Bibb MJ et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC biology*. 2010;8(1):109.
30. Zucchi TD, Guidolin AS, Cõnsoli FL. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiological Research*. 2011;166(1):68-76.