



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
MESTRADO EM AGRONOMIA

CÁSSIA DE FÁTIMA PEREIRA DE BRITO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR
Photorhabdus sp.**

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2021

CÁSSIA DE FÁTIMA PEREIRA DE BRITO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR
Photorhabdus sp.**

Dissertação de Mestrado apresentada a
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
Campus Luiz Meneghel, ao Programa de
Mestrado em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Sandra Alves

BANDEIRANTES, PR, BRASIL

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

dC345i de Fátima Pereira de Brito, Cássia
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA E PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR *Photorhabdus* sp. / Cássia de Fátima
Pereira de Brito; orientadora Viviane Sandra Alves;
co-orientador Leopoldo Sussumu Matsumoto -
Bandeirantes, 2021.
86 p. :il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Agronomia) -
Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2021.

1. *Photorhabdus* sp. 2. Bactéria Simbionte . 3.
Nematoide Entomopatogênico . 4. *Heterorhabdits* sp.
5. Caracterização Molecular . I. Sandra Alves,
Viviane, orient. II. Sussumu Matsumoto , Leopoldo,
co-orient. III. Título.

CÁSSIA DE FÁTIMA PEREIRA DE BRITO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR
Photorhabdus sp.**

Dissertação de Mestrado apresentada a
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
Campus Luiz Meneghel, ao Programa de
Mestrado em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Viviane Sandra Alves
(Orientadora)

Prof. Dr. Luis Eduardo A. M. Lescano
(Biólogo Autônomo)

Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira
(UENP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre estar ao meu lado e iluminar em todos os momentos.

Aos meus amados pais Waldomiro Pereira de Brito, Maria de Fátima de Brito e irmão Leandro Marques Brito por todo o amor, carinho, apoio e serem a base da minha vida. É tudo por vocês!

À minha querida orientadora Professora Dra. Viviane Sandra Alves pela confiança, amizade, paciência e compreensão durante o mestrado. Obrigada por tudo.

Ao meu coorientador, Leopoldo Sussumu Matsumoto pelas orientações e apoio.

Ao meu amado, amigo e namorado Elton Yoshio Akashi pelo incentivo e paciência.

Aos agregados da república Karyssinhas, vocês fazem parte dessa trajetória.

Aos meus parceiros do Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano (LECOM).

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa do mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	16
2.1.1 Gênero <i>Heterorhabditis</i>	17
2.1.2 Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis</i>	18
2.2 BACTÉRIAS SIMBIONTES	20
2.2.1 Bactérias associadas a <i>Heterorhabditis</i> : Gênero <i>Photorhabdus</i>	22
2.2.2 Caracterização molecular	24
2.2.3 Características biológicas e bioquímicas de <i>Photorhabdus</i>	26
2.2.4 Virulência e patogenicidade	28
2.2.5 Antibióticos produzidos pelas bactérias	31
2.2.6 Toxinas	32
3. ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DO GÊNERO <i>PHOTORHABDUS</i>	35
3.1 INTRODUÇÃO	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1 Nematoides entomopatogênicos, isolamento bacteriano	39
3.2.2 Identificação molecular	40
3.2.3 Caracterização fenotípica e bioquímica das bactérias	41
3.2.4 Produção de compostos com atividade antimicrobiana	43
3.2.5 Efeito inseticida	44
3.2.6 Efeito fungicida	46
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.3.1 Caracterização fenotípica	46
3.3.2 Identificação molecular	47
3.3.3 Caracterização bioquímica	50
3.3.4 Atividade antimicrobiana	52
3.3.5 Efeito inseticida	53
3.3.6 Efeito fungicida	59
3.4 CONCLUSÃO	60
4. ARTIGO B: PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS SIMBIONTES DO GÊNERO <i>PHOTORHABDUS</i>	61
4.1 INTRODUÇÃO	63
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	65

4.2.1 Cepas bacterianas.....	65
4.2.2 Prospecção de metabólitos secundários.....	65
4.2.3 Ensaios de bioatividade com extratos de metabólitos secundários	66
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.3.1 Atividade inseticida	69
4.3.2 Atividade antimicrobiana	70
4.3.3 Atividade fungicida.....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Nematoides entomopatogênicos utilizados para isolamento das bactérias simbiotes.....	33
Tabela 3.2 Valores de homologia (%) das sequências de nucleotídeos dos isolados de <i>Photorhabdus</i> utilizados neste trabalho e sequencias provenientes do BLAST.....	42
Tabela 3.3 Características bioquímicas das cepas de <i>Photorhabdus</i> obtidas a partir de nematoides entomopatogênicos nativos do Norte do Paraná.....	45
Tabela 3.4 Atividade antimicrobiana de cepas de <i>Photorhabdus</i> sp. sobre diferentes espécies de bactérias de importância médica e agrícola.....	46
Tabela 3.5 Porcentagem de mortalidade de três hospedeiros inoculados com diferentes cepas bacterianas após 48 horas da inoculação.....	47
Tabela 3.6 Porcentagem média ($\pm$ Desvio Padrão) de mortalidade de <i>Galleria mellonella</i> após aplicação de suspensão bacteriana de <i>Photorhabdus asymbiotica</i> (P04) e <i>Photorhabdus luminescens</i> (L08) na hemolinfa em diferentes concentrações e avaliada por 36 horas.....	51
Tabela 4.1 Cepas bacterianas utilizadas como fonte de metabólitos secundários...	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Ciclo de vida dos nematoides do gênero <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	15
Figura 2.2. Lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (Traça das colmeias) inoculadas com <i>P. luminescens</i> (A) Não inoculada; (B) Após 24 horas da inoculação; (C) Após 48 horas da inoculação; (D) Bioluminescência.....	22
Figura 3.1. Morfologia das colônias da bactéria <i>Photorhabdus</i> sp. (L08) após 48h de crescimento em meio de cultura NBTA.....	41
Figura 3.2. Relações filogenéticas de bactérias simbiotes baseadas na análise de parte do gene 16S do rRNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). <i>Xenorhabdus bovienii</i> foi usado como grupo externo.....	42
Figura 3.4. Teste de motilidade em meio ágar semissólido bactéria <i>Photorhabdus</i> sp. (P04) após 48h de crescimento.....	44
Figura 3.5. Atividade lipase da bactéria <i>Photorhabdus</i> sp. (P04).....	44
Figura 3.6. Atividade antibiótica de <i>Photorhabdus luminescens</i> (P05) sobre <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
Figura 3.7. Porcentagem de mortalidade de <i>Galleria mellonella</i> ao longo do tempo, inoculadas com diferentes concentrações de <i>Photorhabdus luminescens</i> L08 (A) e <i>Photorhabdus asymbiotica</i> P04 (B).....	49
Figura 3.8. Atividade fungicida de <i>Photorhabdus luminescens</i> (P06) sobre <i>Beauveria bassiana</i>	52
Figura 4.1. Lagartas de <i>Galleria mellonella</i> submetidas a dieta contendo extratos bacterianos de <i>Photorhabdus</i> sp.....	60
Figura 4.2. Atividade antimicrobiana de extrato proveniente da cepa L08 de <i>Photorhabdus luminescens</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figura 4.3. Atividade antifúngica do extrato de <i>Photorhabdus asymbiotica</i> (P04) frente a <i>Metharizium anisopliae</i>	62

BRITO, CÁSSIA F. P. **Identificação molecular, caracterização bioquímica e prospecção de metabólitos secundários produzidos por *Photorhabdus* sp.** 2020. 85f. Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2021.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo, identificar as bactérias simbiotes de quatro isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) do gênero *Heterorhabditis* sp. (isolados UENP-n 04, 05, 06 e UEL 08), nativos do Norte do Paraná, e realizar a caracterização molecular, bioquímica e biológica destas bactérias, além de prospectar a capacidade de produção de metabólitos secundários com efeitos antimicrobianos, fungicidas e inseticidas. As bactérias foram isoladas a partir de hemolinfa de lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) e a identificação molecular foi feita a partir da amplificação de parte do gene rRNA 16S. Também foi feita a caracterização por meio de testes bioquímicos de motilidade, coloração de Gram, atividade de lipase, protease, lecitinase e bioluminescência e avaliada a produção de compostos com atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A patogenicidade sobre insetos foi avaliada em lagartas de *G. mellonella*, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito fungicida sobre os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Além disso, prospectou-se a produção de metabólitos secundários a partir de extratos, que foram avaliados quanto ao efeito inseticida sobre *G. mellonella* (aplicação oral e via hemolinfa), efeito antimicrobiano em bactérias *S. aureus*, *E. coli*, e *B. thuringiensis* e fungicida nos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Três cepas bacterianas obtidas foram identificadas como pertencendo a espécie *Photorhabdus luminescens* (P05, P06 e L08) e a outra como *Photorhabdus asymbiotica* (P04). Quanto aos testes bioquímicos observou-se que todas as cepas foram positivas para motilidade, atividade lipase, protease e para absorção do azul de bromotimol, mas negativas para a atividade lecitinase. Quando inoculadas na hemolinfa de lagartas de *G. mellonella*, *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* na forma de suspensão, as cepas foram

altamente virulentas causando mortalidade acima de 85% nas três espécies de lagartas. Quando avaliadas em diferentes concentrações, P04 mostrou-se mais agressiva, matando acima de 95% das lagartas infectadas em todas as concentrações avaliadas após 18 horas de inoculação. Com relação ao efeito antimicrobiano, observou-se que as quatro cepas bacterianas apresentaram atividade positiva inibindo o crescimento de *B. thuringiensis* e *S. aureus* mas apenas P04 apresentou efeito antimicrobiano contra *E. coli*. O efeito dos extratos aquosos obtidos a partir das culturas de bactérias P04 apresentou resultados positivos para ação fungicida sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae* e o extrato proveniente da cepa L08 apresentou efeito antimicrobiano sobre a bactéria *S. aureus*, porém não apresentaram efeito inseticida sobre *G. mellonella* quando inoculadas na hemolinfa ou quando ingeridas.

PALAVRAS CHAVES: Nematoides entomopatogênicos, bactéria simbiote, *Heterorhabditis amazonensis*, *Heterorhabditis mexicana*.

BRITO, CÁSSIA F. P. **Molecular identification, biochemical characterization and prospection of secondary metabolites produced by *Photorhabdus* sp.** 2021. 84f. Dissertation submitted to the Master's Program in Agronomy, State University of Northern Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2021.

ABSTRACT

This study aimed to identify the symbiont bacteria of four isolates of entomopathogenic nematodes (NEPs) of the genus *Heterorhabditis* sp. (isolates UENP-n 04, 05, 06 and UEL 08), native to Northern Paraná, and to perform the molecular, biochemical and biological characterization of these bacteria, besides prospecting the production capacity of secondary metabolites with antimicrobial, fungicidal and insecticidal effects. The bacteria were isolated from the hemolymph of larvae of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and molecular identification was done by amplification of part of the 16S rRNA gene. It was also characterized by biochemical tests for motility, Gram staining, lipase, protease, lecithinase and bioluminescence activity and evaluated the production of antimicrobial on *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. The pathogenicity on insects was evaluated on caterpillars of *G. mellonella*, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and the fungicidal effect on the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Furthermore, the production of secondary metabolites from extracts was prospected and evaluated for their insecticidal effect on *G. mellonella* (oral application and via hemolymph), antimicrobial effect on *S. aureus*, *E. coli*, and *B. thuringiensis* bacteria, and fungicidal effect on *M. anisopliae* and *B. bassiana* fungi. Three bacterial strains obtained were identified as belonging to *Photorhabdus luminescens* species (P05, P06 and L08) and the other as *Photorhabdus asymbiotica* (P04). As for the biochemical tests, all strains were positive for motility, lipase and protease activity, and bromothymol blue uptake, but negative for lecithinase activity. When inoculated into the hemolymph of *G. mellonella*, *S. frugiperda* and *A. gemmatilis* larvae as suspension, the strains were highly virulent, causing mortality above 85% in all three caterpillar species. When evaluated in different concentrations, P04 proved to be more aggressive, killing over 95% of the infected

caterpillars in all concentrations evaluated after 18 hours of inoculation. Regarding the antimicrobial effect, it was observed that the four bacterial strains showed positive activity inhibiting the growth of *B. thuringiensis*, *S. aureus* but only P4 showed antimicrobial effect against *E. coli*. The effect of the aqueous extracts obtained from the bacterial cultures P04 showed positive results for fungicidal action on *B. bassiana* and *M. anisopliae* and the extract from the L08 strain showed antimicrobial effect on *S. aureus* bacteria, but showed no insecticidal effect on *G. mellonella* when inoculated in the hemolymph or when ingested.

KEY WORDS: Entomopathogenic nematodes, symbiotic bacteria, *Heterorhabditis amazonensis*, *Heterorhabditis mexicana*.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são membros das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, constituindo agentes de controle biológico promissores e efetivos devido sua associação a bactérias simbiotes. O termo entomopatogênico refere-se à capacidade de causar patogenia em insetos via liberação de toxinas ou outra substância de caráter inseticida (ALMENARA et al., 2012; SUBRAMANIAN; MUTHULAKSHMI, 2016).

Em geral, as espécies de nematoides do gênero *Heterorhabditis* associam-se com bactérias do gênero *Photorhabdus*, enquanto os do gênero *Steinernema* associam-se com bactérias do gênero *Xenorhabdus* (GREWAL et al., 2005).

Tanto os nematoides do gênero *Heterorhabditis*, quanto às bactérias do gênero *Photorhabdus* não são encontrados no meio ambiente dissociados, pois ambos partilham de um mutualismo multipartidário (GOODRICH-BLAIR; HUSSA, 2013), onde o nematoide é ineficiente em colonizar e se reproduzir no inseto na ausência da bactéria, assim como a bactéria sem o NEP não consegue chegar ao inseto hospedeiro.

A simbiose dos NEPs com as bactérias apresenta um papel muito importante, pois, além de matar o hospedeiro rapidamente, a bactéria metaboliza os tecidos internos do hospedeiro, facilitando a alimentação do nematoide. As bactérias também controlam o microecossistema (interior do cadáver) impedindo a infecção por outros microrganismos que estão presentes no ambiente, através da síntese de vários metabólitos secundários, que, entre outras funções, podem ter ação antibiótica sobre outros agentes microbiano (ALMENARA et al., 2012).

As bactérias entomopatogênicas possuem um extenso repertório de genes envolvidos na produção de toxinas e metabólitos secundários. Acredita-se que estas moléculas sejam responsáveis por garantir tanto o processo de patogenicidade para o inseto quanto o reconhecimento pelo nematoide e a manutenção da simbiose (CLARKE, 2008). O complexo nematoide-bactéria é muito virulento para insetos, fazendo destes organismos uma alternativa não química no controle de insetos-praga a nível mundial (OROZCO et al., 2013). Nesse sentido, o conhecimento das especificidades apresentadas pelas espécies tanto de nematoides como das suas

bactérias simbiontes, são de extrema importância na determinação de agentes para o controle de pragas e biocontroladores.

Assim, o objetivo desse estudo foi realizar o isolamento, identificação molecular, caracterização biológica e bioquímica, bem como a prospecção de metabólitos secundários das bactérias simbiontes do gênero *Photorhabdus* associadas aos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* sp. isolados UENP 04, 05, 06 e UEL 8.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NEMATOIDES ENTOMOPATOGENICOS

O termo nematoides entomopatogênicos (NEPs) se refere às espécies de nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, os quais constituem agentes de controle biológico que têm sido aplicados em programas de controle biológico clássico, conservador e aumentativo. NEPs de ambos os gêneros têm sido usados para controlar um amplo espectro de insetos pragas, nematoides fitófagos e outros patógenos de plantas, podendo ser encontrados em diversos lugares do mundo, sendo isolados de diferentes ambientes e ecossistemas, desde ártico até os trópicos, com exceção da Antártida (STOCK, 2015; DOLINSKI et al., 2017).

Os NEPs causam patologia e a morte de insetos de diversas ordens e outros hospedeiros e tem grande potencial no controle de pragas, sendo considerados uma potencial ferramenta em programas de manejo integrado de pragas (MIP) (GUIDE et al., 2019), possuindo vários atributos positivos como agentes no controle microbiano (SHAPIRO; GREWAL, 2008; SHAPIRO-ILAN et al., 2014). Entre estes atributos, não apresentam risco a saúde e organismos não-alvo e ao meio ambiente (AKHURST; SMITH, 2002; EHLERS, 2005), e o elevado nível de segurança associado aos NEPs resultou na exclusão dos requisitos de registro de pesticidas em muitos países como os Estados Unidos (EHLERS, 2005).

As espécies de NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são as mais utilizadas em pesquisas e em programas de controle biológico devido a seu alto potencial de aplicação e fácil multiplicação, pois podem ser reproduzidos em hospedeiros (*in vivo*) ou *in vitro* (em meios de cultura), não afetam plantas, não são nocivos a vertebrados e outros organismos não alvo como citado acima, não poluem a água e podem ser aplicados com equipamentos agrícolas comuns como pulverizadores ou sistema de irrigação (ALVES; LOPES, 2008; VOSS et al., 2009).

No entanto, embora tanto as espécies do gênero *Steinernema* quanto *Heterorhabditis* sejam considerados NEPs, e sejam bastante semelhantes e compartilhem muitos traços comuns, como características morfológicas e ecológicas, na verdade apresentam histórias evolutivas independentes, e mesmo que atualmente ocupem o mesmo nicho ecológico (ALMENARA, 2012), essas

semelhanças observadas entre essas famílias são o resultado de evolução convergente (POINAR, 1993).

Trabalhos realizados com base em estudos filogenéticos para o Filo Nematoda (BLAXTER et al., 1998), evidenciaram que os Heterorhabditidae estão mais próximos dos Strongylida (um grupo de parasitas vertebrados) e teriam um ancestral marinho (mais próximos de *Caenorhabditis elegans*), enquanto Steinernematidae são considerados estreitamente relacionados com os Panagrolaimoidea (nematoides de vida livre a associados a insetos) e tem origem terrestre (STOCK, 2015).

Entre os aspectos que favorecem a utilização dos NEPs no controle de pragas, destaca-se a capacidade destes organismos em se locomover no solo em busca de hospedeiros para os quais são atraídos por diferencial no teor de CO₂ e possivelmente, por componentes fecais, ou por terem uma extensa gama de hospedeiros, o que possibilita a sobrevivência em condições ambientais nem sempre favoráveis e armazenamento em laboratório antes de serem aplicados (GARCIA, 2006).

Um grande número de casos de sucesso do uso de NEPs no controle de pragas em vários cultivos agrícolas têm sido relatados em todo o planeta. No Brasil, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando conhecer as espécies de NEPs que ocorrem aqui, estes organismos podem ser encontrados em diversos lugares praticamente em todo o mundo, e em diferentes ecossistemas (STOCK, 2015). Eles podem ser isolados a partir de amostras de solo ou de insetos infectados encontrados no campo.

2.1.1 Gênero *Heterorhabditis*

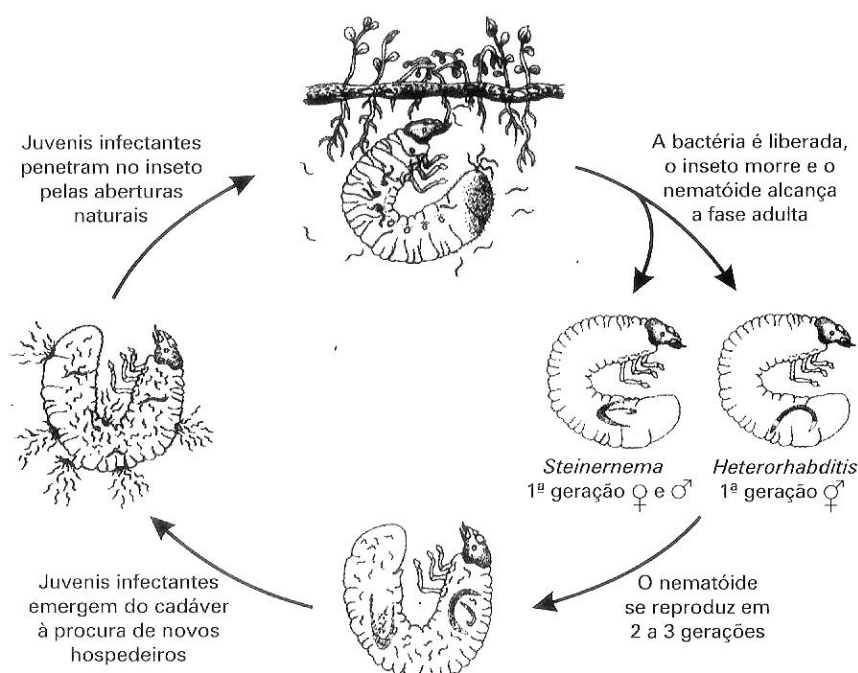
A família Heterorhabditidae pertencente à ordem Rhabditida, contida na Classe Secernentea dentro do Filo Nematoda. O gênero *Heterorhabditis*, de modo particular é o único gênero da família Heterorhabditidae e inclui mais de 20 espécies atualmente reconhecidas (STOCK; GOODRICH-BLAIR, 2012).

Embora o número de espécies de *Heterorhabditis* seja pequeno quando comparado com as 95 espécies válidas de *Steinernema*, acredita-se que isso se deva em parte por uma subnotificação anterior, a julgar que a maior parte das espécies foram descritas nos últimos 15 anos, graças ao advento das técnicas

moleculares que desempenham um papel importante no diagnóstico, e segundo Hunt, Subbotin (2016) espera-se que o ritmo de novas identificações diminua nos próximos anos, pois o gênero *Heterorhabditis* é mais específico que *Steinernema* pelo fato de apresentar a primeira geração hermafrodita (e não anfímitica como no gênero *Steinernema*), o que diminui a diversidade genética da progênie.

2.1.2 Ciclo de vida de *Heterorhabditis*

Os heterorhabditídeos são encontrados no solo em apenas uma de suas fases de vida, a de juvenil infectante (JI), que corresponde à terceira fase larval do nematoídeo. As demais fases larvais e a fase adulta podem apenas ser encontradas no cadáver colonizado de insetos hospedeiros. Assim, o ciclo de vida desses nematoides consiste na fase de ovo, quatro estágios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adulto (RIBEIRO, 2018) (Figura 2.1).



Fonte: Ferraz et al., 2008.

Figura 2.1. Ciclo de vida dos nematoides do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis*.

Os JIs livres no solo buscam ativamente por seus hospedeiros, e quando os encontram infectam este inseto, adulto ou forma jovem, penetrando através de

orifícios naturais como boca, ânus ou espiráculos (VIDAL et al., 2018). Assim que atingem a hemolinfa do hospedeiro, os JIs liberam as bactérias simbiotes, que iniciam a colonização dos tecidos internos, enquanto os JIs de terceiro estágio se alimentam desse interior, passando para o último estágio juvenil (J4), e em seguida dão origem a adultos hermafroditas com morfologia de fêmeas, cujos ovos são produzidos por autofecundação. Destes ovos, eclodem juvenis de primeiro estágio, que vão se diferenciar em machos e fêmeas de segunda geração (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Dentro do cadáver do inseto, as diferentes fases de *Heterorhabditis* alimentam-se dos tecidos do cadáver, bioconvertido por bactérias do gênero *Photorhabdus* para disponibilização da matéria orgânica. A bioconversão ocorre por meio de uma extensa gama de enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, lipases e quitinases (ELEFThERIANOS et al., 2010) que atuam degradando os tecidos e tornando-os assimiláveis ao nematoide. Assim, as células bacterianas e os tecidos do hospedeiro funcionam como um meio rico para crescimento e reprodução do nematoide.

A duração do ciclo de vida pode ser variável em função da oferta de alimento no interior do inseto. Portanto, se houver pouca fonte de alimento no interior do hospedeiro, os ovos da primeira geração dão origem aos J1, que em seguida se transformam em J2. Como a fonte de alimento está se esgotando os J2 não se alimentam, ingerem uma quantidade de bactérias e mudam para estágio pré-infecciosos ou infecciosos (J3), retendo a cutícula do segundo estágio. Deste modo, eles deixam o cadáver e saem a procura de um novo hospedeiro. Caso não encontrem, eles podem sobreviver no solo por vários meses (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Durante o período em que permanecem no solo, os JIs carregam as bactérias no interior do seu tubo digestivo que sobrevivem com crescimento e metabolismo controlados, até que um novo hospedeiro seja encontrado (VIDAL et al., 2018).

O gênero *Heterorhabditis* apresenta um recurso peculiar em seu ciclo de vida que garante que a bactéria do gênero *Photorhabdus* esteja presente em todos seus descendentes, possivelmente devido ao fato de que a bactéria é fundamental para o sucesso da infecção no hospedeiro, através da endotoquia matricida durante a reprodução do nematoide (CICHE et al., 2008).

No gênero *Heterorhabditis* a endotoquia matricida é representada pela eclosão dos ovos de nematoide no período que ainda vivem dentro da mãe. As larvas se alimentam dos tecidos da mãe, causando sua morte numa fase chamada de “saco de vermes”, onde as larvas recém eclodidas entram em contato com as células de *Photorhabdus* enquanto se alimentam no pseudoceloma materno, garantindo a associação entre a prole do nematoide e a linhagem de bactéria simbiote (CICHE et al., 2008).

Um fato interessante sobre a colonização do cadáver do inseto por *Photorhabdus* é que outros organismos não costumam ser encontrados no cadáver, pois essas bactérias produzem antibióticos que impedem o desenvolvimento de outras bactérias. Além disso, estas bactérias também produzem pigmentos que conferem ao inseto hospedeiro já morto, coloração marrom-avermelhada com bioluminescência característica na cutícula (ANDALÓ et al., 2006).

2.2 BACTÉRIAS SIMBIONTES

Cada espécie de nematoide entomopatogênico possui individualidades em relação a bactéria simbiótica, que em geral são do gênero *Xenorhabdus* (Poinar e Thomas, 1979) e *Photorhabdus* (Thomas e Poinar, 1979), e associam-se com nematoides dos gêneros *Steinernema* (Travassos, 1927) e *Heterorhabditis* (Poinar, 1975) respectivamente (ANDALÓ et al., 2009).

Recentemente, estudos tem evidenciado que espécies de nematoide do gênero *Oscheius* também podem apresentar associações temporárias ou oportunistas com bactérias entomopatogênicas do gênero *Serratia* (YE, TORRES-BARRAGAN, CARDOZA, 2010; ZANG et al., 2008, 2009).

Embora esta não seja uma associação obrigatória como nos outros grupos, pode ser considerada entomopatogênica, uma vez que aumenta a patogenicidade dos nematoides e acelera a morte do inseto hospedeiro (DILLMAN et al., 2012).

As bactérias entomopatogênicas pertencentes aos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são portanto, bactérias endossimbiontes de nematoides entomopatogênicos, e enquanto o sistema *Heterorhabditis-Photorhabdus* é bastante restritivo, uma vez que cada espécie de nematoide apresenta como simbiote sempre e somente uma única linhagem daquela espécie de bactéria (FORST;

CLARKE, 2002). A simbiose *Steinernema-Xenorhabdus* pode ser menos restritiva e várias espécies diferentes de nematoide podem crescer e reter as mesmas espécies de *Xenorhabdus* (AKHURST; BOEMARE, 1990).

Embora os dois gêneros de bactérias façam parte da família Enterobacteriaceae, apresentam muitas diferenças entre si, tanto fenotipicamente quanto bioquimicamente (STOCK, 2015). Dentro do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* são as espécies mais estudadas. Embora apresentem comportamentos análogos dentro do ciclo de vida dos nematoides, determinadas características fenotípicas divergem entre estas duas espécies de bactérias. A maior parte das linhagens de *P. luminescens* é bioluminescente, propriedade constatada devido à presença de genes do operon *lux*, codificadores de uma luciferase, similar ao que acontece nos microorganismos marinhos bioluminescentes (PARACER; AHMADJIAN, 2000). *P. luminescens* é responsável por sintetizar um pigmento do tipo antraquinona e antibióticos da classe dos estilbenos (BRACHMANN; COLS; JOYCE, 2008).

Xenorhabdus nematophila, não apresenta síntese de pigmentos e bioluminescência, seus metabólitos secundários são antibióticos de distintas classes: xenocumarinas e xenorhabdinas. Outra característica bioquímica que também difere *X. nematophila* de *P. luminescens* é o fato de algumas linhagens de *P. luminescens* possuírem atividade de catalase e urease, características que estão ausentes em *X. nematophila* (AKHURST, 1982; MCINERNEY et al., 1991; ALMENARA et al., 2012)

Entre os dois pares de simbioses (*Heterorhabditis-Photorhabdus* e *Steinernema-Xenorhabdus*) podem ser observadas diferenças no modo de colonização do hospedeiro nematoide pela bactéria: *Heterorhabditis* carrega as bactérias na porção anterior do intestino (2/3 iniciais) e *Steinernema* possui um divertículo intestinal próprio para abrigar as células de *Xenorhabdus* (BIRD, AKHURST, 1983; CICHE; ENSIGN, 2003; MARTENS; GOODRICH-BLAIR, 2005; FLORES-LARA; FORST, 2007; CICHE et al., 2008).

Em comum, estas bactérias caracterizam-se por serem Gram-negativas moveis, não esporulam e, uma vez que sejam liberadas na hemolinfa dos insetos, multiplicam-se no corpo do hospedeiro e liberam uma série de toxinas e metabólitos secundários, além de produzirem vários compostos antimicrobianos a fim de inibir o

crescimento de outros microrganismos oportunistas (FERRAZ, 1998). Essas bactérias também liberam diferentes enzimas que contribuem para os processos de degradação dos tecidos do hospedeiro e assim, geram um ambiente ideal para o desenvolvimento dos nematoides (RUIU, 2015), levando o hospedeiro a morte num período de 24 a 48 horas.

Neste processo de simbiose, as bactérias requerem os nematoides para serem disseminadas de um inseto para o outro, para a proteção do ambiente externo e para a penetração na hemocèle do inseto (AKHURST; BOEMARE, 1990; HAZIR et al., 2003; STOCK; GOODRICH-BLAIR, 2008). Por sua vez, os nematoides se beneficiam do alimento provido pelas bactérias (FORST; CLARKE, 2002).

2.2.1 Bactérias associadas a *Heterorhabditis*: Gênero *Photorhabdus*

A conhecida relação de simbiose entre *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* lhes permite infectar uma vasta gama de artrópodes, incluindo principalmente os insetos. Contudo, os isópodes e carrapatos (SICARD et al., 2008) foram registrados como potenciais hospedeiros desses NEPs (DE OLIVEIRA VASCONCELOS et al., 2004; MONTEIRO et al., 2012).

As bactérias do gênero *Photorhabdus* não são encontradas no solo e na água, indicando que não possuem formas de vida livre e que a associação com os NEPs é fundamental para a sobrevivência das mesmas no ambiente (RATHORERE, 2013). Além disso, essa característica demonstra que estas não são consideradas perigosas ao ambiente, pois aparentemente sua permanência no solo é mínima, já que não possuem formas de vida livre, como algumas bactérias esporulantes (AKHURST; SMITH, 2002).

São conhecidas três espécies do gênero *Photorhabdus*: *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus temperata* e *Photorhabdus asymbiotica* (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009).

A primeira espécie a ser caracterizada foi *P. Luminescens* (THOMAS; POINAR, 1979), e também a primeira espécie do gênero *Photorhabdus* a ter o genoma sequenciado (DUCHAUD et al., 2013).

Entre as espécies de *Photorhabdus luminescens* tem as subespécies *luminescens*, *laumondii*, *akhurstii*. Hazir et al (2004) propôs duas novas subespécie

de *P. luminescens*, incluindo *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii*, e *P. luminescens* subsp. *thracensis* isolados do intestino do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* em campos na Turquia.

Há registros de *P. luminescens* associada a várias espécies de nematoides *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. Indica*, *H. georgina*, *Heterorhabditis* sp. (MANEESAKORN et al., 2011).

Dentro da espécie de *Photorhabdus temperata* à subesp. *temperata*.

As espécies *P. temperata* e *P. luminescens* compartilham características semelhantes, pois são encontradas exclusivamente em associação com o nematoide. (PARK et al., 2013). Nas duas espécies já foram descritos vários genes com expressão na fase mutualística com o nematoide, apontando forte regulação entre a interação nematoide e bactéria (CLARKE, 2014).

Embora a associação mutualista entre *Photorhabdus* e *Heterorhabditis* originalmente acreditava-se ser estritamente específico, com a diversidade do número de nematoides e isolados bacterianos, tem sido observado que algumas espécies bacterianas colonizam mais do que uma espécie de nematoide. Um exemplo, enquanto todos os parceiros bacterianos de *H. megidis* são identificados como simbiote de *P. temperata* (KUWATA et al., 2007), esta espécie bacteriana foi encontrada associada à *H. bacteriophora*, *H. zealandica* e *H. downesi* (ADAMS et al., 2006; GREWAL, 2010b, 2011; BOEMARE, 2002; TOTH; LAKATOS, 2008).

Inicialmente, apenas *P. luminescens* e *P. temperata* foram relatadas como simbióticas de NEPs, enquanto *P. asymbiotica* era associada apenas a casos clínicos humanos, pois só foi encontrada em feridas de seres humanos (FISCHER-LE SAUX et al., 1999). No entanto, trabalhos mais recentes indicam que *P. asymbiotica* pode apresentar associação com os NEPs (GERRARD et al., 2006; PLICHTA et al., 2009; GERRARD et al., 2011).

O mecanismo da infecção em humanos utilizado pela bactéria *P. asymbiotica* ainda não foi descrito, se a bactéria é capaz de iniciar a infecção sozinha ou se a mesma requer a participação de um vetor (COSTA et al., 2010) para que consiga chegar até seu hospedeiro alvo, mas a espécie mantém sua capacidade de infectar insetos em associação com o nematoide (WATERFIELD et al., 2009).

As bactérias do gênero *Photorhabdus* apresentam células em formato de bastonete, que medem 0,5-2 x 1-10 µm, não esporulam e são anaeróbicas

facultativas (BOEMARE et al., 2005), e que podem apresentar duas variantes fenotípicas denominadas fase I e fase II. Quando a bactéria é isolada do nematoide ela apresenta o fenótipo de fase I (ou forma I), de modo que, após algumas gerações, ela irá apresentar o fenótipo de fase II (ou forma II) (KOPPENHÖFER, 2007). A produção de pigmentos, o tamanho das células, condições de virulência, infecção e a presença de cristais de inclusão, são algumas particularidades que divergem entre os dois fenótipos (BOEMARE et al., 1997).

A fase I é sinalizada pela expressão e secreção em larga escala dos produtos metabólicos ligados à patogenia causada ao inseto, além do controle de outras populações bacterianas, potenciais concorrentes pelos nutrientes presentes no cadáver, e é mais exigente nutricionalmente, e por isso está presente no início do processo infectivo no inseto hospedeiro. A fase II é caracterizada pelos produtos primários de metabolismo, além dos fatores estruturais ligados à reprodução (TURLIN et al., 2006), é menos exigente nutricionalmente e normalmente ocorre no final do processo infectivo, quando o hospedeiro está próximo do esgotamento nutricional (EHLERS et al., 1998).

2.2.2 Caracterização molecular

A primeira espécie de bactéria simbiótica dos NEPs a ter genoma sequenciado foi *Photorhabdus luminescens* linhagem TT01 em 2003 (5.688.987 pares de base) que passou a ser referência para estudos do gênero desde então (DUCHAUD et al., 2003; CLARKE, 2014). Contudo, embora muitas das espécies dos NEPs simbiotes deste gênero já tenham sido identificadas e caracterizadas, muitas das bactérias associadas a esses nematoides ainda não foram totalmente identificadas e descritas (OROZCO, 2013), sendo essa uma área ainda carente de estudos.

De fato, a identificação dessas bactérias requer experiência em diversas áreas, incluindo bioquímica, sorologia, fisiologia e biologia molecular. Normalmente, a triagem fenotípica é considerada o primeiro passo na distinção de cepas bacterianas, pois possibilita uma comparação aproximada e distribuição em grupos semelhantes ou diferentes. Contudo, semelhante a seus hospedeiros nematoides, a detecção rápida e exata destas espécies de bactérias também tem requerido a

aplicação de métodos moleculares. Estes últimos de modo particular vem sendo amplamente aplicados, pois revolucionaram sistemática e a classificação dos microrganismos (SZÁLLÁS et al., 2001).

Neste sentido, métodos como reassociação de DNA e *riboprinting* foram considerados para identificação mais rápida de espécies e cepas evitando o uso de diversas técnicas de caracterização fenotípica (SZÁLLÁS et al., 2001). Mais recentemente, pesquisadores adotaram dados de sequência de conjuntos de dados únicos e multigênicos para identificação de espécies ou cepas para abordar questões evolutivas (LIU; BERRY; BLOUIN, 1999; TAILLIEZ et al., 2006; LEE; STOCK, 2010; OROZCO et al., 2013).

As análises de sequência comparativa do gene 16S rRNA e vários genes de manutenção têm sido amplamente usados para o diagnóstico de *Xenorhabdus* e espécies de *Photorhabdus*, para inferir relações filogenéticas de novas espécies bacterianas (KUWATA et al., 2012; FERREIRA, VAN REENEN, ENDO et al., 2013; OROZCO et al., 2013).

Esses estudos moleculares têm contribuído para identificação dos membros das Enterobacteriaceae que desenvolveram uma variedade de associações simbióticas com hospedeiros eucarióticos, variando de intracelular obrigatório a comensalístico incluindo interações patogênicas ou associadas ao intestino, indicando que essas associações surgiram múltiplas vezes em sua história evolutiva (HUSNIK; CHRUDIMSKÝ; HYPSE, 2011).

Com base nisso, foi hipotetizado que *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* podem ter divergido de um ancestral enterobacteriano comum o qual foi capaz de colonizar nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (POINAR, 1990). Uma associação de longo prazo com seus hospedeiros nematoides podem ter dado independentemente origem a cada um desses gêneros. Posteriormente, pressões seletivas podem ter contribuído para a manutenção de sua associação simbiótica com os hospedeiros nematoides, levando ambos os grupos a desenvolver diferentes mecanismos para convergir para o mesmo estilo de vida (POINAR; BOEMARE, 2002).

Os avanços no melhoramento genético e o sequenciamento do genoma de nematoides e seus simbiossiontes pode esclarecer formas de melhorar a eficácia desses

agentes e potencializar sua eficiência (DUCHAUD et al., 2003; BAI et al., 2013; DILLMAN et al., 2015).

Nesse sentido, estudos a respeito dessas interações simbióticas podem esclarecer como diferentes organismos podem seguir rotas diferentes para atingir pontos finais semelhantes (CHASTON et al., 2011). A este respeito o conhecimento sobre o genoma de *Photorhabdus* e os novos projetos de sequenciamento têm revelado a capacidade de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* em produzir vários metabólitos secundários diferentes incluindo peptídeos, policetídeos, e híbridos de ambos (BODE, 2009).

Como dito anteriormente, a primeira bactéria simbiótica de NEPs a ter seu genoma completamente sequenciado foi o de *Photorhabdus luminescens subsp. laumondi* Fischer – LeSaux, Viallard, Brunnel, Normand, Boemare (Enterobacterales: Enterobacteriaceae) (isolado TT01) (DUCHAUD et al., 2003), apresentando cerca de 5,7 milhões de pares de base e 4.839 genes codificantes de proteínas. Outras espécies de *Photorhabdus* que tiveram seus genomas completamente sequenciados incluem *Photorhabdus asymbiotica* com 5,065 milhões de pares de base e *Photorhabdus temperata* - LeSaux, Viallard, Brunnel, Normand e Boemare (Enterobacterales: Enterobacteriaceae), com 5,5 milhões de pares de base (WILKINSON et al., 2009; PARK et al., 2013).

2.2.3 Características biológicas e bioquímicas de *Photorhabdus*

As bactérias do gênero *Photorhabdus* são bacilos Gram negativos, Gamma-Proteobacteria, da família *Enterobacteriaceae* e são pleomórficas, ou seja, tem formas distintas da colônia e alteração de fase. As duas fases variantes podem ser evidenciadas em vários aspectos, incluindo a virulência contra insetos ou na associação com os NEPs. De modo geral, as propriedades da fase I estão muito acentuadas ou ausentes na fase II (GIVAUDAN; LANOIS, 2000; OROZCO, 2014).

A temperatura ótima de crescimento é geralmente 28°C, mas algumas cepas crescem a 37±1°C. Todas as cepas são catalíticas positivas, mas não são capazes de reduzir o nitrato. Além disso, elas são negativas para muitos caracteres de *Enterobacteriaceae*. Elas hidrolizam gelatina (protease positiva) e a maioria das

linhagens são hemolíticas para sangue de ovelhas e cavalos, algumas produzindo uma hemólise anular incomum em sangue de ovelha a 25°C. Todos são lipolíticas em Tween-20 e muitos em Tweens-40, 60, 80 e 85 (lipase positiva). Também apresentam glicose, frutose, D-manose, maltose, ribose e N-acetilglucosamina, são acidificadas e a fermentação a partir do glicerol é fraca (BOEMARE, 2001).

O genoma de *Photorhabdus* está repleto de genes que codificam proteínas que compartilham similaridade de sequência com uma ampla gama de fatores de virulência caracterizados anteriormente em patógenos de mamíferos (FFRENCH-CONSTANT et al., 2000), e os papéis desses fatores de virulência ainda não foram totalmente esclarecidos na patogenicidade dos insetos (FORST; TABATABAI, 1997; HU; WEBSTER, 2000).

Durante o estágio estacionário a bactéria produz inúmeras moléculas incluindo agentes antimicrobianos e exoenzimas que são importantes no processo simbiótico. Quando *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são inoculadas em meios artificiais produzem diferentes combinações de proteases, lipases, quitinases e lecitinases (AKHURST; BOEMARE, 1990; THALER et al., 1998) e até uma metaloprotease foi identificada durante a fase pós-exponencial do crescimento bacteriano de *P. luminescens* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CLARKE; DOWDS, 1995; DABORN et al., 2001).

A fase I das bactérias apresentam flagelos peritricos, produzem diversas toxinas que são as responsáveis pela morte do hospedeiro (BOEMARE; AKHURST, 1988). Na fase I também ocorre a produção de antibióticos que impedem o crescimento de outros micro-organismos no mesmo ambiente e possui grandes inclusões para-cristalinas no seu citoplasma. Quanto a aparência, forma colônias pequenas que absorvem o corante Azul de Bromotimol e reduzem o Cloreto de Trifenil-tetrazolio em placas de NBTA, adquirindo coloração verde e consistência pegajosa, e em culturas artificiais as bactérias em fase I produzem também combinação de proteases, lipases, quitinases e lecitinases (AKHURTS; BOEMARE, 1990).

A fase II não apresenta flagelos e podem ser mantidas em cultivos *in vitro* por um longo período. Sua atividade inseticida é menos eficiente (BOEMARE; AKHURST, 1988) porém, é igualmente produtora de compostos com ação antimicrobiana, mas não forma inclusões para-cristalinas. As colônias marcadas por

essa fase são grandes, não adsorve o Azul de Bromotimol, e adquire uma cor marrom - avermelhada após a degradação do cloreto de trifeniltetrazolio em placas de NBTA (ENSIGN, 2000; MARTINEZ, 2010).

Outra característica que chama a atenção em espécies do gênero *Photorhabdus* é a possibilidade de produzir bioluminescência. A enzima catalisadora da emissão de luz foi identificada como *luciferase* bacteriana (dímero de alfa – beta). Isto significa que utiliza o oxigênio molecular para oxidar dois substratos (um aldeído alifático de cadeia longa e um FMNH 2), responsável por produzir uma luz de cor verde-azul. Apesar da *luciferase* produzir uma luz azul verde, o inseto fica como uma aparência vermelha (Figura 2.2) possivelmente devido ao pigmento vermelho produzido pelas bactérias (FORST; NEALSON, 1996). Os genes responsáveis da produção da enzima *luciferase* são chamados de genes *lux*.

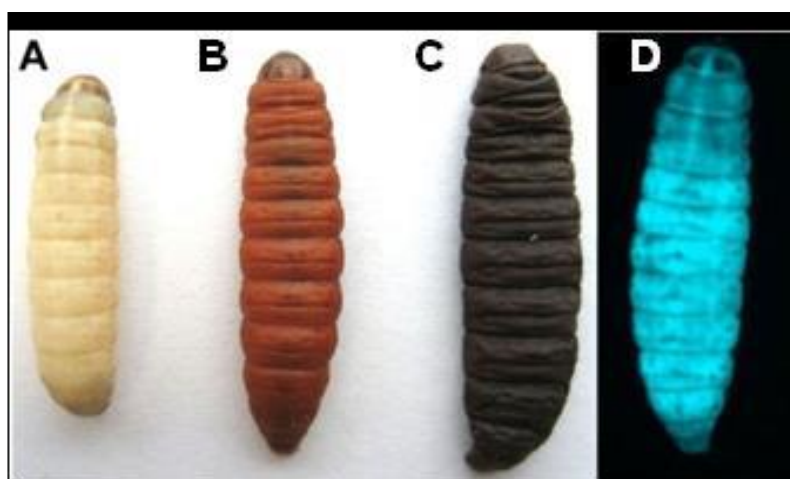


Figura 2.2 Lagartas de *Galleria mellonella* (Traça das colmeias) inoculadas com *P. luminescens*. (A) Não inoculada; (B) Após 24 horas da inoculação; (C) Após 48 horas da inoculação; (D) Bioluminescência (MANNHREZ, 2010).

2.2.4 Virulência e patogenicidade

A maioria das espécies de *Photorhabdus* são extremamente virulentas quando injetadas diretamente em insetos (CLARKE; DOWDS, 1995), e na forma mutualística (encontrada no nematoide) as células da bactéria são 17 vezes menores que a célula na forma patogênica (encontrada no inseto), produzem menos metabólitos secundários e menos bioluminescência. Na forma patogênica a

produção de metabólitos secundários é bem vasta. Os genes responsáveis pela produção destes metabólitos são de cerca de 6% dos genes de *P. luminescens* TT01, quase o dobro dos 3,8% presentes em *Streptomyces*, que é conhecido como modelo para o estudo dessas moléculas (BODE, 2009). Desta forma tornando as bactérias do gênero *Photorhabdus* excelentes modelos para estudo de relações simbióticas, objeto de mineração de compostos com atividade antibióticas, e mesmo não sendo encontradas dissociadas na natureza elas podem ser cultivadas em *in vitro*.

A patogenicidade das bactérias *Photorhabdus* está diretamente ligada à inibição das reações de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (DOWDS; PETERS 2002). O sistema imune do inseto é responsável por dois tipos de reações de defesa celular, promovidos por células livres da hemolinfa, chamadas hemócitos (GOMES, 2002; OROZCO, 2014).

Após a invasão do inseto alvo, ocorre a formação de nódulos ao redor dos NEPs, resultando no seu encapsulamento e isolando do resto das células do organismo por meio da formação de diversas camadas concêntricas formadas por numerosos hemócitos, chamados plasmatócitos. E em sequência ocorre a fagocitose, provida por diversos tipos de hemócitos, sendo os mais eficazes os granulócitos. Este recurso é auxiliado pela cascata de Fenol-Oxidase (PO), um composto do sistema imune do inseto, além de ser uma molécula essencial ao NEP, sinalizando o momento certo para seu desenvolvimento no interior do inseto (JOYCE et al., 2008).

As bactérias entomopatogênicas também produzem fatores de virulência que são tão eficientes a ponto de destruir as células responsáveis pela defesa imunológica (GOMES, 2002) estas bactérias produzem exo-enzimas como lipases (THALER et al., 1995), quitinases (CHEN et al., 1996), proteases (BOWEN et al., 2000), e fosfolipases responsáveis por atuar nos tecidos e células do hospedeiro, destruindo ou reduzindo suas defesas imunes. As lecitinases são produzidas somente por bactérias do gênero *Xenorhabdus* e estão envolvidas na degradação de fosfolipídios de insetos ocasionando uma fonte lipídica para o crescimento de NEPs do gênero *Steinernema* (MAHAR et al., 2008).

A análise do genoma de *P. luminescens* TT01 descreveu que quase 6% de seu genoma tem relação na produção de metabólitos (DUCHAUD et al., 2003;

WILKINSON et al., 2009), e que há um grande número de adesinas, toxinas, hemolisinas, proteases e lipases codificadas, também como uma extensa gama de genes que sintetizam antibióticos (BODE, 2009). Essas proteínas podem desempenhar um papel importante na colonização, invasão e bioconversão do hospedeiro do inseto cadáver. A comparação desses genomas com bactérias relacionadas também revelou que as bactérias entomopatogênicas adquiriram fatores de virulência por extensas transferências (DUCHAUD et al., 2003; CHASTON et al., 2011; GUALTIERI et al., 2014; LANOIS et al., 2013).

Essas bactérias desenvolveram mecanismos altamente eficientes para impedir a resposta imune do inseto hospedeiro. *Photorhabdus* pode produzir um inibidor termolábil de ação *trans* do sistema fenoloxidase do inseto (BATH, 2000). *Xenorhabdus* parece inibir a resposta imunológica do hospedeiro por ligação ou entrada nos hemócitos do inseto (DUNPHY; WEBSTER, 1991). Da mesma forma que acontece com seus respectivos nematoides, parece que *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* podem ter desenvolvido diferentes estratégias para impossibilitar a resposta do sistema imunitário do hospedeiro. A patogenicidade é uma etapa extremamente importante para pré-requisito na simbiose bactéria-nematoide.

No momento que as bactérias são regurgitadas pelos nematoides, elas identificam reconhecem a Prolina na hemolinfa do inseto. Este composto é responsável por induzir ou regular a mudança metabólica das bactérias as quais passam a produzir toxinas, antibióticos e outros metabólitos secundários (CRAWFORD et al., 2010).

Vários estudos e pesquisas têm se dedicado na compreensão de relações simbióticas e comunicação com bactérias, incluindo mecanismos de virulência e metabólitos bacterianos (BRIGHT; BULGHERESI 2010; CHASTON et al., 2011; KAPLAN et al., 2012; NOGUEZ et al., 2012).

A patogenicidade de *P. temperata* K122 foi avaliada sobre formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). A bactéria ocasionou elevada mortalidade (>80% e 60%) para as duas espécies de formigas após 24h de inoculação, matando em tempo reduzido as operárias de *A. subterraneus* quando comparadas com aquelas de *A. laevigata* (DE PAULA, 2006).

Em um estudo posterior, Carneiro (2008) testou os efeitos da bactéria *P. temperata* sobre as enzimas digestivas de lagartas de *Diatraea saccharalis* (L), conferindo redução na atividade da alpha-glucosidase em 50% e de alpha-galactosidase em 70% após 20h da inoculação da bactéria. Neste estudo o autor relatou a morte de todas as lagartas após 48 horas.

A patogenicidade de NEPs e de sua bactéria simbiote *Photorhabdus*, também foram avaliadas pela injeção em pré-pupas de *Spodoptera frugiperda* (L), conferindo que os isolados bacterianos principalmente de *Heterorhabditis*, causaram altos níveis de mortalidade (SALVADORI, 2011).

2.2.5 Antibióticos produzidos pelas bactérias

A produção de antibióticos pelas bactérias dentro do hospedeiro permite o desenvolvimento dos nematoides em um ambiente oportuno no cadáver do inseto, livre de outras bactérias, fungos e de outras espécies de nematoides (PARK; KIM, 2005; TRIVINO et al., 2006).

As bactérias simbiotes também produzem diversos fatores antimicrobianos, como os derivados de Indol que possui uma ampla gama de efeitos com atividades nematicidas (OROZCO, 2012) e o Rhabduscin composto com atividade anti-Fenol-Oxidase, que é um componente inato que faz parte do sistema imune do inseto (CRAWFORD et al., 2010).

As bactérias do gênero *Photorhabdus* produzem compostos poliquetideos, como as antraquinonas poliaromáticos, que lhe conferem atividade antifúngica e antibacteriana reduzida, mas tem atividade para controlar formigas e pássaros (PANKEWITZ; HILKER, 2008), cuja produção é regulada pela prolina. *Photorhabdus* spp. também produz estilbenos (ST) que possui um amplo espectro antibacteriano e características antifúngicas (ELEFATHERIANOS et al., 2007).

Este composto ST são alquenos conjugados que são produzidos frequentemente pelo reino vegetal, e têm sido encontrados nas culturas de todas as espécies do gênero *Photorhabdus*, de forma que essa bactéria vem sendo apontada como o único organismo não planta que produz essa família de compostos até o momento (CRAWFORD; CLARDY, 2011). A produção deste composto é regulada também pela prolina. Joyce et al. (2008) evidenciaram que o isopropyl estilbeno é de

extrema importância para desenvolvimento correto dos nematoides. Weber et al. (2002) notaram também a produção de hidroxiestilbeno, composto que possui propriedade nematicida e antibiótica.

2.2.6 Toxinas

As bactérias simbiontes de NEPs produzem toxinas que contribuem para a letalidade do inseto e a proteção microbiana do cadáver. As proteínas Tc são toxinas inseticidas, produzidas por bactérias Gram-negativas e Gram positivas. Os genes que codificam essas toxinas foram primeiramente descritos em bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, e só subsequentemente, loci semelhantes a Tc foram descritos em outras espécies bacterianas, algumas claramente associadas à toxicidade a insetos (FFRENCH-CONSTANT et al., 2000).

Os genes Tc de *P. luminescens*, são genes que codificam toxinas e que são responsáveis para o sucesso da bactéria na infecção do inseto, apresentam semelhança com o correspondente em *Yersinia pestis*, agente causador da peste negra (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010). Este Tc representa em pelo menos 10 polipeptídios que são ligados em três componentes proteicos de classe A, B e C (BOWEN et al., 1998), e que se distribuem com base em similaridade da sequência e tamanho. As proteínas de Classe A são consideradas grandes, com peso molecular de 280 kDa, e as proteínas da Classe B com 170 kDa, e as proteínas da classe C com 110 kDa (FFRENCH-CONSTANT et al., 2006; OROZCO, 2014).

As proteínas classificadas como A, estas são responsáveis pelos efeitos citotóxicos do Tc, já as que fazem parte da classe B controlam a toxicidade das proteínas da classe A, e as proteínas de classe C abrigam a atividade biológica. O Tc de *Photorhabdus* é formado pelas proteínas TcdA1, TcdB2 e TccC3 ou TccC5 (SHEETS et al., 2011).

Em trabalhos desenvolvidos por Duchaud et al. (2003) foi apresentado que as bactérias do gênero *Photorhabdus* possuem proteínas relacionadas ao inseto “*Photorhabdus insect-related*” – (Pir) que são toxinas binárias PirAB.

Apontam ter atividade por via oral, e agrupam as proteínas relacionadas a virulência “*Photorhabdus virulence cassettes*” (PVCs), que são ativadas quando

injetadas dentro da hemolinfa (FFRENCH-CONSTANT et al., 2006). Outras toxinas proteicas são produzidas pela expressão de um gene chamado “*makes caterpillars floppy*” (Mcf). Estas toxinas promovem a destruição rápida do intestino do inseto, resultando na morte das lagartas (DABORN et al., 2002; OROZCO, 2014)

As bactérias produtoras de toxinas são particularmente atraentes como agentes para o desenvolvimento de novos produtos, uma vez que frequentemente possuem um espectro mais amplo de atividade, além de benefícios de formulação e aplicação (LACEY et al., 2015).

Os PVCs correspondem a genes que codificam sequência de aminoácidos semelhante da toxina Mcf de *P. luminescens* ou da toxina A de *Clostridium difficile*. Cada um desses cassetes codifica de 15 a 20 proteínas que se assemelham as piocinas do tipo R (tipo de bacteriocina). Os produtos proteicos dos PVCs não tem atividade antibacteriana direta, mas destroem os hemócitos de insetos (RODOU et al., 2010).

Com base no exposto acima cabe ressaltar, que NEPs e suas bactérias simbiotes estão sendo investigados como sistemas modelo para avançar o conhecimento nas interações procariotos-eucariotos. A pesquisa tem se concentrado na compreensão de suas relações simbióticas e comunicação com suas bactérias incluindo virulência, mecanismos e metabólitos bacterianos (BRIGHT; BULGHERESI 2010; CHASTON et al., 2011; KAPLAN et al., 2012; NOGUEZ et al., 2012).

Além disso, a disponibilidade de um número crescente de genomas de NEPs e seus simbiotes bacterianos abriram espaços para investigar seu potencial na medicina e a bioprospecção farmacêutica. A este respeito, projetos de sequenciamento revelaram a capacidade de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* de produzir vários metabólitos secundários, incluindo peptídeos, policetídeos, e híbridos de ambos (BODE, 2009).

As bactérias simbiotes de NEPs têm a principal e uma das mais importantes características de produzir metabólitos secundários, que possuem estruturas químicas diversas e tem uma extensa gama de atividades de importância medicinal e agrícola, como antibióticos, antimicóticos, inseticidas, nematicidas e antiviral (WANG et al., 2011). Cada vez mais espécies são descobertas com mais frequência (POWELL; WEBSTER, 2004), ampliando a chance de mais pesquisas e da

identificação de compostos de caráter natural que atuam como toxinas e antibióticos (PARK et al., 2009).

Por isso, o estudo desses metabólitos secundários é de extrema importância e tem se tornado tão ou mais importante quanto a identificação dessas espécies de bactérias, pois entre estas substâncias podem ser encontrados uma vasta fonte de compostos orgânicos bioativos para o controle de doenças das plantas, doenças humanas ou substâncias com potencial de uso direto no controle de insetos.

Assim, este trabalho objetivou identificar as cepas bacterianas simbiontes de quatro isolados de NEPs nativos do norte pioneiro do Paraná, bem como caracterizá-las bioquimicamente e realizar uma prospecção de seus metabólitos secundários.

3. ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DO GÊNERO *PHOTORHABDUS*

RESUMO

As bactérias do gênero *Photorhabdus* são conhecidas por sua associação simbiótica com nematoides do gênero *Heterorhabdits*, cuja ação conjunta apresenta alta virulência e leva os hospedeiros a morte em até 48 horas após sua infecção. Assim, este trabalho teve como objetivo, identificar as bactérias simbiontes de quatro isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) do gênero *Heterorhabditis* sp. (isolados UENP04, 05, 06 e UEL08), nativos do Norte do Paraná, e realizar a caracterização molecular, bioquímica e biológica destas bactérias. As bactérias foram isoladas a partir de hemolinfa de lagartas de *Galleria mellonella* L (Lepidoptera: Pyralidae) inoculadas com os isolados de NEPs e cultivadas em meio de cultura (NBTA). A identificação molecular foi feita a partir da amplificação de parte do gene rDNA 16S e a caracterização por meio de testes bioquímicos de motilidade, coloração de Gram, atividade de lipase, protease e lecitinase. Também foi avaliada a patogenicidade dessas cepas bacterianas sobre três espécies de insetos, e a virulência de duas delas em diferentes concentrações ao longo do tempo sobre lagartas de *G. mellonella*. As colônias de bactérias isoladas em NBTA também apresentaram características típicas do gênero *Photorhabdus*, com coloração verde escuro, brilhantes e consistência pegajosa quando manipuladas. A identificação molecular confirmou que três cepas de bactérias são da espécie *Photorhabdus luminescens* (P05, P06 e L08) e uma de *Photorhabdus asymbiotica* (P04). Quanto aos testes bioquímicos observou-se que todas as cepas apresentaram atividade positiva para todos os testes descritos em exceção para atividade lecitinase, confirmando que esse composto é produzido apenas por bactérias do gênero *Xenorhabdus*. Todas as cepas mostraram-se patogênicas e altamente virulentas sobre as três espécies de insetos avaliadas, causando mortalidade entre 85% a 100%, sendo que L08 foi a única que causou 100% de mortalidade sobre os três hospedeiros avaliados. Quando avaliadas em diferentes concentrações e ao longo do tempo, P04 e L08 apresentaram comportamento diferentes, sendo P04 mais virulenta e causando mortalidade mais rápida em lagartas de *G. mellonella*.

PALAVRAS CHAVES: *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus asymbiotica*, nematoides entomopatogênicos, identificação molecular.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Photorhabdus* are known for their symbiotic association with nematodes of the genus *Heterorhabdits*, whose joint action presents high virulence and leads the hosts to death within 48 hours after infection. Thus, this study aimed to identify the symbiont bacteria of four isolates of entomopathogenic nematodes (EPNs) of the genus *Heterorhabditis* sp. (isolates UENP04, 05, 06 and UEL08), native to Northern Paraná, and to perform the molecular, biochemical and biological characterization of these bacteria. The bacteria were isolated from hemolymph of caterpillars of *Galleria mellonella* L. (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) inoculated with the NEPs isolates and grown on culture medium (NBTA). Molecular identification was done by amplification of part of the 16S rDNA gene and characterization by biochemical tests for motility, Gram staining, lipase, protease and lecithinase activity. We also evaluated the pathogenicity of these bacterial strains on three insect species, and the virulence of two of them at different concentrations over time on *G. mellonella* larvae. The bacterial colonies isolated in NBTA also showed characteristics typical of the genus *Photorhabdus*, with dark green coloration, shiny and sticky consistency when handled. Molecular identification confirmed that three strains of bacteria are of the species *Photorhabdus luminescens* (P05, P06 and L08) and one of *Photorhabdus asymbiotica* (P04). Regarding the biochemical tests, it was observed that all strains showed positive activity for all the tests described, except for the lecithinase activity, confirming that this compound is produced only by bacteria of the genus *Xenorhabdus*. All strains were pathogenic and highly virulent on the three species of insects evaluated, causing over 90% mortality and showing no statistical difference among them. On the other hand, when evaluated in different concentrations and over time, P04 and L08 showed different behavior, being P04 more virulent and causing faster mortality in *G. mellonella* larvae.

KEY-WORDS: *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus asymbiotica*, entomopathogenic nematodes, molecular identification.

3.1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Photorhabdus* (BOEMARE, AKHURST, MOURANT, 1993) da Família Enterobacteriaceae são Gram-negativos com capacidade de produzir bioluminescência, e associam-se mutualisticamente com nematoides parasitos de insetos do gênero *Heterorhabditis* (Nematoda, Heterorhabditidae). (GAUGLER; KAYA, 1990; GREWAL et al., 2005).

A simbiose dos NEPs com as bactérias apresentam um papel muito importante, pois além de matar o hospedeiro em um período de 24 a 48 horas, a bactéria produz enzimas que são responsáveis pela bioconversão dos tecidos internos do hospedeiro, facilitando a alimentação do nematoide. As bactérias também controlam o microecossistema (interior do cadáver) impedindo a infecção por outros microorganismos que estão presentes no ambiente, através da síntese de vários metabólitos secundários, que entre outras funções, podem ter ação antibiótica sobre outros agentes microbiano (ALMENARA et al., 2012).

Segundo Salazar-Gutiérrez et al. (2017), muitos trabalhos desenvolvidos com NEPs, se preocupam apenas em avaliar o desempenho do complexo NEP+bactéria como um todo, sem se preocupar em conhecer as características individuais de cada um desses agentes. No entanto, estudos tem indicado que conhecer a espécie de bactéria simbiote e os fatores patogênicos associados a ela, são tão importantes quanto aos da espécie de nematoide, e que este tipo de caracterização é indispensável não apenas para esclarecer os mecanismos patogênicos, mas também para desenvolver formulações para controle de pragas baseadas apenas em bactérias do gênero *Photorhabdus*.

Assim, o objetivo desse estudo foi realizar a identificação molecular e a caracterização bioquímica, das bactérias simbiotes do gênero *Photorhabdus* associadas aos nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* sp. isolados UENP04, P05 e P06 e L08.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Nematoides entomopatogênicos, isolamento bacteriano

Os isolados de NEPs dos quais as bactérias simbiotes foram isoladas (Tabela 3.1) foram multiplicados por método *in vivo* em lagartas de último instar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) de acordo com a metodologia de Molina e Lopes (2001).

Tabela 3.1. Nematoides entomopatogênicos utilizados para isolamento das bactérias simbiotes.

Espécies de Nematoides Entomopatogênicos	Isolados	Local de obtenção	Referência
<i>Heterorhabdtis amazonensis</i>	UEL 08	Londrina – PR	Guide (2019)
<i>Heterorhabdtis amazonensis</i>	UENP 05	Ribeirão Claro – PR	Doneze (2019)
<i>Heterorhabdtis amazonensis</i>	UENP 06	Ribeirão Claro – PR	Doneze (2019)
<i>Heterorhabdtis mexicana</i>	UENP 04	Ribeirão Claro – PR	Fernandes (2020)

Para isolamento das bactérias, lagartas de *G. mellonella* foram infectadas pelo complexo NEP+bactéria e após 48 horas da inoculação, foi feita uma perfuração com auxílio de agulha esterilizada na última perna abdominal da lagarta morta. Em seguida o inseto foi levemente pressionado par extravasamento da hemolinfa a qual foi inoculada por estriamento com alça de platina em meio NBTA (15g de ágar nutriente; 0,025g de azul de Bromotimol; 0,04g de Cloreto de Trifenil-Tetrazólio; 1000 mL de água destilada).

Todas as avaliações deste estudo foram realizadas a partir de colônias bacterianas isoladas em meio NBTA, com 48 horas de crescimento e que tenham expressado coloração verde, característica da absorção do corante Azul de Bromotimol e redução do Cloreto de Trifenil-tetrazolio.

3.2.2 Identificação molecular

Extração do DNA bacteriano

As bactérias isoladas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (10g de Triptona; 5 g de Extrato de levedura, 5g de NaCl, 1000 mL de água destilada) mantido a 28° em câmara climatizada. Posteriormente o DNA foi extraído utilizando o Kit comercial “Pure Link” da Invitrogen®, para bactérias Gram-negativas. A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria usando o equipamento Qubit Fluorometer.

Amplificação e sequenciamento do gene

Para identificação molecular das cepas, parte do gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os *primers* (16S rRNA fD1 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' e 16S rRNA rP1 5'ACGGTTACCTTGTTACGACTT 3'). As reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram conduzidas em um volume final de 15 uL, incluindo 1X *GoTaq Master Mix* Color Less (Promega), 0,67 µM de cada *primer* e 15 ng de DNA.

A amplificação foi conduzida em termociclador utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, e uma elongação final de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) a 100 V, corados com Brometo de Etídio e visualizados a partir da luz ultravioleta de Transiluminador UV.

Depois da confirmação de amplificação das amostras, os produtos da PCR foram purificados com a enzima IllustraExoStar IT® (GE), ficando a 37°C por 1 hora, seguido de 15 minutos a 80°C para desativação da enzima. As reações de sequenciamento foram conduzidas em um volume final de 10µL com 5,75µL de Água ultra pura, 1µL de Tampão de Sequenciamento, 0,25 µL do primer a 20 µM, 2 µL de Big Dye Terminator (Applied Biosystems) e 1 µL da PCR purificada. Os ciclos das reações PCR de sequenciamento consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 20 s, 50°C por 15 s, e 60°C por 2 min, e uma extensão final a 60°C por 2 min. O sequenciamento pelo método de

Sanger foi realizado em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems).

Análises das sequências

Após a obtenção das sequências estas foram comparadas com outras sequências semelhantes do banco de dados GenBank utilizando o BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), o que permitiu iniciar a identificação taxonômica das bactérias estudadas, bem como obter sequências de indivíduos e espécies mais próximas para as análises posteriores. Procedeu-se então o alinhamento e a edição do conjunto de dados com auxílio do programa BioEdit (*Sequence Alignment Editor*) (HALL, 1999). Em seguida, as sequências parciais do gene do rRNA 16S foram analisadas utilizando o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011), o qual testou o sinal filogenético dos dados, utilizando o método de Máxima Parcimônia e os parâmetros *Mini heuristic* com o nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas pela adição aleatória de sequências (10 réplicas) e todas as análises foram conduzidas com 1000 repetições de *bootstrap*.

3.2.3 Caracterização fenotípica e bioquímica das bactérias

Para caracterização bacteriana foi empregada análise morfotintorial (Coloração de Gram), avaliação da motilidade, além de testes bioquímicos para atividade lipase, protease e lecitinase. Foi avaliado a produção de compostos com atividade antimicrobiana e de bioluminescência de acordo com Boemare et al (1988) e Akhurst (1980). Além disso, foi observada a capacidade de absorção de vermelho neutro em meio MacConkey, absorção de Azul de Bromotimol e redução de Trifenil-Tetrazólio em meio NBTA (GUERRA et al., 2014).

Para avaliação da bioluminescência, lagartas de *G. mellonella* foram inoculadas com microseringa Hamilton contendo 10µL da suspensão. Para cada isolado, preparou-se uma suspensão celular diluindo uma alçada contendo as bactérias em 200µL de água destilada estéril. A inoculação foi feita no último par de pernas das lagartas. Para cada isolado de bactéria foram inoculadas três lagartas.

Após 48 horas as lagartas foram submetidas a luz U.V. para observação da presença/ausência de luminescência.

Teste de motilidade

A motilidade foi avaliada em meio Ágar Nutriente semissólido (3g de extrato de levedura; 5g de Peptona; 8g de NaCl; 5g de ágar nutriente; 1000 mL de água destilada). Os testes foram realizados em tubos de ensaio de 15 cm de altura contendo 10 mL do meio de cultura. Para os testes, a suspensão celular foi inoculada no meio, com auxílio de agulha de platina estéril, em uma única picada, descendo com a agulha e voltando no mesmo sentido. Os tubos foram mantidos em câmara climatizada a 28°C, sem fotoperíodo com umidade relativa de 50%. A avaliação ocorreu após 48 horas para observação da presença ou não de turbidez no meio de cultura.

Lipase

A atividade lipase foi determinada em meio Ágar Peptona (10g de Peptona Bacteriológica; 5g de NaCl; 0,1g de $\text{CaCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$; 15g de ágar; 1000 mL de água destilada) suplementado com Tween 80 a 10%, de acordo com a metodologia de Sierra (1957), na qual foi feita a adição do Tween quando o meio auto clavado atingiu a temperatura entre 50 e 40° C. O meio foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e após a solidificação, foi inoculado as bactérias. Em seguida, foi aplicado sobre o meio uma gota de 10µL de cada suspensão celular. As placas foram armazenadas em câmara climatizada a 28°C, sem fotoperíodo com umidade relativa de 50% por 48 horas. Após este período foi observado se havia a formação de halos claros ao redor das colônias, que correspondem às zonas do substrato hidrolisado.

Protease

A produção de protease foi avaliada utilizando o meio Ágar Nutriente contendo 4% de gelatina segundo Whaley et al. (1982). Foi adicionado a gelatina

depois do meio de cultura auto clavado e com temperatura próxima a 50°C. Após solidificação, o meio de cultivo foi perfurado formando poços de 0,5 cm, para obtenção dos poços no centro das placas (MELO et al., 2015) onde foram inoculados 50µL da suspensão celular. Foram feitas três placas para cada isolado e estas placas foram colocadas em câmara climatizada a 28°C, sem fotoperíodo e com umidade relativa de 50%. Após 48 horas de incubação as placas foram avaliadas para verificar presença ou ausência de halo transparente ao redor do crescimento bacteriano, que é indicativo da degradação da gelatina.

Lecitinase

Avaliou-se a atividade lecitinase em meio Ágar Nutriente (Kasvi®) suplementado com gema de ovo pasteurizada líquida a 10% (15g de Ágar Nutriente; 1000 mL de água destilada). A gema de ovo foi adicionada após o meio de cultura auto clavado e com temperatura próxima a 50°C. Verteu-se o meio em placas de Petri, e após solidificado, inoculou-se uma gota de 10µL de suspensão celular de cada bactéria. A suspensão foi preparada para cada isolado de bactéria, diluindo uma colônia bacteriana em 200µL de solução salina. As placas foram armazenadas em câmara climatizada a 28°C, sem fotoperíodo e com umidade relativa de 50%.

3.2.4 Produção de compostos com atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do halo de inibição de crescimento frente à *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Após cultivo por 24 horas em meio LB líquido, uma suspensão celular de cada bactéria foi inoculada em ágar nutriente (15g de ágar nutriente; 5g de peptona bacteriológica; 1000 mL de água destilada). O inóculo foi efetuado utilizando-se swab estéril embebido da suspensão celular, em três sentidos a fim de obter crescimento confluyente em todo o meio. Após cinco minutos para secagem das placas, foi realizado o inóculo das bactérias isoladas dos NEPs. Para isso, um disco de papel filtro estéril de 0,3 cm de diâmetro foi embebido na suspensão celular e colocado no centro da placa. As placas foram armazenadas a 28°C, sem fotoperíodo

e com umidade relativa de 50%. Após 24 horas foi realizado a avaliação por meio da observação da presença ou não do halo de inibição do crescimento de Bt.

3.2.5 Efeito inseticida

A) Avaliação da patogenicidade em lagartas de *Galleria mellonella*, *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*

Avaliou-se o efeito inseticida das bactérias simbiotes quando inoculadas na hemolinfa de lagartas de *G. mellonella*, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae).

Para o preparo do inóculo bacteriano, as cepas bacterianas foram inoculadas em meio de cultura líquido LB e crescidas em câmara de germinação por 48 horas a 28°C.

Em seguida, as bactérias foram aplicadas nas lagartas de *G. mellonella*, *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* com auxílio da microseringa de Hamilton. Seguiu-se o protocolo de lavagem da seringa que inclui uma série de lavagens em solução de hipoclorito a 1%, em água destilada, em álcool 70% e em solução salina. O processo de lavagem foi realizado antes, durante e depois do experimento. As lagartas utilizadas foram escolhidas por igual tamanho, cor clara e sem manchas pretas. A inoculação foi feita no último par de pernas injetando-se 10µL de suspensão bacteriana diretamente na hemolinfa.

Cada tratamento teve três repetições que constituíram uma placa de cultivo de células de 12 poços contendo papel de filtro umedecido com 0,25 uL de água destilada e dez lagartas inoculadas com a suspensão bacteriana de cada bactéria (uma lagarta por poço). No tratamento controle as lagartas foram inoculadas com 10µL de água destilada. As placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 28°C. As lagartas foram mantidas sem alimentação durante todo o experimento e após 48 horas foi feita a avaliação, contando o número de lagartas mortas e observando-se o sintoma de infecção pelas bactérias.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.4 (FERREIRA, 2011).

B) Avaliação da virulência das cepas bacterianas em lagartas de *Galleria mellonella* aplicadas em diferentes concentrações e avaliadas ao longo do tempo

Avaliou-se o efeito inseticida das bactérias simbiotes das cepas P04 e L08 inoculadas na hemolinfa de lagartas de *G. mellonella* em diferentes concentrações. Para o preparo do inóculo bacteriano, as cepas bacterianas foram inoculadas em meio de cultura NBTA e crescidas em câmara de germinação por horas a 48°C. Após esse período, uma colônia foi suspensa em solução salina (0,85%) e a suspensão foi quantificada por comparação com a Escala de MacFarland e padronizada nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0.

Em seguida, as bactérias foram aplicadas nas lagartas de *G. mellonella* com auxílio da microseringa de Hamilton. Previamente à inoculação seguiu-se o protocolo de lavagem da seringa que inclui uma série de lavagens em solução de hipoclorito a 1%, em água destilada, em álcool 70% e em solução salina. O processo de lavagem foi realizado antes, durante e depois do experimento. As lagartas utilizadas foram escolhidas por igual tamanho, cor clara e sem manchas pretas. A inoculação foi feita no último par de pernas injetando-se 10µL de suspensão bacteriana diretamente na hemolinfa.

Cada tratamento teve três repetições que consistiu de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo papel de filtro umedecido com 2mL de água destilada e dez lagartas inoculadas com a suspensão bacteriana. No tratamento controle, as lagartas foram inoculadas com 10µL de água destilada. As placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 28°C.

As lagartas foram mantidas sem alimentação durante o experimento, e as avaliações ocorreram a cada 6 horas durante dois dias (48 horas), contando-se o número de lagartas mortas e observando-se o sintoma de infecção pelas bactérias e os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.4 (FERREIRA, 2011).

3.2.6 Efeito fungicida

Os isolados de campo de *Beauveria bassiana* e *Metharizium anisopliae* foram obtidos do Laboratório de Biotecnologia da UNIOESTE. Os fungos foram cultivados em meio BDA por 15 dias, tempo necessário para que ocorresse a esporulação. Os esporos foram coletados e armazenados em freezer por no máximo 30 dias, antes de serem utilizados nos ensaios. Suspensões de esporos foram preparadas e 50 microlitros da suspensão (1×10^6 esporos/mL) foram espalhados em placa de Petri de 10 cm de diâmetro em meio BDA, após a secagem foi adicionado 3 discos embebidos com suspensão bacteriana. As placas foram incubadas no escuro a 25°C durante 24 h. A atividade antifúngica das suspensões foi determinada medindo-se a zona de inibição do crescimento ao redor dos discos nas placas de BDA. Os controles consideraram a adição apenas de água destilada em cada disco da placa de cultura. Foram feitas três placas por tratamento, cada uma delas consideradas uma parcela.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas de *G. mellonella* inoculadas com os isolados de NEPs UENP04, 05, 06 e UEL08 apresentaram sintomatologia característica da infecção pelo complexo nematoide+bactéria dos gêneros *Heterorhabditis*+*Photorhabdus*, pois apresentaram tegumento íntegro, ausência de odores putrefatos e coloração vermelho escuro.

3.3.1 Caracterização fenotípica

Após o isolamento bacteriano, foi possível observar que as colônias obtidas em meio NBTA também apresentaram características fenotípicas de bactérias simbiotes do gênero *Photorhabdus* isoladas na fase I podendo-se observar colônias convexas, brilhantes, circulares e de consistência pegajosa, com coloração verde escuro característica devido a absorção do Azul de Bromotimol e a redução do Cloreto de Trifenil-Tetrazolium conforme observado para outros isolados bacterianos

do gênero *Photorhabdus* (FUKRUKSA et al., 2017; OROZCO et al., 2013) (Figura 3.1).



Fonte: Brito, 2020.

Figura 3.1. Morfologia das colônias da bactéria *Photorhabdus* sp. (UEL08) Após 48h de crescimento em meio de cultura NBTA.

3.3.2 Identificação molecular

A amplificação e sequenciamento de parte do gene do rRNA 16S para as quatro cepas analisadas no presente estudo obteve: um segmento de 643 nucleotídeos para L8, 575 nucleotídeos para P5, 636 nucleotídeos para P6 e 427 nucleotídeos para P4.

Estas sequências foram então submetidas ao BLAST do NCBI (ALTSCHUL et al., 1997) e se mostraram similares a seguimentos de bactérias do gênero *Photorhabdus* (Tabela 3.2). As sequências que apresentaram maior similaridade foram então submetidas à análise e geraram árvore filogenética apresentada na Figura 3.2.

Apartir das análises moleculares foi possível identificar que as cepas bacterianas pertenciam a duas espécies distintas, mas ambas do gênero *Photorhabdus*. As cepas bacterianas simbiotes isoladas da espécie de nematoide *H. amazonensis* (UEL 08, UENP 05, UENP 06) foram identificadas pertencendo a espécie *Photorhabdus luminescens*. Por outro lado, a bactéria simbiote associada ao isolado *Heterorhabditis mexicana* (UENP 04) foi identificada como sendo da

especie *Photorhabdus asymbiotica* (Figura 3.2).

Tabela 3.2. Valores de homologia (%) das sequências de nucleotídeos das cepas de *Photorhabdus* utilizadas neste trabalho e sequencias provenientes do BLAST.

Espécies NEPs (Isolados)	Cepa	Espécies de bactéria	% Similaridade	Acesso
<i>Heterorhabdtis amazonensis</i> (UEL08)	L08	<i>Photorhabdus luminescens</i>	100%	NR_115332.1
<i>Heterorhabdtis amazonensis</i> (UENP05)	P05	<i>Photorhabdus luminescens</i>	99%	JQ912649.1
<i>Heterorhabdtis amazonensis</i> (UENP06)	P06	<i>Photorhabdus luminescens</i>	100%	JQ912644.1
<i>Heterorhabdtis mexicana</i> (UENP04)	P04	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	98%	AY278672.1

P. luminescens é uma espécie de bactéria encontrada exclusivamente em associação com nematoide do gênero *Heterorhabditis* e já teve seu genoma sequenciado (PARK et al., 2013), onde foi possível observar a presença de diversos genes com expressão exclusiva na fase mutualística com o nematoide, indicando forte regulação da simbiose entre nematoide e bactéria (CLARKE, 2014).

Como citado anteriormente neste trabalho, a espécie *P. luminescens* é a mais comumente encontrada associada a NEPs *Heterorhabditis*, sendo conhecidas cinco subespécies que se associam a mais de uma espécie de nematoides.

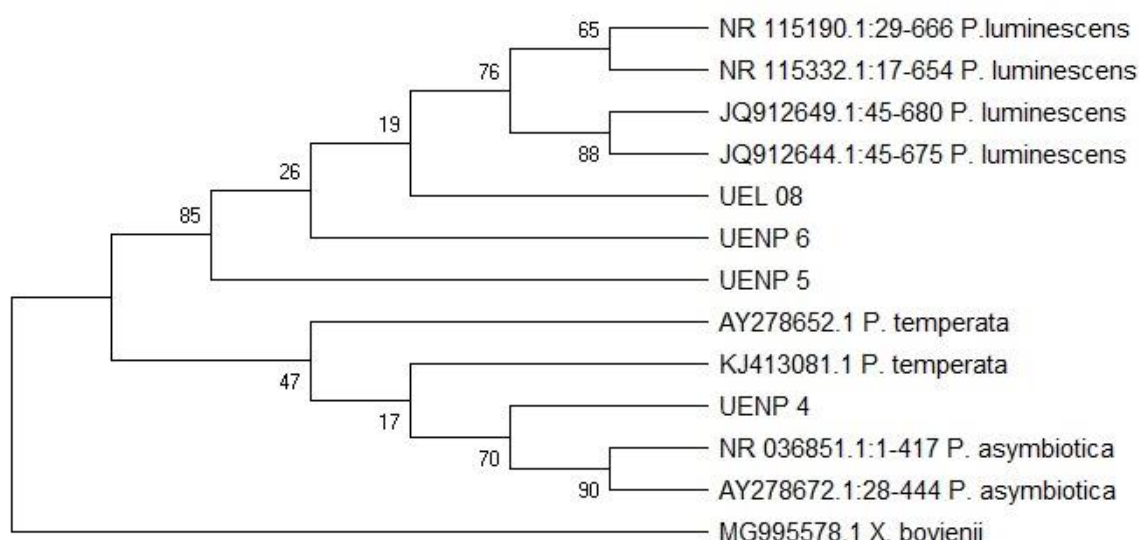


Figura 3.2. Relações filogenéticas de bactérias simbiotes baseadas na análise de parte do gene 16S do rRNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). *Xenorhabdus bovienii* foi usado como grupo externo.

Em trabalho desenvolvido por Orozco (2013), observou-se que o isolado de NEP *H. amazonensis* possui associação com a bactéria da espécie *Photorhabdus luminescens*, e que esta apresentou similaridade de 96% com outra sequência obtida a partir do Genbank. Neste trabalho observamos que todas as cepas de bactéria simbiotes obtidas a partir dos isolados de *H. amazonensis* mostraram-se próximos da espécie *P. luminescens*, porém com valores de similaridade superiores aos observados no trabalho acima citado (Tabela 3.2), corroborando com o resultado encontrado no trabalho citado.

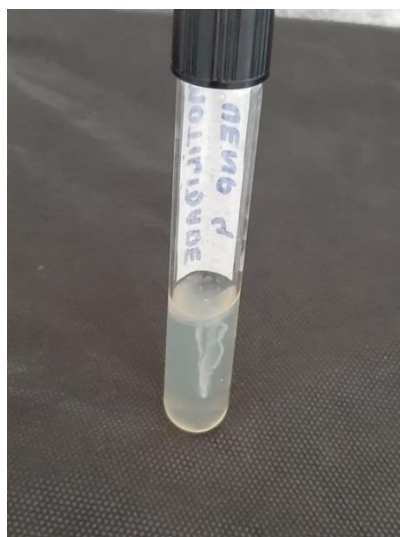
P. asymbiotica foi originalmente descrita em 1989, após ser isolada de um paciente com úlcera de perna nos Estados Unidos, sendo inicialmente uma bactéria de importância clínica (FARMER et al. 1989; HAPESHI; WATERFIELD, 2016). Eventualmente, verificou-se que estava associado simbioticamente a NEPs do gênero *Heterorhabditis* (GERRARD et al., 2006), mas estudos mais recentes tem indicado que esta espécie ocorre associada a NEPs com mais frequência do que se imaginava, e novos relatos dessa associação vem sendo feitos em países como EUA (PLICHTA et al., 2009), Japão (KUWATA et al., 2008) e Austrália (GERRARD et al., 2011).

Em estudos desenvolvidos por Gerrard et al. (2006), um paciente australiano foi exposto a *Photorhabdus*, e o mesmo relatou ter contato com solo cavando buracos e após isso apresentou febre e uma infecção local grave. *Photorhabdus* sp. foi isolado em cultura pura de pus coletado da ferida do paciente, e foi coletado 7 amostras de solo no local onde o paciente teve contato.

A amostra de solo e da ferida foram comparadas para elucidar se havia alguma relação entre as cepas bacterianas, confirmando que os isolados bacterianos tanto dos nematoides coletados no solo, quanto das cepas de *Photorhabdus* proveniente das feridas eram da mesma estirpe de *P. Asymbiotica*.

3.3.3 Caracterização bioquímica

Quanto a caracterização bioquímica os dados obtidos para as cepas P04, P05, P06 e L08 são apresentados na Tabela 3.3. Observou-se que estas apresentaram reações positivas para o teste de motilidade em ágar semissólido, pois foi possível observar turbidez (Figura 3.4) no meio de cultura, indicando que as bactérias possuem flagelos peritríquios que lhes conferem mobilidade, como relatado para outros isolados destas mesmas espécies. Essa característica pode ser observada somente na fase I pois a bactéria em fase II não possui flagelos, pode ser cultivada *in vitro* por longo tempo e, embora apresente ação inseticida, é menos efetiva (BOEMARE; AKHURST, 1988).

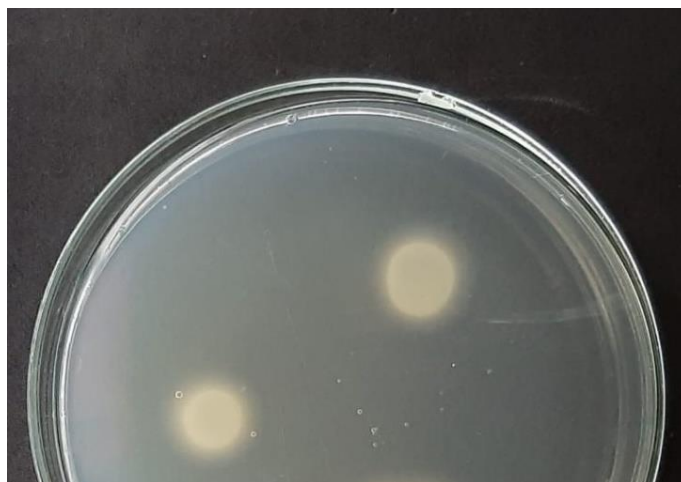


Fonte: Brito, 2020.

Figura 3.4. Teste de motilidade em meio ágar semissólido bactéria *Photorhabdus* sp. (P04) após 48h de crescimento.

No teste de coloração de Gram, as quatro cepas foram classificadas como Gram-negativas, de cor vermelha e células com formato de bastonete.

As quatro cepas testadas apresentaram reação positiva para assimilação da atividade lipase caracterizado por halo ao redor do crescimento bacteriano, que é considerada uma característica típica das bactérias simbiotes (THALER et al., 1995), confirmando os resultados neste trabalho (Figura 3.5).



Fonte: Brito, 2020.

Figura 3.5. Atividade lipase da bactéria *Photorhabdus* sp. (P04).

Para atividade da protease as cepas demonstraram reação positiva, que pode ser visualizada pela presença de halo claro, indicativo da degradação da gelatina. Essas características também foram observadas por Guide (2019), trabalhando com bactérias simbiotes obtidas de um isolado de NEP *H. amazonensis*.

Tabela 3.3. Características bioquímicas das cepas de *Photorhabdus* obtidas a partir de nematoides entomopatogênicos nativos do Norte do Paraná.

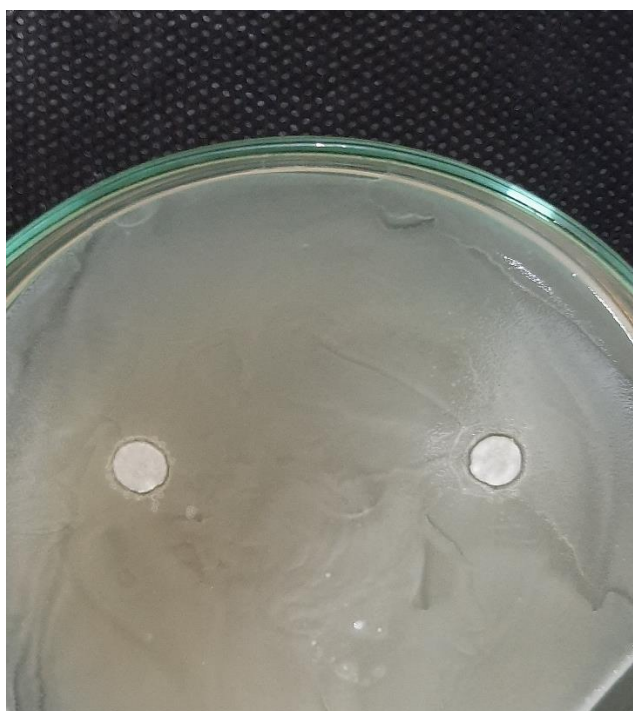
Cepa bacteriana	Motilidade	Lipase	Protease	Lecitinase	Absorção A.B*
P04	+	+	+	-	+
P05	+	+	+	-	+
P06	+	+	+	-	+
L08	+	+	+	-	+

A.B* = Azul de Bromotimol;

Para avaliação da atividade Lecitinase, observou ausência de halo em torno do crescimento bacteriano para as cepas P04, P05, P06 e L08, confirmando que esses isolados não possuem atividade lecitinase. Resultados confirmados por Mahar et al. (2008) indicam a produção de lecitinase somente por *Xenorhabdus*, uma vez que estas estão envolvidas na quebra de fosfolipídios de insetos, proporcionando assim uma fonte lipídica para o crescimento de NEPs do gênero *Steinernema*.

3.3.4 Atividade antimicrobiana

Com relação a avaliação da produção de compostos com atividade antimicrobiana utilizando as cepas de *Photorhabdus* P04, P05, P06 e L08 frente as bactérias *B. thuringiensis*, *E. coli* e *S. Aureus*, todas as cepas apresentaram halo de inibição, com exceção da cepa P04 sobre *S. aureus* (Tabela 3.4) (Figura 3.6).



Fonte: Brito, 2020.

Figura 3.6. Atividade antimicrobiana de *Photorhabdus luminescens* (P05) sobre *Bacillus thuringiensis*.

Também foi observado por Fodor et al. (2010) que isolados de *Photorhabdus* da forma primaria produziram zonas claras de inibição contra *S. epidermidis*, *S.*

aureus, *Staphylococcus* sp. e *E. coli*, corroborando com os resultados obtidos neste presente trabalho.

Tabela 3.4. Atividade antimicrobiana de cepas de *Photorhabdus* sp. sobre diferentes espécies de bactérias de importância médica e agrícola.

Cepa bacteriana	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
P 04	+	-	+
P 05	+	+	+
P 06	+	+	+
L 08	+	+	+

3.3.5 Efeito inseticida

A) Avaliação da patogenicidade em lagartas de *Galleria mellonella*, *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*

Todas as cepas testadas apresentaram efeito inseticida sobre os hospedeiros avaliados, mostrando-se altamente virulentas, com porcentagem de mortalidade acima de 85%. Observou-se também que houve diferença quanto a virulência das cepas testadas quando comparamos as porcentagens de mortalidade nos diferentes hospedeiros e entre as cepas em um mesmo hospedeiro (Tabela 3.5).

Quando avaliado o efeito das diferentes cepas sobre o hospedeiro *G. mellonella*, a cepa P05 foi a menos virulenta, diferindo das demais que não apresentaram diferença entre si. Com relação ao efeito das cepas sobre *A. gemmatilis*, P05 e L08 foram mais virulentas que P04 e P06, e ambas não diferiram entre si, e com relação a *S. frugiperda*, todas as cepas apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 3.5).

Comparando os resultados para cada cepa bacteriana, observou-se que L08 foi a mais virulenta, causando 100% de mortalidade sobre todos os hospedeiros avaliados. Para as demais cepas, verificou-se que houve variabilidade, sendo que todas apresentaram diferença entre todos os hospedeiros avaliados (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Porcentagem de mortalidade de três hospedeiros inoculados com diferentes cepas bacterianas após 48 horas da inoculação.

Cepas bacterianas	Hospedeiros		
	<i>Galleria Mellonella</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Controle	10,0 ± 5,77 Aa	10,0 ± 0,0 Aa	0,0 ± 0,0 Aa
P05	86,6 ± 5,77 Ca	100,0 ± 0,0 Cc	96,6 ± 5,77 Db
L08	100,0 ± 0,0 Ba	100,0 ± 0,0 Ca	100,0 ± 0,0 Ea
P04	100,0 ± 0,0 Ba	93,3 ± 11,5 Bb	90,0 ± 0,0 Cc
P06	100,0 ± 0,0 Bc	93,3 ± 5,77 Bb	86,7 ± 5,77 Ba

C.V.= 1,99 %

* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas nas linhas não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Em trabalho desenvolvido por Guide et al. (Dados não publicados), os autores também observaram alta mortalidade para o hospedeiro *G. mellonella* quando inoculado com diferentes bactérias simbiotes de nematoides do gênero *Heterorhabditis*.

As atividades inseticidas da bactéria também foram avaliadas por Salvadori (2011) pela injeção em pré-pupas de *Spodoptera frugiperda* (L), concluindo que os isolados bacterianos, especialmente de *Heterorhabditis*, causaram altos níveis de mortalidade.

Bowen e Ensign (1998) também observaram altos níveis de virulência utilizando *P. luminescens* em lagartas de *G. mellonella*, comprovando que quando inoculadas na hemolinfa estas bactérias entomopatogênicas são extremamente virulentas, e mesmo a injeção de doses baixas (1-15 células bacterianas) resultaram em 100% de mortalidade dos insetos (MILSTEAD, 1979), pois o principal mecanismo da atividade inseticida é a produção de toxinas de alto peso molecular (Tcs) que são eficazes contra muitos gêneros e ordens de insetos (FRENCH-CONSTANT; BOWEN, 2000).

Segundo BOWEN e ENSIGN (1998), os complexos são letais tanto quando alimentados oralmente ou injetados diretamente na hemocele e conforme dados obtidos neste trabalho, também é confirmada alta patogenicidade das bactérias quando injetadas diretamente na hemolinfa de insetos.

Trabalhos desenvolvidos por Clarke e Downs (1995) sugeriram que a atividade lipase é um fator de virulência para *G. mellonella* e que as bactérias

entomopatogênicas que produzem esses fatores de virulência são capazes de destruir as células responsáveis pela defesa imunitária (GOMES, 2002). No caso das bactérias do gênero *Photorhabdus* estas se caracterizam por produzirem uma vasta gama de exo-enzimas tais como lipases (THALER et al., 1995), quitinases (CHEN et al., 1996), proteases (BOWEN et al., 2000), e fosfolipases que são responsáveis por atuar nos tecidos e células do hospedeiro, causando alta letalidade.

Além disso, de acordo com trabalhos de Daborn et al. (2001) e Bowen et al. (2003), as proteases parecem desempenhar um papel importante na bioconversão dos tecidos do inseto em nutrientes assimiláveis para o nematoide e na inibição dos fatores antibacterianos segregados pelo inseto (CABRAL et al., 2004). Fato pelo qual não são encontrados outros microrganismos parasitando o mesmo inseto.

Por outro lado, Schmidt et al. (1988) sugerem que as proteases podem ter um papel na toxicidade de insetos por analogia com proteases produzidas por outros patógenos de insetos. Desta forma, se faz necessário mais estudos relacionados a esta enzima para entender a sua real função na patogenicidade de insetos.

De acordo com Akhurst e Paul (1982), além das enzimas de biodegradação, as bactérias também produzem antibióticos para evitar necrófagos (insetos, bactérias, fungos etc.) invadindo a carcaça do inseto. Resultados obtidos neste trabalho utilizando a bactéria simbiote frente a *B. thuringiensis*, *E. coli* e *S. Aureus* também pode observar a inibição do crescimento.

B) Avaliação da virulência das cepas bacterianas em lagartas de *Galleria mellonella* aplicadas em diferentes concentrações e avaliadas ao longo do tempo

Com relação ao teste para comparação da virulência das cepas P04 (*P. asymbiotica*) e L08 (*P. luminescens*) sobre lagartas de *G. mellonella* em diferentes concentrações e ao longo do tempo, observou que houve variações significativas entre os parâmetros avaliados. A cepa P04 não apresentou variação entre as concentrações avaliadas, causando mortalidade de mais de 90% das lagartas para as três concentrações na avaliação de 18 horas após a aplicação, apresentando um pico bastante marcante de mortalidade nesse período (Tabela 3.6).

Por outro lado, a cepa L08 mostrou maior variabilidade entre ambos os fatores avaliados. A menor concentração testada (0,25 da escala de Macfarland) foi

a que causou mortalidade significativamente diferente na avaliação de 24 e 30 horas, enquanto nas demais concentrações não houve variabilidade significativa nos diferentes tempos avaliados (Tabela 3.6).

Observando os resultados ao longo do tempo, é possível verificar que a cepa P04 demora mais para começar a matar, mas o efeito é mais homogêneo, matando acima de 90% das lagartas em todas as concentrações avaliadas com 18 horas após a aplicação (Figura 3.7).

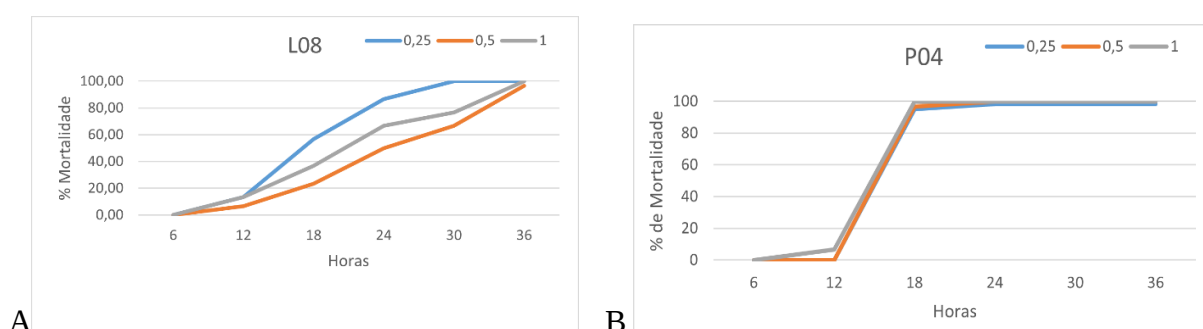


Figura 3.7. Porcentagem de mortalidade acumulada de *Galleria mellonella* ao longo do tempo, inoculadas com diferentes concentrações de *Photorhabdus luminescens* L08 (A) e *Photorhabdus asymbiotica* P04 (B).

Como citado anteriormente, *P. luminescens* e *P. asymbiotica* são bactérias diferentes, sendo que a última aparentemente é capaz de tolerar intervalos maiores de temperatura, sendo inclusive capaz de infectar humanos (GERRARD et al., 2004).

Em estudos desenvolvidos por Gerrard et. (2004) as cepas de *P. asymbiotica* até agora testadas em insetos têm provado ser altamente virulento, e se os fatores de virulência associados à infecção humana são responsáveis por este elevado grau de patogenicidade de insetos não é conhecida. Não há atualmente modelo experimental de vertebrados para *P. asymbiotica* e pouco é conhecida em relação aos mecanismos patogênicos especificamente associados à infecção humana.

Em trabalho recente desenvolvido por Maldonado e Eleftherianos (2021), os autores avaliaram a ação patogênica de *P. luminescens* e *P. asymbiotica* em culturas de células de insetos, e observaram que a sobrevivência e o metabolismo das células de insetos, bem como a proliferação bacteriana, diferem entre as

infecções com duas espécies de *Photorhabdus*, reforçando a idéia de que *P. luminescens* e *P. asymbiotica* empregam diferentes táticas para infectar as células dos insetos.

Tabela 3.6. Porcentagem média ($\pm$ Desvio Padrão) de mortalidade de *Galleria mellonella* após aplicação de suspensão bacteriana de *Photorhabdus asymbiotica* (P04) e *Photorhabdus luminescens* (L08) na hemolinfa em diferentes concentrações e avaliada por 36 horas.

Cepa	Conc*	Tempo de avaliação					
		6	12	18	24	30	36
P04	0,25	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa	96,7 $\pm$ 5,77Ab	3,3 $\pm$ 5,77Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Ab
P04	0,50	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa	96,7 $\pm$ 5,77Ab	3,3 $\pm$ 5,77Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa
P04	1,0	0,0 $\pm$ 0,0Aa	6,67 $\pm$ 5,77Aa	93,3 $\pm$ 5,77Ab	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa
L08	0,25	0,0 $\pm$ 0,0Aa	0,0 $\pm$ 0,0Aa	13,3 $\pm$ 15,28Ba	43,31 $\pm$ 11,54Bb	30,0 $\pm$ 10Ab	13,3 $\pm$ 11,54Ba
L08	0,50	0,0 $\pm$ 0,0Aa	6,67 $\pm$ 11,54Aa	16,67 $\pm$ 11,54Ba	26,67 $\pm$ 5,77Ba	16,67 $\pm$ 15,27Aa	30,0 $\pm$ 10,0Ba
L08	1,0	0,0 $\pm$ 0,0Aa	13,3 $\pm$ 11,54Aa	23,3 $\pm$ 5,77Ba	30,0 $\pm$ 10,0Ba	10,0 $\pm$ 10,0Aa	23,3 $\pm$ 15,27Ba

C.V.: 88,88; Conc* = Concentração estimada com base na escala de MacFarland; Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram entre si pelo teste de Skot-knot com $P \geq 0,05$.

3.3.6 Efeito fungicida

Foi possível observar a presença de halo de inibição do crescimento para os fungos testados *M. anisopliae* e *B. bassiana* utilizando as cepas bacteriana P04, P05, P06 e L08 (Figura 3.8).



Fonte: Brito, 2020.

Figura 3.8. Atividade fungicida de *Photorhabdus luminescens* (P06) sobre *Beauveria bassiana*.

Em trabalhos realizados por San-Blas et al. (2012), Shapiro-Ilan, Bock, Hotchkiss (2014), Fang et al. (2014) esses autores testaram diferentes espécies de bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* e todas demonstraram capacidade de inibir o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *Moniliophthora roreri*, *Armillaria tabescens*, *Fusicladium effusum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinérea*, corroborando com os dados obtidos nesse trabalho.

Embora *B. bassiana* e *M. anisopliae* sejam fungos benéficos, a ação fungicida das cepas avaliadas sobre eles sugere que estas possam ser utilizadas na inibição de fungos fitopatogênicos, sendo necessários mais estudos para confirmar esta ação.

3.4 CONCLUSÃO

As cepas bacterianas P05, P06 e L08 foram identificadas como da espécie *Photorhabdus luminescens* e P04 como *P. asymbiotica* e apresentaram características fenotípicas e bioquímicas compatíveis com o observado para outras cepas das mesmas espécies, além de apresentarem efeito com atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *S. aureus* e *B. thuringiensis*. As cepas também apresentaram efeito fungicida e mostraram-se altamente virulentas sobre insetos quando inoculadas na hemolinfa dos hospedeiros.

4. ARTIGO B: PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS SIMBIONTES DO GÊNERO *PHOTORHABDUS*

RESUMO

Photorhabdus são bactérias simbióticas de nematoides entomopatogênicos que se caracterizam por produzirem um complexo de toxinas, enzimas, antibióticos de amplo espectro e metabólitos secundários que são responsáveis pela rápida morte de seus hospedeiros e impedir a colonização de patógenos oportunistas no cadáver. Assim, este trabalho teve como objetivo prospectar a capacidade de produção de metabólitos secundários com efeitos antimicrobiano, fungicidas e inseticidas. As bactérias foram isoladas a partir de hemolinfa de lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) inoculadas com quatro isolados de NEPs (UENP04, 05, 06 e UEL08). Após isolamento, identificação e caracterização, as cepas foram cultivadas em Caldo Triptona Soja (TSB), incubadas a 28°C com agitação a 200 rpm no escuro, e no quarto dia de cultivo foi feito o processo de extração dos metabólitos secundários. Os extratos obtidos foram testados quanto ao efeito inseticida sobre *G. mellonella* (aplicação oral e via hemolinfa), antimicrobiano sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e fungicida sobre os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Quanto ao efeito inseticida, observou-se que tanto os extratos bacterianos inoculados na hemolinfa de lagartas de *G. mellonella*, quanto através de ingestão não foram capazes de causar mortalidade. Com relação ao efeito antimicrobiano dos extratos observou-se que as cepas P04, P05 e P06 não apresentaram inibição frente ao crescimento das bactérias, porém o extrato proveniente da cepa L08 apresentou halo de inibição para bactéria de *S. Aureus*, e quanto a atividade fungicida apenas o extrato da cepa P04 apresentou atividade contra os dois fungos testados.

PALAVRAS-CHAVES: *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus asymbiotica*, nematoides entomopatogênicos, controle biológico.

ABSTRACT

Photorhabdus are symbiotic nematode entomopathogenic bacteria that are characterized by producing a complex of toxins, enzymes, broad-spectrum antibiotics and secondary metabolites that are responsible for the rapid death of their hosts and prevent the colonization of opportunistic pathogens in the corpse. Thus, this study aimed to prospect the production capacity of secondary metabolites with bactericidal (antibiotic), fungicidal and insecticidal effects. The bacterias were isolated from hemolymph of larvae of *Galleria mellonella* L. (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) inoculated with four isolates of EPNs (UENP04, 05, 06 and UEL08). After isolation, identification and characterization, the strains were grown in Soy Tryptone Broth (TSB), incubated at 28°C with shaking at 200 rpm in the dark, following procedures summarized by Stock and Goodrich-Blair (2012), and on the fourth day of cultivation the extraction process of secondary metabolites was performed. The extracts obtained were tested for insecticidal effect on *G. mellonella* (oral application and via hemolymph), bactericidal on the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and fungicidal on the fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana*. Regarding the insecticidal effect, it was observed that both bacterial extracts inoculated into the hemolymph of *G. mellonella* larvae and through ingestion were not able to cause mortality. Regarding the antibiotic effect of the extracts, it was observed that the strains P04, P05 and P06 did not inhibit the growth of bacteria, but the extract from strain L08 showed a halo of inhibition for *S. Aureus* bacteria, and regarding the fungicidal activity, only the extract from strain P04 showed activity against both fungi tested.

KEY-WORDS: *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus asymbiotica*, entomopathogenic nematodes, biological control.

4.1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos microrganismos habitando a natureza encontram-se as entomobactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que se caracterizam por sua relação simbiótica com nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente e são promissoras fontes para novos compostos inseticidas e parasiticidas (BODE, 2009) através da produção de metabólitos secundários como antimicrobianos, toxinas e exoenzimas (LEWIS et al., 2006; BODE, 2009).

O papel dessas bactérias e seus compostos tem sido alvo de vários grupos de pesquisas visando sua utilização na área agrícola, farmacêutica e produtos industriais (TEMPLETON; HEINY, 1989; WHIPPS; LUMSDEN, 2001), pois a capacidade das bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* em causar a morte dos insetos está relacionada principalmente à inibição das reações de defesa do sistema imunológico (DOWDS; PETERS, 2002), mas também por que produzem diversos metabólitos que impedem o crescimento de outras bactérias e fungos oportunistas, incluindo derivados de estilbeno (SHI et al., 2016), ácido trans-cinâmico (TCA) (BOCK et al., 2014), xenocoumacinas (YANG et al., 2011) e enzimas hidrolíticas (CHEN et al., 1996).

Photorhabdus e *Xenorhabdus* podem secretar vários fatores de virulência na hemocele do inseto hospedeiro para suprimir as respostas imunológicas, e consequentemente causar septicemia fatal. A imunossupressão do inseto pode ocorrer pela inibição da atividade da fosfolipase A2 (PLA2), que é conhecida por catalisar a liberação de araquidônico (ácido de fosfolipídios), que é uma etapa comprometida para a produção de vários eicosanóides, que medeiam as respostas imunes celulares e humorais contra vários patógenos microbianos em insetos (KIM et al., 2005; MOUCHLIS et al., 2018).

Outra forma de imunossupressão através de metabólitos secretados pelas bactérias é a produção de rabducina, um composto contendo isocianeto produzido a partir do cluster de genes biossintéticos, que pode inibir a atividade da fenoloxidase (PO) em lagartas de *Galleria mellonella* (CRAWFORD et al., 2012). Mais de 70 tipos de rabdopeptídeo/xenortida peptídeos derivados de Peptídeos não ribossomais (NRPS) são estruturalmente semelhantes a inibidores de protease. Eles podem degradar várias proteínas associado à imunidade. Também furealipídios produzidos

de NRPS pode impedir a expressão de genes de peptídeos antimicrobianos (SUSSMUTH et al., 2017, NOLLMANN et al., 2015).

Considerando o potencial de bio-controle dos metabólitos produzidos pelas bactérias simbiontes do gênero *Photorhabdus*, o objetivo desse estudo foi realizar a prospecção e determinar a virulência de metabólitos secundários provenientes das bactérias simbiontes do gênero *Photorhabdus* com base em suas atividades inibitórias contra insetos, fungos e bactérias.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Cepas bacterianas

Os extratos bacterianos foram produzidos a partir de quatro cepas bacterianas do gênero *Photorhabdus*, isoladas e identificadas conforme descrito no capítulo 3 deste trabalho (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Cepas bacterianas utilizadas como fonte de metabólitos secundários.

Isolados NEPs	Cepa bacteriana	Nematoides Entomopatogênicos	Espécies de bactéria
UEL 08	L08	<i>Heterorhabdtis amazonensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
UENP 05	P05	<i>Heterorhabdtis amazonensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
UENP 06	P06	<i>Heterorhabdtis amazonensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
UENP 04	P04	<i>Heterorhabdtis mexicana</i>	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>

4.2.2 Prospecção de metabólitos secundários

Culturas bacterianas

Para a produção de metabólitos secundários em meio de cultivo, as bactérias foram cultivadas em Caldo Triptona Soja (TSB) e incubadas a 28°C com agitação a 200 rpm no escuro, seguindo procedimentos resumidos por Stock e Goodrich-Blair (2012). A cultura bacteriana inicial foi preparada a partir de uma única colônia recuperada de uma placa NBTA suspensa em 30 mL de TSB e depois incubada a 28° C, 100 rpm. A partir dessa cultura, 1L TSB foi inoculado a 1% (10 mL), e cultivado sob as mesmas condições durante quatro dias antes da extração. Em cada etapa da subcultura, a pureza das culturas foi verificada por estrias em NBTA.

Após os 4 dias de crescimento as culturas foram acidificadas com 5M HCl para pH 4,0. Após duas horas, os metabólitos secundários (MS) foram extraídos usando um volume igual de acetato de etila. Uma segunda extração foi realizada para garantir o máximo de recuperação de MS. As camadas orgânicas foram

separadas por centrifugação da mistura a 5.000 rpm por 10 minutos. As amostras foram então concentradas em evaporador rotatório Buchi 011 in vácuo a 37-40 °C até obtenção de resíduo oleoso espesso. O solvente remanescente foi evaporado até a secagem completa por meio de fluxo de ar. Os extratos controle foram preparados a partir de meio TSB não inoculado com a bactéria, utilizando os mesmos procedimentos de extração.

4.2.3 Ensaio de bioatividade com extratos de metabólitos secundários

Os extratos foram avaliados quanto aos efeitos inseticida, antimicrobiano e antifúngicos considerando os seguintes organismos: a) lagartas de *G. mellonella*, b) bactérias das espécies *B. thuringiensis*, *E. coli* e *S. aureus* e c) fungos: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

a) Toxicidade sobre insetos

O efeito dos extratos sobre insetos foi avaliado em lagartas de *G. mellonella* de duas formas: através de aplicação na hemolinfa e por via oral. Na primeira metodologia, a aplicação foi feita com auxílio da microseringa de Hamilton. Previamente à aplicação seguiu-se o protocolo de lavagem da seringa que inclui uma série de lavagens em solução de hipoclorito a 1%, em água destilada, em álcool 70% e em solução salina. O processo de lavagem foi realizado antes, durante e depois do experimento. As lagartas utilizadas foram escolhidas por igual tamanho, cor clara e sem manchas pretas. A inoculação foi feita no último par de pernas injetando-se 10µL de suspensão bacteriana diretamente na hemolinfa.

Cada tratamento teve três repetições que constituíram uma placa de cultivo de células de 12 poços contendo papel de filtro umedecido com 0,25 uL de água destilada e dez lagartas inoculadas com as bactérias (uma lagarta por poço). No tratamento controle, as lagartas foram inoculadas com 10µL de água destilada. As placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 28°C. As lagartas foram mantidas sem alimentação durante todo o experimento e após 48 horas foi feita a avaliação, contando o número de lagartas mortas e observando-se o sintoma de infecção pelas bactérias.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.4 (FERREIRA, 2011).

Para a segunda metodologia, o extrato foi misturado ao alimento, onde cada larva recebeu 0,25 g de dieta contendo 20µL dos extratos bacterianos. Cada tratamento foi repetido três vezes, e cada parcela consistiu de 10 insetos por repetição. O controle consistiu em dieta suplementada com água e <1% DMSO, para contabilizar quaisquer efeitos do solvente. A mortalidade foi registrada uma semana após o tratamento.

b) Atividade antimicrobiana

Culturas de *B. thuringiensis*, *E. coli* e *S. aureus* foram obtidas após cultivo por 24 horas em meio LB líquido, uma suspensão celular de cada bactéria foi inoculada em ágar nutriente (15g de ágar nutriente; 5g de peptona bacteriológica; 1000 mL de água destilada) (COSTA et al., 2010). O inóculo foi efetuado utilizando-se *swab* estéril embebido da suspensão bacteriana, em três sentidos, a fim de obter crescimento confluyente em todo o meio. Após cinco minutos para secagem das placas, foram perfurado quatro poços na placa de Petri e adicionados 60µL do extrato de cada cepa em poços individualizados. As placas foram armazenadas a 28°C e após 24 horas foi realizado a avaliação por meio da observação da presença ou não do halo de inibição.

c) Atividade antifúngica

Para avaliação do efeito antifúngico dos extratos foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3.6, substituindo-se as suspensões bacterianas pelos extratos.

Os isolados de campo de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram obtidos do Laboratório de Biotecnologia da UNIOESTE. Os fungos foram cultivados em meio BDA por 15 dias, tempo necessário para que ocorresse a esporulação. Os esporos foram coletados e armazenados em freezer por no máximo 30 dias, antes de serem utilizados nos ensaios. Suspensões de esporos foram preparadas e 50 microlitros da

suspensão (1×10^6 esporos/mL) foram espalhados em placa de Petri de 10 cm de diâmetro em meio BDA, após a secagem foram adicionado discos embebidos com os extratos e estes foram dispostos em quatro pontos (um por extrato) equidistantes na placa. As placas foram incubadas no escuro a 25°C durante 24 h. A atividade antifúngica dos extratos foi determinada observando-se a zona de inibição do crescimento ao redor dos discos nas placas de BDA. Os controles consideraram a adição apenas de água destilada em cada disco da placa de cultura.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Atividade inseticida

Para os testes de toxicidade dos efeitos dos extratos metabólitos injetados diretamente na hemolinfa de lagartas de *G. Mellonella* não se observou mortalidade para nenhum dos extratos testados, indicando que estes não apresentam atividade inseticida para esse hospedeiro.

Em trabalhos desenvolvidos por Orozco et al., (2016) os autores observaram que a mortalidade de insetos foi variável (de 0 100%), dependendo do extrato e dos insetos considerados nos bioensaios.

O teste de ingestão utilizando dieta umedecida com os extratos das cepas bacterianas P04, P05, P06 e L08 também não apresentou mortalidade para as lagartas de *G. mellonella* (Figura 4.1).



Fonte: Brito, 2020.

Figura 4.1. Lagartas de *Galleria mellonella* submetidas a dieta contendo extratos bacterianos de *Photorhabdus* sp.

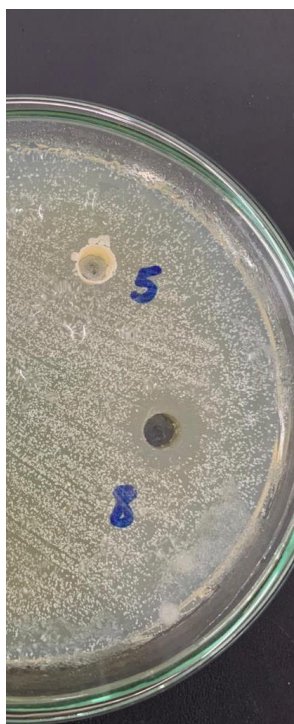
Por outro lado, estudos desenvolvidos por Shrestha et al. (2012) mostram que o sobrenadante livre de bactérias de diferentes espécies de *Photorhabdus* spp. ou cepas quando administradas com dieta em várias espécies de insetos exibiu toxicidade oral. Também em trabalho desenvolvido por Orozco et al. (2016) foram observadas atividade inseticida após ingestão dos extratos de *Photorhabdus*, e os

autores indicam ser o primeiro relato de toxicidade oral de extratos brutos dessa bactéria, e ainda nesse mesmo estudo foi observado que houve diferença na mortalidade quanto a concentração do extrato disposto para os insetos.

Se faz necessário mais avaliações de ingestão oral com concentrações diferentes para confirmar os resultados obtidos nesse trabalho.

4.3.2 Atividade antimicrobiana

Os extratos das cepas bacterianas P04, P05, P06 não apresentaram halo de inibição para as bactérias testadas, mas para o extrato da cepa L08 foi possível observação de um halo de inibição ao entorno do desenvolvimento da bactéria *S. aureus* (Figura 4.2).



Fonte: Brito, 2021.

Figura 4.2. Atividade antimicrobiana de extrato proveniente da cepa L08 de *Photorhabdus luminescens* sobre *Staphylococcus aureus*.

Os extratos de *Photorhabdus* produzem MS com atividade de antibióticos de amplo espectro (MAXWELL et al., 1994; ELEFThERIANOS et al. 2009; WATERFIELD et al., 2009) e em trabalhos desenvolvidos por HEVESI, AL-ARABI (2004) relatam que extratos de várias cepas de *Photorhabdus* spp. apresentaram

atividade bactericida contra *Erwinia amylovora*, o agente causador da queima do fogo. Em outro estudo, Uma et al. (2010) mostraram o potencial de *P. luminescens* para controlar dois importantes patógenos de plantas, *Xanthomas* e *Pseudomonas* spp.

4.3.3 Atividade fungicida

Para avaliação da atividade antifúngica dos extratos provenientes das cepas bacterianas P05, P06 e L08 utilizando os isolados *M. anisopliae* e *B. bassiana* não foi possível a observação de halo para as cepas citadas, indicando que os extratos que corresponde as bactérias da espécie *Photorhabdus luminescens* não possuem atividade responsável para inibição dos fungos, porém a cepa que corresponde ao isolado P04 da espécie *Photorhabdus asymbiotica* apresentou halo de inibição contra os dois fungos testados (Figura 4.3).



Fonte: Brito, 2021.

Figura 4.3. Atividade antifúngica do extrato de *Photorhabdus asymbiotica* (P04) frente a *Metharizium anisopliae*.

Fang et al. (2014), Chen et al. (1996) e Hazir et al. (2016) sugerem que as bactérias do gênero *Xenorhabdus* tem gerado altos níveis de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos, em relação àqueles produzidos por *Photorhabdus*, apresentando índices de inibição do fungo *N. parvum* acima de 70% comparado com as do gênero *Photorhabdus*.

Vários grupos de genes para a biossíntese de MS foram identificados em sequências do genoma de *Photorhabdus* spp. (DERZELLE et al., 2002; CICHE et al., 2003; BRACHMAN et al., 2007; JOYCE, et al. 2008; BRACHMAN et al., 2012). Muitos dos compostos biossintetizados pelas enzimas codificadas estão atualmente sendo investigados para quantificar suas propriedades antimicrobianas (ELEFTHERIANOS et al., 2008; BOCK et al., 2014; HAZIR et al., 2016).

Segundo Bode (2009), as bactérias simbióticas de NEPs produzem diversos metabólitos que impedem o crescimento de outras bactérias e fungos oportunistas, incluindo derivados de estilbeno (SHI et al., 2016), ácido trans-cinâmico (TCA) (BOCK et al., 2014), xenocoumacinas (YANG et al., 2011) e enzimas hidrolíticas como as quitinases, um peptídeo que decompõe majoritariamente a quitina na parede celular dos fungos filamentosos (CHEN et al., 1996).

Em trabalho desenvolvido por Hazir et al. (2016) estes avaliaram filtrados livres de células, obtidos de sete espécies de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. contra *Fusicladium carpophilum*, *F. effusum*, *Monilinia fructicola*, *Glomerella cingulata* e *Armillaria tabescens*. Os autores também verificaram maiores níveis de inibição com metabólitos de *X. szentirmaii*, em relação às outras bactérias testadas e ao controle.

Ainda, em trabalho desenvolvido por Orozco et al. (2016) os autores observaram que os extratos inibiram fortemente o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* (Hypocreales: Nectriceae) mas não o de *Alternaria alternata* (Pleosporales: Pleosporaceae), e apresentaram efeito inibitório moderado a alto foi sobre *B. bassiana*.

De forma geral os extratos provenientes das bactérias do gênero *Photorhabdus*, cepas P04 e L08 apresentaram atividades de inibição para os testes de atividade antimicrobiana e antifúngica realizados, sendo necessário mais testes para confirmação dos resultados. Já para os extratos provenientes das cepas P05 e P06 não apresentaram nenhuma das atividades avaliadas.

De acordo com Orozco et al. (2016) os extratos provenientes de *Photorhabdus* apresentam atividade antimicrobiana variável, dependendo das espécies bacterianas alvo.

Em estudo desenvolvido por Orozco et al. (2016), observou-se que os MS produzidos por cepas de *Photorhabdus* sp. *in vitro* e *in vivo* diferiram entre si, o que sugere que o sistema imune do inseto pode estimular a produção de compostos que não ocorrem quando estes microrganismos são cultivados em meios de cultura. Ainda segundo Bode (2009), as variações nas porcentagens de inibição devem-se às diferenças de compostos ativos produzidos pelos diferentes gêneros de bactérias, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie.

Nesse mesmo trabalho citado acima foram realizados testes com nematoides fitopatogênicos do gênero *Meloidogyne incógnita* no qual para uma determinada estirpe CH35 aplicada na concentração mais elevada apresentou mortalidade de 100% em todas as concentrações dos extratos, independente das concentrações aplicadas. Do mesmo modo para os extratos da estirpe Caborca relatou menor mortalidade variando entre 35% e 73%. Indicando baixa atividade considerando a concentração do extrato utilizado bem como o organismo alvo.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho são considerados iniciais, e se faz necessário testar outras metodologias para produção dos extratos, bem como avaliar o efeito destas sobre outros organismos para uma efetiva comparação da eficiência desses extratos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G.; DELEURY, E.; WINCKER, P. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.
- ADAMS, B. J.; BURNELL, A. M.; POWERS, Thomas O. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. **Journal of Nematology**, v. 30, n. 1, p. 22, 1998.
- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and Systematics. **Entomopathogenic Nematology**. v. 1, 2002.
- AKHURST, R.; SMITH, K. Regulation and safety. In. R. Gaugler (ed.), *entomopathogenic Nematology*. P. 311- 322, 2002.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, pág. 403-410, 1990.
- AKHURST, R. J.; BOEMARE, N. E. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. **Journal of Genetic Microbiology**. 134, 1835–1845, 1990.
- AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. **Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 303-309, 1980.
- ALMENARA, D. P.; ROSSI, C.; NEVES, M. R. C.; WINTER, C. E. Nematoides Entomopatogênicos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INTC. p. 1-40, 2012.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de pragas na América Latina**. FEALQ, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v. 14, cap. 6, p. 171-202, 2008.
- ALVES, V.S.; ALVES, L.F.A.; QUADROS, J.C.; LEITE, L.G. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 479-482, 2009.
- ALVES, V.S.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECILIA, L.V.C.; ANDALÓ, V.; SOUZA, G.C. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (tinsley) (Hemiptera: pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.67-73, 2009.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K.; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006.

ANDALÓ, V.; SANTOS, V.; MOREIRA, G.F.; MOREIRA, C.C.; MOINO JR. A. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n.9, p. 1860-1866, 2010.

BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 6, p. 599-606, 1983.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current opinion in chemical biology**, v. 13, n. 2, p. 224-230, 2009.

BLAXTER, M. L.; De Ley, P.; Garey, J. R.; Liu, L. X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; THOMAS, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 71–75, 1998.

BOEMARE, N. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. **Entomopathogenic nematology**, p. 35–56, 2002.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 751-761, 1988.

BRIGHT, M.; BULGHERESI, S. A complex journey: transmission of microbial symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 218–230, 2010.

BRACHMANN, A.O.; JOYCE, S.A.; JENKE-KODAMA, H.; SCHWÄR, G.; CLARKE, D.J.; BODE, H.B. A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. **ChemBioChem**, v. 14, p. 1721-1728, 2007.

BOWEN, D. J.; ENSIGN, J.C. Isolation and characterization of intracellular protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4834-4841, 2001.

BOWEN, D. J.; ENSIGN, J.C. Purification and characterization of a highmolecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8 p. 3029-3035, 1998.

CARNEIRO, C. N. B.; DAMATTA, R. A.; SAMUELS, R. I.; SILVA, C. P. Effects of Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus temperata* Infection on the digestive enzymes of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Protein and Peptide Letters**, v.15, n.7, p. 658-62, 2008.

CABRAL, C. M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMOES, N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. Strain Az29. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3831-3838, 2004.

CAI X.; NOWAK S.; WESCHE F.; BISCHOFF I.; KAISER M.; FURST R.; BODE, H.B. Entomopathogenic bacteria use multiple mechanisms for bioactive peptide library design. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 379-86, 2017.

OROZCO, J.G.C.; LEITE, L.G.; CUSTÓDIO, B. C.; SILVA, R.S.A.D.; CASTELIANI, AGB.; TRAVAGLINI, R.V. Inibição do fungo simbiote da formiga-cortadeira *Atta sexdens* por metabólitos secundários da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* associada a nematoides entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

CRAWFORD, J. M.; KONTEK, R.; CLARDY, J. Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. **Current Biology**, v. 20, n. 1, p. 69–74, 2010.

CICHE, T. A.; KIM, K. S.; KAUFMANN-DASZCZUK, B.; NGUYEN, K. C.; HALL, D. H. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2275–2287, 2008.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which of a nematode is out. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1890-1897, 2003.

CLARKE, D. J. The genetic basis of the symbiosis between *Photorhabdus* and its invertebrate hosts. **Advances in Applied Microbiology**, v. 88, p.1-29, 2014.

COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, n. 5, p. 757-766, 2010.

DABORN, P. J.; WATERFIELD, N.; BLIGHT, M. A.; FRENCH-CONSTANT, R. H. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5834-5839, 2001.

DE OLIVEIRA VASCONCELOS, V.; FURLONG, J.; DE FREITAS, G. M.; DOLINSKI.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C. D.; PRATA, M. *Steinernema glaseri* santa rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 201-206, 2004.

DE PAULA, A. R.; VIEIRA, L.P.; DÁTTILO, W.F.C.; CARNEIRO, C. N. B.; ERTHAL J. M.; BRITO, E. S.; SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Patogenicidade e efeito comportamental de *Photorhabdus temperata* K122 nas formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **O Biológico**, v. 68, p 311- 413, 2006.

DILLMAN, A. R.; CHASTON, J.M.; ADAMS, B. J.; CICHE, T.A.; GOODRICH-BLAIR, H.; STOCK, S.P.; STERNBERG, P. W. Nematóide entomopatogênico. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002527, 2012.

DOLINSKI, C.; CHOO, H. Y.; DUNCAN, L. W. Grower acceptance of entomopathogenic nematodes: case studies on three continents. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 226-235, 2012.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALO, V.; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v. 4, p. e10, 2017.

DOLINSKI, C.; VALLE, E. D.; STUART, R. J. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. **Biological Control**, v. 38, n. 3, p. 422-427, 2006.

DONESE, G. S. Caracterização molecular de nematoides entomopatogenicos (isolados UENP 02, 05 e 06) nativos na região norte do Paraná. 2019, 25 f, TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná- Campus Cornélio Procópio, 2019.

DOWLING, A.; WATERFIELD, N. R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 436–451, 2007.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. R. N. E.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematology. **Virulence Mechanisms**, p. 79-98, 2002.

DUCHAUD E., et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nature Biotechnology**, v.21, n.11, p. 1307-1313, 2003.

DUCHAUD, E.; RUSNIOK, C.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; GIVAUDAN, A.; TAOURIT, S.; KUNST, F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1307-1313, 2003

DUNPHY, G. B.; WEBSTER, J. M. Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 1, p. 40-51, 1991.

EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Mass production. In P. S. GREWAL, R. U. EHLE, D.I. SHAPIRO-ILAN (Eds.), **Nematode as biological control agente**, p. 65–78. 2005.

EHLERS, R. U.; LUNAU, S.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.; OSTERFELD, K. H. Liquid culture of the entomopathogenic nematode–bacterium-complex *Heterorhabditis megidis*/*Photorhabdus luminescens*. **BioControl**, v. 43, n. 1, p.77–86, 1998.

ELEFThERIANOS, I.; R H FFRENCH-CONSTANT, R. H.; CLARKE, D. J.; DOWLING, A. J.; REYNOLDS, S. E. Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 552–560, 2010.

EMELIANOFF, V.; LE BRUN, N.; PAGÈS, S.; STOCK, S. P.; TAILLIEZ, P.; MOULIA, C.; SICARD, M. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 2, p. 211-217, 2008.

FARMER, J. J.; JORGERNSEN, P. A.; GRIMOUNT, P. A. D.; AKHURST, R. J.; POINAR, G. O.; AGERON, E.; WILSON, K. L. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1594–1600, 1989.

FERNANDES, T. A. P.; MARCOMINI, M. C.; FERREIRA, F. P.; GUIDE, B. A.; ALVES, V. S.; NEVES, P. M. O. J. Native isolates and the effect of aviary litter on the pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes for the control of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 1-18, 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FEIRREIRA, T.; VAN REENEN.; PAGÈS, S.; TAILLIEZ, P.; MALAN, A. P.; DICKS, L. M. T. *Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel *Heterorhabditis* species related to *Heterorhabditis indica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 5, p.1853-1858, 2013.

FFRENCH-CONSTANT, R., WATERFIELD, N. An ABC guide to a complex, bacterial toxin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 58, p. 169–183, 2006.

FFRENCH-CONSTANT, R.; BOWEN, D. *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 284-288, 1999.

FORST, S.; DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 47-72, 1997.

FORST, S.; NEALSON, K. Molecular Biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. **American Society for Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 21-43, 1996.

FORST, S.; TABATABAI, N. Role of the histidine kinase, EnvZ, in the production of outer membrane proteins in the symbiotic-pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 962-968, 1997.

FORST, S., CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. **Entomopathogenic Nematology**, v. 57, 2002.

FLORES-LARA, Y.; RENNECKAR, D.; FORST, S.; GOODRICH-BLAIR, H.; STOCK, P. Influência da idade do nematóide e das condições de cultivo nos parâmetros morfológicos e fisiológicos da vesícula bacteriana de *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 95 n. 2, p. 110-118, 2007.

GARCIA, L. C. Avaliação de tecnologias de aplicação de nematoides entomopatogênicos visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. 55 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2006.

GARCIA, L.C.; RAETANO, C. G.; LEITE, L. G. Tecnologia de aplicação para os nematoides *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Neotropical Entomology**, v.37, n. 3, p. 305- 311, 2008.

GAUGLER, R. Ecological considerations in the biological control of soilinhabiting insects pests with entomopathogenic nematodes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 24, n. 1-3, p. 351–360, 1988.

GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, 2002.

GERRARD, J.; WATERFIELD, N.; VOHRA, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. Infecção humana por *Photorhabdus asymbiotica*: um patógeno bacteriano emergente. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 229-237, 2004.

GERRARD, J. G.; JOYCE, S. A.; CLARKE, D. J.; FRENCH-CONSTANT, R. H.; NIMMO, G. R.; LOOKE, D. F. M. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1562–1564, 2006.

GERRARD, J. G.; WATERFIELD, N. R.; SANCHEZ-CONTREERAS, M. *Photorhabdus asymbiotica*: Shedding light on a human pathogenic bioluminescent bacterium. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, n. 14, p. 103-109, 2011.

GHEDIN, E.; WANG, S.; SPIRO, D.; CALER, E.; ZHAO, Q.; CRABTREE, J.; SCOTT, A. L. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. **Science**. v. 317, n. 5845, p. 1756–1760, 2007.

GIOMETTI, F. H. C. et al. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 81-86, 2011.

GIVAUDAN, A. S.; BAGHDIGUIAN, S.; A. LANOIS.; BOEMARE, N. Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1408–1413, 1995.

GUALTIERI, M.; OGIER, J. C.; PAGES, S.; GIVAUDAN, A.; GAUDRIAULT, S. Draft genome sequence and annotation of the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus szentirmaii* strain DSM16338. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, p. np, 2014.

GOTZ, P.; BOMAN, A.; BOMAN, H.G. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. **Proceedings of royal Society London**. Series B. Biological Sciences, v. 212, n. 1188, p. 333-350, 1981.

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction, **Journal of Thermal Biology**, v. 19, p. 245–253, 1994.

GUERRA, B. E.; CHACÓN, J. G.; MUÑOZ, J. E.; CAICEDO, M.A. Evaluación de la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. nativos en Colombia. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 1, p. 111-118, 2014.

GUIDE, B. A. Identificação e aspectos biológicos do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* ISOLADO UEL 08. 2019. 67 f. Tese (Doutorado) – Programa Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, 2019.

GUIDE, B. A.; ALVES, V. S.; FERNANDES, T. A. P.; MARCOMINI, M. C.; MENEGHIN, A. M.; NEVES, P. M. O. J. Pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes against *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae). **Semina; Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 1417- 1426, 2019.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, n. 41 p. 95-98, 1999.

HAZIR, S.; KESKIN, N.; ESTOQUE, S. P., KAYA, H.K.; ÖZCAN, E. S. Diversidade e distribuição do entomopatogênico nematodes (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae). **Biodiversidade e Conservação**, v. 12, p. 375–386. 2003.

HEERMANN, R.; FUCHS, T. M. Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-21, 2008.

HOMINICK, W. M.; REID, A. P.; BOHAN, D. A.; BRISCOE, B. R. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the Convention on Biological Diversity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 317–331, 1996.

HUI, E.; WEBSTER, J. M. Influence of insect larvae and seedling roots on the host–insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium in insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 2, p. 152- 162, 2000.

HUSSA, E. A.; GOODRICH-BLAIR, H. It takes a village: Ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 161–178, 2013.

HUSNIK, F.; CHRUDIMSKY, T.; HYPŠA, V. Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (γ -Proteobacteria: Convergence of complex phylogenetic approaches. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2011.

HUNT, DAVID J.; SUBBOTIN, SERGEI A. Taxonomy and systematics. In: Advances in entomopathogenic nematode taxonomy and phylogeny. **Brill**, p. 13-58, 2016.

JOYCE, S. A.; BRACHMANN, A.O.; GLAZER, I.; LANGO, L.; SCHWÄR, G.; CLARKE, D. J.; BODE, H. B. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. **Angew Chemie International**, v. 47, n. 10, p. 1942-1945, 2008.

KAPLAN, F.; ALBORN, H. T.; VON REUSS, S. H.; AJREDINI, R.; ALI, J. G.; AKYAZI, F.; TEAL, P. E. Interspecific nematode signals regulate dispersal behavior. **PLoS One**. v.7, n. 6, p. e38735, 2012.

KIM, Y.; CHO, J. D.; PARK, Y. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 89, n. 3, p. 258-264, 2005.

KIM, I. H.; ARYAL, S. K.; AGHAI, D. T., CASANOVA-TORRES, Á. M.; HILLMAN, K.; KOZUCH, M. P.; DILLMAN, A. R. The insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus innexi* has attenuated virulence in multiple insect model hosts yet encodes a potent mosquitocidal toxin. **BMC genomics**, v.18, n.1, p. 1-25, 2017.

KUMAR, S.; SCHIFFER, P. H.; BLAXTER, M. 959 Nematode Genomes: a semantic wiki for coordinating sequencing projects. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 1295–1300, 2012.

KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P.S.; KAYA, H.K.; KLEIN, M. G. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white larvae: greenhouse and field evaluation. **Biological control**, v. 19. n. 3, p.245–251, 2000.

KRIN, E.; CHAKROUN, N.; TURLIN, E.; GIVAUDAN, A.; GABORIAU, F.; BONNE, I.; DERZELLE, S. Pleiotropic role of quorum-sensing autoinducer 2 in *Photorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.10, p. 6439-6451, 2006.

KOPPENHÖFER, H. S. Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. **Nematology Monographs and Perspectives**, v. 5, p. 735-808, 2007

KUWATA, R.; QIU, L. H.; WANG, W.; HARADA, Y.; YOSHIDA, M.; KONDO, E.; YOSHIGA, T. *Xenorhabdus ishibashii* sp. nov., a bacterium from the entomopathogenic nematode *Steinernema aciari*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1690–1695, 2012.

KUWATA, R.; YOSHIGA, T.; YOSHIDA, M.; KONDO, E. Mutualistic association of *Photorhabdus asymbiotica* with Japanese heterorhabditid entomopathogenic nematodes. **Microbes and infection**, v.10, n. 7, p. 734-741, 2008.

LANOIS, A.; OGIER, J. C.; GOUZY, J.; LAROU, C.; ROUY, Z.; GIVAUDAN, A.; GAUDRIAULT, S. Draft genome sequence and annotation of the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* strain F1. **Genome Announcements**, v. 1, n. 3, 2013.

LACEY, L.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; GOETTEL, M. S.; BROWNBRIDGE, M. Insect *luminescens*. **Biocontrol**, v. 43, p. 77-86, 2015.

LEE, MING-MIN.; STOCK, S. P. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp.(γ -Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 2, p. 67-74, 2010.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.

LI, J.; CHEN, G.; WEBSTER, J.M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 770-773, 1997.

LIU, W.; YE, W.; WANG, Z.; WANG, X.; TIAN, S.; CAO, H.; LIAN, J. *Photorhabdus luminescens* toxin-induced permeability change in *Manduca sexta* and *Tenebrio molitor* midgut brush border membrane and in unilamellar phospholipid vesicle. **Environmental Microbiology**, v.8, n.5, p.858-870, 2006.

LIU, J.; BERRY, R. E.; BLOUIN, M. S. Molecular differentiation and phylogeny of entomopathogenic nematodes Rhabditida: Heterorhabditidae based on ND4 gene sequences of mitochondrial DNA. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 709–715, 1999.

MAHAR, A.N.; N.D. JAN.; MAHAR, G.M.; MAHAR, A. Q. Control of Insects with Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophila* and its Toxic Secretions. **International journal of agriculture and biology**, v. 10, n. 1, p. 52-56, 2008.

MANEESAKORN, P.; AN, R.; DANESHVAR, H.; TAYLOR, K.; BAI, X.; ADAMS, B. J., CHANDRAPATYA, A. Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 59, n. 2, p. 271-280, 2011.

MARTENS, E. C.; GOODRICH-BLAIR, H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila*

associates during colonization initiation. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1723-1735, 2005.

MILSTEAD, J. E. Pathophysiological influences of *Heterorhabditis bacteriophora* complex on seventh-instar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*: Changes in the hemolymph refractive index. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 33, p. 274–277, 1979.

MOLINA, J. P. A.; LÓPEZ, N.J.C. Producción in vivo de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 27, p. 73-78, 2001.

NOGUEZ, J. H.; CONNER, E. S.; ZHOU, Y.; CICHE, T. A.; RAGAINS, J. R.; BUTCHER, R. A. A novel ascaroside controls the parasitic life cycle of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 6, p. 961–966, 2012.

NOLLMANN, F. I.; HEINRICH, A. K.; BRACHMANN, A. O, MORRISSEAU, C.; MUKHERJEE, K.; CASANOVA-TORRES, A.M.; BODE, H. B. *Photorhabdus* natural product inhibits insect juvenile hormone epoxide hydrolase. **Chembiochem**, v. 16, p. 766-71, 2015.

NGUYEN, K. B. et al. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 8-20, 2010.

NGUYEN, K. B.; GINARTE, C. M. A.; LEITE, L. G.; DOS SANTOS, J. M.; HAKAKA, R. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, n. 1, p. 8-20, 2010.

OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; AZEVEDO PRATA, M. C.; FAZA, A.; PAULA BATISTA, E. S.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J. *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) {HP88} for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): The effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2–4, p. 364 – 367, 2012.

OROZCO, R.A.; MOLNÁR, I.; BODE, H.; STOCK, S. P. Bioprospecção de metabólitos secundários na bactéria entomopatogênica *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 141, p. 45-52, 2016.

OROZCO, R.A.; HILL, T.; STOCK, P.S. Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* (γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae). **Current Microbiology**, v. 66, p.30-39, 2013.

OROZCO, R. A. Characterization of the entomopathogenic bacterium *photorhodus luminescens sonorensis*, and bioactivity of its secondary metabolites. Dissertação (Mestrado), Department of Entomology, University of Arizona, 2012.

PARACER, S.; AHMADJIAN, V. **Symbiosis: An Introduction to Biological Associations**. Oxford University Press, 2000.

PANKEWITZ F.; HILKER M. Polyketides in insects: ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. **Biology Reviews**, v. 83, n. 2, p. 209-226, 2008.

PARK, Y.; ALIZA, A.R.; STANLEY, D. A secretory PLA2 associated with tobacco hornworm hemocyte membrane preparations acts in cellular immune reactions. **Archives and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 60, n. 3, p. 105-115, 2005.

PIDOT, S.; J, COYNE, S.; KLOSS, F.; HERTWECK C. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 14–22, 2014.

POINAR, G. O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, n. 4, p. 333-338, 1993.

POINAR, G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**, v.365, p. 23-62, 1990.

PLICHTA, K. L.; JOYCE, S. A.; CLARKE, D.; WATERFIELD, N.; STOCK, S. P. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp.(Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: γ -Proteobacteria). **Journal of Helminthology**, v. 83, n. 4, p. 309-320, 2009

RATHORE, J. S. Expression, purification, and functional characterization of atypical xenocin, Its immunity protein, and their domains from *Xenorhabdus nematophila*. **International Journal of Bacteriology**, 2013.

RIBEIRO, C. A. Efeito sobre os hemocitos de insetos do factor citotóxico produzido pela bactéria *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae). Tese (Doutorado), Universidade dos Açores, 2002.

RIBEIRO, P. A. Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos. Dissertação (Conclusão de Curso Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

RODOU, A.; ANKRAH, D. O.; STATHOPOULOS, C. Toxins and secretion systems of *Photorhabdus luminescens*. **Toxins**, v. 2, n. 6, p. 1250-1264, 2010.

RUIU, L. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 52-367, 2015.

SÁENZ, A. A.; LÓPEZ, J. C. N. Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 37, p. 43-47, 2011.

SALVADORI, J. M. Caracterização da patogenicidade de nematoides entomopatogênicos e de bactérias associadas para o controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; BROWN, I.; LEWIS, E. E. Freezing and desiccation tolerance in entomopathogenic nematodes: diversity and correlation of traits. **Journal of Nematology**, v. 46, n. 1, p. 27–34, 2014.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SCHWARTZ, H. T.; ANTOSHECHKIN, I.; STERNBERG, P. W. Applications of high-throughput sequencing to symbiotic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. **Symbiosis**, v. 55, n. 3, p. 111–118, 2011.

STOCK, S. P.; GOODRICH-BLAIR, H. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: the inside out of a mutualistic association. **Symbiosis**, v. 46, p. 65-75, 2008.

STOCK, S. P.; GOODRICH-BLAIR, H. Nematode parasites, pathogens and associated of insects and invertebrates of economic importance. In L. A. Lacey (Ed.), **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, v. 2, n. 12, p. 373-426, 2012.

STOCK, S. P.; HUNT, D. J. Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. **Nematodes as Biocontrol Agentes**, p. 3-43, 2005.

STOCK, S. P.; Diversity, Biology and evolutionary relationships. In: **Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests**. Springer, Cham. p. 3-27, 2015.

SUBRAMANIAN, S.; MUTHULAKSHMI, M. In: Omkar (Ed.) Ecofriendly pest management for food security. **Entomopathogenic nematodes**. p. 368–410, 2016.

OMKAR. **Ecofriendly Pest Management For Food Security**. Elsevier Ltd, 2016.

SUSSMUTH, R.D.; MAINZ, A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 14, p. 3770-3821, 2017.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THALER, J.; BAGHDIGUIAN, S.; BOEMARE, N. Purification and characterization of substances, nematophin and xenorxides. PhD thesis, Simon Fraser University, British symbionts: The inside out of a mutualistic association. **Symbiosis**, v. 46, p. 65–75. 1995.

THALER, J.O.; DUVIC, B.; GIVAUDAN, A. BOEMARE, N. Isolation and entomotoxic properties the entomopathogenic nematode–bacterium-complex *Heterorhabditis megidis*–*Photorhabdus* toward wax moth larvae. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 66, p. 149–155. 1998.

TAILLIEZ, P.; PAGES, S.; GINIBRE, N.; BOEMARE, N. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2805–2818, 2006.

VIDAL, M. L. B. Nematoides entomopatogênicos: agentes promissores no controle biológico de parasitos. Alegre: Caufes, p. 302-305, 2018.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI, A. S. J.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. Passo Fundo: **Embrapa Trigo-Documentos (INFOTEC-A-E)**, p. 1- 38, 2009.

ZUCKERMAN, B. M.; JANSSON, H. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 95–113, 1984.

WATERFIELD, N. R.; CICHE, T.; CLARKE, D. *Photorhabdus* and a host of hosts. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 557–574, 2009.

WATERFIELD, N. R; DABORN, P. J.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Genomic islands in *Photorhabdus*. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 541-554, 2002.

WHALEY, D. N.; V. R. DOWELL.; WANDERLINDER, L. M.; LOMBARD, G. L. Gelatin agar medium for detecting gelatinase production by anaerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 224-229, 1982.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematodes larvae from cultures. **Science**, v. 66, p. 302-303, 1927.

YE, W.; TORRES-BARRAGAN, A.; CARDOZA, Y. J. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), um nematóide entomopatogênico potencial do vermicomposto. **Nematology**, v. 12, n. 1, pág. 121-135, 2010.