

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**Instituto de Ciências Exatas e Biológicas**  
**Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais**

**INFLUÊNCIA DE *Azteca chartifex* (FORMICIDAE) NA MICROBIOTA FOLIAR DE  
*Byrsonima sericea***

**Aluno: Marília Romão Bitar de Brito**

**Orientador: Sérgio Pontes Ribeiro**

**Co-orientador: Leandro Marcio Moreira**

**Ouro Preto/MG**

**Mai 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**Instituto de Ciências Exatas e Biológicas**  
**Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais**

**INFLUÊNCIA DE *AZTECA CHARTIFEX* (FORMICIDAE) NA MICROBIOTA  
FOLIAR DE *BYRSONIMA SERICEA***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção de título de Mestre em Ecologia.**

**Ouro Preto/MG**  
**Mai 2019**

B624i

Bitar, Marília.

Influência de *Azteca chartifex* (Formicidae) na Microbiota Foliar de *Byrsonima sericea* [manuscrito] / Marília Bitar. - 2019.

40f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Pontes Ribeiro.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Moreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais .

CDU: 595.796

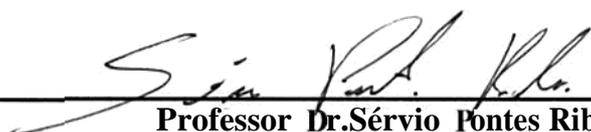
Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

 <p><b>UFOP</b> Universidade Federal de Ouro Preto</p>	<p><b>Ministério da Educação</b>  <b>Universidade Federal de Ouro Preto</b>  <b>Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais</b>  <b>ICEB - Campus — Morro do Cruzeiro</b>  <b>Ouro Preto—MG - CEP 35.400-000</b>  <b>Fone: (031)3559-1747</b>  <b>E-mail: <a href="mailto:biomas@ufop.edu.br">biomas@ufop.edu.br</a></b></p>
---	--

**“Influência de *Azteca chartifex* na microbiota foliar de  
*Byrsonima sericea*.”**

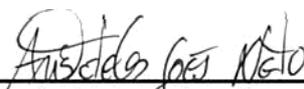
***Autora: Marília Romão Bitar de Brito***

Dissertação defendida e aprovada, em 20 de maio de 2019, pela banca examinadora constituída pelos professores:



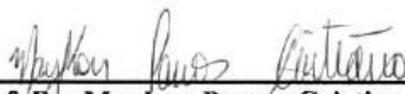

---

**Professor Dr. Sérgio Pontes Ribeiro**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**




---

**Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**




---

**Prof. Dr. Maykon Passos Cristiano**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

*Há uma força extremamente poderosa para a qual a ciência até agora não encontrou uma explicação formal.*

*É uma força que inclui e governa todas as outras, existindo por trás de qualquer fenômeno que opere no universo e que ainda não foi identificada por nós.*

*Esta força universal é o AMOR.*

*Esta força tudo explica e dá SENTIDO à vida!*

*(Trecho da carta de Albert Einstein para a filha Lieserl)*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço à minha família, aos meus pais João e Adelita, e à minha irmã Patrícia, por confiarem em mim com muito carinho, positividade e amor! Vocês são maravilhosos!

Ao meu orientador, Sérgio pelas oportunidades oferecidas, pelos ensinamentos e por falar de Ecologia da forma mais bonita que já vi.

Ao Leandro, que foi um grande professor, obrigada por tudo que me ensinou e por confiar em mim, sou muitíssimo grata a você!

Aos meus grandes amigos, irmãos e professores: Victor, Aline, Fernanda, obrigada por caminharem comigo e por todos os conselhos e ensinamentos.

Ao Laboratório de Ecologia Evolutiva de Insetos de Dossel e Sucessão Natural, e à todos meus amigos irmãos que oportunizaram uma melhor vivência acadêmica. E obrigada por ser família em todos os momentos, foi uma experiência incrível!

Ao LabGiba, por oferecer uma estrutura que possibilitou o desenvolvimento do projeto, e à toda equipe do laboratório pela ajuda, paciência, conselhos e risadas, obrigada meninas! E aos laboratórios do ICEB, aos quais sem a estrutura e a colaboração dos alunos e técnicos, não seria possível desenvolver este trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto, que me permitiu que mais essa etapa fosse concluída. Em especial, ao programa de pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, todos os professores e funcionários.

Ao IEF e Parque Estadual do Rio Doce, por possibilitarem o desenvolvimento do projeto. E a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições. E a todos os amigos de Ouro Preto, com quem eu cruzei o caminho e tive trocas incríveis.

Meu muitíssimo OBRIGADA!

## RESUMO

A interação entre formigas e microrganismos na superfície foliar de plantas hospedeiras é um aspecto negligenciado da ecologia. Há evidências de que a elevada densidade de formigas em um dado habitat foliar pode afetar substancialmente a microbiota, e a relação desta com a planta. A questão fundamental deste trabalho é determinar, ainda que de forma preliminar, até que ponto a microbiota associada a formigas dominantes e abundantes no dossel florestal poderia atuar na inibição de grupos microbianos invasivos e potencialmente entomopatógenos. Para tal, foi verificada a influência das interações entre a formiga *Azteca chartifex*, plantas da espécie *Byrsonima sericea* e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dos corpos das operárias e da superfície das folhas. Um ensaio do efeito inibitório das próprias bactérias e dos compostos extraídos de *A. chartifex* sobre *Xanthomonas citri subsp. Citri* (XAC 306), *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* foi realizado. Em acréscimo, foi verificado o efeito inibitório direto de bactérias mutualísticas associadas ao exoesqueleto das formigas contra bactérias das superfícies foliares de *B. sericea*. Finalmente, foi avaliado se as bactérias mutualísticas com as formigas e com maior potencial inibitório seriam Gram-negativas, devido às vantagens adaptativas das duas membranas deste tipo de bactéria para ocupação de ambientes extremos. Verificamos que os compostos extraídos de *A. chartifex* não tiveram efeito inibitório contra *S. aureus* e *X. citri subsp. Citri*. Ao contrário, os tratamentos contendo o extrato das formigas obtiveram maiores taxas de crescimento destas bactérias. Por outro lado, foi encontrado que bactérias associadas à *A. chartifex* tiveram maior taxa de crescimento sobre bactérias Gram-positivas associadas às folhas de *B. sericeae* que não possuem interação com essas formigas, portanto sugerindo potencial de inibição. Também foi detectado que a maior taxa de crescimento foi de bactérias de formigas provenientes do ninho matriz em relação aos ninhos satélites. Os filos mais representativos dos isolados das formigas foram Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria. Houve maior porcentagem de Gram-negativas nos três grupos de amostras. Portanto, as formigas carregam bactérias capazes de inibir microrganismos exógenos à microbiota associada à *A. chartifex*, bactérias Gram-negativas seriam mais competitivas que Gram-positivas, e há um maior investimento em defesa dentro de colônias onde há maior densidade de indivíduos, que seleciona isolados mais agressivos na inibição de bactérias exógenas ao sistema.

Palavras chaves: Interação inseto-planta-bactéria; Filosfera; Ecologia de microorganismos; extrato antimicrobiano.

## INTRODUÇÃO

Formigas (Hymenoptera: Formicidae) típicas de dosséis florestais ocorrem com populações adensadas e apresentam grande capacidade de proteção territorial (Dejean *et al.*, 2007; Do Espírito Santo *et al.*, 2011). Grandes colônias das espécies dominantes resultam em extenso patrulhamento das folhas das árvores por operárias, o que causa proteção contra o ataque de insetos herbívoros (Dejean *et al.*, 2009), e outros inimigos naturais da planta (Rocha and Bergallo, 1992). As formigas afetam a estrutura e dinâmica de insetos herbívoros nas plantas hospedeiras (Lourenço *et al.*, 2015). Alguns experimentos de exclusão mostraram que elas beneficiam as plantas, reduzindo o ataque de herbívoros. (Cuautle and Rico-Gray, 2003; Fernandes *et al.*, 2005; Alves-Silva, 2014). Em contrapartida, as plantas possuem condições e recursos essenciais para a manutenção das populações de formigas, como nutrientes presentes em nectários florais ou corpos mullerianos, além de naturalmente servir como substrato para a construção do ninho (Heil and Mackey, 2003), numa relação complexa envolvendo custos e benefícios proporcionais aos investimentos da planta hospedeira (Fagundes *et al.* 2017).

Até recentemente, as relações potencialmente mutualísticas entre formigas-árvores têm abordado especialmente os efeitos da presença das formigas sobre os insetos herbívoros. Entretanto, o papel das formigas e seu patrulhamento sobre as folhas na regulação da microbiota foliar, por exemplo, foi até o momento pouco estudado (ver Gonzalés-Teuber *et al.*, 2014).

As folhas forrageadas ou patrulhadas por formigas constituem um micro-habitat para diferentes gêneros de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas e outros microorganismos, sendo as bactérias os organismos mais abundantes e diversificados (Lindow and Brandl, 2003). Algumas comunidades bacterianas em superfícies das folhas contêm mais de 78 espécies, podendo representar 37 gêneros (Beattie and Lindow, 1999). Essas bactérias podem ser endofíticas, que se estabelecem no interior da planta, ou epifíticas, que vivem na superfície dos órgãos e tecidas vegetais (Azevedo, 1998). As endofíticas podem auxiliar no crescimento da planta por meio da produção de hormônios de crescimento, fixação de nitrogênio e produção de enzimas hidrolíticas associadas a

processos metabólicos da planta (Mirza *et al.*, 2001). Esses microrganismos também são responsáveis pela produção de compostos secundários que podem apresentar função de antibacterianos e antifúngicos, o que os tornam interessantes para o uso medicinal (Glick, 2010), agrônomo e ambiental (Beattie and Lindow, 1999), mas que num contexto ecológico podem ser fundamentais para a homeostasia do sistema vegetal.

Os microrganismos epifíticos habitam as partes aéreas das plantas, denominadas de filosfera, e podem chegar à superfície das folhas carreados por insetos, excreção de origem animal, intemperes ou mesmo associados a sementes (Whipps *et al.*, 2008). A filosfera está exposta às flutuações de temperatura, umidade relativa do ar e fontes limitantes de nutrientes para os microorganismos (Lindow and Brandl, 2003), que também são limitados pela liberação de compostos orgânicos voláteis através das folhas, como dióxido de carbono, acetona, moléculas de terpenóides, aldeídos, álcoois e grandes cadeias de hidrocarbonetos (Whipps *et al.*, 2008). Além disso, a disponibilidade de açúcares na filosfera controla o tamanho da população bacteriana (Mercier and Lindow, 2000).

Portanto, o estabelecimento de microrganismos na filosfera depende das propriedades físico-químicas da superfície foliar, das características abióticas (Whipps *et al.*, 2008; Mercier and Lindow, 2000), do metabolismo energético e secundário das plantas (Müller and Riederer, 2005) e da própria capacidade de colonização das bactérias (Felestrino *et al.*, 2017). Como exemplo, a alta incidência de radiação solar sobre as folhas pode estar relacionada com a ocorrência já registrada de bactérias pigmentadas (Jacobs and Sundin, 2001). Além disso, espécies de bactérias que modificam as características foliares podem facilitar a colonização de outras espécies (Beattie and Lindow, 1999). Um processo claro de facilitação deste processo é exemplificado por bactérias que produzem biosurfactantes, a fim de diminuir a tensão superficial das cutículas, aumentando desta forma a disponibilidade de água na superfície foliar (Schreiber *et al.*, 2005).

Estes fatores bióticos e abióticos estruturam as comunidades bacterianas presentes nas plantas como um todo. Contudo, cada espécie hospedeira é caracterizada por uma microbiota distinta. Lambais *et al.* (2006), analisaram a diversidade de bactérias em dosséis da Mata Atlântica, e observaram que as comunidades bacterianas de diferentes espécies de árvores de uma mesma floresta foram altamente diferenciadas, com apenas 0,5% das espécies de bactérias em comum entre quatro espécies de plantas investigadas.

No que se refere à interação tritrófica, a microbiota da planta também pode mediar as interações entre planta e artrópodes (Bonte *et al.*, 2010; Biere and Tack, 2013). Bactérias da filosfera podem influenciar a escolha de herbívoros especialistas, induzindo a susceptibilidade da planta ao ataque (Humphrey *et al.*, 2014). Müller *et al.* (2003) mostraram que larvas lepidópteras podem afetar a diversidade bacteriana na superfície de folhas de faia e de carvalho. Por outro lado, a planta pode recrutar entomopatogênicos, através da produção de compostos secundários, para agir contra herbívoros (Cory and Ericson, 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre como a presença de formigas modifica a composição das comunidades bacterianas epifíticas das superfícies das folhas. Um dos poucos estudos existentes indicou que a presença de *Pseudomyrmex ferrugineous* nas copas de *Acacia hindisii*, diminui a ocorrência de bactérias patogênicas na filosfera (González-Teuber *et al.* 2014), revelando que pode haver uma interação entre inseto, planta e microorganismos (Biere and Tack, 2013; Müller *et al.*, 2003). Nesse caso, as formigas diminuíram a presença de microorganismos potencialmente fitopatogênicos, resultando assim na defesa da planta. No caso particular de *A. hindisii* e *P. ferrugineous*, a formiga defender a planta de doenças beneficia sua própria colônia, uma vez que a árvore fornece espaços ociosos para a ocupação desta espécie numa relação de mutualismo obrigatório.

No entanto, a elevada densidade populacional de espécies arbóreas de formigas e a alta similaridade genética das operárias impõe aumento do risco de eventos de adoecimento da colônia. A chamada seleção dependente de frequência e densidade (Axelrod and Hamilton, 1981) não teria como causar aumento de variabilidade genética em um superorganismo com uma mesma origem genética, como é o caso de uma colônia. Ainda assim, não há registros na literatura de contaminação e morte de colônias por qualquer tipo de adoecimento. Devido à própria organização social em colônia das formigas, a propagação de bactérias patogênicas pode ser facilitada (Baer and Schmid-Hempel, 1999; Schmid-Hempel, 1998). Portanto, esse aparente paradoxo só se resolve se houver um arsenal de mecanismos de imunidade coletiva extremamente eficiente, que iria da produção de compostos antimicrobianos até a manipulação da microbiota do ambiente (Cremer *et al.* 2007; Vannette *et al.* 2017)

Formigas possuem uma variedade de glândulas responsáveis por diferentes secreções que auxiliam principalmente na comunicação entre os indivíduos e na proteção contra patógenos (Attygale and Morgan, 1984). A glândula metapleurale nas formigas

cortadeiras, por exemplo, libera substâncias antissépticas que protegem a superfície corporal e o ninho contra microrganismos (Maschwitz *et al.* 1970). Em formigas da subfamília Dolichoderinae, as glândulas de Pavan e Pygidial são responsáveis pela produção de compostos usados na comunicação e defesa (Wilson and Pavan, 1959).

Estes sinais químicos deixados por elas também possuem o efeito de repelir herbívoros (Offenberg, 2014). Em um estudo realizado por Offenberg *et al.* (2004) foi observado que besouros herbívoros preferiram se alimentar de folhas que não tiveram contato com formigas do que aquelas que foram patrulhadas por elas. Além disso, folhas tratadas com macerado feito de operárias de *Azteca instabilis* foram menos consumidas do que em folhas patrulhadas pelas formigas (Gonthier, 2012). Do Nascimento *et al.* (1998), utilizaram colônias de *Azteca bicolor* e *A. chartifex* e observaram que a glândula pygidial presentes nelas secreta substâncias com características antifúngicas, antibacterianas e que repelem insetos.

Formigas interagem com diversos microrganismos presentes nos ambientes em que habitam (de La Fuente and Marquis, 1999; Heil *et al.* 2002; Gonzáles-Teuber *et al.* 2014). Cada espécie de formiga tem sua própria microbiota, a qual varia entre castas e com o ambiente que as rodeiam (Ishak *et al.*, 2011, Kellner *et al.*, 2015; Lucas *et al.*, 2017). A composição dessas comunidades bacterianas associadas à organismos sociais tem particular importância na compreensão de hábitos comportamentais e no risco de propagação de doenças (Wilson, 1975). Sendo assim, formigas seriam capazes de moldar e manter suas bactérias mutualísticas (Fernández-Marín *et al.*, 2009; Kellner *et al.*, 2015).

Bactérias podem inibir ou matar competidores e invasores no seu território de forma direta, através da competição por interferência, liberando toxinas ou antibióticos que criam zonas inóspitas para os competidores (Stubbendieck and Straight, 2016). Contudo, acredita-se que, em uma comunidade bacteriana, a seleção natural pode ter favorecido a especialização a fim de reduzir conflitos bioquímicos e melhorar a capacidade de coexistência das espécies (Johnson *et al.*, 2012). Como consequência dessa especialização funcional, as células bacterianas adotaram novas estratégias de crescimento, o que afetaria as interações entre elas e com o ambiente (Stubbendieck *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos adaptativos das bactérias que afetam tanto o potencial de invasibilidade de ambientes quanto a competitividade, está a sofisticada e complexa

membrana que as protegem (Silhavy *et al.*, 2010). As variações no tipo e composição dessas membranas separam esses organismos procarióticos em dois grupos principais: Gram-positivo e Gram-negativo, baseados nas características de retenção de coloração por suas membranas (Gram, 1884; Stanier *et al.*, 1976). Bactérias Gram-positivas são limitadas por uma membrana simples e geralmente contém uma camada de peptidoglicano relativamente grossa (Gupta, 2011). As bactérias Gram-negativas são cercadas por duas membranas diferentes, sendo que no compartimento periplasmático entre a membrana interior e a membrana exterior, contém uma fina camada de peptidoglicano (Stanier, 1976, Sutcliffe, 2010). Diversos estudos discutem como e quais pressões seletivas contribuíram para a evolução destes dois grupos (Nikaido, 1989; Davies, 1994; Gupta, 1998; Gupta, 2011). Do ponto de vista ecológico, esses dois grupos podem ser considerados guildas, as quais se separam pela maior resistência a condições adversas e maior capacidade competitiva das Gram-negativas (Kramer and Gleixner, 2008; De Vries and Shade, 2013; Schwechheimer *et al.*, 2013).

Contudo, neste trabalho investigamos, ainda que de forma primária, até onde a presença de formigas dominantes em um mesmo local no dossel florestal, teria uma participação efetiva de uma microbiota mutualística. Atuando na inibição de grupos microbianos invasivos e potencialmente entomopatógenos. Para isso testamos as seguintes hipóteses: 1) Os corpos das operárias de *A. chartifex* produzem compostos antimicrobianos, seja através de bactérias simbiontes ou por meio de suas glândulas; 2) A presença de *A. chartifex* forrageando nas folhas de *B. sericea* pode alterar a composição bacteriana na superfície das folhas, controlando que espécies coexistiriam com a planta-formiga em local de intensa visitação por operárias; 3) As bactérias Gram-negativas são mais resistentes, devido às vantagens adaptativas das duas membranas na sua estrutura.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Verificar a influência das interações entre a formiga da espécie *Azteca chartifex* (Formicidae: Dolichoderinae), plantas da espécie *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae) e bactérias Gram-positivas e negativas presentes na filosfera e no exoesqueleto das operárias.

### **Objetivos específicos:**

- Testar o efeito inibitório das próprias bactérias e dos compostos extraídos de *A. chartifex* sobre *Xanthomonas citri subsp. citri* (XAC306), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.
- Testar o efeito inibitório direto de bactérias mutualísticas associadas ao exoesqueleto das formigas contra bactérias das superfícies foliares de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae).
- Verificar se as bactérias mutualísticas com as formigas e com maior poder de inibição seriam Gram-negativas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Área de estudo:**

O Parque Estadual do Rio Doce – PERD (19°45' S 42°38' W) é uma das maiores reservas de Mata Atlântica do Brasil com uma área de 35.970 ha. Segundo a classificação de Köppen, clima é tropical sazonal, do tipo Aw, e a altitude varia de 236 m a 515m com precipitação média de 1.350mm a 1900 mm (Alvares *et al.*, 2013). O parque possui o maior sistema lacustre da região Neotropical sendo composto por aproximadamente 40 lagoas naturais que ocupam cerca de 11% de sua área.

Este trabalho foi realizado com indivíduos de *Byrsonima sericea* que ocorrem na orla dessas lagoas. Essa espécie é dominante neste ambiente (Dos Reis Barbosa, 2014) e importante na estruturação do habitat ecotonal de florestas e lagos, tendo sua fauna de insetos associados suficientemente conhecida (Campos *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008).

### **Espécies estudadas:**

#### ***Azteca chartifex.***

O gênero *Azteca* (Formicidae: Dolichoderinae) ocorre em toda região Neotropical, desde o México até o norte da Argentina (Benson and Harada, 1988) são habitantes especializadas em plantas mimercófitas e exibem uma variedade de tipos de ninhos, incluindo o ninho de “cartão” (Longino, 2007). *Azteca* sp. geralmente são dominantes no

mosaico de espécies de formigas presentes na mesma árvore (Leston, 1978), devido ao seu comportamento agressivo em defender seu território são capazes de dominar o dossel (Do Espírito Santo *et al.*, 2011). *Azteca chartifex* (Formicidae: Dolichoderinae) é uma espécie territorialista e dominante pertencente a um grupo estritamente neotropical de formigas arborícolas (Longino, 2007). Constroem seus ninhos a base de celulose e fibras processadas, podendo abrigar milhares de indivíduos (Baccaro *et al.*, 2015).

### ***Byrsonima sericea***

*Byrsonima sericea* DC. é uma árvore da família Malpighiaceae encontrada frequentemente em Campo Rupestre, Cerrado (*latu sensu*), Matas de Galeria, Floresta de Terra Firme, Floresta Ombrófila e Restinga (Mamede *et al.*, 2015). Essa espécie, nativa do Brasil, é muito comum em ambientes de transição floresta-água, como em áreas de restinga (Sacramento *et al.*, 2007) e florestas ripárias (Lorenzi, 2000).

O padrão de crescimento de *B. sericea* no ecótono floresta-lago indica que essa espécie inclina sua copa na direção das lagoas em busca de luz, formando uma estrutura de copa horizontal (Dos Reis Barbosa, 2014). Essa condição específica formada pelo “dossel dobrado” para a beira das lagoas aumenta as taxas de insolação e dessecação das copas, tornando as copas dobradas sobre a água habitats extremos para insetos, semelhantes ao dossel superior (Campos *et al.*, 2006; Ribeiro and Basset 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Lourenço *et al.* 2019).

### **Isolamento das bactérias das folhas**

Durante a estação chuvosa (Dezembro de 2017) foram coletadas folhas de 10 indivíduos de *B. sericeae* com ninhos de *A. chartifex* e folhas de 10 indivíduos sem ninhos, separadas aproximadamente 10 metros uma da outra. As folhas foram coletadas utilizando luvas e armazenadas em tubos falcon, ambos estéreis, e assim levadas para o Laboratório de Genômica e Interação Bactéria-Ambiente (LabGiba), na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Um swab estéril foi passado em média 5 x sobre a superfície adaxial e abaxial de cada folha e depois foi passado para placas de Petri de 90x15 mm, contendo meio LB ágar (sólido) e 0,03 mg/L do fungicida tiofenato, propício para o crescimento de

bactérias. As placas foram incubadas em B.O.D. em uma temperatura de 28°C durante 48 horas.

As bactérias, de diferentes morfotipos e cores, que desenvolveram melhor crescimento foram repicadas em novas placas de Petri de mesmas dimensões e condições. Uma vez certificado o isolamento, tais isolados foram colocados para crescer em tubos tipo eppendorfs de 1,5 mL de volume contendo meio LB líquido e depois que foram incubados em B.O.D. por 48 horas. Após este período, glicerol foi adicionado a uma concentração final de 30% e armazenadas em freezer.

### **Isolamento das bactérias das formigas**

Foram coletados ninhos satélites e um pedaço do ninho matriz de *A. chartifex*, utilizando um facão estéril, durante a estação chuvosa (Abril de 2018). As amostras foram armazenadas em baldes estéreis e levados para o LabGiba, na UFOP. Em placas de Petri de 90x15 mm, contendo meio LB ágar (sólido), foram introduzidas até 10 operárias vivas para andar sobre o meio de enriquecimento e depois incubadas em B.O.D. com 28°C por 48 horas. Todas as etapas de certificação do isolamento e conservação foram idênticos aos descritos no item anterior.

### **Placa Matriz**

Para realizar os ensaios envolvendo as bactérias isoladas das formigas, montou-se uma placa matriz, com a finalidade de otimizar a inoculação das bactérias, de tal maneira que todas elas fossem inoculadas ao mesmo tempo. Foram inseridos 200 µL de isolados das formigas em cada poço, após crescidos em meio LB líquido durante 48 horas. Assim, as bactérias das formigas foram inseridas em duplicata na placa de 96 poços, separando de forma esquemática as bactérias de formigas de ninhos satélites e as do ninho matriz, da seguinte forma (Figura 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FT1	FT2	FT3	FT4	FT5	FT6	FT1	FT2	FT3	FT4	FT5	FT6
B	FT7	FT8	FT9	FT2.1	FT2.2	FT2.3	FT7	FT8	FT9	FT2.1	FT2.2	FT2.3
C	FT2.4	FT2.5	FT2.6	FT2.7	FT2.8	FT2.9	FT2.4	FT2.5	FT2.6	FT2.7	FT2.8	FT2.9
D	FT2.10	FT2.11	FT2.14	F2.1	F2.2	F2.3	FT2.10	FT2.11	FT2.14	F2.1	F2.2	F2.3
E	F2.6	F2.8	F2.9	F2.10	F2.11	F2.12	F2.6	F2.7	F2.9	F2.10	F2.11	F2.12
F	F2.13	F2.15	F2'.1	F2'.2	F2'.3	F2'.4	F2.13	F2.15	F2'.1	F2'.2	F2'.3	F2'.4
G	F2'.5	F2'.6	F2'.7	F2'.8	F2'.9	F2'.10	F2'.5	F2'.6	F2'.7	F2'.8	F2'.9	F2'.10
H	F2'.11	F2'.12	F2'.13	F2'.14	F2'.15	C	F2'.11	F2'.12	F2'.13	F2'.14	F2'.15	C

Figura 1. Esquema da placa de 96 poços contendo as bactérias das formigas em duplicata. FT= bactérias isoladas de formigas de ninhos satélites; F= bactérias isoladas de formigas do ninho matriz; C= Controle (somente o meio LB líquido).

### **Ensaio de inibição direta *in vitro*: Bactérias das formigas versus Bactérias patogênicas**

O ensaio foi realizado utilizando *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Xanthomonas citri subsp. citri* (XAC 306). Optamos por testar duas situações hipotéticas: a inibição de um fitopatógeno, *X. citri*, que seria uma possibilidade evolutiva caso a defesa da planta hospedeira fosse benéfica às formigas; inibição de dois outros patógenos humanos, na perspectiva de que esses compostos tenham ação genérica sobre microrganismos invasores e potencialmente patogênicos.

Para cada bactéria foi inoculado 10 µL com uma O.D. de 0,5 e espalhadas com uma alça de drigalski em uma placa de Petri grande (150x15 mm), contendo meio LB sólido. Depois que o “tapete” da cultura bacteriana estava seco, os isolados das formigas, presentes na placa matriz, foram inoculados sobre o alvo por meio de um multi-inoculador de colônias. As placas foram incubadas em B.O.D. com 28°C por 48 horas. Após isto, foi analisado se houve halos de inibição.

## Extração de substâncias antibióticas das formigas

Diferentes quantidades de formigas (50, 100, 150) foram submersas em cinco mL de álcool 95% e deixados durante 24 e 48 horas (Penick *et al.*, 2018). Depois, o álcool foi filtrado em um microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}$  e transferido 1 mL para microtubos tipo eppendorfs. Os microtubos foram deixados abertos em temperatura ambiente e após 72 horas o álcool foi evaporado, restando a substância extraída das formigas. Utilizando uma pipeta, estas substâncias foram ressuspensas com 200  $\mu\text{L}$  de água autoclavada, de uma forma repetitiva com o objetivo de solubilizar toda a substância retida no fundo do eppendorf.

## Ensaio de inibição utilizando os compostos das formigas

O teste foi realizado contra *Staphylococcus aureus* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC 306). Em uma placa de 96 poços, foi colocado na primeira coluna as soluções controle (somente o meio LB líquido) e nas demais colunas foram colocados os tratamentos em diferentes diluições e concentrações (Figura 2). As bactérias foram padronizadas em um nível de absorvância O.D. de 0,5.

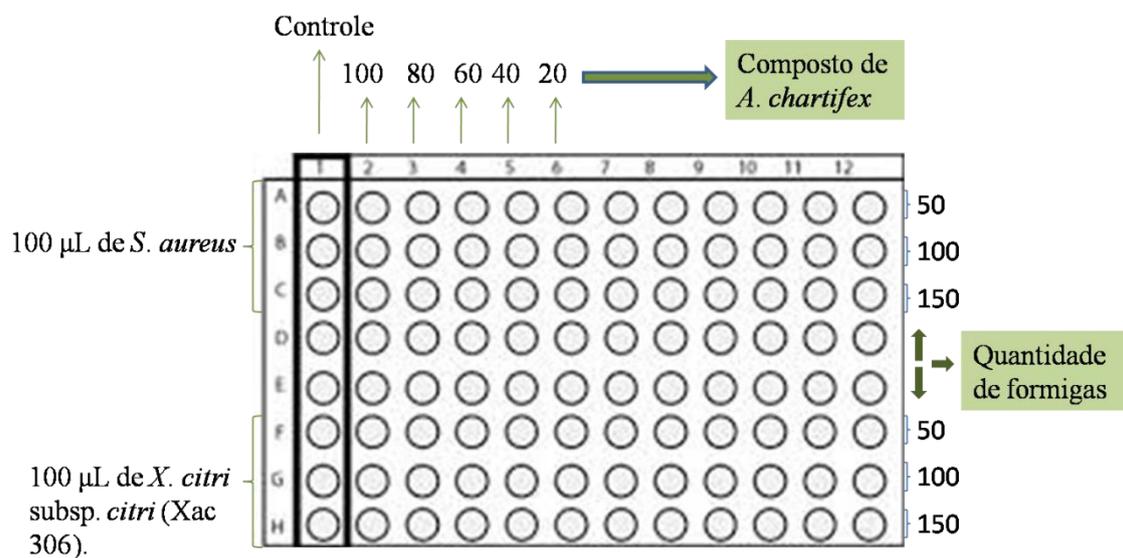


Figura 2. Esquema do teste de inibição em uma placa de 96 poços.

Foram feitas leituras no espectrofotômetro, com 24 e 48 horas e depois a análise dos dados, em OD de 600 nm para verificar o crescimento bacteriano.

## **Teste de Gram**

O teste de coloração de Gram das bactérias das formigas e das bactérias das folhas consistiu inicialmente no esfregado de 5 µL das culturas bacterianas em uma lâmina que, em seguida, foram flambadas, com o objetivo de fixar as amostras à lâmina. O procedimento foi realizado na sequência dos seguintes reagentes: cristal violeta (10 s), retirada do reagente, lugol (10 s), água destilada, lavagem rápida álcool-acetona, fucsina (10 s) e última lavagem com água destilada e observada ao microscópio com aumento de 400 e 1000X.

## **Ensaio de inibição direta *in vitro*: Bactérias das formigas x Bactérias das folhas**

O teste foi feito em uma placa de Petri (150x15 mm), tendo como alvos os isolados das folhas de árvores com formiga e os isolados de folhas de árvores sem formigas. Após o crescimento de cada isolado, foi inoculado 10 µL na placa contendo meio LB ágar (sólido) e feito o espalhamento utilizando uma alça drigalski. Os isolados das formigas, presentes na placa matriz, foram inoculados sobre cada “tapete” das bactérias alvo, por meio de um multi-inoculador de colônias. Posteriormente, as placas foram colocadas em B.O.D. com 28°C por 48 horas. Após o crescimento das bactérias, cada experimento foi fotografado e através das fotos foram analisadas as áreas de crescimento das bactérias das formigas. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Foram selecionadas um total de 60 placas que obtiveram crescimento similar nas duplicatas. A área de crescimento das bactérias das formigas foi calculada separadamente em dois grupos: bactérias isoladas de formigas de ninhos satélites e bactérias isoladas de formigas do ninho matriz. O cálculo foi feito através da proporção da área coberta em relação à área da placa, ou seja, a ocupação da área da placa com a substituição do tapete original de bactérias foliares foi a medida de inibição aqui adotada. A medida foi feita utilizando um papel transparente marcado com pontos milimetrados. Esse método permite um maior número de medições por tempo. Para certificar a eficiência deste método, algumas amostras tiveram a área de crescimento exata calculadas pelo programa ImageJ, e assim os valores foram comparados.

## **Extração do DNA e amplificação da região 16S**

Para identificação dos gêneros de bactérias, foram selecionados ao acaso, portanto proporcionalmente à frequência, os isolados quanto ao morfotipo da sua colônia. Desses, foi possível extrair DNA de 37 isolados de formigas e 12 da filosfera. A técnica usada para a extração do DNA dos isolados bacterianos foi descrita por Queipo-Ortuño *et al.* (2008) e Diana *et al.* (2012). Um volume de 1,5 mL de meio líquido contendo células bacterianas, crescidas durante a noite, foram centrifugadas a 15000 x g por 15 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de água ultra pura, e centrifugado em 15000 x g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuscitado em 40 µL de água ultra pura, e assim as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 min e logo depois foram colocadas no freezer a -20°C por 10 min. Depois foram centrifugadas a 15000 x g por 20 s, e retirado o sobrenadante contendo o DNA genômico.

Os isolados foram submetidos a reações de PCR, foram utilizados oligonucleotídeos complexos compostos por: sequência forward 5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3' e reverse 5' CCGTCAATTYYTTTRAGTTT 3' para amplificar a região V4 – V5 (Fouhy *et al.*, 2016). Para cada amostra foi usado 3 µL do Buffer +MgCl<sup>2</sup> (10 x), 1,13 µL de dNTP (10 mM), 4,5 µL dos primers forward (10 pM) e reverse (10 pM), 0,48 µL de Taq (5U/µl), 1 µL do DNA genômico em uma concentração de 20 ng/µL e 15,36 µL de água Mili-q. A amplificação foi submetida à um ciclo inicial de 5 minutos por 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 57 °C, 1 minuto a 72°C, e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. As reações foram realizadas em termociclador Biocycler® e as regiões de DNA amplificadas foram analisadas em gel de agarose 0,8%, utilizando 5 µl do produto de PCR para verificação da qualidade. As amostras com bandas inespecíficas foram submetidas ao corte do fragmento desejado, e depois purificadas usando o Kit Invitex, seguindo instruções do fabricante. As amostras purificadas e as que apresentaram banda única foram enviadas para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), na Universidade Estadual Paulista (UNESP). As sequências de DNA foram analisadas utilizando a plataforma the Ribosomal Database Project (RDP), através da ferramenta Sequence Match (Garrity *et al.*, 2001).

### **Análises estatísticas:**

Para testar o efeito de inibição dos compostos das formigas, foi realizado Modelos Lineares Generalizados (GLM). O crescimento das bactérias, medido pela absorbância, foi a variável dependente e os tratamentos, sendo as diferentes diluições e concentrações foram considerados variáveis explicativas. Foi realizado um teste para saber se houve diferença entre as espécies de bactérias, e se a diluição e concentração dos compostos afetou o crescimento das mesmas.

Para o teste de inibição direta das bactérias das formigas sobre as bactérias da superfície foliar, foi realizado um GLM, tendo como variável dependente o crescimento total das bactérias das formigas, em resposta a serem as bactérias foliares provenientes de plantas com ou sem ninhos e forrageamento de *A. chartifex*. O efeito das bactérias de formigas sobre as foliares também foi testado contra o tipo de membrana das bactérias alvo. Para analisar as proporções de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, isoladas da superfície de folhas de indivíduos com presença e ausência de ninhos e isoladas dos corpos das formigas, foi feito um teste qui-quadrado.

Todas as análises estatísticas utilizando GLM foram feitas com auxílio do software R (R Development Team, 2017), e o teste qui-quadrado foi feito utilizando o Microsoft Office Excel, com nível de significância de 0,05.

## **RESULTADOS**

### **Número de isolados obtidos**

Foram obtidos 85 isolados bacterianos a partir das folhas de *B. sericeae* com ninhos de *A. chartifex* e 60 isolados bacterianos a partir das folhas de indivíduos sem ninhos. E quanto às bactérias do exoesqueleto das formigas, houve um total de 47 isolados.

### **Teste de inibição direta in vitro: Bactérias das formigas versus Bactérias patogênicas**

No experimento entre as bactérias das formigas contra *Xanthomonas citri subsp. citri* (XAC 306) houve pequenos halos de inibição (Figura 3A). Não houve qualquer inibição contra *S. epidermidis* e *S. aureus* (Figura 3B; Figura 3C).

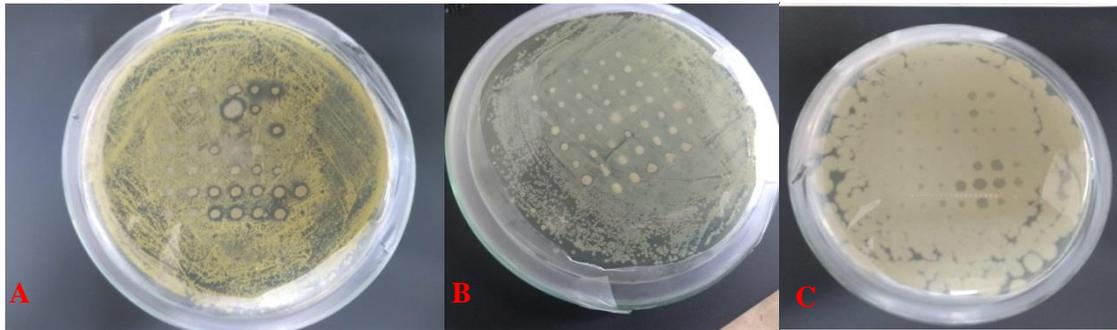


Figura 3. Teste de inibição direta. (A) *Xanthomonas citri subsp. citri* (XAC 306); (B) *Staphylococcus epidermidis*; (C) *Staphylococcus aureus*.

### Ensaio de inibição utilizando os compostos das formigas

O composto extraído em diferentes quantidades de formigas não afetou o crescimento das colônias de *Staphylococcus aureus* e *Xanthomonas citri subsp. citri*, sendo que análise entre absorbância e concentração dos compostos não foi significativo (GLM;  $F_{1,58} = 0.034$ ,  $p = 0.85$ ). A diluição dos compostos também não afetou o crescimento das bactérias (GLM;  $F_{1,58} = 3.07$ ,  $p = 0.08$ ). A análise de absorbância entre *S. aureus* e *X. citri* (XAC 306) não foi significativo (GLM;  $F_{1,58} = 17.53$ ,  $p = 0.97$ ), mostrando que o efeito do composto foi o mesmo para as duas espécies de bactérias. De fato, os valores de O.D foram maiores para as bactérias tratadas com o composto das formigas (GLM;  $F_{1,56} = 31.39$ ,  $p < 0.01$ ), sugerindo que este composto não apresenta efeito inibitório sobre os isolados testados (Figura 4).

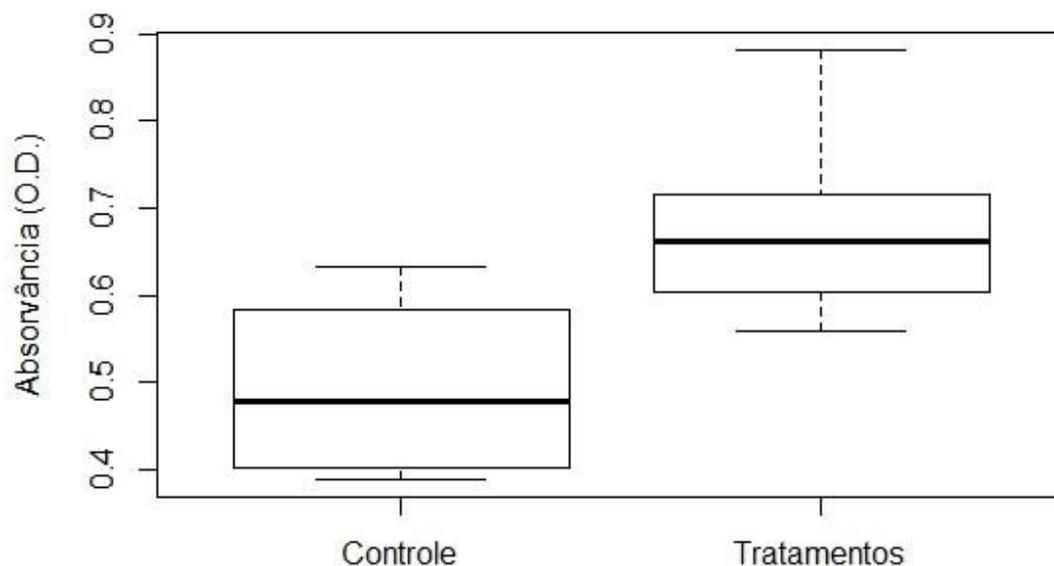


Figura 4. Valores de absorvância entre o controle e os tratamentos. Os tratamentos possuem diferentes diluições e concentrações.

### Identificação morfológica das bactérias

As bactérias foram identificadas de acordo com o teste Gram, e assim foi realizado uma análise das proporções de Gram-positivas e Gram-negativas em cada grupo de isolados. Seja para bactérias provenientes de folhas de árvores com ninhos de *A. chartifex*, sem ninhos de *A. chartifex* e para a microbiota associada à *A. chartifex* predominaram Gram-negativas, porém de forma mais acentuada nas folhas com formigas e nos exoesqueletos destas (Figura 5;  $\chi^2 = 18.521$ ,  $p < 0.05$ ).

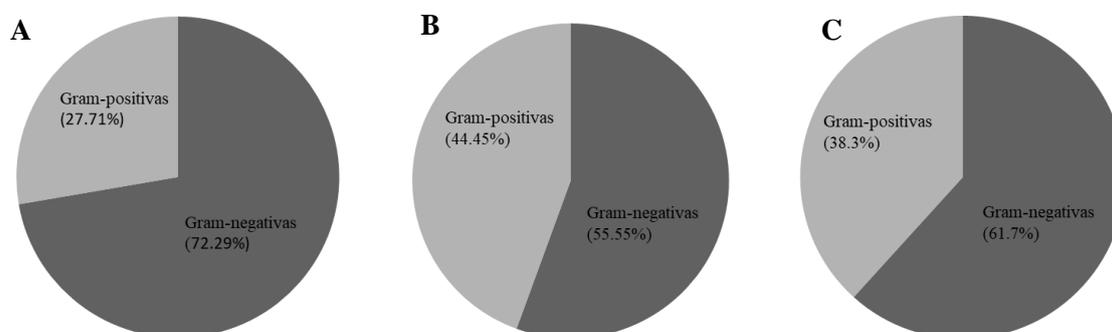


Figura 5. Proporção de Gram-positivas e Gram-negativas. (A) Em 85 isolados de folhas de árvores com formigas. (B) Em 60 isolados de folhas de árvores sem formigas e (C) em 47 isolados das formigas.

### Ensaio de inibição direta in vitro: Bactérias das formigas versus Bactérias das folhas

As bactérias associadas às formigas cresceram mais sobre isolados alvos provenientes de árvores que não eram visitadas por *A. chartifex* (GLM;  $F_{1,58} = 15.21$ ,  $p < 0.01$ ). Embora, numa análise global não tenha havido diferenças significativas na inibição de Gram – ou + (GLM;  $F_{1,57} = 0.13$ ,  $p < 0.7$ ), na análise de interações de fatores, em isolados de folhas de árvores sem ninhos, as bactérias das formigas apresentaram maior crescimento sobre bactérias Gram-positivas, e o inverso para as árvores com forrageamento de *A. chartifex* (GLM;  $F_{1,56} = 4.92$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 6).

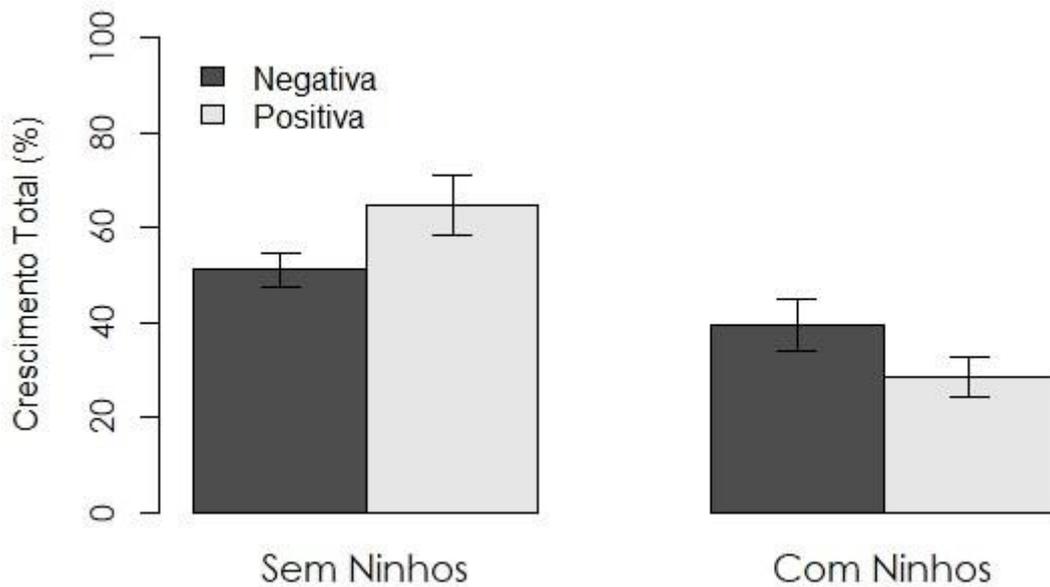


Figura 6. Crescimento total das bactérias das formigas sobre alvos isolados de folhas de árvores sem ninhos e com ninhos de *A. chartifex*. As bactérias alvo estão separadas em Gram-positivas e Gram-negativas. Para o crescimento sobre alvos de árvores sem ninhos (média= 56.5; ep=3.50) e para alvos de árvores com ninhos (média= 36.145; ep= 4.048).

Tabela 1. Valores de máximo, mínimo e médio para o crescimento total das bactérias das formigas, crescimento das bactérias das formigas de ninhos satélites (N1) e crescimento das bactérias das formigas do ninho matriz (N2).

	Crescimento Total (%)	Crescimento N1 (%)	Crescimento N2 (%)
<b>Máximo</b>	81.39	30.950	77.70
<b>Mínimo</b>	10.14	1.230	5.79
<b>Média</b>	46.09	11.645	31.82

O crescimento das bactérias das formigas do ninho matriz apresentou maiores valores quando comparados ao crescimento das bactérias provindas de ninhos satélites (Tabela 1, Figura 7).

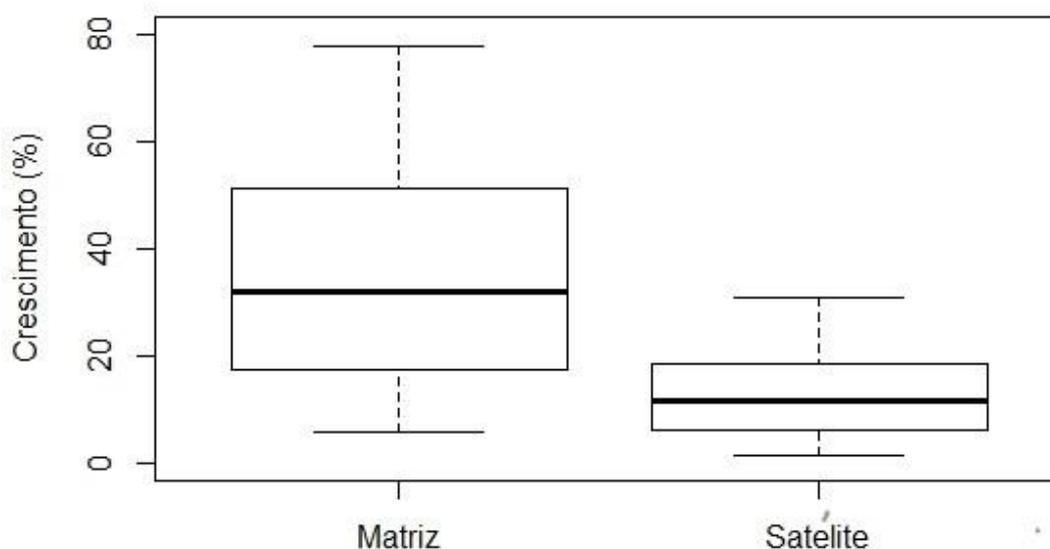


Figura 7. Comparação entre os valores de crescimento das bactérias das formigas de ninhos satélites e crescimento das bactérias das formigas do ninho matriz. Para ninhos satélites (média= 12.62; dp= 6.90; ep= 0.89) e para o ninho matriz (média= 34.24; dp= 18.35; ep= 2.37).

### **Análise da distribuição dos gêneros de bactérias associados às formigas e à filosfera**

Dos isolados identificados, estão presentes em maiores quantidades os gêneros *Enterobacter* (Proteobacteria), seguido por *Staphylococcus* (Firmicutes) e *Curtobacterium* (Actinobacteria). Outros gêneros pertencentes aos filos Proteobacteria (*Buchnera*, *Pantoea*, *Rodhocyclales*), Firmicutes (*Bacillus* e *Streptococcus*) e Actinobacteria (*Microbacterium* e *Streptomyces*) estão presentes em menores quantidades dentro da técnica cultivável utilizada neste estudo. A maioria das bactérias isoladas e identificadas do corpo das formigas eram Gram-negativa, dos gêneros *Enterobacter* e *Pantoea* (Figura 7). As bactérias da filosfera de ambos conjuntos de folhas eram na maioria Gram-positivas.

Duas das bactérias Gram-negativas associadas às formigas se fazem presentes na microbiota de folhas comumente patrulhadas por elas: *Enterobacter* sp1. (51% dos isolados dos corpos de formigas), e *Pantoea* sp1. (10.8% dos isolados dos corpos de formigas). Esses gêneros passam a compor aproximadamente 30% das bactérias dominantes identificadas nas folhas com formigas, estando ausentes das folhas sem patrulhamento das formigas (Figura 8).

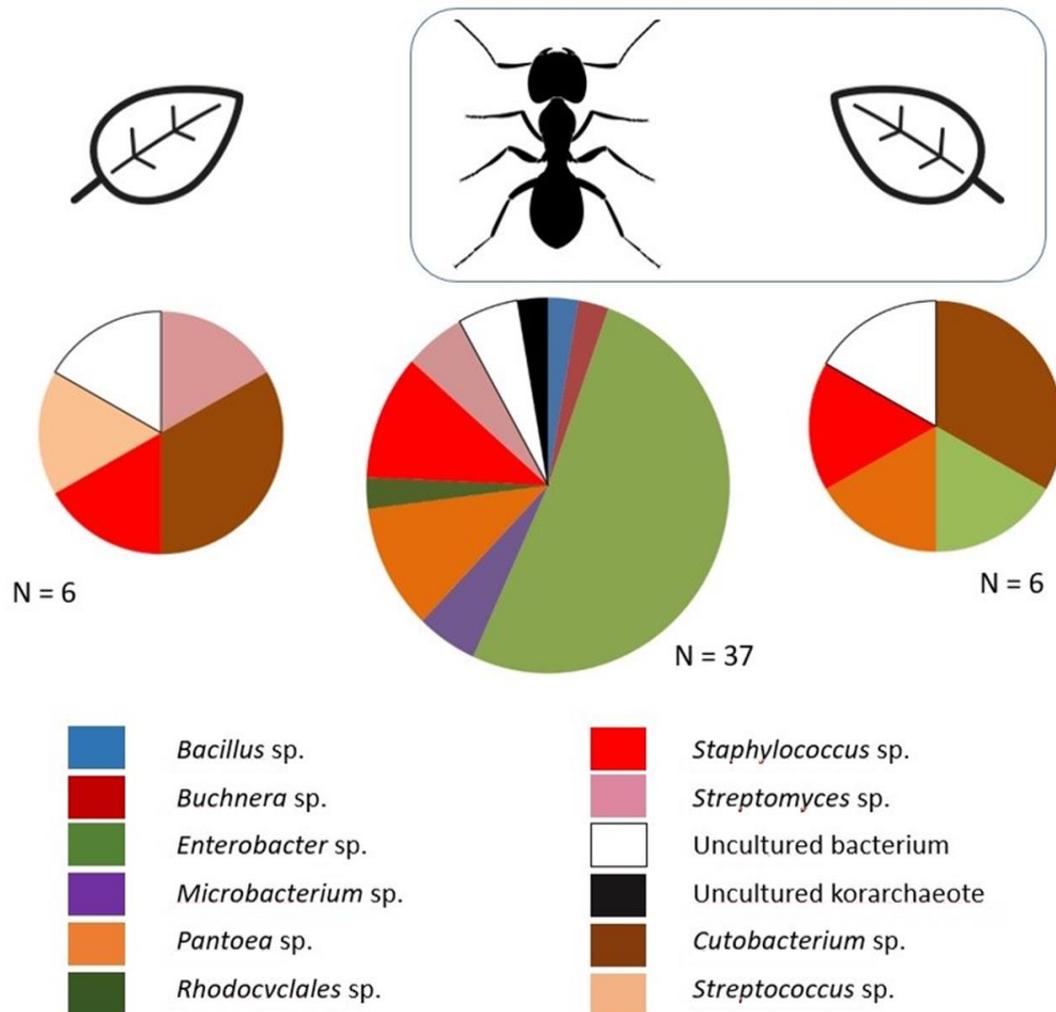


Figura 8. Identificação dos gêneros dos isolados bacterianos: de folhas sem formigas (N=6), das formigas (N=37) e de folhas com formigas (N=6).

Por outro lado, a presença das formigas se deu em folhas onde não se registrou *Streptomyces* e *Streptococcus* em quantidades relevantes, enquanto que nas folhas sem patrulhamento de formigas essas bactérias corresponderam a 30% dos isolados obtidos. Por outro lado, a capacidade inibitória das bactérias de formigas crescendo sobre as colônias dessas bactérias foliares foi relativamente baixa, não se podendo atribuir a inexistência dessas das folhas patrulhadas a uma ação das Gram-negativas das formigas (Tabela 2).

Finalmente, observou-se uma discrepância da capacidade inibitória das bactérias Gram- de formigas sobre duas bactérias dominantes da filosfera: *Cutobacterium* sp1. e *Staphylococcus* sp1. Tanto nas folhas patrulhadas quanto nas sem formigas, esses dois gêneros corresponderam a 50% dos isolados. No entanto, os isolados correspondente aos

mesmos gêneros das folhas sem formigas, foram as que sofreram maiores taxas de inibição quando expostas ao crescimento das Gram- dos corpos das formigas. Ao contrário, essas mesmas bactérias nas folhas com formigas sofreram as menores taxas inibitórias, sugerindo que hajam isolados resistentes à presença das bactérias entomofílicas.

Tabela 2. Identificação dos gêneros e tipo de membrana dos isolados alvos, provindos das folhas, e maiores e menores valores da taxa de crescimento das bactérias das formigas sobre estes alvos. Com 6 isolados de folhas com formigas (C) e 6 isolados de folhas sem formigas (S).

Isolado alvo	Gênero	Tipo de membrana	Taxa de crescimento (%)
C10.4	uncultured bacterium		79.41
C10.7	<i>Enterobacter</i> sp.	G-	73.19
C10.2	<i>Pantoea</i> sp.	G-	69.41
C1'.2	<i>Curtobacterium</i> sp.	G+	12.63
C5.5	<i>Curtobacterium</i> sp.	G+	12.04
C2.2	<i>Staphylococcus</i> sp.	G+	10.14
S8.6	<i>Curtobacterium</i> sp.	G+	81.39
S2.2	<i>Staphylococcus</i> sp.	G+	81.08
S8.8	<i>Curtobacterium</i> sp.	G+	78.4
S3.3	uncultured bacterium		33.33
S4.3	<i>Streptomyces</i> sp.	G+	20.93
S3.4	<i>Streptococcus</i> sp.	G+	14.1

## DISCUSSÃO

A habilidade que as formigas possuem em colonizar diversos nichos e explorar uma grande diversidade de recursos (Wilson and Kinne, 1990), pode ter conduzido à seleção de um forte sistema imunológico, direcionado pela constante exposição à microorganismos associados aos seus recursos (Schulenburg *et al.*, 2008). Neste trabalho,

vimos que as bactérias das formigas não inibiram diretamente *S. epidermidis* e *S. aureus*, mas obtiveram pequenos halos de inibição contra o fitopatógeno *X. citri subsp. citri*. Verificamos que os compostos extraídos de *A. chartifex* não tiveram efeito inibitório contra *S. aureus* e *X. citri subsp. citri*, pelo contrário, os tratamentos que tinham o extrato das formigas obtiveram maiores taxas de crescimento destas bactérias. Isto pode ser explicado por diversos fatores, dentre eles pode ser sugerido que alguns insetos tenham desenvolvido atividades antimicrobianas específicas e induzidos após exposição ao patógeno. Konrad *et al.* (2012) demonstrou que *Lasius neglectus* desenvolve antifúngicos após a exposição de operárias ao fungo *Metarhizium anisopliae*. Nesse caso, além da defesa ser induzida, se dá como estímulo de um microrganismo que é um patógeno natural de formigas. Existe, porém exemplos de outros insetos sociais capazes de produzir defesas contra patógenos exógenos à sua ecologia, como o cupim *Reticulitermes flavipes* que produz compostos que inibem o crescimento de alguns patógenos humanos (Zeng *et al.* 2016). No entanto, esses compostos só são produzidos depois que os cupins se alimentam de células mortas dessas bactérias.

Insetos sociais evoluíram uma variedade de defesas contra patógenos, porém não exclusivamente químicas (Stow *et al.*, 2010). Penick *et al.* (2018) mostrou que 40% de 20 espécies de formigas estudadas não produzem compostos capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Outra solução, formigas hospedam uma diversidade de microorganismos endosimbiontes que investem em produtos antibióticos. Certas espécies de formigas se tornam “hotspots” de diversidade microbiológica, enquanto outras abrigam poucos microrganismos simbiotes (Russel *et al.*, 2017). Independentemente do número total de espécies associado à uma dada espécie de formiga, é extremamente importante que essas tenham uma associação mutualística específica, como em *Polyrhachis*, que apresentam endobactérias específicas capazes de inibir a invasão de espécies potencialmente patógenas (Ramalho *et al.* 2017). Wernegreen *et al.* (2009) descrevem um sistema de elevada especificidade entre espécies de bactérias do gênero *Blochmannia*, e espécies de formigas da Tribo Camponotini. Essas bactérias também têm potencial de proteção contra patógenos, mas o mais interessante é que as formigas são colonizadas por elas através de trofobiose com insetos sugadores, seus hospedeiros primários. Apesar do grande número de estudos sobre endobactérias de formigas, pouco se sabe sobre o papel mutualístico da microbiota associada ao exoesqueleto desses insetos.

Nesse trabalho, bactérias associadas à *A. chartifex* tiveram maior taxa de crescimento sobre o tapete de bactérias Gram-positivas associadas às folhas de *B. sericeae* que não possuem interação com essas formigas, isto é, provenientes de árvores sem ninhos de *A. chartifex*. Essa foi a situação na qual as bactérias das formigas cresceram mais rápido, exaurindo a disponibilidade de nutrientes e, portanto, eliminando de maneira mais eficiente a espécie foliar previamente cultivada. As predições que são concomitantemente corroboradas aqui é de que as formigas carregam bactérias capazes de inibir microrganismos exógenos à microbiota associada à *A. chartifex*, e que bactérias Gram-negativas seriam mais competitivas que Gram-positivas. O sucesso de crescimento das bactérias das formigas foi definido pela maioria dos isolados que eram Gram-negativos. Esse efeito inibitório foi muito mais efetivo sobre as bactérias foliares exógenas ao sistema *A. chartifex* – *B. sericea*, sendo que a expansão sobre Gram-positivas provenientes de folhas que são visitadas pelas formigas foi apenas a metade daquela observada para bactérias vindas de folhas que não são visitadas. Bactérias Gram-negativas geralmente apresentam menor sensibilidade ao meio em que vivem do que bactérias Gram-positivas (Nikaido, 1989; Spratt, 1994), devido à sua membrana externa que as protegem ao excluir moléculas tóxicas e fornecer um envelope estável para a célula (Silhavy *et al.*, 2010). Esta membrana externa faz com que exista um espaço intermembranar, onde estão localizadas enzimas envolvidas na inativação de antibióticos (Davies, 1994; Nikaido, 2003). Sendo assim, acredita-se que os antibióticos exerceram uma pressão de seleção para a evolução de bactérias com duas membranas, o que concede às Gram-negativas maior resistência e capacidade invasiva (Gupta, 2011).

Na análise das proporções de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas realizada neste estudo, houve maior porcentagem de Gram-negativas nos três grupos de amostras. Estas bactérias são amplamente estudadas na interação com plantas, pois são mais fáceis de serem manejadas, isoladas e passíveis de abordagens genéticas (Francis *et al.*, 2010). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas são mais comuns em assembleias do que as Gram-negativas (Frey-Klett *et al.*, 2007), o que pode explicar as menores proporções de Gram-positivas nas amostras. Alguns estudos usam a relação GP/GN para compreender a estrutura da comunidade biológica de diversos ambiente (Denef *et al.*, 2009; Robroek, 2015). Zhang (2008) apontou que diferentes valores da relação GP/GN podem indicar efeitos da aplicação de inseticida na comunidade microbiológica da filosfera, realçando que a abundância destes dois grupos pode estar relacionada com

diferentes fatores externos (Sundin and Jacobs, 1999; Jacobs and Sundin, 2001). Neste estudo foi visto que a presença de *A. chartifex* forrageando nas folhas de *B. sericea* pode alterar as proporções de GP e GN na superfície das folhas.

Em acréscimo, houve maior taxa de crescimento das bactérias de formigas provenientes do ninho matriz em relação às dos ninhos satélites. O maior investimento em defesa dentro de colônias, onde se concentra maiores grupos de indivíduos e de forma constante, certamente seleciona cepas mais agressivas na inibição de bactérias exógenas ao sistema. Lucas *et al.* (2017) encontrou resultados similares estudando microbiota de colônia de *Azteca trigona* e solos próximos. Uma relação de maior capacidade de defesa mutualística associada à alta agregação de indivíduos de uma espécie foi observado até para espécies não sociais. Turnbull *et al.* (2011) apontou que o tamanho da colônia de algumas espécies da ordem Thysanoptera está relacionado com o potencial dos antimicrobianos produzidos pelos indivíduos. Além disso, estratégias de defesa mais agressiva entorno do ninho matriz confere maior proteção da rainha, garantindo sua sobrevivência e a adaptabilidade da colônia.

Na identificação dos isolados bacterianos provenientes do exoesqueleto das formigas, foram encontrados em maiores quantidades os filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria. Esse dado também foi encontrado por Lucas *et al.* (2017) em *Azteca trigona* e por Eilmus and Heil (2009) ao estudar a microbiota de *Pseudormymex ferruginous*, uma formiga mirmecófita. Um estudo envolvendo *Allomerus* e *Tetraponera*, dois gêneros de formigas também simbioses de plantas, foi encontrado mais de 75% de Proteobacterias no microbioma culticular (Seipke *et al.*, 2013). E em *Liometopum apiculatum*, do gênero Dolichoderinae, foi encontrado o domínio de Proteobacteria em formigas adultas e Firmicutes na fase larval (González-Escobar *et al.*, 2018). A presença de Actinobacterias pode ser uma estratégia, desenvolvida por muitos insetos sociais, na produção de antimicrobianos para deter infecções (Fernández-Marin *et al.*, 2009) Neste estudo, o gênero mais representativo nos isolados das formigas foi *Enterobacter* sp. (Proteobacteria), também encontrado na filosfera de folhas forrageadas por formigas. González-Teuber *et al.* (2014), mostrou que a ocorrência de bactérias da família Enterobacteriaceae na superfície de folhas, foi significativamente afetado pela presença de formigas. Insetos atuam como vetores de bactérias que normalmente ocorrem na filosfera, podendo mediar a composição da comunidade bacteriana (Griffin and Carson, 2015). Já foi visto que a presença da agressiva *Azteca sericeasur*, altera a composição da

microbiota de flores do cafeeiro (Vannette *et al.*, 2017). Sendo assim, é possível que *A. chartifex* altere a composição da filosfera de *B. sericea*, o que torna necessária a identificação da comunidade bacteriana através da metagenômica, para que esta conclusão seja aprofundada.

Bactérias do gênero *Curtobacterium* foram encontradas nas amostras de folhas de árvores com e sem formigas. Estas bactérias são Gram-positivas e obrigatoriamente aeróbicas, pertencentes ao filo Actinobacteria (Evtushenko and Takeuchi, 2006). O habitat de *Curtobacterium* é geralmente descrito em associação com plantas e ocorre principalmente na filosfera (Behrendt *et al.*, 2002; Matulich *et al.*, 2015). No ensaio de interação entre as bactérias das formigas e das folhas, as maiores taxas de crescimento foram sobre bactérias deste gênero, isoladas de folhas sem formigas. Em contrapartida, as bactérias das formigas obtiveram menores taxas de crescimento sobre *Curtobacterium* sp., isoladas de folhas forrageadas pelas formigas. Portanto, podemos inferir que há uma relação de coexistência entre bactérias provenientes das formigas e os isolados de *Curtobacterium* sp., um gênero comum à filosfera, provenientes de folhas que já tiveram contato com *A. chartifex*.

Neste trabalho vimos que as formigas carregam bactérias capazes de inibir microorganismos exógenos à microbiota associada a *A. chartifex*. As bactérias Gram-negativas seriam mais competitivas que as Gram-positivas. Há um maior investimento em defesa dentro de colônias com maior densidade de indivíduos, que seleciona cepas mais agressivas na inibição de bactérias exógenas no sistema. Estudos que abordam interações entre formiga, bactéria e filosfera são necessários para compreender como estas microbiotas se estabelecem, tornando-se importante a realização da metagenômica para a identificação mais aprofundada das comunidades.

## REFERÊNCIAS

Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D., and Kemen, E. M. 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biology*, 14(1), e1002352.

Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., de Moraes, G., Leonardo, J., and Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711-728.

Alves-Silva, E., Bächtold, A., Barônio, G. J., Torezan-Silingardi, H. M., and Del-Claro, K. 2014. Ant-herbivore interactions in an extrafloral nectaried plant: are ants good plant guards against curculionid beetles?. *Journal of natural history*, 49(13-14), 841-851.

Azevedo, J. L. Microrganismos endofíticos. 1998. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137.

Attygalle, A. B., and Morgan, E. D. 1984. Chemicals from the glands of ants. *Chem. Soc. Rev.* 13:245-278.

Axelrod, R., Hamilton, W. D. 1981. The evolution of cooperation. *science*, 211(4489), 1390-1396.

Baccaro, F. B., Feitosa, R. M., Fernández, F., Fernandes, I. O., Izzo, T. J., Souza, J. L., and Solar, R. 2015. Guia para os gêneros de formigas do Brasil. *Manaus: Editora INPA*, 388.

Baer, B. and P. Schmid-Hempel, 1999. Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature* 397: 151–154.

Beattie, G. A., and S. E. Lindow. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89:353-359.

Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., and Suzuki, K. I. 2002. Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5), 1441-1454.

Benson, W.W. and Harada, A.Y. 1988. Local diversity of tropical and temperate ant faunas (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Amaz.* 18: 275-289.

Biere, A., and Tack, A. J. 2013. Evolutionary adaptation in three-way interactions between plants, microbes and arthropods. *Functional Ecology*, 27(3), 646-660.

Bonte, D., De Roissart, A., Vandegheuchte, M. L., Ballhorn, D. J., Van Leeuwen, T., and de la Peña, E. 2010. Local adaptation of aboveground herbivores towards plant phenotypes induced by soil biota. *PLoS One*, 5(6), e11174.

Campos, R. I., Vasconcelos, H. L., Ribeiro, S. P., Neves, F. S., and Soares, J. P. 2006. Relationship between tree size and insect assemblages associated with *Anadenanthera macrocarpa*. *Ecography*, 29(3), 442-450.

Cory, J. S., and Ericsson, J. D. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *BioControl*, 55(1), 75-88.

Cremer, S., Armitage, S. A., and Schmid-Hempel, P. 2007. Social immunity. *Current biology*, 17(16), R693-R702.

Cuautle, M. and Rico-Gray, V. 2003. The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Funct Ecol.* 17:417-423.

Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264(5157), 375-382.

Dejean, A., Kenne, M., and Moreau, C. S. (2007). Predatory abilities favour the success of the invasive ant *Pheidole megacephala* in an introduced area. *Journal of Applied Entomology*, 131(9-10), 625-629.

Dejean A, Grangier J, Leroy C, Orivel J. 2009. Predation and aggressiveness in host plant protection: a generalization using ants from the genus *Azteca*. *Naturwissenschaften.* 96:57-63.

Denef, K., Roobroeck, D., Wadu, M. C. M., Lootens, P., and Boeckx, P. 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 144-153.

De Vries, F. T., and Shade, A. 2013. Controls on soil microbial community stability under climate change. *Frontiers in microbiology*, 4, 265.

Diana, J. E., Pui, C. F., and Son, R. 2012. Enumeration of Salmonella spp., Salmonella Typhi and Salmonella Typhimurium in fruit juices. *International Food Research Journal*, 19(1), 51.

Do Nascimento, R. R., Billen, J., Sant'ana, A. E. G., Morgan, E. D., and Harada, A. Y. 1998. Pygidial gland of *Azteca* nr. *bicolor* and *Azteca chartifex*: Morphology and chemical identification of volatile components. *Journal of chemical ecology*, 24(10), 1629-1637.

Do Espírito Santo, N. B., Ribeiro, S. P., and Santos Lopes, J. F. 2011. Evidence of competition between two canopy ant species: is aggressive behavior innate or shaped by a competitive environment?. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.

Dos Reis Barbosa, C. Z., de Mendonça, M. S., and Rodrigues, R. S. (2014). Seedling morphology of three sympatric savanna species of *Byrsonima*: First evidence of cryptogeal germination in Malpighiaceae and an overlooked seedling type in eudicots. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(8), 401-407.

Eilmus, S., and Heil, M. 2009. Bacterial associates of arboreal ants and their putative functions in an obligate ant-plant mutualism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(13), 4324-4332.

Evtushenko, L. I., and Takeuchi, M. 2006. The family microbacteriaceae. *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, 1020-1098.

Fagundes, R., Dáttilo, W., Ribeiro, S. P., Rico-Gray, V., Jordano, P., and Del-Claro, K. 2017. Differences among ant species in plant protection are related to production of extrafloral nectar and degree of leaf herbivory. *Biological Journal of the Linnean Society*, 122(1), 71-83.

Felestrino, É. B., Santiago, I. F., Freitas, L. D. S., Rosa, L. H., Ribeiro, S. P., and Moreira, L. M. 2017. Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. *Frontiers in microbiology*, 8, 172.

Fernandes, G.W., Fagundes M, Greco M.K.B, Barbeitos M.S, Santos J.C. 2005. Ants and their effects on an insect herbivore community association with the inflorescences of *Byrsonima crassifolia* (Linnaeus) H.B.K. (Malpighiaceae). *Rev. Bras. Entomol.* 49, 264–269.

Fernández-Marín, H., Zimmerman, J. K., Nash, D. R., Boomsma, J. J., and Wcislo, W. T. 2009. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb-2009.

Fouhy, F., Clooney, A. G., Stanton, C., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. 2016. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC microbiology*, 16(1), 123.

Francis, I., Holsters, M., and Vereecke, D. 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1-12.

Frey-Klett, P., Garbaye, J. A., and Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New phytologist*, 176(1), 22-36.

Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M., and Tiedje, J. M. 2001. The RDP-II (ribosomal database project). *Nucleic Acids Res*, 29(1), 173174.

Glick, B. R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*. Vol. 28, 367–374.

Gonthier, D. J. 2012. Do herbivores eavesdrop on ant chemical communication to avoid predation?. *PloS one*, 7(1), e28703.

González-Escobar, J. L., Grajales-Lagunes, A., Smoliński, A., Chagolla-López, A., De León-Rodríguez, A., and De La Rosa, A. P. B. 2018. Microbiota of edible *Liometopum apiculatum* ant larvae reveals potential functions related to their nutritional value. *Food Research International*.

González-Teuber, M., Kaltenpoth, M., and Boland, W. 2014. Mutualistic ants as an indirect defence against leaf pathogens. *New Phytologist*, 202(2), 640-650.

Griffin, E. A., and Carson, W. P. 2015. The ecology and natural history of foliar bacteria with a focus on tropical forests and agroecosystems. *The Botanical Review*, 81(2), 105-149.

Gupta, R. S. 1998. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1435-1491.

Gupta, R. S. 2011. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(2), 171-182.

Gram, C. 1884. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.

Heil, M., Baumann, B., Andary, C., Linsenmair, E. K., and McKey, D. 2002. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften*, 89(11), 519-524.

Heil, M., and McKey, D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 425-553.

Humphrey, P. T., Nguyen, T. T., Villalobos, M. M., and Whiteman, N. K. 2014. Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Molecular Ecology*, 23(6), 1497-1515.

Ishak, H. D., Plowes, R., Sen, R., Kellner, K., Meyer, E., Estrada, D. A., and Mueller, U. G. 2011. Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. *Microbial Ecology*, 61(4), 821-831.

Jacobs, J. L., and G. W. Sundin. 2001. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5488-5496.

Johnson, D. R., Goldschmidt, F., Lilja, E. E., and Ackermann, M. 2012. Metabolic specialization and the assembly of microbial communities. *The ISME journal*, 6(11), 1985.

Kellner, K., Ishak, H. D., Linksvayer, T. A., and Mueller, U. G. 2015. Bacterial community composition and diversity in an ancestral ant fungus symbiosis. *FEMS microbiology ecology*, 91(7), fiv073.

Konrad, M., Vyleta, M. L., Theis, F. J., Stock, M., Tragust, S., Klatt, M., and Cremer, S. 2012. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. *PLoS biology*, 10(4), e1001300.

Kramer, C., and Gleixner, G. 2008. Soil organic matter in soil depth profiles: distinct carbon preferences of microbial groups during carbon transformation. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(2), 425-433.

Lambais, M.R., Crowley D.E., Cury J.C., Büll R.C. and Rodrigues R.R. 2006. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. *Science* 312: 1917.

- Leston, D. 1978. A neotropical ant mosaic. *Annals of the Entomological Society of America*, 71(4), 649-653.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69. 2003, pp. 1875-1883.
- Lucas, J., Bill, B., Stevenson, B., and Kaspari, M. 2017. The microbiome of the ant-built home: the microbial communities of a tropical arboreal ant and its nest. *Ecosphere*, 8(2).
- Longino, J. T. 2007. A taxonomic review of the genus *Azteca* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica and a global revision of the aurita group. Longwood, FL: Magnolia Press.
- Lorenzi H. 2000. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Lourenço, G. M., Campos, R. B., and Ribeiro, S. P. 2015. Spatial distribution of insect guilds in a tropical montane rainforest: effects of canopy structure and numerically dominant ants. *Arthropod-Plant Interactions*, 9(2), 163-174.
- Lourenço, G. M., Soares, G. R., Santos, T. P., Dáttilo, W., Freitas, A. V., and Ribeiro, S. P. 2019. Equal but different: Natural ecotones are dissimilar to anthropic edges. *PLoS one*, 14(3), e0213008.
- Mamede, M. C. H., Amorim, A. M., Sebastiani, R., Almeida, R. F., and Francener, A. 2015. Malpighiaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Accessed at [http://www. Flora do brasil. jbrj. gov. br/jabot/floradobrasil/FB155](http://www.Flora do brasil. jbrj. gov. br/jabot/floradobrasil/FB155), 4.
- Maschwitz U, Koob K, Schildknecht H. 1970. Ein Beitrag zur Funktion der Metathoracaldrüse der Ameise. *J Insect Physiol* 16:387–404.
- Matulich, K. L., and Martiny, J. B. 2015. Microbial composition alters the response of litter decomposition to environmental change. *Ecology*, 96(1), 154-163.
- Mercier, J., and S. E. Lindow. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369–374.

- Mirza, M. S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., et al. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil* 237, 47–54.
- Müller, T., Müller, M., Behrendt, U., and Stadler, B. 2003. Diversity of culturable phyllosphere bacteria on beech and oak: the effects of lepidopterous larvae. *Microbiological research*, 158(4), 291-297.
- Müller, C., and Riederer, M. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of chemical ecology*, 31(11), 2621-2651.
- Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(11), 1831.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.
- Offenberg, J., Nielsen, M. G., MacIntosh, D. J., Havanon, S., and Aksornkoae, S. 2004. Evidence that insect herbivores are deterred by ant pheromones. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(suppl\_6), S433-S435.
- Offenberg, J. 2014. Pest repelling properties of ant pheromones. *IOBC-WPRS Bulletin*, 99, 173-176.
- Penick, C. A., Halawani, O., Pearson, B., Mathews, S., López-Urbe, M. M., Dunn, R. R., and Smith, A. A. 2018. External immunity in ant societies: sociality and colony size do not predict investment in antimicrobials. *Royal Society open science*, 5(2), 171332.
- Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D. D., Macias, M., Bravo, M. J., and Morata, P. 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15(2), 293-296.
- R Development Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. <https://doi/3-900051-07-0>.

Ramalho, M. O., Bueno, O. C., and Moreau, C. S. 2017. Microbial composition of spiny ants (Hymenoptera: Formicidae: Polyrhachis) across their geographic range. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 96.

Reichenbach, T., Mobilia, M., and Frey, E. 2007. Mobility promotes and jeopardizes biodiversity in rock–paper–scissors games. *Nature*, 448(7157), 1046.

Ribeiro, S.P. and Y. Basset. 2007. Gall-forming and free-feeding herbivory along vertical gradients in a lowland tropical rainforest: the importance of leaf sclerophylly. *Ecography* 30: 663-672.

Ribeiro, S.P., Soares, J.P., Campos, R.I., and Martins, R.P. 2008. Insect herbivores species associated to pioneer tree species: contrasting within forest and ecotone canopy habitats. *Revista Brasileira de Zoociências*, vol. 10, pp. 237–248.

Robroek, B. J., Jassey, V. E., Kox, M. A., Berendsen, R. L., Mills, R. T., Cécillon, L., and Bodelier, P. L. 2015. Peatland vascular plant functional types affect methane dynamics by altering microbial community structure. *Journal of Ecology*, 103(4), 925-934.

Rocha, C. F. D., and Bergallo, H. G. 1992. Bigger ant colonies reduce herbivory and herbivore residence time on leaves of an ant-plant: *Azteca muelleri* vs. *Coelomera ruficornis* on *Cecropia pachystachya*. *Oecologia*, 91(2), 249-252.

Russell, J. A., Sanders, J. G., and Moreau, C. S. 2017. Hotspots for symbiosis: function, evolution, and specificity of ant-microbe associations from trunk to tips of the ant phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 24, 43-69.

Sacramento A.C., Zickel C.S. and Almeida Jr. E.B. 2007. Aspectos florísticos da vegetação de restinga no litoral de Pernambuco. *Revista Árvore*, 31: 1121-1130.

Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in Social Insects*. Princeton University Press. New Jersey. 409 pp.

Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y., and Siva-Jothy, M. T. 2008. Introduction. *ecological immunology*.

Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. and Kroppenstedt, R.M. 2005. Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol* 166, 589–594.

Seipke, R. F., Barke, J., Heavens, D., Yu, D. W., and Hutchings, M. I. 2013. Analysis of the bacterial communities associated with two ant–plant symbioses. *MicrobiologyOpen*, 2(2), 276-283.

Silhavy, T. J., Kahne, D., and Walker, S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a000414.

Spratt, B. G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 264(5157), 388-393.

Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., and Ingraham, J. L. 1976. *The Microbial World*. Prentice Hall. *Inc. New Jersey* p276.

Stubbendieck, R. M., and Straight, P. D. 2016. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *Journal of bacteriology*, 198(16), 2145-2155.

Stubbendieck, R. M., Vargas-Bautista, C., and Straight, P. D. 2016. Bacterial communities: interactions to scale. *Frontiers in microbiology*, 7, 1234.

Sundin, G. W., and Jacobs, J. L. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaeae* L.). *Microbial Ecology*, 38(1), 27-38.

Sutcliffe, I. C. 2010. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends in microbiology*, 18(10), 464-470.

Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., and Kuehn, M. J. 2013. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 52(18), 3031-3040.

Stow, A., Turnbull, C., Gillings, M., Smith, S., Holley, M., Silberbauer, L., and Beattie, A. 2010. Differential antimicrobial activity in response to the entomopathogenic fungus *Cordyceps* in six Australian bee species. *Australian journal of entomology*, 49(2), 145-149.

Turnbull, C., Hoggard, S., Gillings, M., Palmer, C., Stow, A., Beattie, D., and Beattie, A. 2010. Antimicrobial strength increases with group size: implications for social evolution. *Biology letters*, 7(2), 249-252.

Vannette, R. L., Bichier, P., and Philpott, S. M. 2017. The presence of aggressive ants is associated with fewer insect visits to and altered microbe communities in coffee flowers. *Basic and applied ecology*, 20, 62-74.

Wernegreen, J. J., Kauppinen, S. N., Brady, S. G., and Ward, P. S. 2009. One nutritional symbiosis begat another: phylogenetic evidence that the ant tribe Camponotini acquired *Blochmannia* by tending sap-feeding insects. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 292.

Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., Bending GD. 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* 105:1744–55.

Wilson, E. O., and Pavan, M. 1959. Glandular sources and specificity of some chemical releasers of social behavior in dolichoderine ants. *Psyche* 66:70-76.

Wilson E. O. 1975. *Sociobiology: the new synthesis*. Cambridge, MA: Belknap.

Wilson, E. O., and Kinne, O. 1990. *Success and dominance in ecosystems: the case of the social insects* (Vol. 2, pp. I-XXI). Oldendorf/Luhe: Ecology Institute.

Zeng, Y., Hu, X. P., and Suh, S. J. 2016. Characterization of antibacterial activities of eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*, against human pathogens. *PloS one*, 11(9), e0162249.

Zhang, B., Zhang, H., Bo, J. I. N., Ling, T. A. N. G., Jianzhou, Y. A. N. G., Baoju, L. I., and Zhihui, B. A. I. 2008. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 20(11), 1356-1362.