

**THAÍS ANDRADE VIANA**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO ORAL A PARTÍCULAS POLUIDORAS E À BACTÉRIA  
GENETICAMENTE MODIFICADA *Serratia* AS1 EM *Partamona helleri***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins  
Coorientadora: Maria Augusta Lima Siqueira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V614e  
2022  
Viana, Thaís Andrade, 1992-  
Efeito da exposição oral a partículas poluidoras e à bactéria  
geneticamente modificada *Serratia AS1* em *Partamona helleri* /  
Thaís Andrade Viana. – Viçosa, MG, 2022.  
1 tese eletrônica (75 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Entomologia, 2022.

Referências bibliográficas: f.23-35.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.601>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bactérias gram-negativas. 2. Abelhas sem ferrão -  
Genética. 3. Dióxido de titânio. 4. Microplásticos. 5. Animais  
transgênicos. 6. Poliestireno expandido. 7. Polietileno tereftalato.  
I. Martins, Gustavo Ferreira, 1980-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de  
Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 632.32

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

**THAÍS ANDRADE VIANA**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO ORAL A PARTÍCULAS POLUIDORAS E À BACTÉRIA  
GENETICAMENTE MODIFICADA *Serratia* AS1 EM *Partamona helleri***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2022.

Assentimento:



---

Thaís Andrade Viana  
Autora



---

Gustavo Ferreira Martins  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Programa de Pós-graduação em Entomologia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) por financiarem a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Gustavo Ferreira Martins e minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Maria Augusta Lima Siqueira, pela orientação, confiança, disponibilidade, conselhos e contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Wagner Faria Barbosa, Dr. Rodrigo Cupertino Bernardes e principalmente à mestra Lorena Lisbetd Botina Jojoa por todo apoio, dedicação, parceria e auxílio no decorrer do trabalho. Aprendi muito com vocês!

Ao Laboratório BIOTAN da UFV, principalmente à pós-doc Juliana Soares da Silva por todo apoio e cooperação durante os experimentos realizados.

Ao Laboratório de Abelhas e Vespas da UFV e ao Laboratório de Imunovirologia pela disponibilidade de equipamentos.

Ao Laboratório Microscopia Eletrônica de Varredura da UFV, ao Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV, ao Laboratório de Sistemática Molecular da UFV pela disponibilidade dos microscópios.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da UFV e aos companheiros de trabalho, principalmente à Dr.<sup>a</sup> Renata Barbosa, Dr.<sup>a</sup> Raquel Marques Godoy e Dr.<sup>a</sup> Gisele Amaro Teixeira pela cooperação, amizade, conselhos e por nunca medirem esforços para me auxiliar na execução do trabalho quando necessitava.

À todas as pesquisadoras que viraram mãe pela determinação ao enfrentarem todas as responsabilidades e pelo empoderamento feminino na ciência. “Lugar de mãe é onde ela quiser, e o nosso é na Ciência.”

Agradeço imensamente a Deus, por mais um sonho concedido e realizado.

Aos meus pais, Claudeth Maria de Andrade e Gilmar Sales Viana por toda dedicação parental. Aos meus irmãos Kelly Letícia e João Augusto por todo carinho e apoio. Aos meus sobrinhos Asaph e Sarah que cada vez mais me enchem de alegria. Ao apoio e reconhecimento de toda família Andrade, principalmente ao meu avô Mário César (*in*

*memorian*) que me inspirou a amar e respeitar as plantas e os animais, assim como sempre me estimulou ser questionadora, curiosa, estudiosa e esforçada.

Ao meu noivo e companheiro Fernando Henrique de Lima por me apoiar, me incentivar, me valorizar e sempre me fazer seguir em frente. Você me inspira a ser uma pessoa cada dia melhor!

À minha princesa Liah, que renova minhas forças e me ilumina todos os dias, que nem imagina a felicidade que me traz. Eu amo você!

Às minhas amigas Laura Nascimento e Luana Bersan e aos meus amigos irmãos Marco Aurélio e Adalberto Rocha, por me fornecer apoio, amizade e amor nessa nossa jornada.

A todos que acompanharam essa conquista, sou eternamente grata!!

## RESUMO

VIANA, Thaís Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Efeitos da exposição oral a partículas poluidoras e à bactéria geneticamente modificada *Serratia* AS1 em *Partamona helleri*.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientadora: Maria Augusta Lima Siqueira.

As avaliações de risco englobam a identificação e a análise dos riscos aos quais um organismo pode estar exposto. Essas avaliações contribuem para a elaboração e a adoção de estratégias para evitar, minimizar e enfrentar riscos. Estudos sobre os potenciais riscos da exposição às partículas poluidoras e a organismos geneticamente modificados em insetos polinizadores são escassos. Considerando que os polinizadores vêm sendo bastante estudados devido ao seu declínio populacional ocasionado por diferentes impactos das atividades humanas, este trabalho explorou: (a) o impacto da ingestão de partículas plásticas (poliestireno expandido-EPS e polietileno tereftalato-PET) e de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) em adultos de *Partamona helleri* (Friese) derivados de larvas que ingeriram estes compostos e (b) o impacto da ingestão de alimento contendo a bactéria geneticamente modificada *Serratia* eGFP AS1 – portadora das proteínas anti-*Plasmodium*, em operárias de *P. helleri*. Não foi encontrada diferença significativa na sobrevivência durante a fase imatura e na proporção de pupas deformadas derivadas de larvas que ingeriram as partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> (500ng/abelha, 500ng/abelha, 10µg/abelha, respectivamente). Entretanto, a ingestão destas partículas causou aumento na massa corpórea dos adultos derivados de larvas tratadas. A contagem total de hemócitos (CTH) diminuiu em abelhas alimentadas com EPS, e aumentou com PET e TiO<sub>2</sub>. E a contagem diferencial de hemócitos (CDH) também foi alterada, onde a proporção de prohemócitos aumentou em abelhas alimentadas com EPS e a proporção dos plasmatócitos foi reduzida com os tratamentos EPS e PET em comparação com o controle. O número de hemócitos circulantes reflete na capacidade do indivíduo em lidar com desafios imunes. Portanto, a contaminação por nano/micropartículas pode prejudicar as colônias de abelhas sem ferrão. A colonização do sistema digestivo de *P. helleri* por *S. AS1* foi verificada nos tempos 24h, 72h e 144h após a ingestão do alimento inoculado com a bactéria, e nenhuma alteração foi detectada na sobrevivência e nos comportamentos de alimentação, caminhar e voo dos adultos, mesmo sendo detectadas no intestino posterior após 144h após o início do

experimento. Nossos resultados demonstraram que *S. AS1* não prejudicou *P. helleri*, e pode ser uma candidata segura para combate de doenças transmitidas por vetores, sem comprometer espécies nativas e ecologicamente relevantes. Considerando a relevância das abelhas como polinizadores, os resultados apresentados aqui fornecem informações inéditas que poderão auxiliar na elaboração de avaliações de risco envolvendo a ingestão de partículas poluidoras e sobre a ação de organismos simbiotes geneticamente modificados em abelhas sem ferrão.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão. Dióxido de titânio. Micropartículas de plástico. Organismo geneticamente modificado. Paratransgênese. Poliestireno expandido. Polietileno tereftalato.

## ABSTRACT

VIANA, Thaís Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Effects of oral exposure to polluting particles and the genetically modified bacterium *Serratia* AS1 on *Partamona helleri*.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins. Co-adviser: Maria Augusta Lima Siqueira.

Risk assessments encompass the identification and analysis of the risks to which an organism may be exposed. These assessments contribute to elaborating and adopting strategies to avoid, and minimize risks. Studies on the potential risks of exposure to polluting particles and genetically modified organisms in pollinating insects are scarce. Considering that pollinators have been extensively studied due to their population decline caused by different impacts of human activities, this work explored (a) the impact of the ingestion of plastic particles (polystyrene-PS and polyethylene terephthalate-PET) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) in adults of *Partamona helleri* (Friese) derived from larvae that ingested these compounds; and (b) the impact of ingestion of food containing the genetically modified bacterium *Serratia* eGFP AS1 - carrier of anti-*Plasmodium* proteins in workers of *P. helleri*. No significant difference was found in survival during the immature phase and in the proportion of deformed pupae derived from larvae that ingested EPS, PET, or TiO<sub>2</sub> particles (500ng/bee, 500ng/bee, 10µg/bee, respectively). However, body mass of treated adults was higher. Total hemocyte counts (THC) decreased in bees that ingested EPS and increased in bees that ingested with PET or TiO<sub>2</sub>. The differential hemocyte count (DHC) was also altered, where the proportion of prohemocytes increased in bees fed EPS, and the proportion of plasmatocytes was reduced with the EPS or PET treatments compared to the control. Therefore, nano/microparticle contaminations can harm stingless bee colonies, once the number of circulating hemocytes reflects the individual's ability to deal with immune challenges. Colonization of the digestive system of *P. helleri* by *S. AS1* was checked at 24h, 72h, and 144h after the ingestion of food inoculated with the bacterium, and no changes were detected in the survival and in the feeding, walking, and flying behaviors of the adults, even though they were detected in the hindgut 144h after the beginning of the experiment. Our findings demonstrate the *S. AS1* is not harmful to *P. helleri*. They may be a safe candidate for combating vector-borne diseases, not compromising native and ecologically relevant species, such as wild bees. Considering the relevance of bees as pollinators, the results presented here

provide new information that could help in the elaboration of risk assessments involving contamination by pollution particles, as well as information on the action of genetically modified symbiotic organisms in stingless bees.

**Keywords:** Stingless bees. Titanium dioxide. Genetically modified organism. Paratransgenesis. Expanded polystyrene. Polyethylene terephthalate.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	10
2. CAPÍTULO I. OS EFEITOS DA INGESTÃO DE MICROPLÁSTICOS E DE NANO- ÓXIDO METALICO VIA ALIMENTO LARVAL EM OPERÁRIAS DE <i>PARTAMONA</i> <i>HELLERI</i> (HYMENOPTERA: APIDAE: APINAE: MELIPONINI).....	28
3. CAPÍTULO II. A GENETICALLY MODIFIED ANTI-PLASMODIUM BACTERIUM IS HARMLESS TO THE FORAGERS OF THE STINGLESS BEE <i>Partamona</i> <i>helleri</i> .....	59
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	74

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas são cruciais para os serviços de polinização ecológica e agrícola, além de produzirem cera, própolis e mel, utilizados para o consumo humano (Whitfield et al. 2006, Potts et al. 2010, Staveley et al. 2014). Dentre a grande diversidade apícola, encontra-se a tribo Meliponini, família Apidae, que são abelhas popularmente chamadas de “abelhas indígenas sem ferrão” (Michener 2007, Vit et al. 2013). Somente no Brasil, cerca de 300 espécies de meliponíneos já foram descritas, sendo 23 espécies de *Partamona*, incluindo a *Partamona helleri* (Friese 1900).

As abelhas *Partamona* são de tamanho médio (6-7 mm), possuindo uma tíbia posterior muito alargada em forma de colher (Silveira et al. 2002, Camargo & Pedro 2003). Os seus ninhos são aéreos, apoiados em diferentes substratos, como ninhos de pássaros feitos de gravetos. Esses ninhos são compostos com uma região de cria, com células em forma de favos, potes para armazenamento de mel e pólen e com o barro e resinas delimitando o espaço do ninho (Camargo & Pedro 2003). No Brasil, *Partamona helleri* pode ser encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, em áreas de diferentes fitofisionomias, inclusive em ambientes antrópicos, como urbanizações. Nesses lugares, as abelhas vão à procura de recursos para a subsistência da colônia, como água, alimento, materiais para a construção do ninho (Camargo & Pedro 2003, Pedro 2014).

A redução populacional das colônias de abelhas tem sido observada nos últimos anos e algumas supostas causas para essa redução são: alterações climáticas, redução da diversidade floral, desnutrição, introdução de espécies exóticas, aumento de predadores, dispersão de patógenos, uso excessivo de agroquímicos e a interação entre esses fatores (Potts et al. 2010, Alaux et al. 2010, Vidau et al. 2011). Um fator que supostamente poderia influenciar essa redução populacional seria os nano/micropoluentes, devido a esses poluentes poderem intoxicar as abelhas e contribuir para a ocorrência de efeitos letais e subletais (Al Naggar et al. 2018, Balzani et al. 2022).

Apesar dos nano/micropoluidores ainda não terem sido associados ao declínio de abelhas, o risco de contaminação das abelhas tende a aumentar em virtude do crescente uso de nano/micromateriais em novas tecnologias e o seu descarte onde as abelhas se encontram. Portanto, antecipar esse cenário torna-se fundamental para

prever os efeitos potenciais de nano/micropartículas em organismos polinizadores. Abelhas solitárias *Megachile* sp. usam fragmentos de plásticos na construção de ninhos, mostrando que elas se adequaram ao uso de material plástico descartado em atividades agrícolas (Maclvor & Moore 2013, Allasino et al. 2019). Foi demonstrado que 66,7% da espécie *Apis mellifera* e *Apis cerana* coletadas em campo na China apresentaram resíduos plásticos, incluindo o poliestireno (PS) e o polietileno tereftalato (PET) (Deng et al. 2021), estando potencialmente expostas à contaminação por nano/microplásticos.

A crescente utilização do plástico é uma preocupação ambiental de extrema importância global. Em 2017, a produção de materiais plásticos no mundo atingiu quase 350 milhões de toneladas. Essa quantidade tem distribuição de 50,1% na Ásia, 18,5% na Europa, 17,7% na América do Norte, 7,1% no Oriente Médio e na África, 4% na América do Sul e 2,6% na Comunidade dos Estados Independentes. Os resíduos plásticos não descartados adequadamente acabam se acumulando e poluindo tanto o ambiente aquático quanto o terrestre (Barnes et al. 2009, Riling 2012). Essa contaminação ocorre devido à maioria dos plásticos utilizados serem de uso descartável, possuindo uma reciclagem limitada e uma alta durabilidade, de décadas ou séculos (Geyer et al. 2017), podendo até serem transportados por longas distâncias através do vento e da chuva (Allen et al. 2019).

Entre os resíduos plásticos utilizados destacam-se o PS e o PET, ambos derivados do petróleo (Simões et al. 2014, PlasticsEurope 2018). O PS é um homopolímero termoplástico e sua síntese acontece através da polimerização de monômero de estireno em água e é encontrado, frequentemente, como poliestireno expandido (EPS), popularmente chamado de isopor (Huntsman 2001). O seu resíduo é resultante de protetores de equipamentos, embalagens de alimentos, isolantes térmicos, peças automotivas, dentre outros, e sua vida útil é indefinida (Ho et al. 2018, PlasticsEurope 2018).

O PET é um polímero de etileno termoplástico, e a sua produção ocorre através da reação do tereftalato de dimetilo com etilenoglicol (EG) pela transesterificação ou através da reação ácido tereftálico com EG, pela esterificação direta. Após esses processos, os subprodutos passam, basicamente, pela pré-polimerização, seguida da policondensação em fusão e, por último, a policondensação em estado sólido (Ravindranath & Mashelkar 1986). O seu resíduo é resultante do uso de garrafas

plásticas para embalagens de líquidos em geral, e podem demorar até 600 anos para se decompor (Formigoni & Campos 2012, PlasticsEurope 2018).

Recentemente, o estudo do impacto ambiental das partículas microplásticas (com diâmetro <5mm) vem aumentando (Cole et al. 2011, Thompson 2015). Essas partículas podem se originar, principalmente, da decomposição de plásticos maiores presentes nos ambientes (Thompson 2004). Os microplásticos podem sofrer um maior desgaste formando partículas ainda menores que um mm de diâmetro, os nanoplásticos formados, por exemplo, a partir do atrito com substratos rochosos (Mattsson et al. 2015). Como esses nano/microplásticos são muito pequenos, eles podem ser espalhados e ingeridos por organismos, e assim, acumularem na cadeia alimentar (Riling 2012, Thompson 2015, Huerta Lwanga et al. 2016, 2017).

Embora ocorra a ingestão de nano/microplásticos por diferentes organismos como invertebrados bentônicos (Graham & Thompson 2009), invertebrados terrestres (Zhu et al. 2018, Chae & An 2018), peixes (Possatto et al. 2011, Foekema et al. 2013), aves (van Franeker et al. 2011) e mamíferos (Rebolledo et al. 2013), não se sabe ao certo o potencial dano dessa ingestão na cadeia alimentar. Entretanto, já é comprovado que a ingestão dessas partículas afeta o desenvolvimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* e da ascídia *Ciona robusta*, o desenvolvimento e o crescimento da minhoca *Lumbricus terrestris*, e a reprodução e a massa corporal do anelídeo *Enchytraeus crypticus* (Huerta Lwanga et al. 2016, Messinetti et al. 2018, Zhu et al. 2018, Botterell et al. 2019). Fragmentos de plásticos podem limitar o consumo alimentar do molusco *Mytilus edulis* ou alterar a microbiota intestinal de *E. crypticus* (von Moos et al. 2012, Zhu et al. 2018). Danos histopatológicos e imunológicos no anelídeo *Eisenia andrei* também foram observados após o consumo de microplásticos (Rodriguez-Seijo et al. 2017).

Nanoplásticos podem permear membranas celulares e organelas de diferentes órgãos de *M. edulis*, e este efeito também foi observado em mamíferos, podendo resultar em respostas inflamatórias, alterações na expressão gênica e morte celular (Brown et al. 2001, von Moos et al. 2012, Roex et al. 2013, Chae & An, 2018). Além disso, microplásticos podem carrear poluentes como o fenantreno e o nonifenol, e produtos químicos como o triclosan e o éter difenil polibromado - 47 (PBDE-47), tendo o potencial de serem transferidos para os organismos no pós-ingestão (Teuten et al. 2009, Roex et al. 2013, Browne et al. 2013). Em contrapartida, os estudos de

toxicidade provocada pela ingestão de plásticos são quase exclusivamente focados em ambientes aquáticos, tornando o estudo do seu impacto em ambiente terrestre incipiente (Riling 2012, Thompson 2015, Chae & An 2018).

A nanotecnologia tem se tornado indispensável na ciência, na indústria, na biotecnologia, na medicina e em muitas outras áreas. Na agricultura, por exemplo, acredita-se que os avanços nessa tecnologia podem auxiliar na proteção de cultivos e no manejo de pragas (Parisi et al. 2015). Além disso, o efeito das nano/micropartículas de metais e não metais são conhecidos pela sua atividade antimicrobiana, tendo sua ação em patógenos resistentes a fungicidas e a bactericidas (Chowdappa & Gowda, 2013, Aziz et al. 2015, 2016). Uma dessas nanopartículas em ascensão no mercado é o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), um semicondutor, cujas partículas são produzidas a partir do processo sol-gel de Sau e Rogach, onde o precursor utilizado é o etóxido de titânio também conhecido como ortotitanato de tetraetilo (Bernier et al. 2012, Tiwari & Turner et al. 2014).

Por ser versátil, o  $\text{TiO}_2$  pode ser empregado para diferentes finalidades como na fabricação de corantes de alimentos, tintas, cosméticos e protetores solares, células solares fotossensíveis, sensores de gás, além de ter aplicação como material autolimpante e catalisador da fotocálise (Tiwari & Turner 2014, Banerjee et al. 2015, Yadav et al. 2016, Yang et al. 2016). São inúmeras as aplicações do  $\text{TiO}_2$  e elas tendem a aumentar, fazendo com que a disponibilização dele no ambiente aumente.

Em invertebrados, os efeitos da ingestão de  $\text{TiO}_2$  foram avaliados em larvas das mariposas *Bombyx mori*, (Wang et al. 2015, Li et al. 2016) e *Galleria mellonella* (Zorlu et al. 2018) e no microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (Dalai et al. 2013). Os efeitos da ingestão de  $\text{TiO}_2$  variam de acordo com a espécie, podendo ser benéfico. Por exemplo, foi demonstrado que a ingestão de nanopartícula de  $\text{TiO}_2$  teve efeito no sistema digestivo de larvas de *B. mori*, podendo atenuar lesões pré-existentes, bem como diminuir o estresse oxidativo no intestino médio, além de aumentar a sobrevivência e o peso corporal de indivíduos tratados por phoxim, um organofosfato (Wang et al. 2015, Li et al. 2016).

A ingestão de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  pode aumentar o tempo de desenvolvimento e diminuir a sobrevivência de larvas da mariposa *G. mellonella* (Zorlu et al. 2018). No microcrustáceo *C. dubia*, popularmente conhecida com pulga d'água, a mortalidade foi aumentada em altas concentrações de  $\text{TiO}_2$ , assim como ocorreu

um aumento na expressão de catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase (Dalai et al. 2013). Pelo exposto, conclui-se que a toxicidade de TiO<sub>2</sub> varia em função das concentrações testadas e das espécies de invertebrados.

Uma alternativa ao controle de doenças transmitidas por insetos vetores é a paratransgênese, que envolve manipulação genética de microrganismos simbióticos para reduzir e/ou interromper os patógenos dentro de seus insetos hospedeiros (Coutinho-Abreu et al. 2010, Wang et al. 2017). Dentro da família Enterobacteriaceae encontra-se o gênero *Serratia*, bastonetes gram-negativos e aeróbios facultativos. Esse gênero pode ser simbiótico e é encontrado em muitos artrópodes, como mosquitos (Gusmão et al. 2003, Pumpuni et al. 1993), abelhas (Botina et al. 2019) e flebotomíneos (Maleki-Ravasan et al. 2014).

Estudos recentes demonstraram o potencial da bactéria *Serratia* eGFP AS1 (*Serratia marscerpens*, linhagem AS1) para a paratransgênese (Wang et al. 2017, Koosha et al. 2018, 2019). Na *Serratia* eGFP AS1 foi integrado o gene da proteína que codifica o eGFP (proteína verde fluorescente), e cinco genes efetores anti-*Plasmodium* ((MP2)<sub>2</sub> - Scorpine – (EPIP)<sub>4</sub> – Shiva1 – (SM1)<sub>2</sub>) sobre o controle de um único promotor, os quais inibem o desenvolvimento do patógeno *Plasmodium falciparum* em fêmeas do mosquito *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi* (Wang et al. 2017). Todas as proteínas efetoras inibem fortemente esse patógeno, reduzindo a carga de oocisto em até 93% (Wang et al. 2017).

Parasitas do gênero *Plasmodium* podem ser transmitidos aos humanos através de picadas das fêmeas infectadas de *Anopheles*, ocasionando a Malária, doença endêmica em muitos países em desenvolvimento. As ferramentas disponíveis para o combate à malária são, basicamente, o controle dos vetores e os medicamentos antimaláricos (World Malaria Report 2019). Infelizmente, essas ferramentas têm perdido sua eficácia diante do aumento da resistência dos mosquitos aos inseticidas e dos parasitas aos medicamentos (World Malaria Report 2019). Por conseguinte, encontrar outras maneiras para o combate dessa doença é extremamente necessário.

A utilização de qualquer organismo modificado geneticamente (OGM) para o controle biológico requer que ele apresente um custo mínimo para o condicionamento físico dos seus portadores (Coutinho-Abreu et al. 2010), o que é investigado através de avaliações de risco, incluindo os riscos que os indivíduos paratransgênicos representam (CTNBio nº 24, de 07.01.2020). Essas avaliações incluem a investigação

das rotas de transferência dos OGMs – que podem ser vertical (da mãe para a prole), transestadial (entre as fases de desenvolvimento) e/ou horizontal (de um indivíduo para o outro, sem ser parental) – bem como dos efeitos no comportamento (ex. alimentar), na sobrevivência e na reprodução dos hospedeiros alvos (Wang et al. 2017, Koosha et al. 2018).

A transferência horizontal dos OGM entre os indivíduos pode ocorrer através do compartilhamento de recursos em comum (Eggers & Mackenzie 2000, Engel et al. 2016, Wang et al. 2017), por exemplo, o contato com a água contaminada pela presença desse organismo (Koosha et al. 2019). Os órgãos normativos, como a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, Brasil), também exigem a avaliação da interação dos indivíduos paratransgênicos com o meio ambiente, o que inclui a preocupação particular com os possíveis efeitos nocivos desses OGM em organismos não-alvo (CTNBio nº 24, de 07.01.2020, Eckerstorfer et al. 2012), como polinizadores (Eckerstorfer et al. 2012). Uma vez que abelhas são polinizadores naturais dos ecossistemas e tem um papel significativo na manutenção da biodiversidade (Allen-Wardell et al. 1998, Slaa et al. 2006), esses organismos são amplamente reconhecidos para integrarem protocolos de avaliação de risco (Villa et al. 2000, Malone & Pham-Delegue 2001, Romeis et al. 2008, Thompson 2010).

Em virtude da comunicação com o ambiente externo à colônia, para a busca de recursos alimentares, estudos são preferencialmente realizados em abelhas forrageiras e incluem avaliações da letalidade e em menor grau de efeitos subletais (Desneux et al. 2007, Lima et al. 2016). Não menos comum é o uso da espécie *A. mellifera* como organismo modelo em estudos de avaliação de risco ou apenas ecotoxicológicos, ainda que essa espécie seja exótica de ambientes neotropicais como a América (Barbosa et al. 2015, Lima et al. 2016). No entanto, as abelhas sem-ferrão (Meliponini) são mais representativas em ecossistemas neotropicais (Slaa et al. 2009, Lima et al. 2016) como polinizadores da mata nativa (Slaa et al. 2009) e ecossistemas agrícolas (Giannini et al. 2015) e, portanto, elas deveriam ser consideradas em estudos de liberação dos OGMs.

Em abelhas, a capacidade de suportar estressores ambientais está intimamente ligada à microbiota intestinal (Li et al. 2017, Raymann et al. 2017, Raymann & Moren, 2018). Além disso, a microbiota intestinal se relaciona com o

comportamento, o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento dos seus hospedeiros (Zheng et al. 2018, Raymann & Moren 2018) e em abelhas sem ferrão, a microbiota é altamente conservada em relação a abelhas não corbiculadas (Kwong et al. 2017). A espécie de meliponíneo *P. helleri*, por exemplo, possui uma ampla gama de gêneros bacterianos dominantes (cerca de 33) e o gênero *Serratia* também foi encontrado nela, embora menos abundante em relação a outros (Botina et al. 2019). Espécies de *Serratia* podem ser também patogênicas a abelhas, como foi observado para as cepas de *S. marcescens* Ss1 (Burritt et al. 2016), kz2, kz11, kz19, Db11 em adultos de *A. mellifera* (Raymann et al. 2018).

O objetivo do presente trabalho foi avançar na elaboração de técnicas que poderão auxiliar nas construções de avaliações de risco com polinizadores, assim como, estudar possíveis fatores que podem influenciar o declínio populacional de polinizadores. Essas questões levantaram hipóteses sobre a existência dos possíveis risco de contaminação das abelhas por nano/micropartículas e pela colonização por bactérias paratransgênicas. Para acessar essas hipóteses, esta investigação foi organizada em dois capítulos.

No Capítulo I foi avaliado o efeito do consumo de nano/micropartículas de dois tipos de plástico (poliestireno expandido-EPS e polietileno tereftalato-PET) e de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) via ingestão durante a fase larval de *P. helleri*. Essa avaliação foi realizada através da comparação dos parâmetros de sobrevivência, massa corporal, desenvolvimento, locomoção e resposta imune celular em operárias recém-emergidas originadas de larvas alimentadas com as nano/micropartículas.

No Capítulo II foi avaliado o efeito da ingestão do alimento contendo a cepa geneticamente modificada de *Serratia* eGFP AS1 – portadora das proteínas anti-*Plasmodium* em *P. helleri*. Essa avaliação foi realizada através da sobrevivência, dos comportamentos alimentar, locomoção e voo em forrageiras após ingestão do alimento inoculado com a bactéria em comparação com o controle.

Os resultados expostos nessa tese fornecem informações inéditas sobre o risco envolvendo a ingestão de nano/micro poluidores, bem como os efeitos da colonização do sistema digestivo por organismos geneticamente modificados em abelhas sem ferrão.

### 3.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL NAGGAR, Y.; DABOUR, K.; MASRY, S.; SADEK, A.; NAIEM, E.; GIESY, J. P. Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19004-19015, 2018.
- ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHAMITCHAN, S.; COUSIN, M.; LE CONTE, Y. Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12, 3, 774–782, 2010.
- ALLASINO, M. L.; MARRERO, H. J.; DORADO, J.; TORRETTA, J. P. Scientific note: first global report of a bee nest built only with plastic. *Apidologie*, 230-233, 2019.
- ALLEN, S.; ALLEN, D.; PHOENIX, V. R.; LE ROUX, G.; JIMÉNEZ, P. D.; SIMONNEAU, A.; BINET, S.; GALOP, D. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nature Geoscience*, 12, 339-344, 2019.
- ALLEN-WARDELL, G.; BERNHARDT, P.; BITNER, R.; BURQUEZ, A.; BUCHMANN, S.; CANE, J.; COX, P.A.; DALTON, V.; FEINSINGER, P.; INGRAM, M.; INOUYE, D.; JONES, C.E.; KENNEDY, K.; KEVAN, P.; KOOPOWITZ, H.; MEDELLIN, R.; MEDELLIN-MORALES, S.; NABHAN, G.P.; PAVLIK, B.; TEPEDINO, V.; TORCHIO, P.; WALKER, S. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, 8-17, 1998.
- AZIZ, N., FARAZ, M., PANDEY, R., SHAKIR, M., FATMA, T., VARMA, A.; BARMAN, I.; PRASAD, R. Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial, and photocatalytic properties. *Langmuir* 31, 11605–11612, 2015.
- AZIZ, N.; PANDEY, R.; BARMAN, I.; PRASAD, R. Leveraging the attributes of *Mucor hiemalis*-derived silver nanoparticles for a synergistic broad-spectrum antimicrobial platform. *Frontiers in Microbiology* 7, 1984, 2016.

- BALZANI, P.; GALEOTTI, G.; SCHEGGI, S.; MASONI, A.; SANTINI, G.; BARACCHI, D. Acute and chronic ingestion of polyethylene (PE) microplastics has mild effects on honey bee health and cognition. *Environmental Pollution*, 305, 119318, 2022.
- BANERJEE, S.; DIONYSIOU, D. D.; PILLAI, S. C. Self-cleaning applications of TiO<sub>2</sub> by photo-induced hydrophilicity and photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176, 396-428, 2015.
- BARBOSA, W.F.; SMAGGHE, G.; GUEDES, R.N.C. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. *Pest Management Science*, 71, 8, 1049-1053, 2015.
- BARNES, D. K.; GALGANI, F.; THOMPSON, R. C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985-1998, 2009.
- BERNIER, M. C.; EL KIRAT, K.; BESSE, M.; MORANDAT, S.; VAYSSADE, M. Preosteoblasts and fibroblasts respond differently to anatase titanium dioxide nanoparticles: a cytotoxicity and inflammation study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 68-74, 2012.
- BOTINA, L. L., VÉLEZ, M., BARBOSA, W. F., MENDONÇA, A. C., PYLRO, V. S., TÓTOLA, M. R., & MARTINS, G. F. Behavior and gut bacteria of *Partamona helleri* under sublethal exposure to a bioinsecticide and a leaf fertilizer. *Chemosphere*, 234, 187-195, 2019.
- BOTTERELL, Z. L.; BEAUMONT, N.; DORRINGTON, T.; STEINKE, M.; THOMPSON, R. C.; LINDEQUE, P. K. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environmental Pollution*, 98-110, 2019.
- BROWN, D. M.; WILSON, M. R.; MACNEE, W.; STONE, V.; DONALDSON, K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175(3), 191-199, 2001.

- BROWNE, M. A.; NIVEN, S. J.; GALLOWAY, T. S.; ROWLAND, S. J.; THOMPSON, R. C. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23(23), 2388-2392, 2013.
- BURRITT, N.L.; FOSS, N.J.; NEENO-ECKWALL, E.C.; CHURCH, J.O.; HILGER, A.M.; HILDEBRAND, J.A.; WARSHAUER, D.M.; PERNA, N.T.; BURRITT, J.B. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS One* 11(12):e0167752. 2016.
- CAMARGO, J. M.; PEDRO, S. R. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae): bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(3), 311-372, 2003.
- CHAE, Y.; AN, Y. J. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environmental Pollution*, 240, 387-395, 2018.
- CHOWDAPPA, P.; GOWDA, S. Nanotechnology in crop protection: status and scope. *Pest Management Horticultural Ecosystems*, 19 (2), 131–151, 2013.
- COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597, 2011.
- COUTINHO-ABREU, I.V.; ZHU, K.Y.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. (2010) Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. *Parasitology International*, 59, 1-8, 2010.
- CTNBio nº 24, de 07.01.2020  
 <[https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros\\_atos/resolucoes/Resolucao\\_Normativa\\_CTNBio\\_n\\_24\\_de\\_07012020.html?fbclid=IwAR3tstN7JdacfZtV3yn94BCItKulfulpJ3XNHXxDOP-1NE5TsdwSTREUH5A](https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CTNBio_n_24_de_07012020.html?fbclid=IwAR3tstN7JdacfZtV3yn94BCItKulfulpJ3XNHXxDOP-1NE5TsdwSTREUH5A)> (accessed 18 April 2020)
- DALAI, S.; PAKRASHI, S.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Acute toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under visible light and dark conditions in a freshwater system. *PLoS One*, 8(4), e62970, 2013.

- DENG, Y.; JIANG, X.; ZHAO, H.; YANG, S.; GAO, J.; WU, Y.; DIAU, Q.; HOU, C. Microplastic Polystyrene Ingestion Promotes the Susceptibility of Honeybee to Viral Infection. *Environmental Science & Technology*, 55(17), 11680-11692, 2021.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81-106, 2007.
- ECKERSTORFER, M.; BENEDICT, M.; FRANZ, G.; GAUGITSCH, H.; GREITER, A.; HEISSENBERGER, A.; KNOL, B.; KUMSCHICK, S.; NENTWIG, W.; RABITSCH, W. (2012) Defining environmental risk assessment criteria for GM insects to be placed on the EU market. *IOBC/wprs Bulletin*, 73:45–50, 2012.
- EGGERS, B.; MACKENZIE, R. The Cartagena protocol on biosafety. *Journal of International Economic Law* 3, 3, 525-543, 2000.
- ENGEL, P.; KWONG, W.K.; MCFREDERICK, Q.; ANDERSON, K.E.; BARRIBEAU, S.M.; CHANDLER, J.A.; CORNMAN, S.R.; DAINAT, J.; MIRANDA, J.R.; DOUBLET, V.; EMERY, O.; EVANS, J.D, FARINELLI, L.; FLENNIKEN, M.L.; GRANBERG, F.; GRASIS, J.A.; GAUTHIER, L.; HAYER, J.; KOCH, H.; KOCHER, S.; MARTINSON, V.G.; MORAN, N.; MUNOZ-TORRES, M.; NEWTON, I.; PAXTON, R.J.; POWELL, E.; SADD, B.M.; SCHMID-HEMPEL, P.; SCHMID-HEMPEL, R.; SONG, S.J.; SCHWARZ, R.S.; DENNIS VANENGELSDORP, D.; DAINATAB, B. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio* 7(2):e02164-15, 2016.
- FOEKEMA, E. M.; DE GRUIJTER, C.; MERGIA, M. T.; VAN FRANEKER, J. A.; MURK, A. J.; KOELMANS, A. A. Plastic in North Sea fish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8818-8824, 2013.
- FORMIGONI, A.; CAMPOS, I. P. A. Reciclagem de PET no Brasil. *Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia*, Rio de Janeiro, 2012.

- GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782, 2017.
- GIANNINI, T.C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G.D.; CARTOLANO, E.A.; VEIGA, A.K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SARAIVA, A.M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46, 2, 209-223, 2015.
- GRAHAM, E. R.; THOMPSON, J. T. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368(1), 22-29, 2009.
- GUSMÃO, D.S.; SANTOS, A.V.; MARINI, D.C.; RUSSO, E.S.; PEIXOTO, A.M.; BACCI JÚNIOR, M.; BERBERT-MOLINA, M.A.; LEMOS, F.J. (2007) First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti*, (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 8, 919–924, 2007.
- HUERTA LWANGA, E.; GERTSEN, H.; GOOREN, H.; PETERS, P.; SALÁNKI, T., VAN DER PLOEG, M.; BESSELING, E.; KOELMANS, A. A.; GEISSEN, V. Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental science & technology*, 50, 5, 2685-2691, 2016.
- HUERTA LWANGA, E.; GERTSEN, H.; GOOREN, H.; PETERS, P.; SALÁNKI, T.; VAN DER PLOEG, M.; BESSELING, E.; KOELMANS, A. A.; GEISSEN, V. Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution*, 220, 523-531, 2017.
- HO, B. T.; ROBERTS, T. K.; LUCAS, S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical reviews in biotechnology*, 38(2), 308-320, 2018.
- HUNTSMAN TECHNICAL BULLETIN 1-1.0, INTRODUCTION TO EXPANDABLE POLYSTYRENE July 2001 <[www.huntsman.com/polymers/media/EPS1-1.0.pdf](http://www.huntsman.com/polymers/media/EPS1-1.0.pdf)> (accessed 20 may 2021)

- KOOSHA, M.; VATANDOOST, H.; KARIMIAN, F.; CHOUBDAR, N.; ABAI, M.R.; OSHAGHI, M.A. Effect of *Serratia* AS1 (Enterobacteriaceae: Enterobacteriales) on the fitness of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) for paratransgenic and RNAi approaches. *Journal of Medical Entomology*, 56(2), 553-559, 2018.
- KOOSHA, M.; VATANDOOST, H.; KARIMIAN, F.; CHOUBDAR, N.; OSHAGHI, M.A. Delivery of a genetically marked *Serratia* AS1 to medically important arthropods for use in RNAi and paratransgenic control strategies. *Microbial Ecology*, 78,1, 185-194, 2019.
- KWONG, W.K.; ENGEL, P.; KOCH, H.; MORAN, N.A. (2014) Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *PNAS* 111, 31, 11509-11514, 2014.
- KWONG, W.K.; MEDINA, L.A.; KOCH, H.; SING, K.W.; SOH, E.J.Y.; ASCHER, J.S.; JAFFÉ, R.; MORAN, N.A. (2017) Dynamic microbiome evolution in social bees. *Science Advances* 3, 3, e1600513, 2017.
- LI, J.H.; EVANS, J.D.; LI, W.F.; ZHAO, Y.Z.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; HUANG, S.K.; LI, Z.G.; HAMILTON, M.; CHEN, Y.P. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PloS One* 12(11), e0187505. 2017.
- LI, Y.; NI, M.; LI, F.; ZHANG, H.; XU, K.; ZHAO, X.; TIAN, J.; HU, J.; WANG, B.; SHEN, W.; LI, B. Effects of TiO<sub>2</sub> NPs on silkworm growth and feed efficiency. *Biological Trace Element Research*, 169(2), 382-386, 2016.
- LIMA, M.A.P.; MARTINS, G.F.; OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, R.N.C. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *Journal of Comparative Physiology*, 202(9-10), 733–747, 2016.
- MACLVOR, J. S.; MOORE, A. E. Bees collect polyurethane and polyethylene plastics as novel nest materials. *Ecosphere*, 4, 12, 1-6, 2013.

- MALEKI-RAVASAN, N.; OSHAGHI, M.A.; HAJIKHANI, S.; SAEIDI, Z.; AKHAVAN, A.A.; GERAMI-SHOAR, M.; SHIRAZI, M.H.; YAKHCHALI, B.; RASSI, Y.; AFSHAR, D. Aerobic microbial community of insectary population of *Phlebotomus papatasi*. *Journal Arthropod-Borne Diseases*, 18(1), 69-81, 2013.
- MALONE, L.A.; PHAM-DELEGUE, M.H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 32(4), 287-304, 2001.
- MATTSSON, K.; JOCIC, S.; DOVERBRATT, I.; HANSSON, L. A. Nanoplastics in the aquatic environment. In *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, 379-399, 2018.
- MESSINETTI, S.; MERCURIO, S.; PAROLINI, M.; SUGNI, M.; PENNATI, R. Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. *Environmental Pollution*, 237, 1080-1087, 2018.
- MICHENER, C. D. *The Bees of the World*. 2 ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007. pp. 821.
- PARISI, C.; VIGANI, M.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today*, 10 (2), 124–127, 2015.
- PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61, 348–354, 2014.
- PLASTICSEUROPE. *Plastics the facts 2018. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2017*, PlasticsEurope, p. 26, 2018.
- POSSATTO, F. E.; BARLETTA, M.; COSTA, M. F.; DO SUL, J. A. I.; DANTAS, D. V. Plastic debris ingestion by marine catfish: an unexpected fisheries impact. *Marine Pollution Bulletin*, 62(5), 1098-1102, 2011.
- POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353, 2010.

- PUMPUNI, C.B. ; BEIER, M.S.; NATARO, J.P.; GUERS, L.D.; DAVIS, J.R. (1993) *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Experimental Parasitology*, 77(2), 195-199, 1993.
- RAVINDRANATH, K.; MASHELKAR, R. A. Polyethylene terephthalate—I. Chemistry, thermodynamics and transport properties. *Chemical Engineering Science*, 41(9), 2197-2214, 1986.
- RAYMANN, K.; COON, K. L.; SHAFFER, Z.; SALISBURY, S.; MORAN, N. A. Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees. *MBio*, 9, 5, e01649-18, 2018.
- RAYMANN, K.; MORAN, N.A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 97-104, 2018.
- RAYMANN, K.; SHAFFER, Z.; MORAN, N.A. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology* 15(3), e2001861, 2017.
- REBOLLEDO, E. L. B.; VAN FRANEKER, J. A.; JANSEN, O. E.; BRASSEUR, S. M. Plastic ingestion by harbour seals (*Phoca vitulina*) in The Netherlands. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1-2), 200-202, 2013.
- RILLIG, M. C. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental Science & Technology*, 46, 6453–6454, 2012.
- RODRIGUEZ-SEIJO, A.; LOURENÇO, J.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DA COSTA, J.; DUARTE, A. C.; VALA, H.; PEREIRA, R. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution*, 220, 495-503, 2017.
- ROEX, E.; VETHAAK, D.; LESLIE, H.; KREUK, M. D. Potential risk of microplastics in the fresh water environment. STOWA, Amersfoort. 2013.
- ROMEIS, J.; BARTSCH, D.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M.P.; GIELKENS, M.M.; HARTLEY, S.E.; HELLMICH, R.L.; HUESING, J.E.; JEPSON, P.C.; LAYTON,

- R.; QUEMADA, H.; RAYBOULD, A.; ROSE, R.I.; SCHIEMANN, J.; SEARS, M.K.; SHELTON, A.M.; SWEET, J.; VAITUZIS, Z.; WOLT, J.D. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology*, 26(2), 203-208, 2008.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação, 2002. pp. 86-90.
- SIMÕES, C. L.; PINTO, L. M. C.; BERNARDO, C. A. Environmental and economic analysis of end of life management options for an HDPE product using a life cycle thinking approach. *Waste Management & Research*, 32(5), 414-422, 2014.
- SLAA, E.; SÁNCHEZ CHAVES, L.; MALAGODI-BRAGA, K.; HOFSTEDE, F. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37(2), 293-315, 2006.
- STAVELEY, J.P.; LAW, S.A.; FAIRBROTHER, A.; MENZIE, C.A. A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment* 20, 566-591, 2014.
- TEUTEN, E. L.; ROWLAND, S. J.; GALLOWAY, T. S.; THOMPSON, R. C. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 41(22), 7759-7764, 2007.
- THOMPSON, H.M. Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. *Pest Management Science*, 66(11), 1157-1162, 2010.
- THOMPSON, R. C. Microplastics in the marine environment: sources, consequences and solutions. Bergmann M, Gutow L, Klages M, editors. *Marine Anthropogenic Litter*, 2015.
- THOMPSON, R. C.; OLSEN, Y.; MITCHELL, R. P.; DAVIS, A.; ROWLAND, S. J.; JOHN, A. W.; MCGONIGLE, D.; RUSSELL, A. E. Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 304(5672), 838-838, 2004.

- TIWARI, A.; TURNER, A. P. (Eds.). Biosensors nanotechnology. John Wiley & Sons, 2014.
- VAN FRANEKER, J. A.; BLAIZE, C.; DANIELSEN, J.; FAIRCLOUGH, K.; GOLLAN, J.; GUSE, N.; HANSEN, P. L.; HEUBECK, M.; JENSEN, J. K.; GUILLOU, G. L.; OLSEN, B.; OLSEN, K. O.; PEDERSEN, J.; STIENEN, E. W. M.; TURNER, D. M. Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. *Environmental Pollution*, 159(10), 2609-2615, 2011.
- VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *Plos One*, v. 6, n. 6, e21550, 2011.
- VILLA, S.; VIGHI, M.; FINIZIO, A.; SERINI, G.B. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology* 9(4):287-297, 2000.
- VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. Pot-honey: a legacy of stingless bees. (Eds.). Springer Science & Business Media, 2013. pp. 3-17.
- VON MOOS, N.; BURKHARDT-HOLM, P.; KÖHLER, A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327-11335, 2012.
- WANG, L.; SU, M.; ZHAO, X.; HONG, J.; YU, X.; XU, B.; SHENG, L.; LIU, D.; SHEN, W.; LI, B.; HONG, F. Nanoparticulate TiO<sub>2</sub> protection of midgut damage in the silkworm (*Bombyx mori*) following phoxim exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(3), 534-542, 2015.
- WANG, S.; DOS-SANTOS, A.L.; HUANG, W.; LIU, K.C.; OSHAGHI, M.A.; WEI, G.; AGRE, P.; JACOBS-LORENA M. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science* 357(6358), 1399-1402, 2017.
- WHITFIELD, C. W.; BEHURA, S. K.; BERLOCHER, S.H.; CLARK, A.J.; JOHNSTON, S.; SHEPPARD, W. S.; SMITH, D. R.; SUAREZ, A. V.; WEAVER, D.; TSUTSUI,

- N. D. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314: 642–645, 2006.
- WOO, L.; LING, M.; KHARE, A. R.; DING, Y. S. Polypropylene degradation and durability estimates based on the master curve concept. In *Ageing Studies and Lifetime Extension of Materials*. Springer, Boston, MA, 2001. pp. 499-506.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report 2019. World Health Organization, 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330011>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- YADAV, H. M.; KIM, J. S.; PAWAR, S. H. Developments in photocatalytic antibacterial activity of nano TiO<sub>2</sub>: A review. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33(7), 1989-1998, 2016.
- YANG, W.; YANG, P.; TANG, Q. Double-layered TiO<sub>2</sub> anodes from nanorods and nanoparticles for dye-sensitized solar cells. *Materials Letters*, 180, 228-230, 2016.
- ZHENG, H.; STEELE, M.I.; LEONARD, S.P.; MOTTA, E.V.; MORAN, N.A. Honey bees as models for gut microbiota research. *Laboratory Animals*, 47(11), 317-325, 2018.
- ZHU, B. K.; FANG, Y. M.; ZHU, D.; CHRISTIE, P.; KE, X.; ZHU, Y. G. Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Pollution*, 239, 408-415, 2018.
- ZORLU, T.; NURULLAHOĞLU, Z. U.; ALTUNTAŞ, H. Influence of dietary titanium dioxide nanoparticles on the biology and antioxidant system of model insect, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 20(3), 89-103, 2018.

## **CAPÍTULO I**

**OS EFEITOS DA INGESTÃO DE MICROPLÁSTICOS E DE DIÓXIDO DE  
TITÂNIO EM OPERÁRIAS DE *Partamona helleri* (HYMENOPTERA:  
APIDAE: APINAE: MELIPONINI)**

## RESUMO

O descarte inadequado de materiais plásticos e de compostos oriundos de metais e a geração dos nano/micropartículas vem sendo amplamente discutidos devido a seu potencial de risco como poluentes e contaminação dos organismos mediante sua bioacumulação. Entretanto, estudos sobre potencial toxicológico dessas nano/micropartículas sobre insetos polinizadores são escassos. Considerando o valor inestimável dos serviços ecossistêmicos que os polinizadores prestam e seu declínio populacional ocasionado por diferentes impactos antrópicos, este trabalho explorou a letalidade e os efeitos subletais de nano/micropartículas de poluentes na abelha sem ferrão *Partamona helleri*. A toxicidade de partículas plásticas (poliestireno expandido-EPS e polietileno tereftalato-PET) e de óxido metálico (dióxido de titânio-TiO<sub>2</sub>) foi avaliada via ingestão larval. A taxa de sobrevivência não foi afetada pela ingestão de partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> (500ng/abelha, 500ng/abelha, 10µg/abelha, respectivamente) em relação ao controle (alimento sem as partículas). Entretanto, o peso dos adultos teve um aumento significativo nos indivíduos tratados em relação ao controle. O comportamento de locomoção foi afetado após a ingestão das partículas, no qual as abelhas que ingeriram PET ou TiO<sub>2</sub> tenderam a ficar um maior tempo de repouso assim como tenderam a interagir mais. A contagem total de hemócitos foi alterada, assim como a diferencial, sendo observadas alterações significativas na proporção dos plasmatócitos e dos prohemócitos em comparação com o controle. Isto pode refletir negativamente na capacidade do indivíduo em lidar com estressores. Os dados aqui expostos sugerem que a contaminação por partículas de plásticos e TiO<sub>2</sub> podem ocasionar efeitos subletais nas colônias de abelhas sem ferrão. Nosso estudo fornece informações inéditas sobre a ingestão de nano/micropartículas poluidoras em abelhas sem ferrão, a fim de investigar se essa contaminação pode ser um dos fatores que influenciam o declínio populacional de polinizadores.

**Palavras chaves:** Abelhas sem ferrão. Dióxido de titânio. Microplástico. Poliestireno expandido. Polietileno tereftalato.

## 1.0. INTRODUÇÃO

A crescente utilização do plástico é uma preocupação ambiental de extrema importância global e os resíduos não descartados adequadamente se acumulam nos ecossistemas naturais (Barnes et al. 2009, Rillig 2012), gerando contaminação. Essa contaminação ocorre devido à maioria desses resíduos plásticos possuírem uma resistência à degradação (Geyer et al. 2017). Essa preocupação ambiental está associada à decomposição de peças ou pedaços de plásticos maiores presentes nos ambientes (Thompson 2004), o que resulta em partículas menores, denominadas microplásticos (com diâmetro  $< 5 \mu\text{m}$ ) ou até mesmo nanoplásticos (com diâmetro  $< 1 \mu\text{m}$ ) (Cole et al. 2011, Mattsson et al. 2015, Thompson 2015). Como esses nano/microplásticos são muito pequenos, eles podem ser espalhados e ingeridos por organismos e, assim, acumularem na cadeia alimentar (Rillig 2012, Thompson 2015, Huerta Lwanga et al. 2016, 2017). Alguns desses resíduos plásticos são oriundos do petróleo, dentre eles destacam-se o poliestireno (PS) e o polietileno tereftalato (PET) (Simões et al. 2014, PlasticsEurope 2018). O PS é frequentemente encontrado como poliestireno expandido (EPS), conhecido como isopor (Huntsman 2001), e sua vida útil é indefinida (Ho et al. 2018, PlasticsEurope 2018). O resíduo do PET é resultante principalmente do uso de garrafas plásticas para embalagens de líquidos em geral, e podem demorar até 600 anos para se decompor (Formigoni & Campos 2012, PlasticsEurope 2018).

Os efeitos da ingestão das partículas plásticas por diferentes organismos, como invertebrados bentônicos (Graham & Thompson 2009) ou terrestres (Zhu et al. 2018, Chae & An 2018), peixes (Possatto et al. 2011, Foekema et al. 2013), aves (van Franeker et al. 2011) e mamíferos (Rebolledo et al. 2013) tem sido alvo de estudo. Está comprovado que a ingestão dessas partículas afeta o desenvolvimento, o crescimento, a reprodução, o consumo alimentar e a massa corporal dos invertebrados, o que pode alterar a microbiota intestinal e ocasionar, também, danos histopatológicos e imunológicos (von Moos et al. 2012, Huerta Lwanga et al. 2016, Rodriguez-Seijo et al. 2017, Messinetti et al. 2018, Zhu et al. 2018, Botterell et al. 2019). A maioria dos estudos sobre a toxicidade da ingestão de partículas plásticas considera organismos aquáticos, poucos são focados considerando o ambiente terrestre (Rillig 2012, Chae & An 2018, Balzani et al. 2022).

O uso da nanotecnologia tende a se intensificar na agricultura. Acredita-se que os avanços nessa tecnologia podem auxiliar na proteção de cultivos e no manejo de pragas (Parisi et al. 2015). Uma dessas nanopartículas em ascensão é o TiO<sub>2</sub> (dióxido de titânio), pois devido a sua ampla gama de aplicações na fabricação de corantes de alimentos, tintas, cosméticos e protetores solares, células solares fotossensíveis, sensores de gás, material autolimpante e catalisador da fotocálise (Tiwari & Turner 2014, Banerjee et al. 2015, Yadav et al. 2016, Yang et al. 2016), a sua disponibilidade no ambiente tende a aumentar.

A exposição do TiO<sub>2</sub> em invertebrados foi avaliada, e a sua ingestão tem diferentes efeitos observados, variando de benéfico a prejudicial dependente da concentração e espécie (Dalai et al. 2013, Wang et al. 2015, Li et al. 2016, Zorlu et al. 2018). Na mariposa *Bombyx mori* possui um efeito positivo na sobrevivência, no peso corporal e no sistema digestório (Wang et al. 2015). Entretanto, em larvas de outra mariposa (*Galleria mellonella*), a ingestão de TiO<sub>2</sub> prejudicou a sobrevivência e o tempo de desenvolvimento (Zorlu et al. 2018), e no microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, interferiu na mortalidade e na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo (Dalai et al. 2013). Tendo em vista os estudos supracitados, os efeitos TiO<sub>2</sub> nos invertebrados variam de acordo com as espécies expostas e as concentrações utilizadas, sendo assim, a toxicidade de TiO<sub>2</sub> tem que ser melhor investigada.

Há mais de uma década, o declínio populacional das abelhas tem ganhado destaque, e diferentes fatores foram apontados por influenciar essa redução: introdução de espécies exóticas, mudanças no clima, aumento de predadores, diminuição da diversidade floral, escassez de alimentos, dispersão de patógenos, uso demasiado de agrotóxicos e a interação entre esses parâmetros (Potts et al. 2010, Alaux et al. 2010, Vidau et al. 2011). Os nano/micropoluentes ainda não estão associados à redução das colônias de abelhas, entretanto, o perigo diante a exposição delas a essas partículas tende a aumentar devido à crescente poluição ambiental por nano/micropartículas (PlasticsEurope, 2018). Portanto, antecipar esse cenário é fundamental para entender como essa nano/micropoluição pode atuar em organismos polinizadores como as abelhas. Em *Megachile* sp. já foi descrito a construção de ninhos utilizando fragmentos de plásticos, uma forma de utilização dos resíduos plásticos descartados na agricultura (Maclvor & Moore 2013, Allasino et al. 2019), comprovando o quão importante é o estudo sobre a contaminação por

nano/microplásticos. Essa contaminação também é comprovada em abelhas *Apis mellifera* e *Apis cerana* coletadas em campo de diferentes localidades na China, inclusive dos resíduos mais encontrados destacam-se o PS e PET (polietileno) (Edo et al. 2021, Deng et al. 2021).

Neste trabalho investigamos os possíveis efeitos da ingestão das partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> durante a alimentação larval de *Partamona helleri*. Uma grande proporção desses materiais é usada e descartada em ecossistemas visitados pelas abelhas para coleta de recursos, expondo-as ao contato e ingestão desses poluentes (Roex et al. 2013, Horton et al. 2017, Ojha et al. 2018). Além disso, o uso de uma espécie de abelha nativa estimula a adequação de avaliações de risco, uma vez que considera a representatividade da espécie bioindicadora no ecossistema local.

## **2.0. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Abelhas**

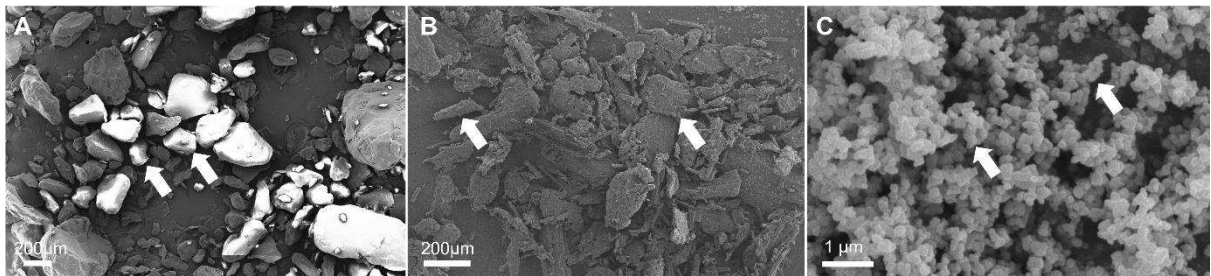
As abelhas *P. helleri* que foram utilizadas para o experimento estão estabelecidas no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG (20° 45' 14" S e 42° 52' 55" O). Favos de cria contendo ovos foram retirados de três colônias e armazenados em placas de Petri em incubadoras (28 ± 1°C, 70 ± 5% RH, no escuro) até o início dos bioensaios. As larvas foram expostas durante o desenvolvimento ao EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> (Bernardes et al. 2018, Botina et al. 2020).

### **2.2. Obtenção e caracterização das partículas**

Os dois tipos de plásticos testados foram o EPS (Sigma-Aldrich) e PET (Sigma-Aldrich), puros e sob a forma de grânulos. Os grânulos foram triturados em liquidificador. As doses utilizadas nos bioensaios foram de 0% (controle), 500ng/abelha de EPS e 500 ng/abelha de PET. A partícula nano-óxido metálica TiO<sub>2</sub> (Mago Indústria LTDA, Cotia, São Paulo, Brasil) foi disponibilizada em pó e a sua dose utilizada nos bioensaios foi de 10µg/abelha. O cálculo para as doses utilizadas foi derivado de testes preliminares com diferentes concentrações, assim como, foram

baseados em estudos anteriores (Zhu et al. 2018, Zorlu et al. 2018, López-Muñoz et al. 2019, Wang et al. 2021).

A caracterização das partículas de plástico e do  $\text{TiO}_2$  (Figura 1) foi realizada no microscópio eletrônico de varredura MEV VP1430 LEO (LEO Electron Microscopy Ltda., Cambridge, Reino Unido) do Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM-UFV) e no MEV JEOL - JSM-6010LA do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (DPF-UFV), sendo que as partículas foram coladas diretamente na fita adesiva dupla-face previamente montada em blocos (*stubs*) de alumínio e, em seguida, metalizadas com ouro em metalizador.



**Figura 1.** Micrografia eletrônica de varredura de micropartículas de plástico e de  $\text{TiO}_2$  (setas). **(A)** Poliestireno expandido (EPS); **(B)** Polietileno tereftalato (PET); **(C)** Dióxido de titânio,  $\text{TiO}_2$ .

### 2.3. Exposição

Células de cria artificiais foram montadas em placas de polietileno de 96 poços, revestidas e fechadas com cera de *Apis mellifera*, obtidas do Apiário Central da UFV. Cada célula de cria recebeu 40  $\mu\text{L}$  de dieta, suficiente para o desenvolvimento larval de operárias (Bernardes et al. 2018, Botina et al. 2020).

O alimento larval foi coletado dos favos de cria e misturado aos compostos nas concentrações testadas. Sendo que os microplásticos foram misturados diretamente à 37  $\mu\text{L}$  da dieta e depois adicionados 3  $\mu\text{L}$  de água, e o  $\text{TiO}_2$  foi diluído em três  $\mu\text{L}$  de água para posterior mistura à 37  $\mu\text{L}$  do alimento larval, totalizando assim 40  $\mu\text{L}$  de dieta contaminada com EPS ou PET ou  $\text{TiO}_2$  adicionada às células de cria. Foram utilizados 48 ovos em cada tratamento, incluindo o controle de cada colônia. Portanto, cada tratamento possuiu 144 ovos provenientes de três colônias diferentes ( $n=576$ ). Os favos de cria (placas de polietileno contendo os ovos) foram colocados dentro de

frascos dessecadores de vidro, mantidos em incubadora a  $28 \pm 1$  °C, sob escuridão total e umidade relativa (UR) de  $95 \pm 5\%$  até o término da alimentação larval.

Após o término do consumo do alimento, a umidade dentro do dessecador foi alterada utilizando uma solução saturada de cloreto de sódio para mantê-la a  $70 \pm 5\%$  de UR até a emergência dos adultos (Bernardes et al. 2018, Botina et al. 2020).

Após emergência, os adultos foram marcados de acordo com a data de emergência com tinta atóxica (Acrilex Tintas Especiais S.A., São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e mantidos em potes de plástico de 500ml a  $28 \pm 1$  °C e  $70 \pm 5\%$  de UR. As operárias foram alimentadas com 50% mel de abelhas melíferas e 50% de água destilada, fornecidas *ad libitum*.

#### **2.4. Sobrevivência e massa corporal**

A avaliação da sobrevivência foi feita diariamente. As abelhas que não foram identificadas como operárias e os ovos que não eclodiram foram excluídos das análises. Indivíduos que não apresentaram movimento respiratório (movimento da abertura do espiráculos) ou apresentaram uma coloração escura foram considerados mortos e descartados para evitar possíveis contaminações nas placas. Indivíduos com alteração morfológica foi considerado deformado. As pupas, com aproximadamente 24 dias após eclosão, foram analisadas em estereomicroscópio para verificação do sexo, de acordo com suas características morfológicas (Michener 1944). Operárias adultas foram pesadas em balança analítica para registro da massa corporal logo após a emergência (< 24 horas de idade adulta).

#### **2.5. Comportamento de locomoção**

Para avaliação do comportamento de locomoção, foi feita uma gravação com operárias com três dias de idade em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro e 2 cm de altura), durante 10 minutos, com auxílio de uma câmera de vídeo digital (HDR-XR520V, Sony Corporation) a 24 fps (*frames per second*) e alta definição (1920 × 1080 pixels) em uma sala a  $25 \pm 3$  °C e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa com três lâmpadas de led vermelho (seis watts) colocadas 50 cm acima das arenas. Os vídeos foram analisados pelo programa de vídeo rastreamento Ethoflow® (Bernardes et al. 2021, Instituto Nacional de Propriedade Industrial-INPI, Brasil, BR 51 2020 000737-6). Isso

possibilitou analisar os efeitos da ingestão das partículas de acordo com as variáveis associadas ao comportamento de locomoção: velocidade média (cm/s), meandros ( $^{\circ}$ /cm; a soma absoluta do ângulo que o indivíduo girou, dividido pela distância que o indivíduo percorreu durante o vídeo), tempo(s) de repouso e interações (todas as interações de um indivíduo com os demais do grupo); interação foi considerada quando os indivíduos se aproximaram de uma distância  $\leq 0,68$  cm. A definição matemática dessas variáveis pode ser encontrada em Bernardes et al. (2021). Foram analisados em média cinco indivíduos tratados com cada composto (EPS, PET ou TiO<sub>2</sub>) e cinco do controle para duas colônias diferentes em cada arena, perfazendo o experimento em duplicata técnica com um total de 72 abelhas (Vídeos suplementares).

## 2.6. Contagem total de hemócitos

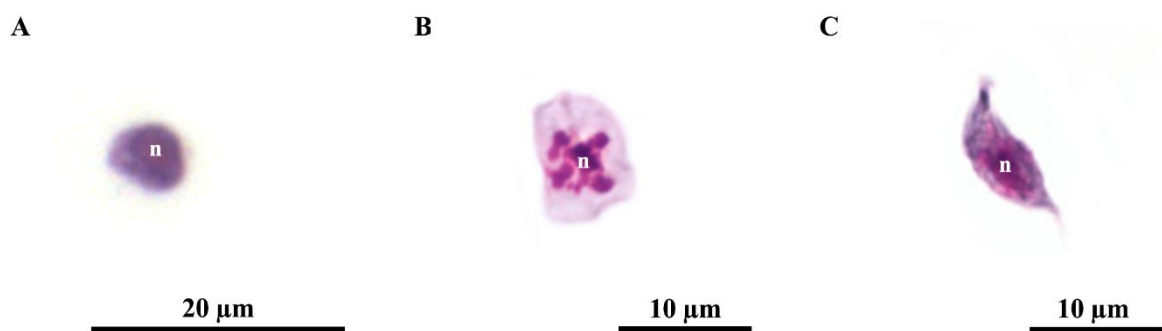
Para coleta da hemolinfa, 10  $\mu$ L de solução anticoagulante (0,098 M de NaOH, 0,145 M de NaCl, 0,017 M de EDTA e 0,041 M de ácido cítrico, pH 4,5) foram injetados no primeiro segmento do abdômen das abelhas imobilizada a frio ( $\pm 4$   $^{\circ}$ C), com uma seringa para aplicação de insulina (modificada de Araújo et al. 2008, Ravaiano et al. 2018ab, Viana et al. 2020). Uma micropipeta e ponteiras previamente siliconadas com SigmaCote (Sigma) foram utilizadas para coletar a hemolinfa (10  $\mu$ L). A hemolinfa coletada foi dispensada diretamente (sem diluição após a coleta) em câmara de Neubauer melhorada. A contagem total dos hemócitos foi feita ao microscópio óptico (Primo Star, Zeiss) com aumento final de 400x. Três abelhas expostas a cada tratamento (EPS, PET, TiO<sub>2</sub> ou controle) foram utilizadas de três colônias diferentes (n=36).

## 2.7. Contagem diferencial de hemócitos

Após a injeção de 10  $\mu$ L de solução anticoagulante, a quantidade máxima de hemolinfa extravasada foi coletada de cada abelha perfazendo um *pool* com três indivíduos. A hemolinfa foi dispensada em lâminas de vidro em linhas paralelas e permaneceu em repouso por 20 min para aderência das células e secagem. As amostras foram fixadas com metanol por 10 min, coradas com solução Giemsa em

tampão Sørensen (0,06M, pH 6,8), na proporção 1:30 (v/v), por 15 min e, finalmente foram lavadas com água corrente (Amaral et al. 2010).

Para cada tratamento, foram analisadas quatro lâminas com um *pool* de hemolinfa de três indivíduos de cada tratamento. As células foram identificadas e caracterizadas em microscópio óptico (Olympus BX53). Para contagem diferencial de hemócitos (CDH), duzentas células foram consideradas por lâmina para se estimar o número médio de três tipos principais de hemócitos (prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos) (Figura 2) por indivíduo (Adaptado de Ravaiano et al. 2018ab).



**Figura 2.** Hemócitos de operárias recém-emergidas de *Partamona helleri* com três dias de idade e corados com Giemsa. **(A)**. Prohemócitos com formato redondo com o núcleo (n) ocupando a maior parte da célula. **(B)**. Granulócitos em formato redondo com núcleos arredondados (n). **(C)**. Plasmatócitos em formato de meia-lua com o núcleo redondo central (n).

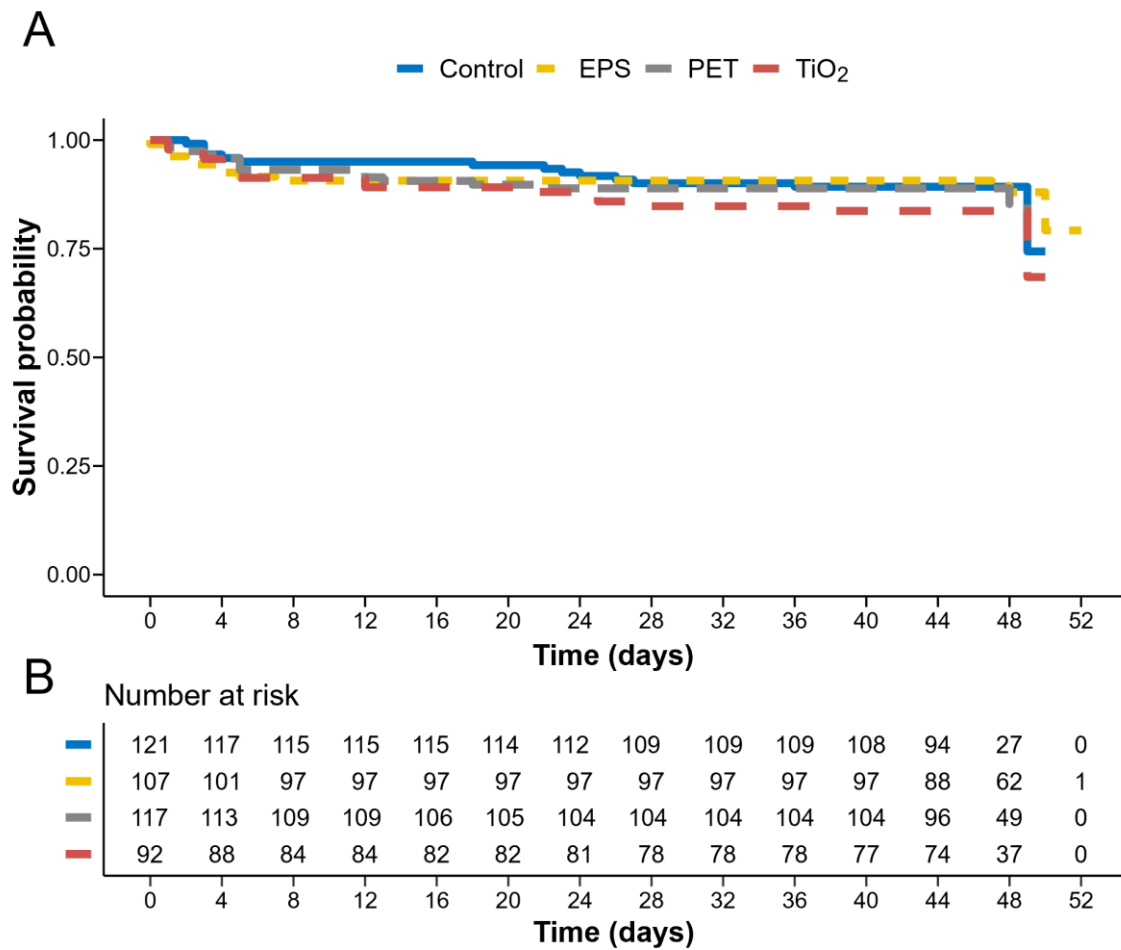
## 2.8. Análise estatística

A longevidade da fase imatura (períodos de larva e pupa somados) foi submetida à análise de sobrevivência pelo teste de log-Rank, com censura estabelecida na mudança dos indivíduos para a fase adulta. O peso dos adultos foi submetido a um modelo linear. A contagem total de hemócitos foi submetida a um modelo linear generalizado com distribuição de Poisson do erro. As proporções de prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos obtidas na contagem diferencial e a proporção de pupas deformadas foram submetidas a modelos lineares generalizados com distribuição binomial do erro. Em todos os modelos, lineares e lineares generalizados, os tratamentos com as nano/micropartículas e as colônias foram consideradas como efeitos fixos e testados, respectivamente, através do teste F e de

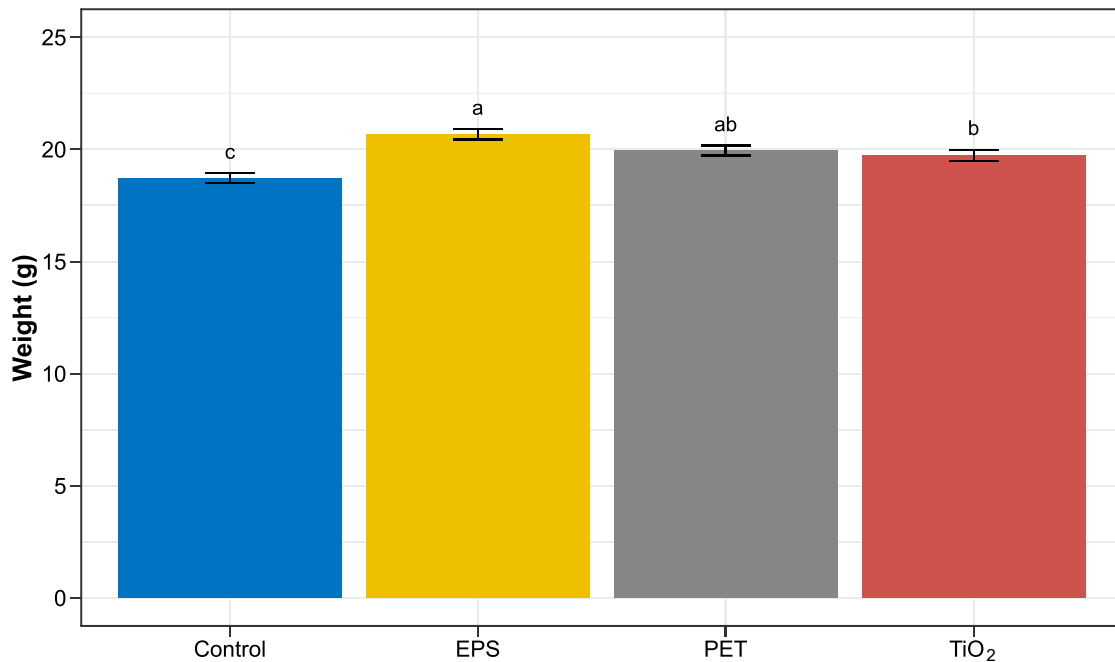
chi-quadrado considerando 5% de significância em ambos os testes. Além disso, o teste de Tukey a 5% de significância foi realizado quando os efeitos fixos dos tratamentos foram significativos. Todas as análises foram realizadas no software R. Os dados do comportamento de locomoção foram submetidos à análise de coordenadas principais (PCoA) com base na matriz de dissimilaridade de Mahalanobis (adequada para dados com variáveis medidas em diferentes escalas), e uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) com 10.000 permutações foi realizada para testar diferença significativa entre os tratamentos. Contrastes pareados entre os tratamentos foram aplicados com ajuste de Holm. Um teste de homogeneidade de dispersão multivariada (PERMDISP) foi utilizado para verificar a suposição da homogeneidade da PERMANOVA (Anderson 2017). Os contrastes pareados entre os tratamentos dos grupos foram aplicados com ajuste de Holm. Essas análises foram realizadas no software R (R Core Team 2021) usando o pacote vegan (Oksanen et al. 2019).

### 3.0. RESULTADOS

Não foi encontrada diferença significativa na sobrevivência dos imaturos de *P. helleri* submetidos a dietas com partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> em comparação com o controle ( $\chi^2 = 2.609$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0.544$ ; Figura 3). O peso dos adultos foi significativamente alterado pelos tratamentos ( $F_{3,354} = 14,637$ ;  $p < 0,001$ ), sendo maior em relação ao controle (Figura 4). Não houve diferença significativa na proporção de pupas deformadas entre os tratamentos ( $\chi^2 = 2,0026$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,572$ ); cuja valor geral foi de  $0,048 \pm 0,013$  (desvio-padrão).

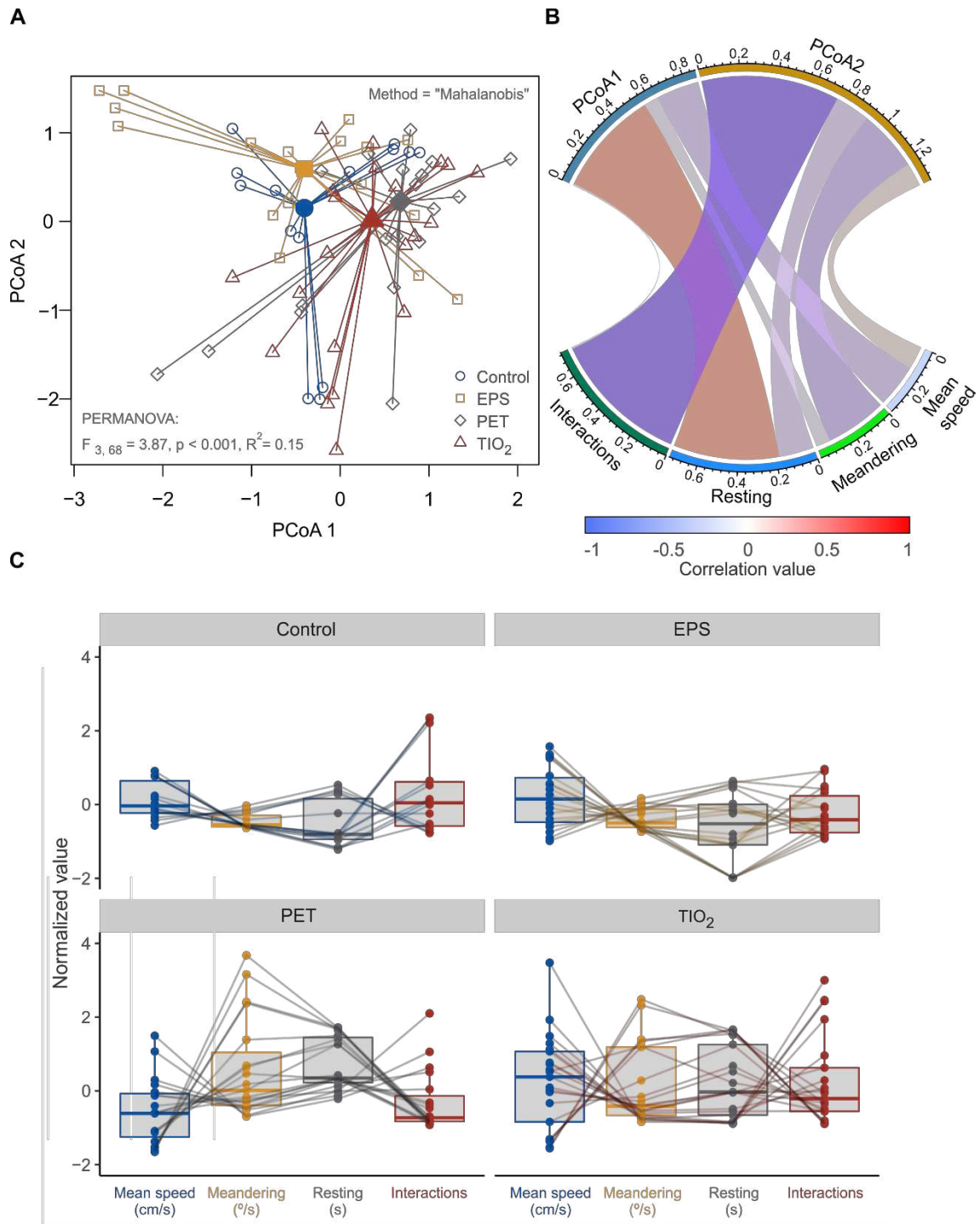


**Figura 3. (A)** Sobrevivência de imaturos de *Partamona helleri* alimentados com dieta larval contendo EPS, PET ou TiO<sub>2</sub>. Apenas água adicionada à dieta foi considerada como controle. O teste de log-Rank geral não indicou diferença significativa entre pelo menos um dos contrastes entre tratamentos ( $\chi^2 = 2,609$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,544$ ). **(B)** A tabela mostra o número de abelhas que permaneceram em risco em cada tratamento ao longo da avaliação.



**Figura 4.** Peso dos adultos de *Partamona helleri* provenientes de larvas alimentadas em dieta contendo EPS, PET, TiO<sub>2</sub> ou controle. Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

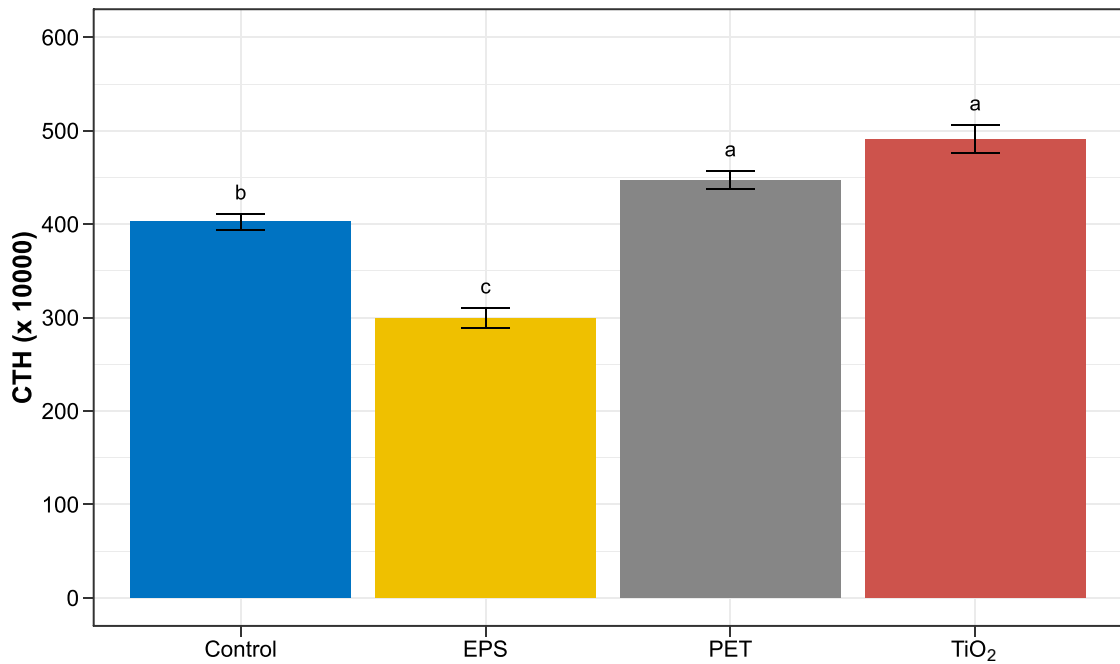
O comportamento de locomoção variou entre os tratamentos (PERMANOVA:  $F_{3,68} = 3,87$ ,  $p < 0,001$ ,  $R^2 = 0,15$ ) (Figura 5A, Tabela suplementar 1). A principal variável (que apresentou maior importância) em relação à dimensão PCoA1 foi o repouso (Figura 5B), como também indicado na ordenação da PCoA1 em abelhas alimentadas com partículas de PET ou TiO<sub>2</sub>, que apresentaram valores maiores (Figura 5A). A variável apresentou maior evidência negativa foi a interação com a dimensão PCoA2 (Figura 5B). Assim, as abelhas nos tratamentos com as partículas de PET e TiO<sub>2</sub> tenderam a interagir mais (Figura 5C), uma vez que eles apresentaram valores menores em relação a ordenação no PCoA2 (Figura 5A).



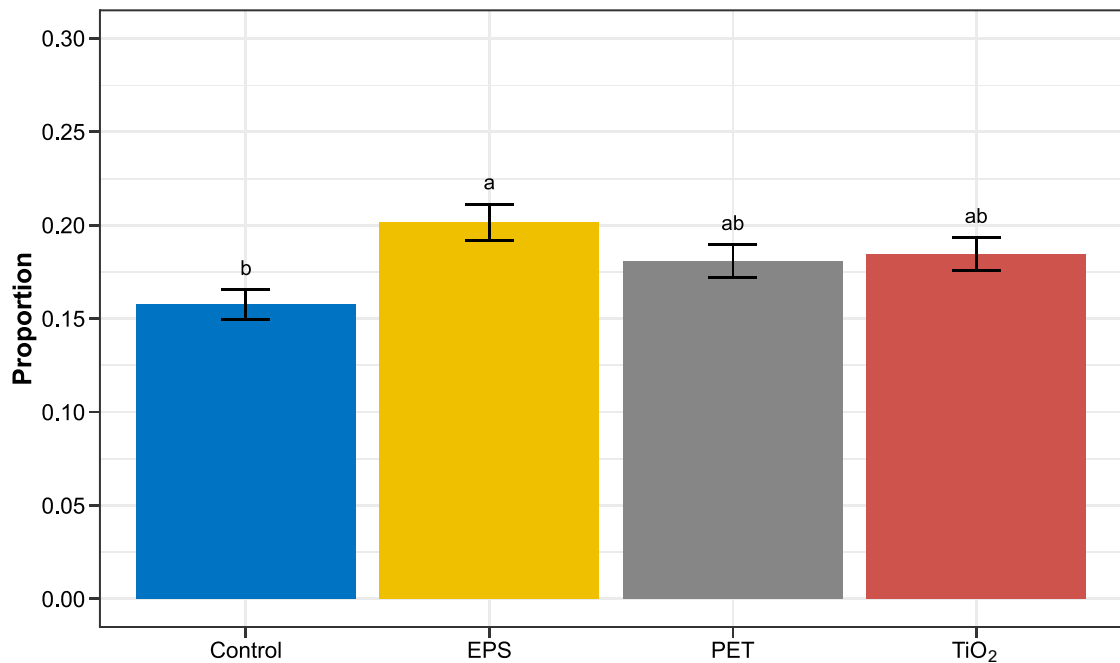
**Figura 5.** Comportamento de locomoção de operárias de *Partamona helleri* provenientes de larvas alimentadas com partículas de EPS, PET,  $TiO_2$  ou controle durante 10 minutos. As variáveis comportamentais avaliadas foram velocidade média (cm/s), meandros ( $^{\circ}/cm$ ; a soma absoluta do ângulo que o indivíduo girou dividido pela distância que o indivíduo percorreu), tempo de repouso (s) e interações (considerada interação quando as abelhas se aproximaram uma distância  $\leq 0,68$  cm). **(A)** Ordenação da análise de coordenadas principais (PCoA) da matriz de dissimilaridade

de Mahalanobis entre os tratamentos. As diferenças dos tratamentos foram comparadas por análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA). Cada ponto representa uma amostra ( $n=72$ ), e os segmentos unem pontos ao seu centroide. **(B)** Diagrama de correlações entre as duas dimensões (PcoA 1 e PcoA 2) da PcoA e as variáveis comportamentais. A espessura das conexões do arco representa o valor de correlação, bem como a barra horizontal. **(C)** Parcela dividida por tratamentos exibindo distribuição (ou seja, caixas indicando a mediana e dispersão; quartis inferior e superior) das variáveis comportamentais avaliadas nas abelhas. Cada característica foi dimensionada (normalizada) para o intervalo padrão (média = 0 e desvio padrão = 1), subtraindo a média de cada variável e dividindo pelo seu desvio padrão.

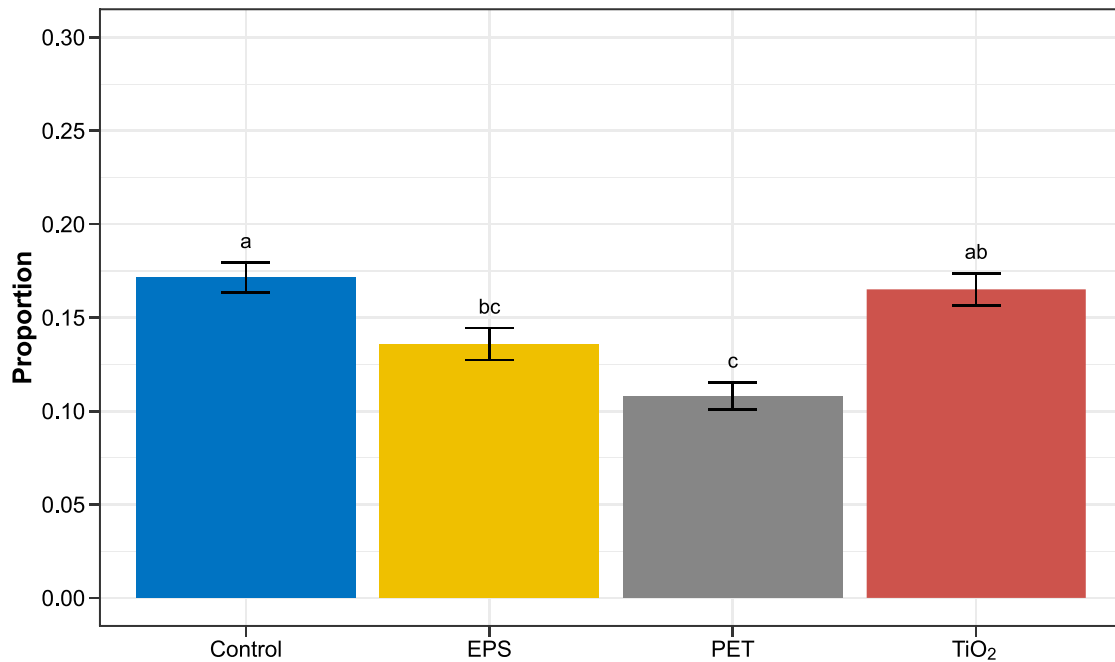
A CTH foi afetada significativamente nos indivíduos tratados em comparação ao controle ( $\chi^2 = 146,923$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Abelhas alimentadas com PET ou  $TiO_2$  aumentaram significativamente a CTH, enquanto, as abelhas alimentadas com EPS, a CTH diminuiu em comparação ao controle (Figura 6). A inclusão dos poluentes na dieta larval não fez diferença significativa na proporção dos granulócitos dos adultos ( $\chi^2 = 5,9966$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,1118$ ), porém, eles alteram significativamente a proporção dos prohemócitos ( $\chi^2 = 11,5381$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,009$ ) e dos plasmatócitos ( $\chi^2 = 40,329$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) em comparação ao controle. Nesse caso, em abelhas alimentadas com EPS a proporção de prohemócitos aumentou (Figura 7), enquanto o tratamento com EPS e o PET a proporção de plasmatócitos diminuiu (Figura 8) em comparação ao controle.



**Figura 6.** Contagem total de hemócitos (CTH) dos adultos de *Partamona helleri* provenientes de larvas alimentadas em dieta contendo EPS, PET, TiO<sub>2</sub> ou controle. Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Proporção de prohemócitos dos adultos de *Partamona helleri* provenientes de larvas alimentadas em dieta contendo EPS, PET, TiO<sub>2</sub> ou controle. Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Proporção de plasmatócitos dos adultos de *Partamona helleri* provenientes de larvas alimentadas em dieta contendo EPS, PET, TiO<sub>2</sub> ou controle. Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.0 DISCUSSÃO

Nano/micropartículas plásticas ou de metal são encontradas em quase todos os ambientes representando uma ameaça emergente à conservação e à biodiversidade (Chowdappa & Gowda, 2013, Aziz et al. 2015, 2016, PlasticsEurope 2018). Muitos estudos relatam uma variedade de efeitos que eles podem causar, de insignificante até prejudicial, porém, pouco se sabe sobre o seu efeito na biota terrestre, e principalmente dos possíveis impactos nos polinizadores. Nossa pesquisa foi pioneira em avaliar os efeitos da ingestão de partículas de plásticos (EPS ou PET) e TiO<sub>2</sub> por *P. helleri*. A ingestão não alterou a sobrevivência e morfologia das abelhas, entretanto, o peso, o comportamento de locomoção, a CTH e CDH foram alterados em comparação com o controle.

Altas concentrações da ingestão de nano/micropartículas poluentes possuem efeitos prejudiciais aos organismos, essas partículas podem ser bioacumuladas na cadeia alimentar (Huerta Lwanga et al. 2016, Messinetti et al. 2018, Al Nagggar et al. 2018, Ferrara et al. 2020, Al Nagggar et al. 2021). Por exemplo, em adultos do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, da ascídia *Ciona robusta*, e da minhoca *Lumbricus*

*terrestris*, a sobrevivência e o desenvolvimento foram prejudicados após a ingestão de microplásticos (Huerta Lwanga et al. 2016, Messinetti et al. 2018), assim como, em adultos *A. mellifera* houve uma maior mortalidade após a ingestão de óxidos metálicos (Al Naggar et al. 2018) e após a ingestão de PS (Wang et al. 2022). Entretanto, a sobrevivência e o desenvolvimento de *P. helleri* submetidos a dieta contendo partículas poluentes não foi afetada. Isso pode ser devido ao fato de as concentrações ingeridas tenham sido subletais. Esse resultado é semelhante ao observado em adultos *A. mellifera* após a ingestão de micropartículas de polietileno em baixas concentrações, onde o efeito significativo na mortalidade foi encontrado somente para concentrações mais altas (Balzani et al. 2022). Essa diversidade de respostas ressaltam a importância de estudos considerando a ingestão de partículas poluentes com diferentes animais terrestres.

Um impacto na alimentação e, conseqüentemente, redução do peso foi observado em adultos do copépode *Calanus helgolandicus* e em adultos de *A. mellifera* após ingestão de microplástico poliestileno e de óxidos metálicos de chumbo e cádmio, respectivamente (Cole et al. 2015, Al Naggar et al. 2018). A redução do peso também foi observada em *A. mellifera* após o consumo de nanopartículas de PS, assim como a acumulação dessas partículas no reto e/ou aderência no pólen germinativo e bactérias intestinais (Wang et al. 2022). No caso de *P. helleri*, foi observado um aumento na massa corpórea das abelhas que ingeriram as partículas poluentes em comparação ao controle, e esse resultado pode ser explicado pelo fato de que essas partículas se acumulam no corpo das abelhas (Deng et al. 2021, Wang et al. 2022), podendo alterar a expressão gênica da resposta de desintoxicação e equilíbrio energético (Wang et al. 2022), levando ao acúmulo da massa corporal. Esse aumento também foi observado para larvas de *Bombis mori* após a ingestão de  $TiO_2$  (Wang et al. 2015, Li et al. 2016). É importante observar que ocorre uma variação na massa corpórea dependente dos compostos ingeridos e das espécies analisadas. Estudos comportamentais (como a análise do comportamento de vôo), assim como, estudos em diferentes órgãos das abelhas terão que ser realizados para comprovar a presença destas partículas e qual seria o efeito desse acúmulo.

A capacidade cognitiva comportamental dos animais pode ser comprometida após a ingestão das nano/micropartículas poluidoras (von Moos et al. 2012, Al Naggar et al. 2018, Deng et al. 2021, Balzani et al. 2022). Por exemplo, em adultos *A. mellifera*

*lingustica*, o comportamento alimentar foi afetado de forma dependente da concentração ingerida, com uma ingestão maior de alimento quando expostas a baixas concentrações de PE, e a alta concentração afetou a capacidade das abelhas de responder à sacarose (Balzani et al 2022). O comportamento alimentar em adultos *A. mellifera* variou de acordo com o composto metálico ingerido, de forma que a ingestão de cádmio ou cobre não alterou sensibilidade à sacarose, mas foi alterada após o consumo de chumbo (Burden et al. 2019). A ingestão de partículas PET ou TiO<sub>2</sub> em concentrações subletais também afetou o caminhar de *P. helleri*. A capacidade cognitiva é essencial no processo de polinização e manutenção das colônias, o estudo sobre a ingestão de nano/micropartículas poluentes por abelhas é de grande relevância, pois qualquer dano comportamental nos indivíduos pode comprometer a sobrevivência das colônias.

A quantidade de hemócitos é um importante parâmetro para entender a resposta imune celular diante de um estresse ambiental (Brandt et al. 2016, 2017, Quintana et al. 2019). Considerando isso, a CTH foi determinada em adultos *P. helleri* após a ingestão de partículas poluentes durante a fase larval. Essa resposta foi alterada, tendo em vista que a CTH aumentou nas abelhas tratadas com PET ou TiO<sub>2</sub> em relação ao controle. Um aumento de CTH também foi relatado em adultos do crustáceo *Procambarus clarkii*, após a ingestão de partículas de PS (Capanni et al. 2021), entretanto, a CTH não foi alterada em adultos do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* após ingestão do PS (Auguste et al. 2020). Em contrapartida, houve uma redução na CTH em comparação ao controle em abelhas alimentadas com EPS. Essa imunossupressão também foi constatada em adultos do molusco *Tegillarca granosa* e do crustáceo *Procambarus clarkii* após a ingestão do microplástico PS e polietileno, respectivamente (Shi et al. 2020, Zhang et al. 2022), assim como em adultos do mexilhão *Mytilus coruscus* após ingestão de nanopartícula TiO<sub>2</sub> (Wang et al. 2019). Estes dados da literatura, juntamente com os dados do nosso trabalho, sugerem que os efeitos sobre a CTH dependem do composto testado e das espécies expostas. Reduções na quantidade de hemócitos circulantes pode prejudicar a fagocitose, nodulação e encapsulação, bem como, a melanização, o transporte e a estocagem de nutrientes, além da coagulação, cicatrização, e a desintoxicação (Lavine & Strand 2002, Strand 2008). Sendo assim, a ingestão de partículas poluentes

durante a fase larval compromete a resposta imune celular de adultos de *P. helleri*, e provavelmente, prejudica as suas colônias.

Uma outra maneira importante utilizada para mensurar a defesa celular é a CDH devido à resposta imune ser mediada por hemócitos, responsáveis pela fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (Lavine & Strand 2002). A alimentação com EPS aumentou a proporção de prohemócitos (células-tronco) em comparação com o controle, e possivelmente isso acontece para remediar a formação de outros hemócitos (Lanot et al. 2001), tendo em vista que essas células dão origem a outros hemócitos (Lanot et al. 2001, Lavine & Strand 2002). Todavia, a proporção de granulócitos não foi alterada após a exposição, como eles são as células imunes mais ativas, era esperado uma alteração na sua quantidade em abelha tratadas. Tendo em vista que, a quantidade de granulócitos em circulação depende da sua própria divisão após a diferenciação (Gardiner & Strand 2000), e a sua diferenciação foi sugerida a partir dos plasmatócitos oriundo dos prohemócitos, ou diretamente dos prohemócitos (Yamashita & Iwabuchi 2001, Lavine & Strand 2002). E como as quantidades de prohemócitos e plasmatócitos foram alteradas com a ingestão de partículas de EPS ou PET, sugere-se uma ocultação na resposta dos granulócitos oriundos de abelhas tratadas em comparação ao controle. A quantidade de plasmatócitos (células-fagocíticas) diminuiu nas abelhas alimentadas com EPS ou PET. Essa imunossupressão pode ser devida a esses hemócitos aderirem a superfícies de alvos abióticos no processo de encapsulação (Lavine & Strand 2001, 2002), constituindo uma barreira entorno das partículas que poderiam estar na cavidade corpórea, o que precisa ser investigado.

Danos ocasionados por partículas microplásticas e óxidos metálicos foram observados em abelhas (Özkan et al 2014, Nikolic et al. 2015, Al Nagggar et al. 2018, Deng et al. 2021, Wang et al. 2021, Balzani et al. 2022). Em adultos de *A. mellifera ligustica*, a exposição ao microplástico de PE afetou a sobrevivência e o comportamento (Balzani et al. 2022). A ingestão de partículas de PS por adultos de *A. mellifera* e *A. cerana* danificou o intestino médio, alterou a microbiota intestinal e a expressão gênica (Wang et al. 2021, Deng et al. 2021, Wang et al. 2022). Todavia, a exposição aos metais chumbo e zinco, e a ingestão aos óxidos de chumbo e de cádmio em adultos de *A. mellifera* diminui a sobrevivência e a taxa de alimentação e alterou a expressão dos genes envolvidos no estresse oxidativo (Nikolic et al. 2015,

Al Naggar et al. 2018). Além dos danos indicados acima, no nosso trabalho foi comprovado que a ingestão de partículas plásticas e de TiO<sub>2</sub> ocasionam alterações comportamentais, fisiológicas e imunes em *P. helleri*.

O presente trabalho é um estudo inovador, sendo o primeiro a avaliar os efeitos da ingestão de partículas de plásticos e de TiO<sub>2</sub> na sobrevivência, desenvolvimento e massa corporal de *P. helleri*, bem como avaliar a dinâmica comportamental e células da resposta imune diante da ingestão destes componentes. Embora a exposição a nano/micropartículas poluidoras não seja um fator reconhecido por influenciar o declínio populacional das abelhas, alterações fisiológicas, imunes e comportamentais foram ocasionados às abelhas sem ferrão pela ingestão destes poluentes em condições controladas. Portanto, a contaminação por nano/micropartículas plásticas ou de TiO<sub>2</sub> tem potencial para ocasionar efeitos subletais nas colônias. Os dados aqui expostos mostram que a exposição a micropartículas poluidoras pode ser um dos fatores que influenciam o declínio populacional de polinizadores, e entender como esses fatores atuam e se relacionam é crucial para gerar informações a fim de apoiar estratégias na conservação de polinizadores. Enfatizamos a necessidade de estudos ecotoxicológicos de campo para melhor compreender o papel das nano/micropartículas poluidoras no declínio da população de abelhas.

## 5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL NAGGAR, Y.; DABOUR, K.; MASRY, S.; SADEK, A.; NAIEM, E.; GIESY, J. P. Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19004-19015, 2018.
- AL NAGGAR, Y.; BRINKMANN, M.; SAYES, C. M.; AL-KAHTANI, S. N.; DAR, S. A.; EL-SEEDI, H. R.; BERND GRÜNEWALD & GIESY, J. P. Are honey bees at risk from microplastics? *Toxics*, 9(5), 109, 2021.
- ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHAMITCHAN, S.; COUSIN, M.; LE CONTE, Y. Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12, 3, 774–782, 2010.

- ALLASINO, M. L.; MARRERO, H. J.; DORADO, J.; TORRETTA, J. P. Scientific note: first global report of a bee nest built only with plastic. *Apidologie*, 230-233, 2019.
- AMARAL, I.M.R.; NETO, J.F.M.; PEREIRA, G.B.; FRANCO, M.B.; BELETTI, M.E.; KERR, W.E.; BONETTI, A.M.; UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron* 41, 123–129, 2010.
- ANDERSON, M.J. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Wiley StatsRef: Statistics Reference Online, American Cancer Society, 1-15, 2017.
- ARAÚJO, H.C.R.; CAVALCANTI, M.G.S.; SANTOS, S.S.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron* 39, 184–189, 2008.
- AUGUSTE, M.; BALBI, T.; CIACCI, C.; CANONICO, B.; PAPA, S.; BORELLO, A.; VEZZULLI, L.; CANESI, L. Shift in immune parameters after repeated exposure to nanoplastics in the marine bivalve *Mytilus*. *Frontiers in immunology*, 11, 426, 2020.
- AZIZ, N., FARAZ, M., PANDEY, R., SHAKIR, M., FATMA, T., VARMA, A.; BARMAN, I.; PRASAD, R. Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial, and photocatalytic properties. *Langmuir* 31, 11605–11612, 2015.
- AZIZ, N.; PANDEY, R.; BARMAN, I.; PRASAD, R. Leveraging the attributes of *Mucor hiemalis*-derived silver nanoparticles for a synergistic broad-spectrum antimicrobial platform. *Frontiers in Microbiology* 7, 1984, 2016.
- BALZANI, P.; GALEOTTI, G.; SCHEGGI, S.; MASONI, A.; SANTINI, G.; BARACCHI, D. Acute and chronic ingestion of polyethylene (PE) microplastics has mild effects on honey bee health and cognition. *Environmental Pollution*, 305, 119318, 2022.
- BARNES, D. K.; GALGANI, F.; THOMPSON, R. C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1526), 1985-1998, 2009.

BERNARDES, R. C.; BARBOSA, W. F.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P. The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens. *Chemosphere*, 201, 550-556, 2018.

BERNARDES, R.C.; LIMA, M.A.P.; GUEDES, R.N.C.; MARTINS, G.F. Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. *Sensors*, 21, 3237, 2020.

BOTINA, L. L., BERNARDES, R. C., BARBOSA, W. F., LIMA, M. A. P., GUEDES, R. N., & MARTINS, G. F. Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). *MethodsX*, 100906, 2020.

BOTTERELL, Z. L.; BEAUMONT, N.; DORRINGTON, T.; STEINKE, M.; THOMPSON, R. C.; LINDEQUE, P. K. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environmental Pollution*, 98-110, 2019.

BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BÜCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal. Insect Physiology.*, 86, 40-47, 2016.

BRANDT, A.; GRIKSCHKEIT, K.; SIEDE, R.; GROSSE, R.; MEIXNER, M.D., BÜCHLER, R. Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. *Scientific Reports*, 7(11), 1-12, 2017.

BURDEN, C. M.; MORGAN, M. O.; HLADUN, K. R.; AMDAM, G. V.; TRUMBLE, J. J.; SMITH, B. H. Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior. *Scientific reports*, 9(1), 1-10, 2019.

CAPANNI, F.; GRECO, S.; TOMASI, N.; GIULIANINI, P. G.; MANFRIN, C. Orally administered nano-polystyrene caused vitellogenin alteration and oxidative stress in the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of the Total Environment*, 791, 147984, 2021.

- CHAE, Y.; AN, Y. J. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environmental Pollution*, 240, 387-395, 2018.
- CHOWDAPPA, P.; GOWDA, S. Nanotechnology in crop protection: status and scope. *Pest Management Horticultural Ecosystems*, 19 (2), 131–151, 2013.
- COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597, 2011.
- COLE, M.; LINDEQUE, P.; FILEMAN, E.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental science & technology*, 49(2), 1130-1137, 2015.
- DALAI, S.; PAKRASHI, S.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Acute toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under visible light and dark conditions in a freshwater system. *PLoS One*, 8(4), e62970, 2013.
- DENG, Y.; JIANG, X.; ZHAO, H.; YANG, S.; GAO, J.; WU, Y.; DIAU, Q.; HOU, C. Microplastic Polystyrene Ingestion Promotes the Susceptibility of Honeybee to Viral Infection. *Environmental Science & Technology*, 55(17), 11680-11692, 2021.
- EDO, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; VEJSNÆS, F.; VAN DER STEEN, J. J.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F.; ROSAL, R. Honeybees as active samplers for microplastics. *Science of The Total Environment*, 767, 144481, 2021.
- FERRARA, G.; SALVAGGIO, A.; PECORARO, R.; SCALISI, E. M.; PRESTI, A. M.; IMPELLIZZERI, G.; BRUNDO, M. V. Toxicity assessment of nano-TiO<sub>2</sub> in *Apis mellifera* L., 1758: histological and immunohistochemical assays. *Microscopy Research and Technique*, 83(4), 332-337, 2020.
- FOEKEMA, E. M.; DE GRUIJTER, C.; MERGIA, M. T.; VAN FRANEKER, J. A.; MURK, A. J.; KOELMANS, A. A. Plastic in North Sea fish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8818-8824, 2013.

- FORMIGONI, A.; CAMPOS, I. P. A. Reciclagem de PET no Brasil. Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia, Rio de Janeiro, 2012.
- GARDINER, E. M. M.; STRAND, M. R. Hematopoiesis (in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*). Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 43(4), 147-164, 2000.
- GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science Advances, 3(7), e1700782, 2017.
- GRAHAM, E. R.; THOMPSON, J. T. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 368(1), 22-29, 2009.
- HUERTA LWANGA, E.; GERTSEN, H.; GOOREN, H.; PETERS, P.; SALÁNKI, T., VAN DER PLOEG, M.; BESSELING, E.; KOELMANS, A. A.; GEISSEN, V. (2016). Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). Environmental science & technology, 50, 5, 2685-2691, 2016.
- HUERTA LWANGA, E.; GERTSEN, H.; GOOREN, H.; PETERS, P.; SALÁNKI, T.; VAN DER PLOEG, M.; BESSELING, E.; KOELMANS, A. A.; GEISSEN, V. Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*. Environmental Pollution, 220, 523-531, 2017.
- HO, B. T.; ROBERTS, T. K.; LUCAS, S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. Critical reviews in biotechnology, 38(2), 308-320, 2018.
- HORTON, A.A.; WALTON, A.; SPURGEON, D.J.; LAHIVE, E.; SVENDSEN, C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. Science of the Total Environment 586, 127-141, 2017.

- HUNTSMAN TECHNICAL BULLETIN 1-1.0, INTRODUCTION TO EXPANDABLE POLYSTYRENE July 2001 <[www.huntsman.com/polymers/media/EPS1-1.0.pdf](http://www.huntsman.com/polymers/media/EPS1-1.0.pdf)> (accessed 20 may 2021)
- LANOT, R.; ZACHARY, D.; HOLDER, F.; MEISTER, M. 2001. Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 230, 243–257, 2001.
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudaletia includens*. *Journal of Insect Physiology*, 47(9), 965-974, 2001.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. 2002. Insect haemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemical. Molecular. Biology*, 32, 25–47, 2002.
- LI, Y.; NI, M.; LI, F.; ZHANG, H.; XU, K.; ZHAO, X.; TIAN, J.; HU, J.; WANG, B.; SHEN, W.; LI, B. Effects of TiO<sub>2</sub> NPs on silkworm growth and feed efficiency. *Biological Trace Element Research*, 169(2), 382-386, 2016.
- LÓPEZ-MUÑOZ, D.; OCHOA-ZAPATER, M. A.; TORREBLANCA, A.; GARCERÁ M. D. Evaluation of the effects of titanium dioxide and aluminum oxide nanoparticles through tarsal contact exposure in the model insect *Oncopeltus fasciatus*, *Science of The Total Environment*, 666, 759-765, 2019.
- MACLVOR, J. S.; MOORE, A. E. Bees collect polyurethane and polyethylene plastics as novel nest materials. *Ecosphere*, 4, 12, 1-6, 2013.
- MATTSSON, K.; JOCIC, S.; DOVERBRATT, I.; HANSSON, L. A. Nanoplastics in the aquatic environment. In *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, 379-399, 2018.
- MESSINETTI, S.; MERCURIO, S.; PAROLINI, M.; SUGNI, M.; PENNATI, R. Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. *Environmental Pollution*, 237, 1080-1087, 2018.
- MICHENER, C. D. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of National History*, v. 82, article 6, 1944.

- NIKOLIĆ, T.V.; PURAĆ, J.; ORČIĆ, S.; KOJIĆ, D.; VUJANOVIĆ, D.; STANIMIROVIĆ, Z.; BLAGOJEVIĆ, D. P. Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 90(4), 181-194, 2015.
- OJHA, S.; SINGH, D.; SETT, A.; CHETIA, H.; KABIRAJ, D.; BORA, U. Nanotechnology in Crop Protection. In *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. Academic Press, 2018. pp. 345-391
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; SZOECS, E.; WAGNER, H., *Vegan: community ecology package*. 2019.
- ÖZKAN, Y.; IRENDE, İ.; AKDENİZ, G.; KABAKÇI, D.; SÖKMEN, M. Evaluation of the comparative acute toxic effects of TiO<sub>2</sub>, Ag-TiO<sub>2</sub> and ZnO-TiO<sub>2</sub> composite nanoparticles on honey bee (*Apis mellifera*). *J. Int. Environmental application & science*, 10, 1, 26-36, 2014.
- PARISI, C.; VIGANI, M.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today*, 10 (2), 124–127, 2015.
- PLASTICSEUROPE. *Plastics the facts 2018. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2017*, PlasticsEurope, p. 26, 2018.
- POSSATTO, F. E.; BARLETTA, M.; COSTA, M. F.; DO SUL, J. A. I.; DANTAS, D. V. Plastic debris ingestion by marine catfish: an unexpected fisheries impact. *Marine Pollution Bulletin*, 62(5), 1098-1102, 2011.
- POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353, 2010.
- QUINTANA, S.; BRADESCO, C.; NEGRIL, P.; MARIN, M.; PAGNUCO, I.; SZAWARSKI, N.; REYNALDI, F.; LARSEN, A.; EGUARAS, M.; MAGGI, M. Up-regulated pathways in response to Deformed Wing Virus infection in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Revista de la Sociedad Entomológica*

Argentina, 78(1), 2019.

- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. <<https://www.R-project.org/>> (accessed may 2021).
- RAVAIANO, S. V.; BARBOSA, W. F.; CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. Variations in circulating hemocytes are affected by age and caste in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *The Science of Nature*, 105(7-8), 48, 2018a.
- RAVAIANO, S. V.; BARBOSA, W. F.; TOMÉ, H. V. V.; DE OLIVEIRA CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 152, 24-28, 2018b.
- REBOLLEDO, E. L. B.; VAN FRANEKER, J. A.; JANSEN, O. E.; BRASSEUR, S. M. Plastic ingestion by harbour seals (*Phoca vitulina*) in The Netherlands. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1-2), 200-202, 2013.
- RILLIG, M. C. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental Science & Technology*, 46, 6453–6454, 2012.
- RODRIGUEZ-SEIJO, A.; LOURENÇO, J.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DA COSTA, J.; DUARTE, A. C.; VALA, H.; PEREIRA, R. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution*, 220, 495-503, 2017.
- ROEX, E.; VETHAAK, D.; LESLIE, H.; KREUK, M. D. Potential risk of microplastics in the fresh water environment. STOWA, Amersfoort. 2013.
- SIMÕES, C. L.; PINTO, L. M. C.; BERNARDO, C. A. Environmental and economic analysis of end of life management options for an HDPE product using a life cycle thinking approach. *Waste Management & Research*, 32(5), 414-422, 2014.
- SHI, W.; HAN, Y.; SUN, S.; TANG, Y.; ZHOU, W.; DU, X.; LIU, G. Immunotoxicities of microplastics and sertraline, alone and in combination, to a bivalve species: size-

dependent interaction and potential toxication mechanism. *Journal of hazardous materials*, 396, 122603, 2020.

STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect immunology*, 32, 25-47, 2008.

THOMPSON, R. C. Microplastics in the marine environment: sources, consequences and solutions. Bergmann M, Gutow L, Klages M, editors. *Marine Anthropogenic Litter*, 2015.

THOMPSON, R. C.; OLSEN, Y.; MITCHELL, R. P.; DAVIS, A.; ROWLAND, S. J.; JOHN, A. W.; MCGONIGLE, D.; RUSSELL, A. E. Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 304(5672), 838-838, 2004.

VAN FRANEKER, J. A.; BLAIZE, C.; DANIELSEN, J.; FAIRCLOUGH, K.; GOLLAN, J.; GUSE, N.; HANSEN, P. L.; HEUBECK, M.; JENSEN, J. K.; GUILLOU, G. L.; OLSEN, B.; OLSEN, K. O.; PEDERSEN, J.; STIENEN, E. W. M.; TURNER, D. M. Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. *Environmental Pollution*, 159(10), 2609-2615, 2011.

VIANA, T. A.; BARBOSA, W. F.; LOURENÇO, A. P.; SANTANA, W. C.; CAMPOS, L. O.; MARTINS, G. F. Changes in innate immune response and detoxification in *Melipona quadrifasciata* (Apinae: Meliponini) on oral exposure to azadirachtin and spinosad. *Apidologie*, 52(1), 252-261, 2021.

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *Plos One*, v. 6, n. 6, e21550, 2011.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. Pot-honey: a legacy of stingless bees. (Eds.). Springer Science & Business Media, 2013. pp. 3-17.

VON MOOS, N.; BURKHARDT-HOLM, P.; KÖHLER, A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327-11335, 2012.

- WANG, L.; SU, M.; ZHAO, X.; HONG, J.; YU, X.; XU, B.; SHENG, L.; LIU, D.; SHEN, W.; LI, B.; HONG, F. Nanoparticulate TiO<sub>2</sub> protection of midgut damage in the silkworm (*Bombyx mori*) following phoxim exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(3), 534-542, 2015.
- WANG, S., DOS-SANTOS, A. L., HUANG, W., LIU, K. C., OSHAGHI, M. A., WEI, G., AGRE, P. & JACOBS-LORENA, M. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science*, 357(6358), 1399-1402, 2017.
- WANG, T.; HUANG, X.; JIANG, X.; HU, M.; HUANG, W.; WANG, Y. Differential in vivo hemocyte responses to nano titanium dioxide in mussels: Effects of particle size. *Aquatic Toxicology*, 212, 28-36, 2019.
- WANG, K.; LI, J.; ZHAO, L.; MU, X.; WANG, C.; WANG, M.; XIAOFENG XUE A.; SUZHEN QI A.; WU, L. Gut microbiota protects honey bees (*Apis mellifera* L.) against polystyrene microplastics exposure risks. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123828, 2021.
- WANG, K.; ZHU, L.; RAO, L.; ZHAO, L.; WANG, Y.; WU, X.; ZHENG, H.; LIAO, X. (2022). Nano-and micro-polystyrene plastics disturb gut microbiota and intestinal immune system in honeybee. *Science of the Total Environment*, 842, 156819, 2022.
- YAMASHITA, M.; WABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of insect physiology*, 47(4-5), 325-331, 2001.
- ZHANG, X.; JIN, Z.; SHEN, M.; CHANG, Z.; YU, G.; WANG, L.; XIA, X. Accumulation of polyethylene microplastics induces oxidative stress, microbiome dysbiosis and immunoregulation in crayfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 125, 276-284, 2022.
- ZHU, B. K.; FANG, Y. M.; ZHU, D.; CHRISTIE, P.; KE, X.; ZHU, Y. G. Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Pollution*, 239, 408-415, 2018.
- ZORLU, T.; NURULLAHOĞLU, Z. U.; ALTUNTAŞ, H. Influence of dietary titanium dioxide nanoparticles on the biology and antioxidant system of model insect,

*Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of the Entomological Research Society, 20(3), 89-103, 2018.

## Material suplementar

**Tabela suplementar 1.** Contraste pareado entre os tratamentos (aplicado com um ajuste de Holm) na análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) a partir de dados do comportamento de locomoção de abelhas alimentadas com as partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub>. Apenas água adicionada a dieta larval foi considerada como controle. O asterisco indica diferença significativa realizada pela análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) ( $p < 0,05$ ).

Pairs	F value	R <sup>2</sup>	P value	
Contol vs EPS	1.007239	0.0258218	0.632	
Contol vs PET	6.369638	0.1704496	0.006	*
Contol vs TIO <sub>2</sub>	2.777827	0.0776410	0.144	
EPS vs PET	7.702928	0.1519228	0.006	*
EPS vs TIO <sub>2</sub>	4.409361	0.0892414	0.024	*
PET vs TIO <sub>2</sub>	1.301889	0.0331253	0.632	

**Vídeos suplementares.** Atividade de locomoção de operárias de *Partamona helleri* proveniente de larvas alimentadas com dieta contendo EPS, PET e TiO<sub>2</sub>. Apenas água adicionada a dieta larval foi considerada como controle. As diferentes letras representam a identidade dos indivíduos.

**Vídeo suplementar 1.** Abelhas alimentadas com solução sem contaminação (controle). Link de acesso:

[https://drive.google.com/file/d/1JGA7PByg0oNz2tAX9qJkyjSoVG\\_epXcZ/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1JGA7PByg0oNz2tAX9qJkyjSoVG_epXcZ/view?usp=sharing)

**Vídeo suplementar 2.** Abelhas alimentadas com dieta contaminada com EPS.

Link de acesso: <https://drive.google.com/file/d/1bcIXpoovU8JRKV8QRblQ-lb-qdCeEMly/view?usp=sharing>

**Vídeo suplementar 3** Abelhas alimentadas com dieta contaminada com PET.

Link de acesso: [https://drive.google.com/file/d/1ddd3-efHO5YK-al7rk11Srm4\\_5QPFkEe/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1ddd3-efHO5YK-al7rk11Srm4_5QPFkEe/view?usp=sharing)

**Vídeo suplementar 4** Abelhas alimentadas com dieta contaminada com TiO<sub>2</sub>.

Link de acesso: <https://drive.google.com/file/d/12durkOI9Ah3FlwFb4iUcU-Cor9jIQBoj/view?usp=sharing>

## CAPÍTULO II

### **A GENETICALLY MODIFIED ANTI-PLASMODIUM BACTERIUM IS HARMLESS TO THE FORAGERS OF THE STINGLESS BEE *Partamona helleri***

Artigo publicado no dia 07 de julho de 2021 na revista Microbial Ecology.

Thaís Andrade Viana, Wagner Faria Barbosa, Lorena Lisbetd Botina Jojoa, Rodrigo Cupertino Bernardes, Juliana Soares da Silva, Marcelo Jacobs-Lorena & Gustavo Ferreira Martins (2022). A Genetically Modified Anti-Plasmodium Bacterium Is Harmless to the Foragers of the Stingless Bee *Partamona helleri*. (doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01805-9>)



# A Genetically Modified Anti-*Plasmodium* Bacterium Is Harmless to the Foragers of the Stingless Bee *Partamona helleri*

Thaís Andrade Viana<sup>1</sup> · Wagner Faria Barbosa<sup>1,2</sup> · Lorena Lisbetd Botina Jojoa<sup>1</sup> · Rodrigo Cupertino Bernardes<sup>1</sup> · Juliana Soares da Silva<sup>3</sup> · Marcelo Jacobs-Lorena<sup>4</sup> · Gustavo Ferreira Martins<sup>5</sup>

Received: 21 March 2021 / Accepted: 21 June 2021 / Published online: 7 July 2021  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

## Abstract

Paratransgenesis consists of genetically engineering an insect symbiont to control vector-borne diseases. Biosafety assessments are a prerequisite for the use of genetically modified organisms (GMOs). Assessments rely on the measurement of the possible impacts of GMOs on different organisms, including beneficial organisms, such as pollinators. The bacterium *Serratia* AS1 has been genetically modified to express anti-*Plasmodium* effector proteins and does not impose a fitness cost on mosquitoes that carry it. In the present study, we assessed the impact of this bacterium on the native bee *Partamona helleri* (Meliponini), an ecologically important species in Brazil. *Serratia* eGFP AS1 (recombinant strain) or a wild strain of *Serratia marcescens* were suspended in a sucrose solution and fed to foragers, followed by measurements of survival, feeding rate, and behavior (walking and flying). These bacteria did not change any of the variables measured at 24, 72, and 144 h after the onset of the experiment. Recombinant and wild bacteria were detected in the homogenates of digestive tract during the 144 h period analyzed, but their numbers decreased with time. The recombinant strain was detected in the midgut at 24 h and in the hindgut at 72 h and 144 h after the onset of the experiment under the fluorescent microscope. As reported for mosquitoes, *Serratia* eGFP AS1 did not compromise the foragers of *P. helleri*, an ecologically relevant bee.

**Keywords** Bees · Genetically modified organism · Pollinator · Risk assessment · *Serratia* · Stingless bee

## Introduction

Malaria is one of the deadliest infectious diseases worldwide. *Plasmodium* parasites, the causative agents of malaria, are transmitted to humans through the bite of infected female *Anopheles* mosquitoes. Control of malaria

is based primarily on reducing vector populations with insecticides and using antimalarial drugs [1]. These tools have been ineffective due to the development of mosquito insecticide resistance and parasite drug resistance [1]. The development of new tools to combat this disease is of high priority.

✉ Gustavo Ferreira Martins  
 gmartins@ufv.br  
 Thaís Andrade Viana  
 thaistablito@yahoo.com.br  
 Wagner Faria Barbosa  
 barbosawf@gmail.com  
 Lorena Lisbetd Botina Jojoa  
 lisbetdlorena@gmail.com  
 Rodrigo Cupertino Bernardes  
 rodrigo.bernardes@ufv.br  
 Juliana Soares da Silva  
 juliana.s.silva@ufv.br  
 Marcelo Jacobs-Lorena  
 ljacob13@jhu.edu

<sup>1</sup> Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil  
<sup>2</sup> Departamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil  
<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil  
<sup>4</sup> Department of Molecular Microbiology and Immunology, Malaria Research Institute, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD 21205, USA  
<sup>5</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

Paratransgenesis, the genetic manipulation of insect symbiotic microorganisms to block pathogen transmission, is a promising strategy for controlling insect-borne diseases. Its effectiveness is enhanced by the fact that bacteria share the same compartment, the midgut, with the pathogens transmitted by the insects and because bacterial numbers increase dramatically following a blood meal [2, 3]. The facultative aerobic and gram-negative rod-shaped bacteria of the genus *Serratia* (Enterobacteriaceae) are common components of the midgut microbiota. This genus is a symbiont of many arthropods, such as mosquitoes, bees, sandflies, ticks, and aphids [4–9].

The potential of *Serratia* eGFP AS1 (*Serratia marcescens*, AS1 strain) for paratransgenesis has been demonstrated [10–12]. The gene encoding the green fluorescent protein (eGFP) has been integrated into the *Serratia* eGFP AS1 chromosome. This bacterium contains a plasmid with five anti-*Plasmodium* effector genes [(MP2) 2—Scorpine—(EPIP) 4—Shiva1—(SM1) 2] under the control of a single promoter, which inhibits the development of *Plasmodium falciparum* in female *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* [10]. Both SM1 and MP2 (midgut peptides 1 and 2, respectively) bind to the mosquito midgut surface and inhibit *Plasmodium* invasion [13, 14]. Scorpine is an antimicrobial peptide found in the venom of the scorpion *Pandinus imperator* and prevents the formation of gametes and ookinetes of *Plasmodium berghei* [15]. EPIP (enolase-plasminogen interaction peptide) inhibits mosquito midgut invasion by preventing plasminogen binding to the ookinete surface [13]. The Shiva1 or cecropin-like synthetic antimicrobial lytic peptide kills *P. falciparum* [16]. All these effector proteins strongly inhibited this pathogen, reducing the oocyst load by up to 93% [10].

The use of any genetically modified organism (GMO) for biological control should impose a minimal cost to its insect carrier [2]. Moreover, a thorough risk assessment to the environment is required before introduction in the field [17]. These assessments include investigating the transfer routes of GMOs, which can be vertical (from mother to offspring), transstadial (between developmental stages), and horizontal (from one individual to another, without being parental), as well as from the effects of the GMO on behavior, survival, and reproduction of potential hosts [10, 11].

The horizontal transfer of the GMO between organisms can occur through the sharing of common resources [10, 18, 19], for example, by water contaminated with the GMO [12]. Normative institutions, such as CTNBio (National Technical Commission of Biosafety, Ministry of Science, Technology and Innovation, Brazil), also require the assessment of the interaction of paratransgenic individuals with the environment, which includes a particular concern regarding the possible harmful effects of GMO on non-target organisms [17], including pollinators [20]. Since bees, as pollinators, play

a significant role in maintaining biodiversity [21, 22], these organisms are widely recognized for integrating risk assessment protocols [23–26].

Forager bees perform out-colony tasks, including the search for resources (i.e., water, fiber, resin, nectar, and pollen), which are in direct contact with the external environment [27]. Therefore, risk assessments are preferably carried out on foragers and include assessments of lethality and, to a lesser extent, sublethal effects [28, 29]. Such assessment studies are mostly carried out with the honey bee *Apis mellifera* as a model organism, but this species is exotic in Neotropical environments such as South America [29, 30]. In this sense, stingless bees (Meliponini) are more representative of Neotropical ecosystems [22, 29] as pollinators of native and cultivated plants [31]. Therefore, stingless bees should be considered in studies to measure the potential risks of GMOs.

The ability of bees to withstand environmental stressors is linked to the gut microbiota [32, 33]. In addition, the gut microbiota can influence the behavior, metabolism, growth, and development of hosts [34, 35]. The microbiota is highly conserved among several species of stingless bees [36]. The stingless bee *Partamona helleri* (Meliponini) has a wide range of dominant bacterial genera (approximately 33), and the genus *Serratia* has also been found in this species [8]. Certain *Serratia* species can also be pathogenic to bees, as was observed for the *S. marcescens sicaria* strain (Ss1) in honeybee adults [37].

This work evaluated the risk to foragers of *P. helleri* of ingestion of the genetically modified *Serratia* eGFP AS1, carrying anti-*Plasmodium* effectors. We investigated survival, food ingestion (i.e., feeding rate), and walking and flight activities of foragers as it relates to the evaluation of safety to the environment.

## Materials and Methods

### Bees

Foragers from five colonies of *P. helleri*, 25 or more days old [27], were obtained from the Central Apiary at the Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa—MG (20° 45' 14"S; 42° 52' 55"). These colonies were unrelated and collected in different locations under license ID75536 (ICMBio – SIS-BIO, Ministério do Meio Ambiente, Brazil). The foragers were captured with a glass bottle at the hive entrance and immediately transported to the Insect Molecular Biology Laboratory (UFV) without controlling the temperature or luminosity. The bees were anesthetized with carbon dioxide for 5 s and then transferred to 500 mL round transparent plastic pots. The foraging bees fasted for 1 h in an incubator (28 ± 1 °C, 70 ± 5% relative humidity (RH), in the dark)

until the bioassays began. This fasting period is necessary to stimulate the ingestion of food provided in oral exposure tests [38].

## Bacteria

*Serratia* eGFP AS1 (GenBank: KY935421) was genetically modified to express eGFP (pBAM2-GFP), antimalarial effector proteins [(MP2) 2—Scorpine—(EPIP) 4—Shiva1—(SM1) 2], and resistance to the antibiotic kanamycin. This strain has a yellowish beige color [10]. The wild strain *S. marcescens* (wild strain MIND01) synthesizes prodigiosin, a naturally reddish pigment at 28 °C, and does not grow in the presence of kanamycin. The recombinant bacterium was provided by the Department of Molecular Microbiology and Immunology, Malaria Research Institute, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (Baltimore, USA). The wild bacterium was kindly provided by Dr. Maria Cristina Dantas Vanetti at the Industrial Microbiology Laboratory (UFV). *Serratia* eGFP AS1 was cultured under license CQB 024/97 at the Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia (DBG-UFV). Both strains were grown for 24 h at 28 °C in Petri dishes containing Luria Bertani (LB) broth (composition per liter: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 10 g NaCl) (Lennox—L3022 Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), with 2% agar (Himedia®—RM026 Technical Data, Mumbai, Maharashtra, India), supplemented with or without kanamycin sulfate (100 µg/mL) (Gibco™—11,815,032 ThermoFisher, Burlington, Ontario, Canada) to obtain isolated colonies. Subsequently, bacteria from each isolated colony were cultured separately for 24 h at 28 °C in 100 mL glass test tubes containing 5 mL of liquid LB medium. Bacteria stocks in LB medium supplemented with 20% glycerol were stored at –80 °C for later use.

## Exposure to the Bacteria

The bacteria (recombinant and wild) stocks were thawed and cultured for 24 h in liquid LB medium at 28 °C and diluted in sterilized sucrose solution (50% v/v) to a final concentration of 10<sup>8</sup> cells/mL, which was verified with the final optical density (OD) 600 nm of 0.1. Different diets were prepared to expose the bees to four separate treatments: (1) sucrose only (control), (2) sterile LB with sucrose (1:1), (3) *Serratia* eGFP AS1 (recombinant) with sucrose, and (4) wild *S. marcescens* with sucrose. For each treatment, we used 20 foragers of each of the five experimental colonies (n = 100 bees per treatment). The experiment was carried out in two independent sets (see below), resulting in a total sampling size of n = 800 bees.

Each diet was offered to 20 bees in a 2 mL microtube drilled at the bottom and inserted through a hole in a 500 mL plastic pot [38]. After 24 h exposure, the diet was changed,

and the bees received only 50% sucrose solution (v/v) for the next 120 h. In the first experiment set, the survival and food consumption over 144 h (n = 400 bees) after the onset of the experiment were assessed. In the second set, the behavior at 72 h and the presence of bacteria in the digestive tract and ovary (n = 400 bees) at 24, 72, and 144 h after the onset of the experiment were assessed.

## Survival and Food Consumption

Survival was monitored every 24 h for 144 h. Individuals were considered dead when they did not move after stimulation with forceps, and dead bees were discarded [38].

Food consumption was measured by weighing the microtubes on an analytical scale. The weights of the microtubes with the sucrose solution were recorded before feeding and then again before switching. The food, which contained the four different diets, was offered for 24 h. The tubes with the remaining food were then weighed. After 24 h, the microtubes were replaced with microtubes containing only sucrose solution, and the weights of the microtubes were measured 48, 72, 96, 120, and 144 h after the beginning of the assay. Plastic pots without bees, but with microtubes containing sucrose (50% v/v), were kept under experimental conditions to estimate the losses by evaporation. These values were used to correct the feeding rate (amount of food consumed by a given group minus the evaporated liquid) [8, 38, 39].

## Detection of Bacteria in the Digestive Tract and Ovary

The presence of *Serratia* eGFP AS1 and *S. marcescens* (wild) in the digestive tract of bees was assessed. Fifteen bees (3 bees per colony, totaling 5 colonies) were used for each treatment (i.e., different diets) at 24, 72, and 144 h (n = 180 bees) after the beginning of the assay. The bees were anesthetized on ice. The anesthetized workers (i.e., live but without movements) were sterilized for 3 min with 70% ethanol and washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M, pH 7.2). The digestive tract (i.e., midgut and hindgut) was dissected, transferred individually to a microtube (1.5 mL), homogenized in 500 µL of sterile PBS, and serially diluted from 10<sup>0</sup> to 10<sup>4</sup>. From this homogenate, the micro-drop plating technique was completed using a 20 µL aliquot, which was plated in triplicate, collected for each sample, and transferred to plates with agar and LB medium containing 100 µg/mL kanamycin [40]. The plates were then incubated at 28 °C for 24 h. The bacteria were identified according to their colony phenotype (Supp. Figure 1). Colony GFP fluorescence was detected using a UV transilluminator (High-Performance 2UVTM Transilluminator, λ = 365 nm).

The presence of fluorescent *Serratia* eGFP AS1 was checked in freshly dissected organs (i.e., digestive tract and ovary) 24 h, 72 h, and 144 h after the onset of the experiment. Bees ( $n=5$  per treatment) from the four treatments were anesthetized and dissected as described above. The organs were transferred to glass slides mounted with PBS. Samples were analyzed with an Olympus BX60 Epifluorescence Microscope coupled with a QColor Olympus® image capture system using WB filters (450–480 nm) for eGFP.

### Walking

Walking activity was studied in groups of 5 individuals from the same colony inside arenas (Petri dishes, 9 cm diameter, 2 cm high). The bottom of the arenas was covered with white filter paper (ash content  $<0.1\%$ , diameter 9 cm, thickness 0.13–0.17 mm), and the upper part of the arenas was wrapped with transparent PVC film. The activities were recorded for 10 min with a digital camcorder (HDR-XR520V, Sony Corporation, Tokyo, Japan) at 30 fps and high definition ( $1920 \times 1080$  pixels) under a couple of red-light lamps (LED; 6 W) positioned 50 cm above the arenas. The videos (Supp. Videos) were analyzed using the EthoFlow® software (National Institute of Industrial Property-INPI, Ministry of Economy, Brazil, BR 51 2020 000,737–6) [41], considering the time at resting (s) (walked distance  $\leq 0.0226$  cm/frame), the medium activity time (s) ( $0.0226 < \text{walked distance} \leq 0.22$  cm/frame), the fast activity time (s) (walked distance  $> 0.22$  cm/frame), and cumulative walked distance (cm). Each treatment was studied in two groups of 5 individuals per colony of five different colonies, 72 h after the onset of the experiment (i.e., 48 h after the 24 h treatment period); therefore, 50 individuals were evaluated per treatment, totaling 200 individuals. In the data analysis, the average of individuals in each arena was considered as a replicate. Recordings were performed under red light at  $25 \pm 2$  °C and  $70 \pm 5\%$  RH [38].

### Flight

The same foragers evaluated in the walking bioassay were evaluated using a flight bioassay. The assay consisted of releasing 5 bees at the bottom of a wooden tower (105 cm high  $\times$  35 cm long  $\times$  35 cm wide) covered laterally with the organza fabric. A white light lamp (LED; 6 W) was placed 5 cm above the top of the tower in a dark room. The bees were kept for 1 min at the base of the tower in a Petri dish for acclimatization and then released. The proportion of individuals that flew to the top of the tower was counted [42]. Two groups of 5 individuals were analyzed for each treatment from the five different colonies ( $n=200$ ). The average proportions of the two groups in each colony were used for statistical analyses.

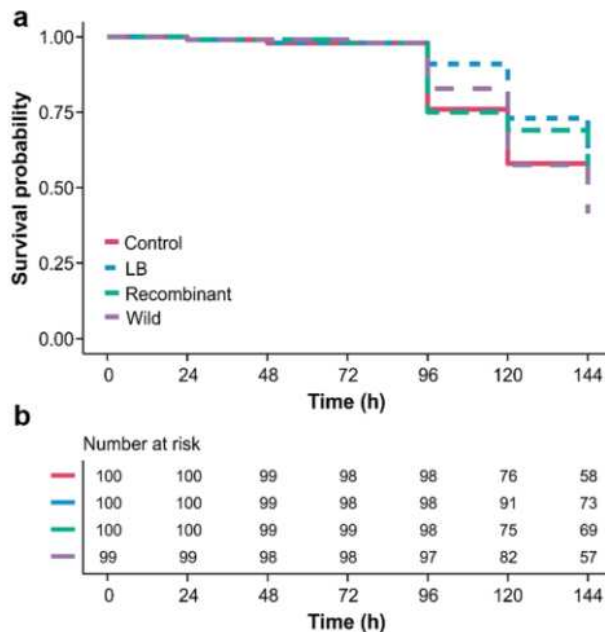
### Statistical Analysis

Survival data were used to obtain survival curves using Kaplan–Meier estimators and were first analyzed using the log-rank test. Subsequently, survival curves were pairwise compared using Bonferroni's method. The values of food consumption were transformed to  $\ln$  and then subjected to the generalized least squares (GLS) model under different structures of variance–covariance, owing to repeated measures over time. The model was chosen based on parsimony, verification of residual quantile plots, and the lowest Bayesian information criterion (BIC). Back-transformed estimates were then used in graphical plots to represent consumption over time and between treatments. CFU data were rank-transformed and submitted to a linear mixed-effects model with the colony as a random effect. Subsequently, Tukey's pairwise comparisons were carried out using adjusted  $P$  values according to the Westfall method [43]. The variables of walking behavior (time at rest, medium activity time, fast activity time, and walked distance accumulated) were subjected to analysis of variance (ANOVA) with colonies considered as repetitions. For flight behavior data, a generalized linear model (GLM) was fitted with a quasibinomial distribution; adequate distribution for proportion data when there was overdispersion (high residual deviance), and colonies were also used as repetitions. The residues were checked in all models to verify the adequacy of the distributions. All data were analyzed using R software [44] with a significance level of 5%.

### Results

Consumption of the different sucrose solutions did not affect the survival of the bees during the 144 h after the onset of the experiment ( $\chi^2=8.7$ ,  $df=3$ ,  $p=0.03$ ) (Fig. 1). However, only pairwise contrast between wild and LB survival curves differed significantly ( $p=0.014$ ). Food consumption was significantly affected over the studied time points (i.e., 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h) ( $F_{1,106}=76.95$ ;  $p<0.001$ ), with the highest ingestion occurring between 72 and 96 h (Fig. 2a). However, the amount of food consumed was not significantly different among the treatments (i.e., different food) during the 144 h period analyzed ( $F_{3,106}=0.16$ ;  $p=0.92$ ) (Fig. 2b).

Both *Serratia* eGFP AS1 and *S. marcescens* (wild) were detected in the homogenate obtained from the digestive tract (midgut + hindgut) dissected at 24, 72, and 144 h after the onset of the experiment (Fig. 3, Supp. Figure 1). The bacterial colony-forming units (CFUs) were higher at 24 h than at 72 h ( $z=-3.57$ ,  $p=0.001$ ) and 144 h ( $z=-2.21$ ,  $p=0.027$ ) but were similar between 72 and 144 h ( $z=1.36$ ,  $p=0.17$ ) for the recombinant strain. The CFUs were higher at 24 h than at 72 h ( $z=-3.65$ ,  $p<0.001$ ) and 144 h ( $z=-4.40$ ,  $p<0.001$ )



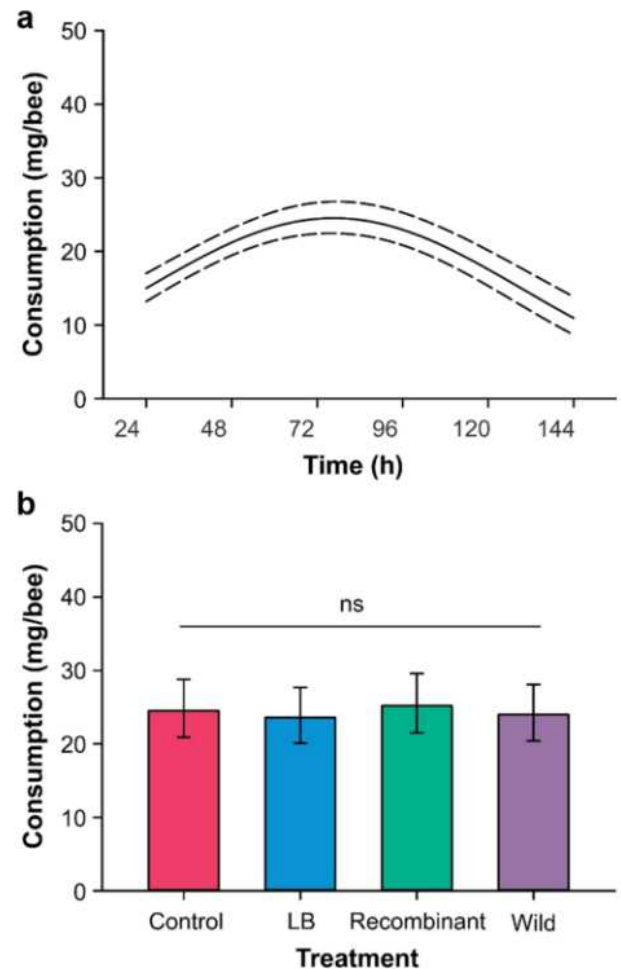
**Fig. 1** **a** Survival of *Partamona helleri* fed with sterile sucrose solution (control), sterile sucrose solution with sterile LB (1:1), sucrose solution containing *Serratia* eGFP AS1 (recombinant), and sucrose solution containing *Serratia marcescens* (wild). The overall log-rank test indicates a significant difference in at least one of the contrasts between treatments ( $\chi^2=8.7$ ,  $df=3$ ,  $p=0.03$ ). **b** Number of bees remaining at risk per treatment for each assessed time

but were similar between 72 and 144 h ( $z = -0.76$ ,  $p=0.45$ ) for the wild strain. *Serratia* eGFP AS1 was detected in the midgut of bees at 24 h and in the hindgut at 72 h and 144 h after the onset of the experiment (Fig. 4). However, this modified bacterium was not detected in the ovaries at any of the analyzed times (Fig. 5).

There was no significant difference between treatments in any of the variables associated with walking activity (Supp. Table 1, Supp. Videos). The resting time ( $F_{3,16}=0.2$ ;  $P=0.9$ ;  $R^2=0.15$ ) (Fig. 6a), medium activity ( $F_{3,16}=0.9$ ;  $P=0.5$ ;  $R^2=0.013$ ) (Fig. 6b), or fast activity ( $F_{3,16}=0.0$ ;  $P=1.0$ ;  $R^2=0.18$ ) (Fig. 6c) were similar among treatments, and the accumulated distance walked ( $F_{3,16}=0.3$ ;  $P=0.9$ ;  $R^2=0.13$ ) (Fig. 6d). Flight activity was also not affected by the treatments ( $F_{3,16}=0.2$ ;  $P=0.89$ ) (Fig. 7).

## Discussion

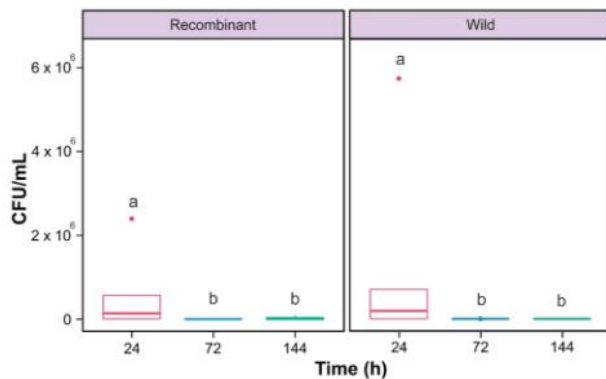
The present study is the first to investigate the possible effects of digestive tract colonization of a stingless bee by a genetically modified bacterium (*Serratia* eGFP AS1) developed for the control of vector-borne diseases. Our results demonstrated that ingestion of the modified bacterium did not affect the lifespan or behavior of *P. helleri* foragers.



**Fig. 2** Ingestion of sucrose solution (mg/bee) by *Partamona helleri*. **a** Food consumption considering all treatments versus time after exposure. **b** Consumption according to treatments: sterile sucrose (control), sterile sucrose plus sterile LB (1:1), *Serratia* eGFP AS1 (recombinant) in sucrose, and *Serratia marcescens* (wild) in sucrose. The values are means of five biological replicates, 20 bees per treatment ( $n=400$ ). ns, not significant; solid line and bars: means ( $\pm 95\%$  confidential intervals)

Foragers colonized by *Serratia* eGFP AS1 had similar survival rates, ingested the same amount of food, and had similar walking and flying activities compared to individuals that ingested a non-recombinant bacterium or sucrose controls.

Our results corroborate the studies using mosquitoes (e.g., *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*) colonized by *Serratia* eGFP AS1 and *Serratia* AS1 (wild strain), and *Culex pipiens* colonized by *Serratia* mCherry AS1, for which no negative effects on survival, feeding behavior, or fertility were detected [10, 11]. The wild strain (*S. marcescens*) used in our work as a control for the inoculated diet was also not harmful to the bees. Although this wild strain is not the wild *Serratia* AS1 that derivate the modified *Serratia* eGFP AS1, these two wild strains did not contain

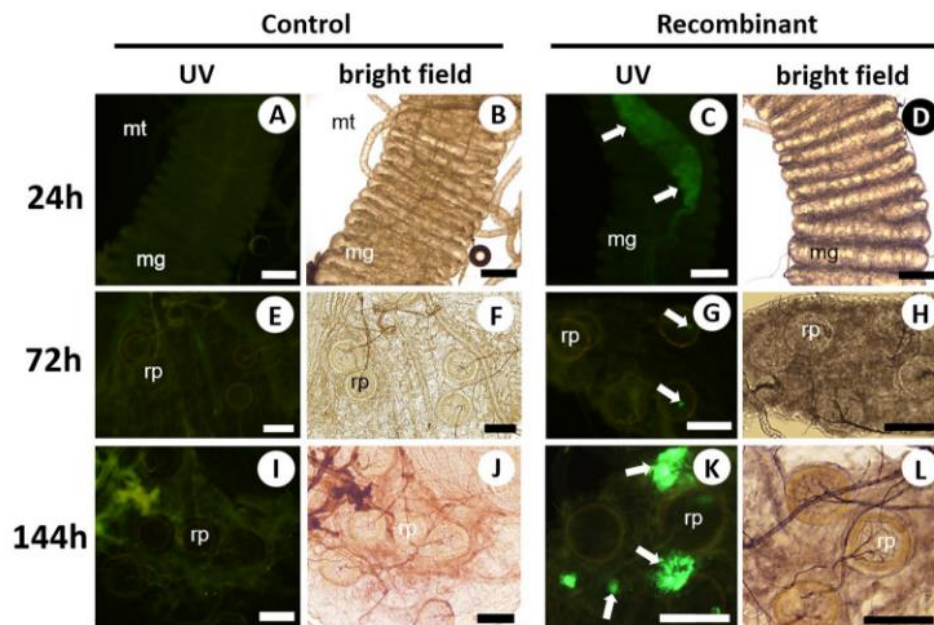


**Fig. 3** Colony-forming units (CFUs/mL) of *Serratia* eGFP AS1 (recombinant) and *Serratia marcescens* (wild) obtained from *Partamona helleri* digestive tract homogenates. CFUs were higher at 24 h than at 72 h ( $z = -3.65$ ,  $p < 0.001$ ) and 144 h ( $z = -4.40$ ,  $p < 0.001$ ), but it was similar between 72 and 144 h ( $z = -0.76$ ,  $p = 0.45$ ) for the wild strain. CFUs were higher at 24 h than at 72 h ( $z = -3.57$ ,  $p = 0.001$ ) and 144 h ( $z = -2.21$ ,  $p = 0.027$ ); however, it was similar between 72 and 144 h ( $z = 1.36$ ,  $p = 0.17$ ) for the recombinant strain. The CFUs are means of five biological replicates in groups of 3 bees per treatment ( $n = 90$ ). Different letters indicate significant differences (Tukey's test;  $\alpha = 5\%$ )

the expression cassette used in the modified strain [10]. In general, the genus *Serratia* is non-pathogenic and is constitutively found in the guts of many arthropods, including

mosquitoes, bees, sandflies, ticks, beetles, and aphids [4–9, 45]. However, certain *S. marcescens* strains are pathogenic. For instance, strain Ss1 is pathogenic when in high abundance in honeybees [33, 37], whereas RPWL1 can be pathogenic to the beetle *Rhynchophorus ferrugineus* [46]. Conversely, a genetically modified *Serratia symbiotica* did not affect the fitness or survival of aphids, suggesting that it is an important future paratransgenic tool for the control of agricultural pests [9].

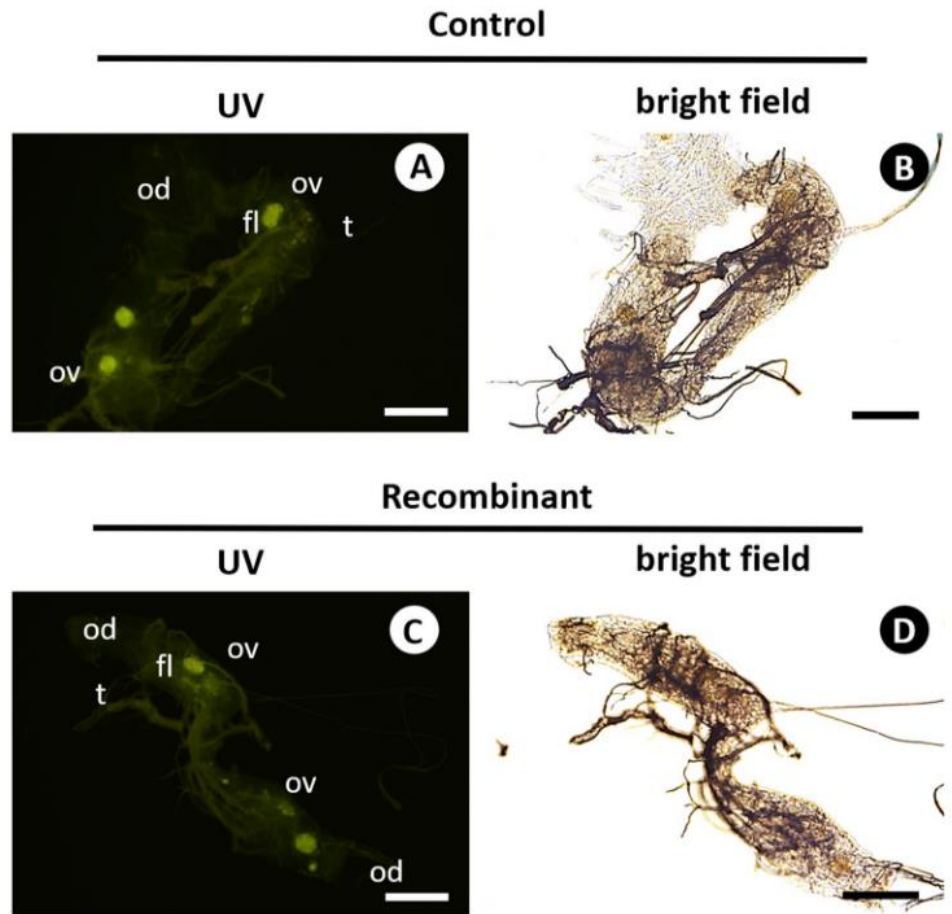
*Serratia* eGFP AS1 and wild *S. marcescens* were recovered from the digestive tract (midgut + hindgut; homogenate) of *P. helleri* at 24, 72, and 144 h after the onset of the experiment; however, there was a reduction in bacterial numbers over time. This reduction may be related to the inability of bacteria from the external environment to successfully colonize the digestive tract of bees protected by the natural microbiota, which can prevent the proliferation of exogenous bacteria [34, 47, 48]. Corroborating this, the spread of *Serratia* eGFP AS1 through the digestive tract of foragers of *P. helleri* was limited. *Serratia* eGFP AS1 was detected only in the midgut 24 h after the onset of the experiment, and only in the hindgut at 72 h and 144 h after the onset of the experiment under the fluorescent microscope. This change in the location may be due to the protection conferred by bacteria naturally present in the midgut of Meliponini bees, such as *Gialliamella* and *Lactobacillus* [8, 36, 48].



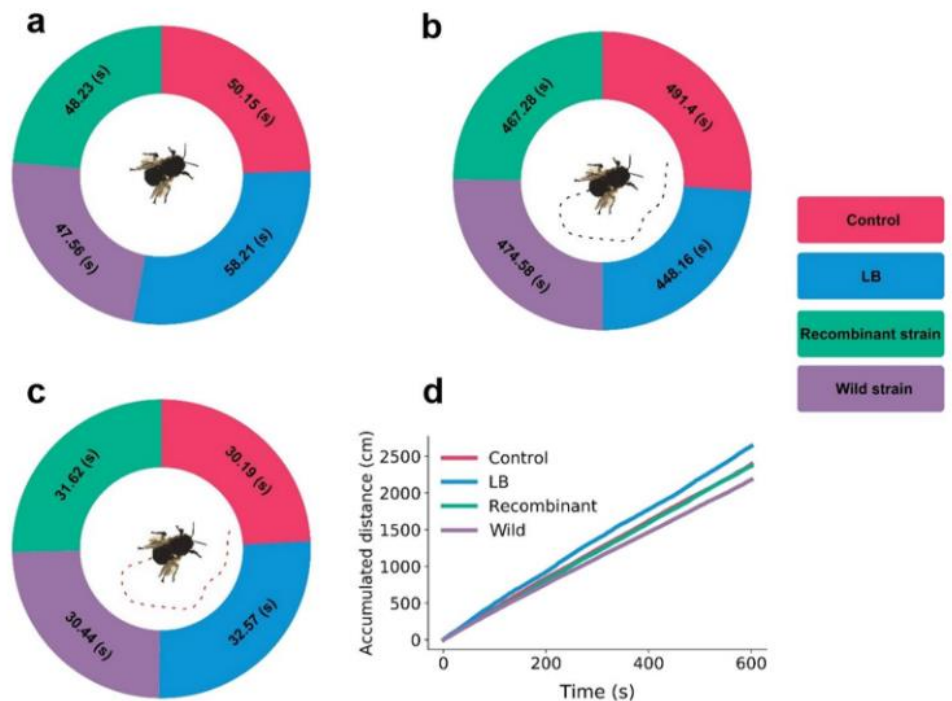
**Fig. 4** Portions of midgut and hindgut of foragers of *Partamona helleri*. **A, B** Midgut of a bee that ingested not inoculated sucrose solution (control), and **C, D** midgut of a bee that ingested food with *Serratia* eGFP AS1 (recombinant, green fluorescent, and pointed by arrows) 24 h after the onset of the experiment. **E, F** Hindgut of a bee that ingested not inoculated sucrose solution, and **G, H** hindgut of a

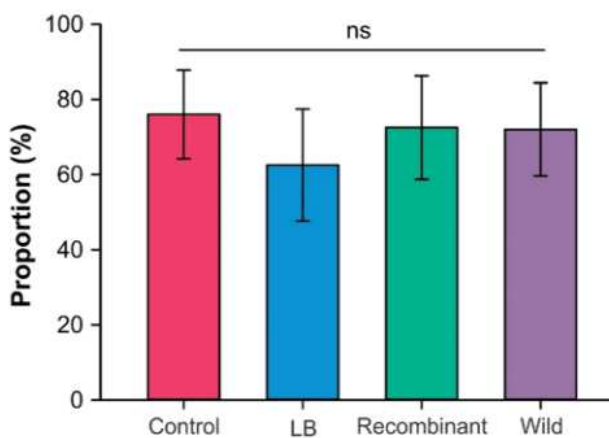
bee that ingested food with *Serratia* eGFP AS1 (arrows) 72 h after the onset of the experiment. **I, J** Hindgut of a bee that ingested not inoculated sucrose solution, and **K, L** hindgut of bees that ingested food with *Serratia* eGFP AS1 (arrows) 144 h after the onset of the experiment. Midgut (mg); Malpighian tubules (mt); rectal pads (rp) in the hindgut. Bars for: 200  $\mu\text{m}$

**Fig. 5** Ovaries of foragers of *Partamona helleri*. **A, B** Ovary after the ingesting of not inoculated sucrose solution (control) 144 h after the onset of the experiment. **C, D** Ovary after the ingestion of food with *Serratia* eGFP AS1 (recombinant) 144 h after the onset of the experiment. Ovary (ov); not developed follicle (fl); oviduct (od); trachea (t). Bar: 200  $\mu$ m



**Fig. 6** The walking activity of *Partamona helleri* after ingestion of different sucrose solutions: not inoculated (control), with sterile LB (1:1), with *Serratia* eGFP AS1 (recombinant), and with *Serratia marcescens* (wild). The constituent values within each part of the graph represent the averages obtained from **a** time at rest, **b** medium activity time, **c** fast activity time, and **d** walked distance accumulated over 10 min. The walking activity is the mean of five biological replicates in two groups of 5 bees per treatment (n=200). There was no significant difference in any of the variables based on the analysis of variance ( $\alpha=5\%$ )





**Fig. 7** The proportion of foragers of *Partamona helleri* that flew after ingestion of different sucrose solutions: not inoculated (control), with sterile LB (1:1), with *Serratia* eGFP AS1 (recombinant), and with *Serratia marcescens* (wild). The average proportion of five biological replicates in two groups of 5 bees per treatment ( $n=200$ ). There was no significant difference in any of the variables analyzed according to the generalized linear model ( $\alpha=5\%$ ), ns indicates not significant; bars: mean ( $\pm$  standard error)

In mosquitoes, *Serratia* eGFP AS1 persists for at least three consecutive generations and colonizes organs other than the midgut, including the ovaries and male accessory glands. In addition, this bacterium rapidly spreads among mosquito populations in the laboratory [10]. In bees, possible interaction with the bacteria occurs when they leave the colony for foraging, a function performed at the end of the bee's life [27]. Foragers can transfer the food with bacteria through trophallactic interactions (mouth-to-mouth contacts) to other individuals of the colony. Thus, the bacteria can rapidly spread to colony individuals, including the queen, via horizontal transfer [49]. If this bacterium can reach the active ovaries of the queen or if this bacterium can be transferred to the eggs and immature from the queen, as observed in mosquito females [10, 11], are unanswered questions. In the current work, *Serratia* eGFP AS1 was not detected in ovaries of foragers (individuals with atrophied ovaries), so it can be inferred that the propagation of this bacterium vertically would be limited in the case of *P. helleri*. This study highlights the importance of studying the effects of GMOs on non-target organisms, including pollinators, to aid in decision-making for the release of GMOs into the environment.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01805-9>.

**Acknowledgements** The authors thank Dr. Maria Cristina Dantas Vanetti for providing the wild *Serratia* strain, Prof. Dr. Hilário Cuquetto Mantovani (Departamento de Microbiologia—UFV) and Dr. Tania

Maria Fernandes Salomão (Departamento de Biologia Geral—UFV) for assistance with bacteria handling.

**Author Contribution** TAV, WFB, RCB, MJL, and GFM conceived this research and designed experiments; TAV, LLBJ, and RCB collected the data; TAV, WFB, LLBJ, RCB, JSS, and GFM analyzed the data; TAV and GFM wrote and reviewed the manuscript. TAV, WFB, LLBJ, JSS, MJL, and GFM corrected the work, contributed critically to the drafts, and approved it for publication.

**Funding** This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—301725/2019–5) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, CBB-APQ-00247–14), NIH grant R01AI031478, and the Bloomberg Philanthropies.

**Data Availability** The two bacterial strains used in the experiments are stored in the Laboratório de Biologia Molecular de Insetos at UFV, Brazil. The data that support the findings are available from the corresponding author upon request.

## Declarations

**Research Involving Human Participants and/or Animals** No approval of research ethics committees was required to accomplish the goals of this study because experimental work was conducted with an unregulated invertebrate species.

**Informed Consent** Not applicable.

**Conflict of Interest** The authors declare no competing interests.

## References

- World Health Organization (2019) World malaria report 2019. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330011>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Coutinho-Abreu IV, Zhu KY, Ramalho-Ortigão M (2010) Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. *Parasitol Int* 59(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.002>
- Wang S, Jacobs-Lorena M (2013) Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnol* 31(3):185–193. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.001>
- Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR (1993) *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Exp Parasitol* 77(2):195–199. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1076>
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo ES, Peixoto AM, Bacci Júnior M, Berbert-Molina MA, Lemos FJ (2007) First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae: new perspectives for an insect-bacteria association. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(8):919–924. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000800005>
- Maleki-Ravasan N, Oshaghi MA, Hajikhani S, Saeidi Z, Akhavan AA, Gerami-Shoar M, Shirazi MH, Yakhchali B, Rassi Y, Afshar D (2013) Aerobic microbial community of insectary population of *Phlebotomus papatasi*. *J Arthropod-Borne Dis* 18(1):69–81
- Li CH, Jie CAO, Zhou YZ, Zhang HS, Gong HY, Zhou JL (2014) The midgut bacterial flora of laboratory-reared hard ticks, *Haemaphysalis longicornis*, *Hyalomma asiaticum*, and

- Rhipicephalus haemaphysaloides*. *J Integr Agric* 13:1766–1771. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60517-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60517-1)
8. Botina LL, Vélez M, Barbosa WF, Mendonça AC, Pylro VS, Tótola MR, Martins GF (2019) Behavior and gut bacteria of *Partamona helleri* under sublethal exposure to a bioinsecticide and a leaf fertilizer. *Chemosphere* 234:187–195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.048>
  9. Elston KM, Perreau J, Maeda GP, Moran NA, Barrick JE (2020) Engineering a culturable *Serratia symbiotica* strain for aphid paratransgenesis. *Appl Environ Microbiol* 87(4):e02245–e2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.02245-20>
  10. Wang S, Dos-Santos AL, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, Agre P, Jacobs-Lorena M (2017) Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science* 357(6358):1399–1402. <https://doi.org/10.1126/science.aan5478>
  11. Koosha M, Vatandoost H, Karimian F, Choubdar N, Abai MR, Oshaghi MA (2018) Effect of *Serratia* AS1 (Enterobacteriaceae: Enterobacteriales) on the fitness of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) for paratransgenic and RNAi approaches. *J Med Entomol* 56(2):553–559. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy183>
  12. Koosha M, Vatandoost H, Karimian F, Choubdar N, Oshaghi MA (2019) Delivery of a genetically marked *Serratia* AS1 to medically important arthropods for use in RNAi and paratransgenic control strategies. *Microb Ecol* 78(1):185–194. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1289-7>
  13. Ghosh AK, Ribolla PE, Jacobs-Lorena M (2001) Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *PNAS* 98(23):13278–13281. <https://doi.org/10.1073/pnas.241491198>
  14. Vega-Rodríguez J, Ghosh AK, Kanzok SM, Dinglasan RR, Wang S, Bongio NJ, Kalume DE, Miuraf K, Long CA, Pandey A, Jacobs-Lorena M (2014) Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *PNAS* 111(4):E492–E500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315517111>
  15. Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH, Possani LD, (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* 471(2–3):165–168. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01384-3)
  16. Jaynes JM, Burton CA, Barr SB, Jeffers GW, Julian GR, White KL, Enright FM, Klei TR, Laine RA (1988) *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* 2(13):2878–2883. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2.13.3049204>
  17. CTNBio nº 24, de 07.01.2020 <[https://www.mctic.gov.br/mctic/openems/legislacao/outros\\_atos/resolucoes/Resolucao\\_Normativa\\_CTNBio\\_n\\_24\\_de\\_07012020.html?fbclid=IwAR3tstN7JdacfZtV3yn94BCItKulfulpJ3XNHXxDOP-1NE5TsdwSTREUH5A](https://www.mctic.gov.br/mctic/openems/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CTNBio_n_24_de_07012020.html?fbclid=IwAR3tstN7JdacfZtV3yn94BCItKulfulpJ3XNHXxDOP-1NE5TsdwSTREUH5A)> (Accessed 18 April 2020)
  18. Eggers B, Mackenzie R (2000) The Cartagena protocol on biosafety. *J Int Econ Law* 3(3):525–543. <https://doi.org/10.1093/jiel/3.3.525>
  19. Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Cornman SR, Dainat J, Miranda JR, Doublet V, Emery O, Evans JD, Farinelli L, Flenniken ML, Granberg F, Grasis JA, Gauthier L, Hayer J, Koch H, Kocher S, Martinson VG, Moran N, Munoz-Torres M, Newton I, Paxton RJ, Powell E, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Song SJ, Schwarz RS, Dennis vanEngelsdorp D, Dainatab B, (2016) The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio* 7(2):e02164–e2215. <https://doi.org/10.1128/mBio.02164-15>
  20. Eckerstorfer M, Benedict M, Franz G, Gaugitsch H, Greiter A, Heissenberger A, Knol B, Kumschick S, Nentwig W, Rabitsch W (2012) Defining environmental risk assessment criteria for GM insects to be placed on the EU market. *IOBC/wprs Bulletin* 73:45–50. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2010.EN-71>
  21. Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann S, Cane J, Cox PA, Dalton V, Feinsinger P, Ingram M, Inouye D, Jones CE, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellin R, Medellin-Morales S, Nabhan GP, Pavlik B, Tepedino V, Torchio P, Walker S (1998) The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conserv Biol* 8:17. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.97154.x>
  22. Slaa E, Sánchez Chaves L, Malagodi-Braga K, Hofstede F (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37(2):293–315. <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>
  23. Villa S, Vighi M, Finizio A, Serini GB (2000) Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology* 9(4):287–297. <https://doi.org/10.1023/A:1026522112328>
  24. Malone LA, Pham-Delègue MH (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32(4):287–304. <https://doi.org/10.1051/apido:2001130>
  25. Romeis J, Bartsch D, Bigler F, Candolfi MP, Gielkens MM, Hartley SE, Hellmich RL, Huesing JE, Jepson PC, Layton R, Quemada H, Raybould A, Rose RI, Schiemann J, Sears MK, Shelton AM, Sweet J, Vaituzis Z, Wolt JD (2008) Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nat Biotechnol* 26(2):203–208. <https://doi.org/10.1038/nbt1381>
  26. Thompson HM (2010) Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues.’ *Pest Manag Sci* 66(11):1157–1162. <https://doi.org/10.1002/ps.1994>
  27. Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) *Abelha urucu: biologia, manejo e conservação* (vol. 2). Fundação Acangaú. 36pp
  28. Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
  29. Lima MAP, Martins GF, Oliveira EE, Guedes RNC (2016) Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J Comp Physiol* 202(9–10):733–747. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1110-3>
  30. Barbosa WF, Smaghe G, Guedes RNC (2015) Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. *Pest Manag Sci* 71(8):1049–1053. <https://doi.org/10.1002/ps.4025>
  31. Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano EA, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL, Saraiva AM (2015) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46(2):209–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
  32. Li JH, Evans JD, Li WF, Zhao YZ, DeGrandi-Hoffman G, Huang SK, Li ZG, Hamilton M, Chen YP (2017) New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee’s vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS One* 12(11):e0187505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187505>
  33. Raymann K, Shaffer Z, Moran NA (2017) Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol* 15(3):e2001861. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861>
  34. Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EV, Moran NA (2018) Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Anim* 47(11):317–325. <https://doi.org/10.1038/s41684-018-0173-x>
  35. Raymann K, Moran NA (2018) The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci* 26:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>
  36. Kwong WK, Medina LA, Koch H, Sing KW, Soh EJY, Ascher JS, Jaffé R, Moran NA (2017) Dynamic microbiome evolution

- in social bees. *Sci Adv* 3(3):e1600513. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600513>
37. Burritt NL, Foss NJ, Neeno-Eckwall EC, Church JO, Hilger AM, Hildebrand JA, Warshauer DM, Perna NT, Burritt JB (2016) Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria. *PLoS One* 11(12):e0167752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167752>
  38. Botina LL, Bernardes RC, Barbosa WF, Lima MAP, Guedes RN, Martins GF (2020) Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). *MethodsX* 100906. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100906>
  39. Rodrigues CG, Krüger AP, Barbosa WF, Guedes RNC (2016) Leaf fertilizers affect survival and behavior of the neotropical stingless bee *Friesella schrottkyi* (Meliponini: Apidae: Hymenoptera). *J Econ Entomol* 109(3):1001–1008. <https://doi.org/10.1093/jee/tow044>
  40. Morton RD (2001) Aerobic plate count. In: Doves FP, Ito K (ed) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th edn. APHA, pp183–193
  41. Bernardes RC, Lima MAP, Guedes RNC, da Silva CB, Martins GF (2021) Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. *Sensors* 21(9):3237. <https://doi.org/10.3390/s21093237>
  42. Tomé HVV, Barbosa WF, Martins GF, Guedes RNC (2015) Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere* 124:103–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.038>
  43. Westfall PH (1997) Multiple testing of general contrasts using logical constraints and correlations. *J Am Stat Assoc* 92:299–306. <https://doi.org/10.1080/01621459.1997.10473627>
  44. R Core Team (2018) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>
  45. Pu YC, Hou YM (2016) Isolation and identification of bacterial strains with insecticidal activities from *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *J Appl Entomol* 140(8):617–626. <https://doi.org/10.1111/jen.12293>
  46. Muhammad A, Habineza P, Ji T, Hou Y, Shi Z (2019) Intestinal microbiota confer protection by priming the immune system of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). *Front Physiol* 10:1303. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01303>
  47. Kwong WK, Engel P, Koch H, Moran NA (2014) Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *PNAS* 111(31):11509–11514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405838111>
  48. Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM, DeGrandi-Hoffman G (2011) An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Soc* 58(4):43. <https://doi.org/10.1007/s00040-011-0194-6>
  49. Grüter C, Acosta LE, Farina WM (2006) Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav Ecol Sociobiol* 60(5):707–715. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0214-0>

## Microbial Ecology

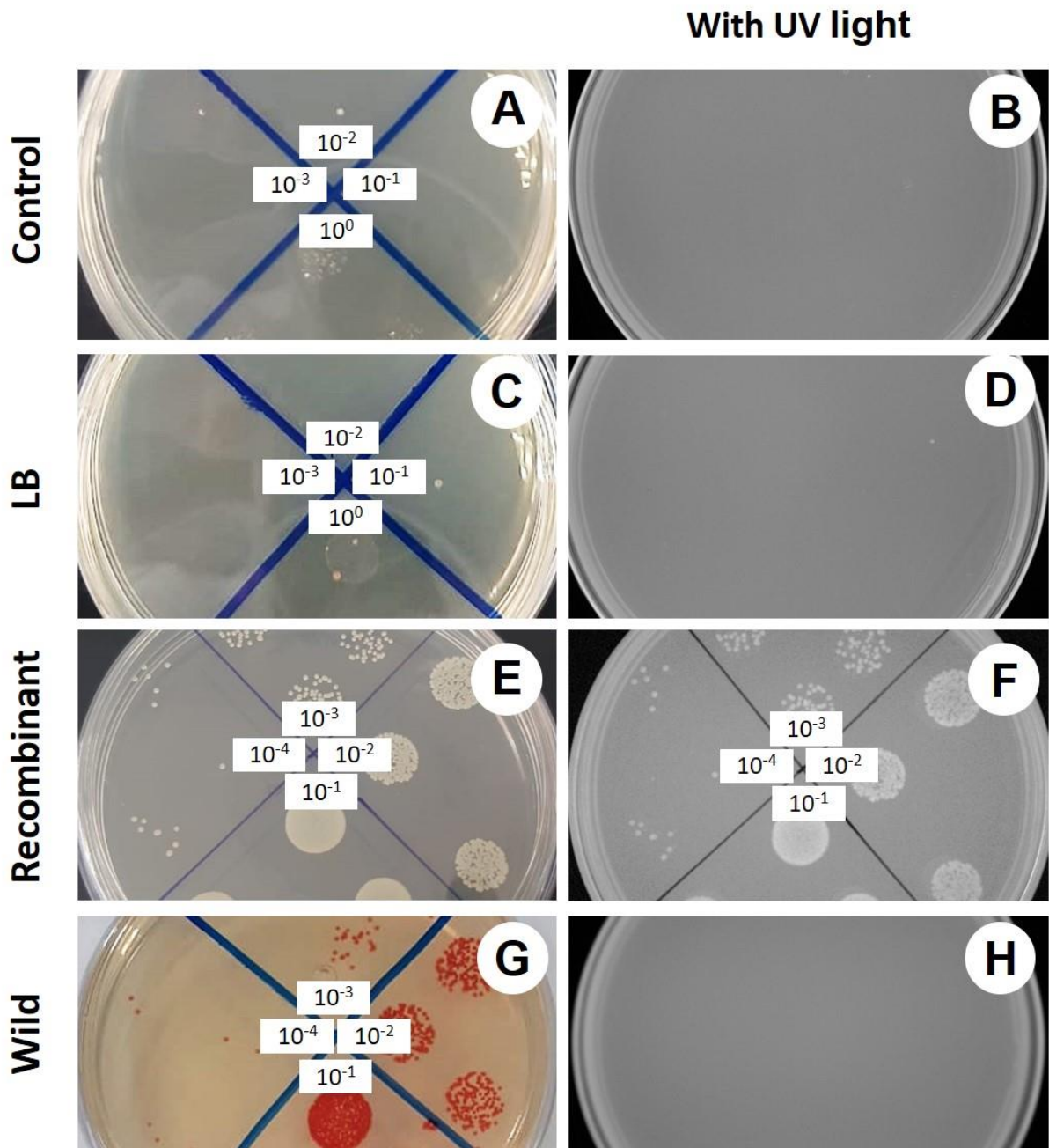
### Supplementary material

#### **A genetically modified anti-*Plasmodium* bacterium is harmless to the foragers of the stingless bee *Partamona helleri***

Thaís Andrade Viana; Wagner Faria Barbosa; Lorena Lisbetd Botina Jojoa; Rodrigo Cupertino Bernardes; Juliana Soares da Silva; Marcelo Jacobs-Lorena; Gustavo Ferreira Martins

Corresponding author:

[gmartins@ufv.br](mailto:gmartins@ufv.br)



**Supplementary fig. 1** Homogenates of the digestive tract (midgut + hindgut) of worker of *Partamona helleri* plated on LB with or without kanamycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 24 h after ingestion of different sucrose solutions (food). **(A, B)** No bacteria added to the food (control). **(C, D)** Workers fed sterile LB (1:1). **(E, F)** Workers fed *Serratia* eGFP AS1 (recombinant). **(G, H)** Workers fed *Serratia marcescens* (wild). Left plates: different dilutions plated, as indicated. Right plates: UV illumination to detect GFP fluorescence

**Supplementary Tab. 1** Results of the analysis of variance of walking distance of *Partamona helleri* workers fed different sucrose solutions (food). Control = not inoculated food, LB = not inoculated with sterile LB (1:1), SE = Standard error F = F value,  $df_{\text{treat.}}$  = treatment degrees of freedom,  $df_{\text{res.}}$  = degrees of freedom of residuals,  $P$  = p-value,  $R^2_{\text{adj.}}$  = adjusted coefficient of determination

Behavioral variables	Food	Mean	SE	F	$df_{\text{treat.}}$	$df_{\text{res.}}$	$P$	$R^2_{\text{adj.}}$
Resting time (s)	Control	50.15	15.82	0.2	3	16	0.9	0.15
	LB	58.21	13.85					
	Recombinant strain	48.23	6.11					
	Wild strain	47.56	13.16					
Medium activity	Control	491.4	19.07	0.9	3	16	0.5	0.013
	LB	448.16	12.37					
	Recombinant strain	467.28	19.45					
	Wild strain	474.58	22.48					
Fast activity time	Control	30.19	8.03	0	3	16	1	0.18
	LB	32.57	6.73					
	Recombinant strain	31.62	6.25					
	Wild strain	30.44	5.98					
Walked distance (cm)	Control	2205	294.4	0.3	3	16	0.9	0.13
	LB	2283.8	340.6					
	Recombinant strain	2078.5	294.1					
	Wild strain	1947.2	196.5					

**Supplementary videos.** The walking activity of *Partamona helleri* workers fed different sucrose solutions. The different letters represent the identity of the individuals.

**Supplementary video 1** Bees fed sucrose solution (control)

**Supplementary video 2** Bees fed sucrose solution with sterile LB (1:1).

**Supplementary video 3** Bees fed sucrose solution with *Serratia* eGFP AS1 (recombinant).

**Supplementary video 4** Bees fed sucrose solution with *S. marcescens* (wild).

Access by link: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-021-01805-9#Sec13>>

#### 4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A ingestão de partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> durante a fase larval não alterou a sobrevivência e nem a morfologia externa das pupas de *P. helleri*, sugerindo que as abelhas podem estar acostumadas a ingestão de doses subletais de nano/microrpartículas de poluentes;
- A ingestão destas partículas aumentou a massa corpórea das abelhas recém-emergidas de *P. helleri*, provavelmente devido a essas partículas poderem ser bioacumuladas e poderem ocasionar processos inflamatórios;
- O comportamento de locomoção dos adultos de *P. helleri* expostos durante o desenvolvimento larval foi comprometido, e devido a essa capacidade ser uma das mais relevantes para a manutenção e sobrevivência das colônias, a exposição a partículas de EPS, PET ou TiO<sub>2</sub> pode prejudicar as mesmas;
- A ingestão das partículas durante a fase larval aumentou a CTH nas abelhas tratadas com PET ou TiO<sub>2</sub> e uma diminuição com EPS em relação ao controle, demonstrando que o tratamento teve um efeito tóxico para as abelhas, dependendo da partícula ingerida;
- A CDH também foi alterada após o tratamento com as partículas, sendo que a proporção dos prohemócitos foi reduzida em indivíduos que ingeriram EPS, e a de plasmatócitos aumentou em indivíduos que ingeriram EPS ou PET em comparação com o controle. Essa alteração na quantidade de hemócitos circulantes pode refletir negativamente na capacidade das abelhas em lidar com estressores;
- A ingestão da bactéria geneticamente modificada *Serratia* eGFP AS1, originalmente desenvolvida para o bloqueio da transmissão de *Plasmodium* por mosquitos, não afetou a sobrevivência e o comportamental (alimentar, caminhamento e voo) de forrageiras de *P. helleri*. Dessa forma, não afetou a atividade vital delas, sugerindo que a bactéria pode ser utilizada como um organismo seguro para controle de patógenos transmitidos por vetores;

- *Serratia* eGFP AS1 foi detectada no sistema digestório 144h após sua ingestão pelas operárias de *P. helleri*. Entretanto, sua quantidade diminuiu com o tempo após a ingestão. Além disso, a localização de *Serratia* eGFP AS1 variou de acordo com o período observado, sendo detectada no intestino médio após 24h e no intestino posterior 72h e 144h após o início do experimento. Essa variação no tempo de detecção e localização pode ser devido à proteção conferida pela microbiota intestinal, que limitaria a colonização do trato digestivo por *Serratia* eGFP AS1.