Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização e avaliação do potencial de aplicação bioindustrial da bacteriofauna intestinal de *Armitermes euamignathus* Silvestri, 1901 (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae)

Aline Peruchi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2013

Aline Peruchi
Licenciada em Ciências Biológicas

Caracterização e avaliação do potencial de aplicação bioindustrial da bacteriofauna intestinal de *Armitermes euamignathus* Silvestri, 1901 (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae)

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2013

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

Peruchi, Aline
Caracterização e avaliação do potencial de aplicação bioindustrial da bacteriofauna intestinal de *Armitermes euamignathus* Silvestri, 1901 (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae) / Aline Peruchi. - - Piracicaba, 2013.
74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Biocombustíveis 2. Biotecnologia 3. Energia renovável 4. Simbiose I. Título

CDD 632.736
P471c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Amilton e Maria Luísa, pelo

amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli pela oportunidade, orientação e pelos conhecimentos compartilhados, que contribuíram para o meu crescimento profissional;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelos conhecimentos compartilhados;

Ao Tiago Zucchi, pela orientação no inicio da minha chegada ao Laboratório de Interações em Insetos;

Aos amigos Aline Sartori Guidolin e Guilherme Duarte Rossi, pela grande ajuda durante todo o meu mestrado e também pelos muitos momentos de descontração;

Aos amigos do Laboratório de Interações em Insetos, Adrian Sosa Gomez, Aline Sartori Guidolin, André Patrício, Bruna Laís Merlin, Daniel Russ Solis, Fabio Cleisto Alda Dossi, Felipe Antônio Domingues, Fernanda Apple Muller, Guilherme Duarte Rossi, Lígia Hansen, Luís Gustavo de Almeida, Nathalia Cavichiolli, Pablo Fresia Coronel, Priscila Fortes, Tamires Fedato e Wanessa Scopel, pela companhia, ajuda e pelas boas risadas;

À minha mãe e ao meu irmão, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e incentivando nos momentos em que mais precisei;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de estudo (proc. 2010/ 13675-8);

E a todos que, de alguma forma, tenham contribuído para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO....9
ABSTRACT....11
LISTA DE FIGURAS....13
LISTA DE TABELAS....15
1 INTRODUÇÃO....17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....21
2.1 Simbiontes em Insetos....21
2.2 Biologia de cupins....22
2.3 Degradação da lignocelulose por cupins....25
2.4 Degradação de xilana e pectina por cupins....26
2.5 Produção de biocombustíveis a partir da hidrólise de celulose e hemicelulose....28
3 MATERIAL E MÉTODOS....29
3.1 Coleta de colônias e indivíduos de *A. euamignathus* e *C. gestroi*....29
3.2 Isolamento, cultivo e caracterização molecular de bactérias simbiontes cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*....29
3.2.1 Isolamento e cultivo....29
3.2.2 Caracterização molecular e filogenia....30
3.3 Caracterização molecular de bactérias simbiontes não-cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*....32
3.3.1 Preparo de células quimicamente competentes....32
3.3.2 Amplificação, transformação e clonagem....33
3.3.3 Caracterização molecular e filogenia....33
3.4 Seleção e caracterização molecular de bactérias simbiontes cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi* em meios seletivos com celulose, xilana ou pectina....35
3.5 Verificação do potencial de hidrólise dos produtos de secreção de simbiontes selecionados....36
4 RESULTADOS....39
4.1 Isolamento e caracterização molecular de bactérias simbiontes cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*....39
4.2 Isolamento e caracterização molecular de bactérias simbiontes não-cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*....46

4.3 Seleção e caracterização molecular de bactérias associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi* em meios seletivos com celulose, xilana ou pectina.....52

4.4 Determinação da capacidade de crescimento de bactérias associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi* isoladas em meios enriquecidos com celulose, xilana ou pectina 56

4.5 Verificação do potencial de hidrólise dos produtos de secreção de simbiontes selecionados 57

5 DISCUSSÃO 61

6 CONCLUSÕES 65

REFERÊNCIAS.....67

RESUMO

Caracterização e avaliação do potencial de aplicação bioindustrial da bacteriofauna intestinal de *Armitermes euamignathus* Silvestri, 1901 (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae)

Microrganismos simbiontes são essenciais para a exploração de dietas de baixo valor nutricional, o desenvolvimento, crescimento e a reprodução de seus hospedeiros. Insetos que se alimentam de dieta rica em materiais celulósicos, como é o caso de cupins, apresentam protozoários e/ou bactérias associadas ao trato digestivo que auxiliam na quebra do polímero de celulose e na fixação de nitrogênio. A celulose e a hemicelulose são polímeros estruturais formados por unidades de glicose, sendo a hidrólise desses polímeros de grande interesse industrial para a produção de etanol. O modo mais eficiente de hidrolisar a celulose é pelo uso de enzimas, as celulases. Os cupins apresentam grande eficiência na digestão de celulose e hemicelulose, sendo que a compreensão do processo de digestão de celulose por esses insetos pode facilitar o desenvolvimento de tecnologia mais eficiente para a quebra desse polímero. Assim, este trabalho buscou *i)* isolar, identificar e caracterizar microrganismos associados ao trato digestivo dos cupins *Armitermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae); *ii)* verificar o potencial da microbiota na degradação dos principais componentes da lignocelulose (celulose, xilana e pectina); *iii)* caracterizar o potencial hidrolítico e determinar as condições ótimas de hidrólise (pH e temperatura das diferentes enzimas produzidas). A análise da microbiota cultivável levou à identificação de 14 filotipos para *A. euamignathus* e de 11 para *C. gestroi,* distribuídos nos quatro principais filos, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria. A caracterização da microbiota não-cultivável levou à identificação de 17 filotipos em operários e três em soldados de *A. euamignathus*, enquanto que em *C. gestroi* foi possível identificar seis filotipos em operários e oito em soldados. O filo Firmicutes foi o mais abundante em *A. euamignathus*, enquanto Proteobacteria predominou em *C. gestroi*. O isolamento de bactérias em meio seletivo para degradação de celulose, xilana ou pectina levou à seleção de oito filotipos para *A. euamignathus* e cinco para *C. gestroi*. Extratos brutos obtidos do cultivo dessas bactérias apresentaram atividade de hidrólise de pectina e xilana, mas não celulose. Ensaios para otimização das reações de degradação indicaram a presença de enzimas que atuam em diferentes faixas de pH ótimo. Assim, a microbiota associada aos cupins estudados foi bastante diversa, apresentando ainda diferenças entre as diferentes castas desses insetos. Essa microbiota também atua em parte do processo de degradação da celulose, demonstrando o potencial que bactérias associadas ao intestino de cupins podem apresentar para a identificação de enzimas digestivas que possam ser utilizadas no processamento da celulose.

Palavras-chave: Biocombustíveis; Biotecnologia; Energia renovável; Simbiose

ABSTRACT

Characterization and potential for bioindustrial application of the gut bacteriofauna of *Armitermes euamignathus* Silvestri, 1901 (Isoptera: Termitidae) and *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) (Isoptera: Rhinotermitidae)

Symbionts are essential for insect hosts as they enhance the nutritional value of their host diets and support host development, growth and reproduction. Insects that feed on diets rich in cellulose, such as termites, exhibit protozoa and/or bacteria within their digestive tract that aid in breaking the cellulose and in nitrogen fixation. Cellulose and hemicellulose are polymers formed by units of glucose, and the hydrolysis of these polymers is of great industrial interest for the production of ethanol. Cellulases are the most efficient enzymes to break cellulose. Termites have a huge capacity to digest cellulose and hemicellulose; thefore, understanding the process by which they digest cellulose may allow the development of more suitable technologies devoted to the industrial utilization of cellulose. This work aimed to i) isolate, identify and characterize microorganisms associated with the digestive tract of *Armitermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae) and *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae), ii) investigate the potential of symbionts in the degradation of the main components of lignocellulose (cellulose, xylan and pectin); iii) characterize the hydrolytic potential and determine the optimum hydrolysis conditions (pH and temperature) for the different enzymes produced. The analysis of culturable microorganisms led to the identification of 14 phylotypes for *A. euamignathus* and 11 for *C. gestroi*, which were distributed in four Phyla, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria. The characterization of the non-culturable microbiota led to the identification of 17 phylotypes in workers and three in soldiers of *A. euamignathus*, while six phylotypes were identified in workers and eight in soldiers of *C. gestroi*. Firmicutes was the most abundant in *A. euamignathus*, while Proteobacteria predominated in *C. gestroi*. The isolation of bacteria in selective medium to degrade cellulose, xylan or pectin led to the selection of eight phylotypes from *A. euamignathus* and five from *C. gestroi*. Crude extracts obtained from the cultivation of these bacteria showed hydrolytic activity towards to xylan and pectin, but not cellulose. Assays for optimization of enzymatic reaction indicated the presence of enzymes that act at different pH ranges great. As a conclusion, symbiont diversity was quite different between the termites species and in between the castes of these species. But the microbiota isolated also acts in the degradation of cellulose, demonstrating the potential for the gut-associated bacteria of termites may present for the identification of digestive enzymes which can be used in the processing of cellulose.

Keywords: Biofuels; Biotechnology; Renewable energy; Symbionts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do trato digestivo de cupim inferior (A) e superior (B). O esquema mostra as regiões: Cr – intestino anterior; Pr – proventrículo; Me – intestino médio; Ms – segmento misto; P1 a P3 – segmentos proctodeais; P3d – divertículo; R – reto (EGGLETON, 2011) 24

Figura 2 – Diversidade de morfortipos de bactérias isoladas do trato digestivo de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* nos diferentes meios de cultura testados.....39

Figura 3 – Abundância relativa dos filotipos isolados do trato digestivo *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* ao nível de Filo, após análise de sequência do 16S do rDNA 40

Figura 4 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Armitermes euamignathus*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo.....43

Figura 5 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Coptotermes gestroi*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo 45

Figura 6 – Abundância relativa dos filotipos isolados do trato digestivo *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* ao nível de Família, após análise de sequência do 16S do rDNA 47

Figura 7 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Armitermes euamignathus*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo.....50

Figura 8 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Coptotermes gestroi*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir

de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo 51

Figura 9 – Frequência relativa dos morfortipos isolados em meio seletivo (M9) acrescido de CMC, xilana ou pectina para *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi.* 52

Figura 10 – Frequência relativa de sequencias do gene do gene 16S rDNA dos morfotipos isolados do trato digestivo *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* distribuídas nos diferente filos, para os diferentes meio de cultivo 53

Figura 11 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Coptotermes gestroi*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,02 substituição por posição de nucleotídeo.....55

Figura 12 – Crescimento, em meio mínimo M9 + CMC, xilana ou pectina como única fonte de carbono, de bactérias associadas ao trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* 57

Figura 13 – Atividade das xilanases secretadas pelas bactérias isoladas do trato digestivo de ao trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, em meio seletivo com xilana....58

Figura 14 – Efeito do pH sobre as xilanases secretadas por *Arthrobacter nicotinovorans* (A) e *Paenibacillus pabuli* (B).....58

Figura 15 – Atividade das pectinas secretadas pelas bactérias isoladas do trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, em meio seletivo de pectina (A); Efeito do pH sobre as pectinases secretadas por *Arthrobacter nicotinovorans* (B) e *Paenibacillus illinoisensis* (C) 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes associados ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* após análise de 1400 pb de sequências do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon 41

Tabela 2 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes não-cultiváveis associadas ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, após análise de fragmento de 1.400 pb do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon.....48

Tabela 3 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes associados ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* após análise de 1400 pb de sequências do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon 54

Tabela 4 – Dosagem de proteínas totais encontradas nas bactérias isoladas do trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, em meio seletivo com CMC, xilana e pectina.....60

1 INTRODUÇÃO

O sucesso adaptativo de insetos à vida terrestre tem a sua associação a microrganismos simbiontes como um dos principais fatores. Esses microrganismos são essenciais para a exploração de dietas de baixo valor nutricional, o desenvolvimento, crescimento e a reprodução de seus insetos hospedeiros (MORAN; BAUMANN, 2000; MORAN, 2006). Dentre os simbiontes intracelulares associados a insetos, *Buchnera* (simbionte primário) e *Wolbachia* (simbionte secundário) são os mais bem estudados (ZCHORI-FEIN et al., 2004; BAUMANN, 2006; SERBUS et al., 2008). Os insetos também podem alojar simbiontes extracelulares, sendo a grande maioria associada ao lúmen do trato digestivo, onde participam de processos ligados à digestão do alimento, ciclagem de nitrogênio, detoxificação de compostos secundários de defesa da planta, entre outros (DILLON; DILLON, 2004).

Insetos que se alimentam de dieta rica em materiais celulósicos, como é o caso de cupins, apresentam protozoários e/ou bactérias associadas ao trato digestivo que auxiliam na quebra do polímero de celulose e na fixação de nitrogênio (TOKUDA et al., 1997; FONTES; ARAUJO, 1999; DOUGLAS, 2009). Os cupins são insetos sociais dominantes em ambientes terrestres e tropicais e se organizam em castas especializadas no desempenho de atividades próprias, como a coleta e distribuição do alimento e manutenção da assepsia da colônia (operários), defesa (soldados) e reprodução (reprodutores) (CONSTANTINO, 1999; FONTES; ARAUJO, 1999; COSTA- LEONARDO, 2002).

Os cupins são agrupados em superiores e inferiores dependendo da microbiota associada ao trato digestivo (TOKUDA et al., 2001). Cupins inferiores, como *Coptotermes gestroi*, estão associados a protozoários flagelados e bactérias, enquanto cupins superiores, como *Armitermes euamignathus*, estão associados exclusivamente a bactérias. Os simbiontes de cupins inferiores e superiores participam do processo de digestão da celulose, mesmo naquelas espécies de cupins capazes de produzir suas próprias celulases (INOUE et al., 1997; TOKUDA; YAMAOKA; NODA, 2000).

A celulose e a hemicelulose são polímeros estruturais formados por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β-1,4. Assim como a xilana e a pectina, são encontradas compondo a parede celular de células vegetais. A hidrólise desses

polímeros tem grande interesse industrial, uma vez que a sua quebra resulta em monômeros de açúcar que servem de substrato para a produção de etanol. O modo mais eficiente de hidrolisar a celulose é pelo uso de enzimas, as celulases, um complexo de enzimas capaz de converter celulose em β-glicose. O desafio enfrentado pela indústria da bioconversão de etanol é fazer com que essa conversão aconteça de forma eficiente, econômica e sustentável (SCHARF; BOUCIAS, 2010; WATANABE; TOKUDA, 2010).

Sabe-se que os cupins apresentam grande eficiência na digestão de celulose (77-99%) e hemicelulose (65-87%), sugerindo que a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de digestão de celulose possa facilitar o desenvolvimento de tecnologia mais eficiente para a quebra do polímero de celulose ou hemicelulose, processo necessário à produção de bioetanol (OHKUMA, 2003; SCHARF; BOUCIAS, 2010; WATANABE; TOKUDA, 2010).

Além do potencial biotecnológico de simbiontes associados a insetos, assim como aquele apresentado pela microbiota intestinal de cupins, simbiontes de insetos representam, atualmente, uma ferramenta moderna a ser utilizada no desenvolvimento de técnicas alternativas para o controle de pragas, seja via transgenia ou paratransgenia, com potencial de sucesso demonstrado para inúmeros insetos-pragas agrícolas ou vetores de doenças ao homem (MILLER; LAMPE; LANZON, 2007; FAVIA et al., 2008; COUTINHO-ABREU; ZHU; RAMALHO-ORTIGÃO, 2010). Além da possibilidade de exploração dos mesmos via manipulação gênica para o controle de insetos-pragas e vetores de doenças, a determinação das associações inseto-simbionte e das funções desempenhadas pelos simbiontes na bioecologia do inseto hospedeiro também representam fonte adicional de informações para que novas vias de regulação de populações de insetos nocivos sejam desenvolvidas (DOUGLAS, 2007).

Dessa forma, o conhecimento da microbiota, cultivável ou não, associada a cupins, os quais são pragas importantes em ambientes agrícola e urbano, poderá fornecer informações essenciais ao desenvolvimento de métodos alternativos de controle desses insetos e à identificação de microrganismos/enzimas que facilitem a conversão da celulose em glicose na produção de biocombustíveis. Este trabalho teve como objetivos: i) isolar, identificar e caracterizar microrganismos associados ao trato digestivo dos cupins *Armitermes euamignathus* (Isoptera: Termitidae) e *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae); ii) verificar o potencial da microbiota

na degradação dos principais componentes da lignocelulose (celulose, xilana e pectina); iii) caracterizar o potencial hidrolítico e determinar as condições ótimas de hidrólise (pH e temperatura das diferentes enzimas produzidas).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Simbiontes em Insetos

Os insetos representam o grupo de animais mais bem sucedidos da natureza. Seu sucesso é devido a fatores como a adaptação à vida no ambiente terrestre, ao vôo e a coevolução com plantas e microrganismos. Relações de simbiose entre insetos e microrganismos são comuns e, muitas vezes, as bactérias podem desempenhar papel crucial na biologia e no ciclo de vida de insetos, afetando sua nutrição, desenvolvimento, reprodução e capacidade de defesa a inimigos naturais, além de interferir no processo de especiação e seleção hospedeira (MORAN; BAUMANN, 2000; MORAN, 2001; MORAN, 2006; FELDHAAR, 2011; KALTENPOTH; ENGL, 2013).

Simbiose pode ser definida como uma relação íntima entre inseto e microrganismo, onde a aquisição e manutenção desses microrganismos podem resultar em novas estruturas e em novas vias metabólicas (ZOOK, 1998). Os endossimbiontes podem ser obrigatórios ou facultativos, e essa classificação está relacionada ao grau de dependência do inseto em relação ao microrganismo simbionte. Simbiontes obrigatórios estão normalmente associados a estruturas especiais do hospedeiro, os bacteriócitos ou micetócitos, são transmitidos verticalmente, e sua associação é necessária à sobrevivência e/ou reprodução de seu hospedeiro. O exemplo mais estudado desta relação é a simbiose de pulgões e o simbionte bacteriano, *Buchnera aphidicola* (BAUMANN, 2005). Como é típico em relações de simbiose obrigatória, *B. aphidicola* tem genoma muito reduzido, mas mantém genes que lhe permitem fornecer ao seu hospedeiro os aminoácidos essenciais e as vitaminas, que não podem ser obtidos da dieta do pulgão (HANSEN; MORAN, 2011; ENGEL; MORAN, 2013).

Simbiontes facultativos podem ser encontrados alojados em vários tecidos do hospedeiro, sendo transmitidos de forma vertical ou horizontal, mantendo relações de simbiose com o inseto que podem variar do mutualismo ao parasitismo (MORAN; BAUMANN, 2000; BAUMANN, 2006; SIOZIOS et al., 2008). *Wolbachia* é o exemplo mais conhecido desta relação, induzindo diversas alterações reprodutivas, tais como: (1) incompatibilidade citoplasmática direcional ou bidirecional, quando não há produção de progênie; (2) indução de telitoquia, em que ovos haplóides originam

indivíduos diplóides do sexo feminino; (3) feminização, quando machos genéticos são convertidos em fêmeas funcionais (ZCHORI-FEIN et al., 2004; SERBUS et al., 2008).

Insetos ainda podem abrigar simbiontes extracelulares que são encontrados em várias partes do corpo do hospedeiro, principalmente no trato digestivo. Muitos fatores influenciam diretamente a colonização do trato intestinal de insetos, uma vez que a diversidade da microbiota está relacionada com estruturas especializadas presentes no intestino, o tipo de alimento ingerido pelo inseto e enzimas digestivas presentes, além do efeito do pH e do potencial redox. Em relação à estrutura e compartimentalização do trato digestivo, foi observado que insetos que tem estruturas mais complexas também apresentam microbiota intestinal mais diversa quando comparados àqueles que apresentam estruturas mais simples (DILLON; DILLON, 2004).

2.2 Biologia de cupins

Os cupins são insetos eussociais pertencentes a Ordem Isoptera e estão entre os invertebrados mais abundantes que compõem a fauna edáfica de ecossistemas tropicais e subtropicais, ocorrendo ainda em regiões áridas (LEE; WOOD, 1971; COSTA-LEONARDO, 2002). As 3000 espécies de cupins descritas no mundo estão agrupadas em sete famílias: Mastotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae, das quais apenas as quatro últimas ocorrem no Brasil (ENGEL; KRISHNA, 2004; HONGOH, 2011).

Uma colônia típica de cupim é composta por indivíduos morfofisiologicamente diferentes. A casta dos indivíduos estéreis é representada por operários e soldados, sendo os primeiros responsáveis pela obtenção e repasse do alimento às demais castas, pelo cuidado à prole e pela construção e limpeza do ninho (COSTA-LEONARDO, 2002). A casta dos operários, por meio do processo de trofalaxia, é responsável pelo complexo fenômeno de regulação social da comunidade. Quando requisitados, os operários podem regurgitar o alimento (alimento estomodeal), oferecendo secreção salivar ou fornecendo uma gota de fluido fecal (alimento proctodeal). Essas substâncias, além do valor nutritivo, transportam hormônios reguladores do desenvolvimento social da colônia, bactérias e/ou protozoários

simbiontes que auxiliam no processo de digestão da celulose (FONTES; ARAUJO, 1999). Os soldados atuam na defesa da colônia e participam do forrageamento juntamente com os operários. Rei e rainha representam a casta fértil, tendo a rainha a função exclusiva de produzir ovos e o rei a de inseminá-la periodicamente (CONSTANTINO, 1999; COSTA-LEONARDO, 2002).

O alimento coletado pelos operários representa o recurso energético básico da colônia. Uma grande variedade de materiais celulósicos e lignocelulósicos podem servir de alimento aos cupins, incluindo madeira (viva ou morta), gramíneas, plantas herbáceas, excremento de herbívoros, fungos e húmus (LIMA; COSTA-LEONARDO, 2007). Por ocuparem a posição de consumidores primários (herbívoros e detritívoros) em ecossistemas naturais e participarem ativamente da decomposição e reciclagem de nutrientes, os cupins são considerados peças-chaves em vários processos ecológicos. Além disso, estão associados a processos de aeração e descompactação do solo, consequentes das construções de galerias para forrageamento. Quando comparado ao alimento consumido por outros animais, o alimento explorado pelos cupins apresenta baixo valor nutricional (WALLER; LA FAGE,1986).

O sistema digestivo de cupins é composto por um tubo que começa na parte superior da cavidade bucal, seguido pela faringe e, posteriormente, diferenciado em três partes: intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesêntero) e intestino posterior (proctodeu) (Figura 1). Na região do proctodeu são encontrados microrganismos simbiontes (protozoários e/ou bactérias) que auxiliam os cupins na digestão de celulose e na fixação de nitrogênio (N_2), o que faz com que esses insetos interfiram nos processos atmosféricos por meio da liberação de metano (CH_4) e de dióxido de carbono (CO_2) (FONTES; ARAUJO, 1999). Dependendo do simbionte associado, cupins são divididos em inferiores, aqueles associados a protozoários flagelados e bactérias, e superiores, associados somente a bactérias. Em ambos os casos, os simbiontes desses insetos participam ativamente da digestão da celulose. Cupins superiores apresentam representantes apenas em Termitidae, sendo todos os demais distribuídos pelas seis famílias restantes (TOKUDA et al., 2000; COSTA-LEONARDO, 2002).

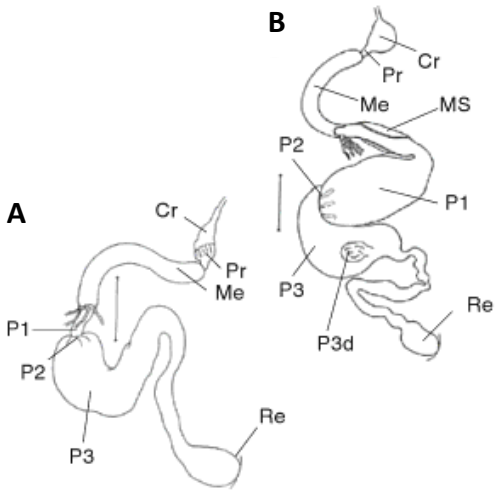

Figura 1 – Estrutura do trato digestivo de cupim inferior (A) e superior (B). O esquema mostra as regiões: Cr – intestino anterior; Pr – proventrículo; Me – intestino médio; Ms – segmento misto; P1 a P3 – segmentos proctodeais; P3d – divertículo; R – reto (EGGLETON, 2011)

Inicialmente, toda digestão de celulose era creditada aos simbiontes associados ao trato digestivo desses insetos; porém, muitos estudos mostram que alguns grupos de cupins apresentam a capacidade de sintetizar enzimas celulolíticas capazes de digerir, pelo menos parcialmente, a celulose, como no caso do cupim superior *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki) (Termitidae) (TOKUDA et al., 2001). Também foi encontrada atividade celulolítica em glândulas salivares e no proctodeu do cupim inferior *Reticulitermes speratus* (Kolbe) (Rhinotermitidae), mas pouco se sabe sobre a eficiência das bactérias associadas no processo de digestão da celulose (INOUE et al., 1997).

A degradação da lignocelulose em açúcares é um processo complexo e envolve uma diversidade de enzimas hidrolisadoras. A alta eficiência de digestão e aproveitamento da celulose por cupins tem fascinado muitos investigadores por quase um século, mas o processo de digestão da celulose por esses insetos ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que a chave para entender todo o processo está na caracterização das enzimas que atuam no processo de digestão da lignocelulose (TOKUDA et al., 1997).

2.3 Degradação da lignocelulose por cupins

A lignocelulose é composta por celulose, hemicelulose e lignina. Celulose e hemicelulose são polissacarídeos estruturais compostos por unidades de açúcar unidas por ligações glicosídicas β-1,4 (WATANABE; TOKUDA, 2010). A celulose é composta por polímeros rígidos de glicose com alto peso molecular, enquanto a hemicelulose é um polímero heterogêneo de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, galactose, glicose) e ácidos de açúcar (ácidos glicurônico ou galacturônico) (BACIC; HARRIS; STONE, 1988). Também é comum encontrar hemiceluloses formadas por xilana, laminarina e liquenana (BEG et al., 2001). A lignina é um polímero tridimensional de compostos fenólicos ligados entre si e à hemicelulose por ésteres. A lignina é sintetizada principalmente a partir de três álcoois hidroxicinamil (p-cumaril, coniferil e sinapil), cujas proporções variam dependendo da espécie de planta (RALPH et al., 2004; ANDERSON; AKIN, 2008).

A degradação da lignocelulose envolve um complexo enzimático e tem inicio durante o processo de mastigação dos cupins. Os materiais lignocelulósicos são quebrados em partículas menores e, em seguida, ocorre a despolimerização da lignina com participação das enzimas lacases e peroxidades (BREZNACK; BRUNE, 1994). A etapa seguinte é a degradação da hemicelulose, que envolve a atividade combinada de diversas enzimas, como endo e exo β-1,4-xilanases, β-xilosidases, α-arabinofuranosidases, α-uronidases e esterases (SCHARF; TARTAR, 2008). A etapa final é a hidrolise da celulose em suas unidades de glicose pela atividade combinada de endo-β-1,4-glicanases, celobiohidrolases e β-1,4-glicosidases. As endo-β-1,4-glicanases hidrolisam aleatoriamente ligações β-1,4-glicosídicas dos polímeros de celulose, liberando oligômeros de quatro ou mais unidades de glicose (TOKUDA et al., 1997; WATANABE et al., 1997). As celobiohidrolases atacam as extremidades não-redutoras das cadeias de celulose, liberando uma unidade de celobiose após hidrólise. Por atacar somente as extremidades não-redutoras das cadeias, a sua atividade é reduzida, a menos que as endoglicanases forneçam substrato suficiente. A terceira enzima envolvida para que ocorra a hidrólise completa da celulose à glicose é a β-1,4-glicosidase, hidrolisando a celobiose à glicose (BREZNACK; BRUNE, 1994; WATANABE; TOKUDA, 2001).

Embora a expressão de genes que codificam enzimas que auxiliam na quebra da lignocelulose já tenha sido verificada por meio de RT-PCR na glândula salivar

e/ou no intestino médio de várias espécies de cupins (TOKUDA et al., 1999; TOKUDA et al., 2009), e também por análise do transcritoma da glândula salivar do cupim inferior *Hodotermopsis sjoestedti* (Termopsidae) (YUKI et al., 2008), a digestão completa desse substrato depende em grande parte da atividade de sua microbiota intestinal. Apesar de todos estes estudos sobre a relação de simbiose entre insetos e microrganismos, ainda faltam informações sobre o papel funcional desta microbiota intestinal, o que explica a grande dificuldade em enumerar os benefícios dessa relação (HONGOH, 2011)

Outro desafio é o fato de grande parte dos microrganismos associados não serem prontamente cultiváveis, fazendo necessária a utilização de métodos independentes de meios de cultivo, como os métodos moleculares, principalmente os baseados no estudo da seqüência do 16S rDNA. Estas técnicas se baseiam na amplificação do 16S rDNA por PCR e posterior caracterização por clonagem e seqüenciamento. Com o conhecimento da microbiota não-cultivável presente no trato digestivo dos insetos é possível a obtenção de informações necessárias para o seu cultivo em condições específicas, como presença ou ausência de oxigênio no momento do cultivo e/ou a suplementação do meio com nutrientes específicos. Outros métodos para estudo da comunidade bacteriana podem ser utilizados, tais como a análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA), polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (TRFLP), análise do espaço ribossomal intergênico (RISA), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) e polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). Existem ainda métodos que se baseiam no perfil dos ácidos graxos fosfolipídicos (PLFA) e dos metil ésteres de ácido graxos (FAME) para obter perfil da comunidade bacteriana (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; DILLON; DILLON, 2004).

2.4 Degradação de xilana e pectina por cupins

Xilana é o principal constituinte do complexo hemicelulósico presente na parede celular de plantas. Para a completa hidrólise de xilana é necessária a ação de muitas enzimas que reduzem este polímero de açúcar a pequenas unidades metabolizáveis. A principal enzima envolvida na hidrólise de xilana é a endo-1,β-xilanase (CORTEZ; PESSOA, 1999).

A hidrólise de xilana facilita a liberação de lignina da polpa, e é aplicada em escala industrial para a redução da quantidade de cloro utilizada nos processos industriais tradicionais. Na indústria de alimentos, xilanas encontram aplicação como substrato para a produção de xilitol, um adoçante de baixo poder calórico (ARRUDA; FELIPE, 2009). Outro produto resultante da hidrólise da xilana é a D-xilose, que pode ser convertida em diversos produtos de interesse industrial, como combustíveis e solventes (etanol, butanol, 2,3-butanodiol, acetona e 2-propanol), alditóis (xilitol e glicerol) e ácidos orgânicos (ácido lático, acético e butírico), além de poder ser utilizada como substrato nos processos de produção de glicose isomerase (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; BEG et al., 2001).

Estudos realizados com os cupins inferiores *Zootermopsis angusticollis* (Termopsidae) *e Reticulitermes speratus* (Rhinotermitidae) demonstraram que protozoários presentes no trato digestivo desses insetos participam ativamente na quebra da xilana (ODELSON; BREZNAK, 1985; INOUE et al., 1997). O estudo de metagenômica realizado com o cupim superior *Nasutitermes ephratae* (Termitidae) relatou a presença de diversas xilanases no segmento P3 do trato digestivo desse cupim (WARNECKE et al., 2007). Pouco se sabe sobre a participação de bactérias simbiontes na degradação de xilana; porém, trabalhos realizados com o cupim inferior *Reticulitermes santonensis* (Rhinotermitidae) identificaram diversas glicosidases bacterianas e, entre elas, uma nova xilanase bacteriana que atua na despolimerização das cadeias de polissacarídeos de hemiceluloses, produzida por uma bactéria do gênero *Streptomyces*. Recentemente, uma nova xilanase termoestável foi isolada de *Paenibacillus macerans*, associada ao intestino de *Nasutitermes* sp. (DHEERAN et al., 2012).

A pectina é um dos principais componentes da lamela média da parede celular de plantas e age como cimento, agregando as células vegetais. As enzimas pectinolíticas, ou pectinase, são divididas em três grupos: protopectinases, despolimerases e esterases. As pectinases são aplicadas em vários processos industriais: para reduzir a viscosidade, aumentar e melhorar a eficiência de filtração e clarificação; para melhorar a extração de óleos vegetais; e no tratamento de fibras naturais (UENOJO; PASTORE, 2007).

2.5 Produção de biocombustíveis a partir da hidrólise de celulose e hemicelulose

Fatores como o aquecimento global e o aumento do custo do petróleo nos últimos anos criou a necessidade de pesquisas para a produção de combustíveis ecologicamente sustentáveis como o bioetanol (SUN; SCHARF, 2010). A biomassa lignocelulósica é uma das fontes renováveis mais abundantes que podemos encontrar na natureza, sendo composta, principalmente, de celulose (44%), hemicelulose (30%) e lignina (26%). Essa biomassa inclui resíduos agrícolas e florestais que tem potencial para se tornar uma importante fonte de açúcares fermentáveis, o que permitiria a expressiva produção de bioetanol (WATANABE; TOKUDA, 2010).

A hidrólise de celulose e hemicelulose em monômeros de açúcares, como glicose, xilose ou manose, é etapa crucial no processo de produção de bioetanol. O método mais eficiente para a hidrólise da celulose em glicose é pelo uso de celulases (um complexo enzimático capaz de quebrar celulose em β-glicose). Entretanto, um dos desafios a ser enfrentado na bioconversão de lignocelulose é a obtenção do bioetanol de forma eficiente, econômica e sustentável (SCHARF; BOUCIAS, 2010).

Os cupins estão entre os mais importantes e eficazes insetos capazes de digerir lignocelulose. Pesquisas demonstram que os cupins apresentam eficiência de digestão de 77-99% de celulose e de 65-87% de hemicelulose (OHKUMA, 2003). Isso sugere que os cupins podem ser a chave para converter, de forma eficiente, lignocelulose em bioetanol. Sendo assim, o estudo da fisiologia do seu trato digestivo, bem como a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de digestão de celulose, seja de forma endógena ou com o auxilio de simbiontes, pode auxiliar no desenvolvimento de tecnologia eficiente de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (quebra do polímero com auxilio de enzimas), processo necessário na produção de bioetanol (SCHARF; BOUCIAS, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de colônias e indivíduos de *A. euamignathus* e *C. gestroi*

Operários e soldados de *A. euamignathus e C. gestroi* foram coletados em ninhos localizados no campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba, São Paulo, e em ninhos localizados na área urbana da cidade Rio Claro. A coleta de *A. euamignathus* foi realizada diretamente de ninhos epígeos, característicos de cupins deste gênero, enquanto para a coleta de *C. gestroi* foram utilizadas iscas Termitrap®, confeccionadas com tiras de papelão corrugado de 15 cm de altura por 135 cm de comprimento. Essas iscas foram enterradas no solo e mantidas nos pontos de coletas por aproximadamente 10 dias. Após a retirada, foi realizada a triagem do material e a separação das castas de interesse.

3.2 Isolamento, cultivo e caracterização molecular de bactérias simbiontes cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*

3.2.1 Isolamento e cultivo

Para isolamento da bacteriofauna cultivável, operários e soldados de *A. euamignathus* e *C. gestroi* foram esterilizados superficialmente via imersão em solução de 0,5% de hipoclorito de sódio em 70% etanol por 5 min. Na sequência, os espécimes foram submetidos a dois banhos sucessivos em água destilada estéril (5 min/cada). Os espécimes foram dissecados para a coleta do intestino. Os intestinos obtidos de dez indivíduos de cada casta (operário e soldado), para cada espécie estudada, foram transferidos para tubo contendo 100 µL de solução salina estéril a 0,8% e, em seguida, macerados com auxilio de pistilo. Os macerados obtidos foram utilizados para o isolamento de colônias após a realização de diluições seriadas.

Cada diluição foi agitada em vórtex e alíquotas de 50 µL foram plaqueadas em diversos meios de cultura, sendo: 1) meio Luria Bertani (LB) (ATLAS, 2005); 2) 10% TSB (Acumedia®); 3) TSB (Acumedia®); 4) meio ágar nutriente (ATLAS, 2005); 5) meio ISP2 (SCHIRLING; GOTTLIEB, 1966); 6) meio ISP4 (SCHIRLING; GOTTLIEB, 1966); 7) meio de extrato de solo (ATLAS, 2005); 8) meio SM3 sem e com antibióticos antibióticos [foi adicionado ao meio SM3 os antibióticos novabiocina (10 µg/mL), ácido nalidixico (10 µg/mL), ciclohexamida (50 µg/mL) e o fungistático

nistatina (50 µg/mL)] (TAN; WARD; GOODFELLOW, 2006) 9) meio ágar-vitamina (HAYAKAWA; NONOMURA, 1987); 10) meio Czapek (Fluka Analytical®); e 11) meio de amido-caseína (KÜSTER; WILLIAMS, 1964), e cultivadas a 28°C por 16 h ou até o surgimento de colônias. As colônias foram inicialmente categorizadas por aspectos morfológicos (cor, tamanho, formato da colônia) e pelo menos três (3) representantes de cada tipo morfológico obtido em cada meio de cultivo, foram selecionados para posterior caracterização molecular. Cada clone isolado foi cultivado em meio líquido e uma alíquota das células em cultivo preservada em 30% glicerol e depositada na Coleção de Simbiontes de Insetos do Laboratório de Interações em Insetos, mantida a -80ºC.

3.2.2 Caracterização molecular e filogenia

Os morfotipos selecionados foram cultivados em meio líquido a 28°C, sob agitação constante, por 24h. Após o crescimento, alíquotas de 1 mL das células bacterianas foram coletadas e sedimentadas via centrifugação (3.500*g* x 5 min x 10°C), sendo o sedimento obtido utilizado para extração de DNA genômico.

O DNA genômico foi obtido após adição de 400 µL do tampão de extração TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA, pH 8; 400 mM NaCl), acrescidos de 40 µL de 20% SDS e 8 µL de proteinase-K (20 mg/mL) ao sedimento de células obtido. O material foi incubado a 55°C por 1 h e 300 µL de solução aquosa saturada de NaCl (5 M) foram adicionados. A amostra foi agitada em vortex por 30s, centrifugada a 14.000*g* (30 min) e o sobrenadante coletado. Um volume de isopropanol gelado foi adicionado ao sobrenadante e incubado a -20°C “over-night” para a precipitação do DNA. Em seguida, o material foi centrifugado (14.000*g* x 30 min x 4°C), o sobrenadante descartado e o sedimento de DNA obtido lavado em banhos sucessivos de 100% (1x) e 70% (2x) etanol e centrifugado (14.000 *g* x 5 min x 4°C). Após o término das lavagens, o sedimento de DNA foi mantido à temperatura ambiente para completa evaporação do etanol, sendo então ressuspenso em 20 µL de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C até sua utilização (SUNNUCKS; HALES, 1996). A qualidade do DNA extraído foi avaliada via eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2) a 5 V/cm, e posterior visualização em transiluminador.

As amostras de DNA obtidas foram utilizadas para a amplificação de fragmento da região 16S do rDNA em reações de PCR com volume final de 25 µL. As reações foram conduzidas em solução contendo tampão de reação 1x, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 0,32 µM de cada um dos iniciadores (8F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'; 1491R: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'), 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®) e 1 µl de DNA genômico (aproximadamente 50 ng). O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min, e finalização com uma etapa de extensão a 72°C por 10 min (RIVAS et al., 2001). Os produtos de amplificação foram separados via eletroforese em gel de agarose a 1,5%, nas mesmas condições descritas anteriormente.

As reações que produziram fragmento único de tamanho esperado (aproximadamente 1.490 pb) foram purificadas utilizando o método enzimático ExoSap (Fermentas®), adicionando-se 10 U da enzima exonuclease e 1 U da enzima fosfatase alcalina a 5 µL da reação de PCR. As amostras foram mantidas a 37°C por 30 min e posteriormente submetidas a 80°C por 15 min para inativação das enzimas. Os amplicons purificados foram submetidos à análise de RFLP ("*Restriction Fragment Length Polimorphysm*" – polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) utilizando as enzimas de restrição *Rsa*I, *Hinf*I e *Dde*I (Fermentas®). Uma alíquota de 4 µL de cada produto de PCR foi digerida em uma mistura de reação de 10 µL (0,2 µL da enzima, 1 µL de tampão e 4,8 µL de água), seguindo as instruções do fabricante (Fermentas®). As reações foram colocadas em banho-maria a 37°C por 24 h e o padrão de restrição obtido visualizado em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Morfotipos que produziram padrões de restrição diferentes foram selecionados e enviados para sequenciamento junto ao CBMEG/UNICAMP ou junto ao Centro de Estudos do Genoma Humano - USP. Para a obtenção dos 1400pb do gene 16S rDNA, as reações de sequenciamento foram conduzidas utilizando-se os iniciadores empregados nas reações originais de amplificação (8F e 1492R), além de iniciadores universais internos (357f: 5' CTCCTACGGGAGGCAGAGG 3'; 515f: 5'- GTGCCAGCAGCCGCGGTAA - 3') (TURNER et al., 1999).

As sequências obtidas foram comparadas às sequências-tipo depositadas nos bancos de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nhi.gov/) e do e-EzTaxon (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/; KIM

et al., 2012) para sua identificação putativa. As sequências de 16S rDNA foram visualizadas no programa FinchTV (disponível em www.geospiza.com/finchtv) e montadas com auxilio da ferramenta BLAST. As sequências completas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW disponível no programa Mega 5.05, utilizando-se de parâmetros padrão (penalidade de “gap” = 15, extensão de “gap” = 6.6) (TAMURA et al., 2011). Ferramentas disponíveis no programa Mega 5.05 foram utilizadas para selecionar o modelo evolutivo mais adequado ao conjunto de dados presente no alinhamento. As relações filogenéticas entres os filotipos foram inferidas pelo modelo *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987) utilizando o modelo de *Kimura-2-parâmetros* (KIMURA, 1980). Para a formação de clados bem definidos, sequências do gene 16S rDNA de bactérias mais próximas aos morfotipos encontrados foram obtidas junto aos bancos de dados NCBI e e-EzTaxon e utilizadas para a confecção da árvore.

Os filotipos identificados receberam código de identificação correspondente às iniciais do nome do laboratório (Laboratório de Interações em Insetos – LII), acrescidas das iniciais da espécie do cupim (AE - *Armitermes euamignathus*; CG - *Coptotermes gestroi*) e de numeração sequencial.

3.3 Caracterização molecular de bactérias simbiontes não-cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*

3.3.1 Preparo de células quimicamente competentes

Para o preparo de células competentes, a cepa DH5α de *Escherichia coli* foi inoculada em 15 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm, “over-night”. Em seguida, foram inoculados 13,3 mL deste pré-inóculo em 226,7 mL de meio LB e mantidos a 37°C sob agitação até atingir densidade ótica (D.O) de 0,3-0,4 a 600 nm. A cultura foi transferida para tubos de 50 mL, incubada em gelo por 10 min e centrifugada a 900*g* por 12 min a 4°C. As células foram ressuspensas em 10 mL de 100 mM $MgCl_2$ gelado e novamente centrifugadas (900*g* x 12 min x 4°C). O pellet foi ressuspenso em 20 mL de 100 mM $CaCl_2$ gelado e incubado em gelo por 20 min, seguindo-se à nova centrifugação. O sedimento foi ressuspenso em 800 µL de 85 mM $CaCl_2$ preparado em 15% glicerol gelado. Em seguida, foram feitas alíquotas de 50 µL em tubos plásticos previamente resfriados e

as células foram mantidas a -80°C até sua utilização (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3.2 Amplificação, transformação e clonagem

O intestino de cinco operários e cinco soldados dos cupins *A. euamignathus* e *C. gestroi* foram extraídos sob condições assépticas e macerados com auxilio de pistilo em solução de homogeneização TEN (10 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA, pH 8; 40 mM NaCl) para extração de DNA genômico da bacteriofauna associada (SUNNUCKS; HALES, 1996). Por meio de reações de PCR, foi realizada a amplificação de fragmento da região 16S do rDNA utilizando o conjunto de iniciadores universais 8F e 1491R, em reação programada a 95°C por 4 min (1 ciclo), seguida por 35 ciclos 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Os amplicons gerados foram purificados e inseridos em vetor TOPO TA 2.1, utilizando o kit *TOPO TA Cloning for Sequencing* (Invitrogen®), seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos contendo os insertos das bactérias de interesse foram utilizados na transformação de células quimicamente competentes de *E. coli*, preparadas conforme descrito no item 3.3.1. As células foram cultivadas em meio SOC (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glicose) sob agitação constante (225 rpm x 1h x 37°C) e aliquotas foram plaqueadas em meio LB (1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura, 1g de NaCl e 1,6g de ágar, em 100 mL de água), contendo 100 mg/L ampicilina e 50 µL de X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranoside) a 20 mg/mL, preparado em dimetilformamida (Amresco®), para seleção dos transformantes, após cultivo a 37°C por 16h.

3.3.3 Caracterização molecular e filogenia

Para a extração do DNA plasmidial, os transformantes positivos foram selecionados e transferidos com o auxilio de palito de dente estéril para tubos plásticos de 1,5 mL contendo 50 µL de água Milli-Q estéril. As amostras foram então sujeitas a tratamento em bloco térmico a 100°C por 10 min. Em seguida, um volume equivalente de água Milli-Q estéril foi adicionado e as amostras foram agitadas em vortex.

Os insertos foram amplificados em reações de PCR com volume final de 25 µL. As reações foram conduzidas em solução contendo tampão de reação 1x, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 0,32 µM de cada um dos iniciadores universais M13F (5'GTAAAACGAACGGCCAG3') e M13R (5'CAGGAAACAGCTATGAC3'), 0,625 U da enzima GoTaq polimerase (Promega®) e 2 µL de DNA plasmidial. As amplificações foram conduzidas em reação programada a 95°C por 4 min (1 ciclo); 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min (35 ciclos); e 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram separados via eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2) a 5 V/cm, e posterior visualização em transiluminador.

Os amplicons produzidos foram submetidos à análise de RFLP utilizando-se três enzimas de restrição informativas, *Rsa*I, *Hinf*I e *Dde*I (Fermentas®), no tampão específico de cada enzima. As reações foram mantidas em banho-maria à temperatura de 37°C por 24 h e o padrão de restrição obtido visualizado em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os padrões de RFLP produzidos foram analisados e pelo menos três plasmídeos contendo insertos correspondentes a cada padrão de RFLP produzido foram selecionados e encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo (CEGH/USP), para sequenciamento bidirecional utilizando os iniciadores universais M13F e M13R. Das quatro bibliotecas de 16S produzidas, duas para cada espécie de cupins, uma para cada casta, foram selecionados 150 clones transformantes para análise por RFLP e sequenciamento.

As sequências obtidas foram comparadas às sequências-tipo depositadas nos bancos de dados NCBI e do e-EzTaxon para sua identificação putativa. As sequências de 16S rDNA foram visualizadas no programa FinchTV e montadas com auxílio da ferramenta BLAST. Para o alinhamento das sequências foi utilizada a ferramenta ClustalW disponível no programa Mega 5.05, utilizando-se de parâmetros padrão (penalidade de "gap" = 15, extensão de "gap" = 6.6) (TAMURA et al., 2011). Ferramentas disponíveis no programa Mega 5.05 foram utilizadas para selecionar o modelo evolutivo mais adequado ao conjunto de dados presente no alinhamento. As relações filogenéticas foram inferidas por analise *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), utilizando o modelo de *Kimura-2-parâmetros* (KIMURA, 1980).

3.4 Seleção e caracterização molecular de bactérias simbiontes cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi* em meios seletivos com celulose, xilana ou pectina

Para verificar a presença de simbiontes capazes de degradar celulose, xilana ou pectina, operários e soldados de *A. euamignathus* e *C. gestroi* tiveram o trato digestivo extraído sob condições assépticas e inoculado em frasco de erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio mínimo de sais (M9) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), adicionado de carboximetilcelulose (CMC) (1 g/L), xilana (1 g/L) ou pectina (1 g/L), como fontes únicas de carbono. Em cada frasco, foi inoculado um intestino equivalente previamente macerado, sendo realizadas cinco repetições. Os frascos foram mantidos sob agitação constante (225 rpm) por até 10 dias a 28°C. Alíquotas do meio de cultivo foram retiradas no quinto, sétimo e décimo dias e plaqueadas (50 µL/placa) em meio mínimo M9 com as diferentes fontes de carbono avaliadas (CMC, xilana ou pectina), adicionado de 16 g de ágar.L^{-1}.

As colônias morfotipadas, assim como descrito anteriormente, foram selecionadas para crescimento (16 h a 28°C) em meio M9 liquido contendo um dos três substratos originalmente utilizados no processo de seleção (CMC, xilana ou pectina). As células foram sedimentadas via centrifugação (3.500*g* x 5 min x 10°C) e utilizadas para extração de DNA genômico para a amplificação de fragmento da região 16S do rDNA, assim como descrito no item 3.2.2. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose contendo brometo de etídio, purificados e submetidos à análise de RFLP utilizando as enzimas de restrição *Rsa*I, *Dde*I e *Hinf*I (Fermentas®), nas mesmas condições citadas anteriormente no subitem 3.2.2. Morfotipos que apresentaram padrões de restrição diferentes foram encaminhados para sequenciamento junto ao CEGH/USP.

As sequências obtidas foram comparadas às sequências-tipo depositadas nos bancos de dados NCBI e do e-EzTaxon para sua identificação putativa. Os programas FinchTV e BLAST foram utilizados para edição e montagem completa das sequências. O alinhamento das sequências foi feito com o auxilio da ferramenta ClustalW disponível no programa Mega 5.05, utilizando-se de parâmetros padrão (penalidade de “gap” = 15, extensão de “gap” = 6.6) (TAMURA et al., 2011). Para a seleção do modelo evolutivo mais adequado ao conjunto de dados presente no alinhamento, foram utilizadas ferramentas disponíveis no programa Mega 5.05. A

árvore filogenética foi construída pelo método de *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), utilizando o modelo evolutivo *Kimura-2-parâmetros* (KIMURA, 1980).

Todos os isolados receberam identificação correspondente às iniciais do nome do laboratório (Laboratório de Interações em Insetos – LII) acrescidas das iniciais da espécie do cupim [*Armitermes euamignathus* (AE) ou *Coptotermes gestroi* (CG)] e uma letra correspondente à fonte de carbono (C - celulose, X – xilana, P - pectina) adicionada ao meio mínimo (M9) em que foram isoladas, além de numeração sequencial.

3.5 Verificação do potencial de hidrólise dos produtos de secreção de simbiontes selecionados

A capacidade dos isolados obtidos em secretar enzimas com potencial de hidrólise de celulose, xilana e pectina foi verificada via seu cultivo em meio M9 enriquecido com carboximetilcelulose (1g/L) ou xilana (1g/L) ou pectina (1g/L).

As enzimas secretadas no meio foram coletadas em intervalos definidos. As alíquotas coletadas foram submetidas à centrifugação (10.000g x 10 min x 4°C) para a sedimentação de células bacterianas e o sobrenadante (extrato enzimático) foi coletado e utilizado para ensaios específicos de atividade enzimática.

Para determinar a atividade de celulase, o extrato enzimático foi incubado a 30°C com o substrato carboximetilcelulose (CMC) em concentração final de 1%. Em intervalos de 30 min, 200 µL do reagente DNS foram adicionados às amostras para a quantificação dos grupos redutores formados (NOELTING; BERNFELD, 1948) após fervura (5 min) e adição de 1.600 µL de água e centrifugação (10.000g x 25°C x 10 min). As amostras foram então lidas em espectofotômetro em comprimento de onda de 550 nm.

A atividade de exo-β-1,4 glicanase foi investigada por meio da detecção de *p*-nitrofenol a partir da hidrólise dos substratos *p*-nitrofenil-β-D-celobiosídeo e *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo, utilizando-se 2 mL de 2M Na_2CO_3 para interromper a reação. A reação de hidrólise foi obtida incubando-se 100 µL do extrato enzimático com 50 µL do substrato (10 mM) em tampão 200 mM citrato-fostato de sódio (pH 5). A reação foi interrompida em intervalos de 10 min e, após a interrupção, a formação de *p*-nitrofenol foi monitorada via espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm (INOUE et al., 2005).

As atividades de xilanase e pectinase também foram determinadas utilizando-se o reagente DNS, assim como descrito anteriormente, mas utilizando-se xilana e pectina como substratos no meio de cultivo, respectivamente. Xilose foi utilizada como referência para determinação da atividade de xilanase do extrato obtido.

A concentração de proteínas totais do extrato enzimático foi detectada segundo o método de BRADFORD (1976), utilizando a formulação comercial do reagente Coomassie Blue G-250 (Pierce®), seguindo as recomendações do fabricante. A curva padrão foi determinada utilizando-se a albumina de soro bovino como referência.

Para a definição dos pHs ótimos, os extratos enzimáticos foram incubados com seus respectivos substratos em uma ampla faixa de pH definida pelos tampões acido cítrico-Na_2HPO_4 (4,0 – 7,0), Na_2HPO_4-Na_2HPO_4 (7,0 – 8,0), Tris (hidroximetil) aminometana-HCl (8,0 – 9,0), glicina-NaOH (9,0 – 10,5) e fosfato-NaOH (10,5 – 12,0), em concentração final de 50 mM (DAWSON et al., 1989). Este mesmo processo foi utilizado para a determinação das temperaturas ótimas para os extratos enzimáticos; porém, em uma faixa de 30°C a 60°C, nas condições de pH ótimo previamente determinado.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e caracterização molecular de bactérias simbiontes cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*

O cultivo da microbiota associado ao intestino de operários e soldados de *A. euamignathus* e *C. gestroi,* nos diversos meios de cultura testados, permitiu a detecção de microbiota morfologicamente diversificada (Figura 2).

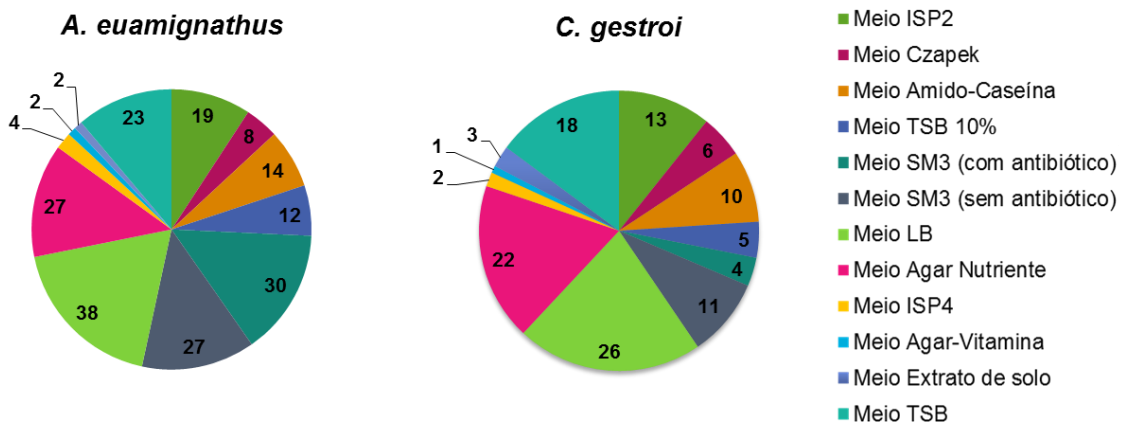

Figura 2 – Diversidade de morfortipos de bactérias isoladas do trato digestivo de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* nos diferentes meios de cultura testados

A análise morfológica das bactérias isoladas levou à seleção de morfotipos para o cupim *A. euamignathus* (206) e para *C. gestroi* (121). O meio de cultura LB foi o que apresentou o maior número de morfotipos para ambas as espécies. Porém, após análise molecular por PCR-RFLP e sequenciamento de fragmento do 16S rDNA, foi possível verificar que essa diversidade morfotípica representava diversidade filotípica muito menor.

Os filotipos identificados em *A. euamignathus* e *C. gestroi* agruparam-se em quatro diferentes filos, sendo cada um representado por até três famílias: Proteobacteria (Moraxellaceae, Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae), Firmicutes (Streptococcaceae, Bacillaceae e Staphylococcaceae), Bacteroidetes (Flavobacteriaceae e Porphyromonadaceae) e Actinobacteria (Micrococcaceae e Intrasporangiaceae), sendo Proteobacteria o filo predominante (Figura 3).

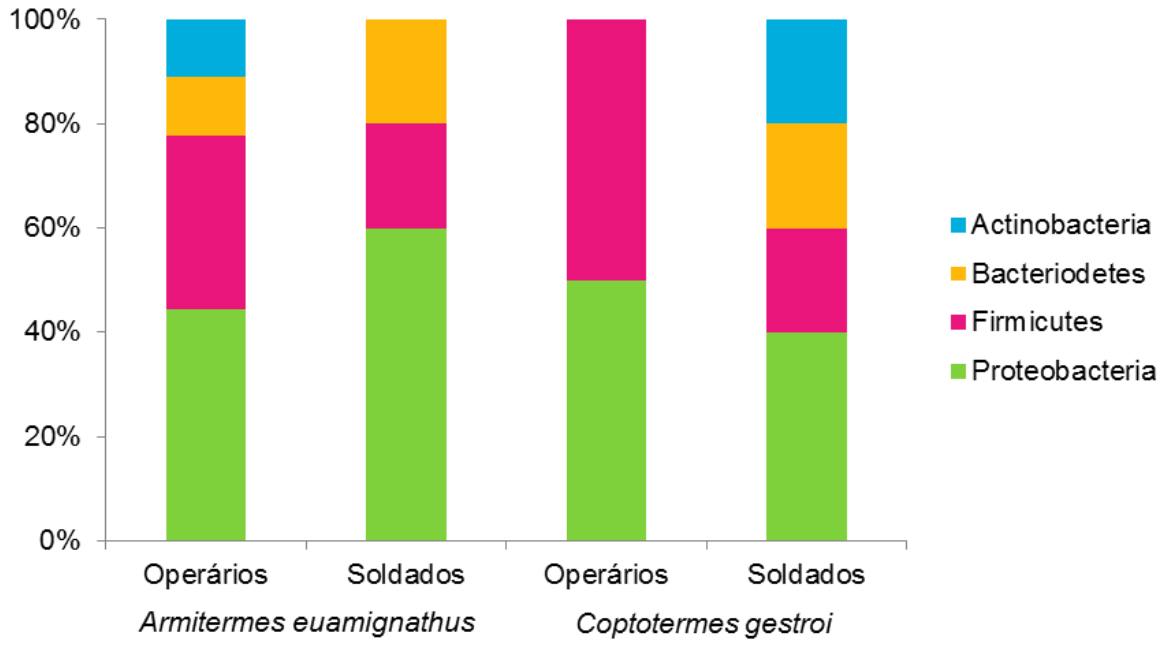

Figura 3 – Abundância relativa dos filotipos isolados do trato digestivo *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* ao nível de Filo, após análise de sequência do 16S do rDNA

Foi encontrada maior diversidade de bactérias cultiváveis no trato digestivo de operários (15 filotipos) do que em soldados (10 filotipos) para ambas as espécies em estudo. Os filotipos *Serratia nematodiphila, Serratia marcescens subsp. sakuensis* e *Chryseobacterium viscerum* ocorreram tanto na casta dos operários quanto na casta dos soldados do cupim superior *A. euamignathus*. No cupim inferior, *C. gestroi*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Citrobacter farmeri* foram os únicos filotipos a ocorrer em ambas as castas (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes associados ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* após análise de 1400 pb de sequências do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon

Filotipo	**Casta**	**Correspondente mais próximo**	**N° de acesso**	**Identidade (%)**
LII_AE 01	Operário	*Serratia nematodiphila*	EU036987	99.57
LII_AE 20	Soldado			99.59
LII_AE 09	Operário	*Serratia marcescens subsp. sakuensis*	AE061685	99.17
LII_AE 11	Soldado			99.57
LII_AE 10	Operário	*Pseudomonas plecoglossicida*	AB009457	99.65
LII_AE 13	Operário	*Staphylococcus haemolyticus*	L37600	100.00
LII_AE 16	Soldado	*Chryseobacterium viscerum*	FR871426	99.10
LII_AE 34	Operário			99.02
LII_AE 19	Operário	*Pseudomonas aeruginosa*	Z76651	98.70
LII_AE 22	Soldado	*Acinetobacter junii*	AM410704	98.71
LII_AE 23	Soldado	*Staphylococcus succinus subsp. succinus*	AF004220	99.93
LII_AE 33	Operário	*Arthrobacter mysorens*	AJ639831	98.87
LII_AE 57	Operário	*Bacillus simplex*	AB363738	99.93
LII_AE 66	Operário	*Lactococcus garvieae*	AP009332	100.00
LII_CG 01	Operário	*Staphylococcus gallinarum*	D83366	99.86
LII_CG 02	Operário	*Lactococcus lactis subsp. lactis*	AB100803	99,86
LII_CG 26	Soldado			99,93
LII_CG 16	Operário	*Cronobacter condimenti*	CAKW01000111	95.53
LII_CG 18	Soldado	*Dysgonomonas gadei*	GL891979	98.21
LII_CG 19	Operário	*Citrobacter youngae*	AJ564736	97.88
LII_CG 21	Operário	*Citrobacter farmeri*	AF025371	99.71
LII_CG 30	Soldado			99.58
LII_CG 22	Soldado	*Knoellia flava*	HQ401007	98.85
LII_CG 28	Operário	*Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus*	AB233326	99.93
LII_CG 32	Soldado	*Trabulsiela odontotermitis*	DQ453129	99,34

A análise filogenética para os filotipos isolados do trato digestivo de operários e soldados de *A. eumignathus* resultou no posicionamento dos mesmos em clados bem definidos. Filotipos com identificação putativa semelhantes (LII_AE01 e

LII_AE20 - *Serratia nematodiphila*; LII_AE09 e LII_AE11 - *Serratia marcescens subsp. sakuensis*; LII_AE16 e LII_AE34 - *Chryseobacterium viscerum*), isolados de operários e soldados, resolveram conjuntamente em seus clados. No entanto, pequena diferença foi observada entre os filotipos LII_AE-09 e LII_AE-11, ambos putativamente identificados como *Serratia marcescens subsp. sakuensis*. Nesse caso, esses filotipos ficaram mais próximos a *Serratia marcescens subsp. marcescens* do que à linhagem tipo mais próxima, mas com baixo valor de boostrap para o ramo (Figura 4).

O filotipo LII_AE-22, associado a soldados de *A. euamignathus*, se agrupou com *Acinetobacter parvus* em um ramo bem definido dentro do clado representado por diferentes espécies de *Acinetobacter*, ao invés de se posicionar ao lado da espécie tipo com maior similaridade, *Acinetobacter junii*. Nesse caso, fica evidente que o posicionamento filogenético desse filotipo, associado ao valor de similaridade obtido (98,7%), muito próximo ao limite de 98,5% estabelecido para a identificação putativa, indica que o mesmo deva se tratar de unidade taxonômica que necessita de abordagem analítica adicional para o seu correto posicionamento (Figura 4, Tabela 1). LII_AE10 foi outro filotipo que não se agrupou com a espécie-tipo de maior similaridade. Esse filotipo apresentou 99.6% de similaridade a *Pseudomonas plecoglossicida*, mas acabou resolvendo em um ramo único, mais externo ao clado formado por *Pseudomonas monteilli, P. taiwanensis e P. plecoglossicida* e, à semelhança dp LII_AE-22, necessita de análise taxonômica mais específica para sua correta identificação (Figura 4).

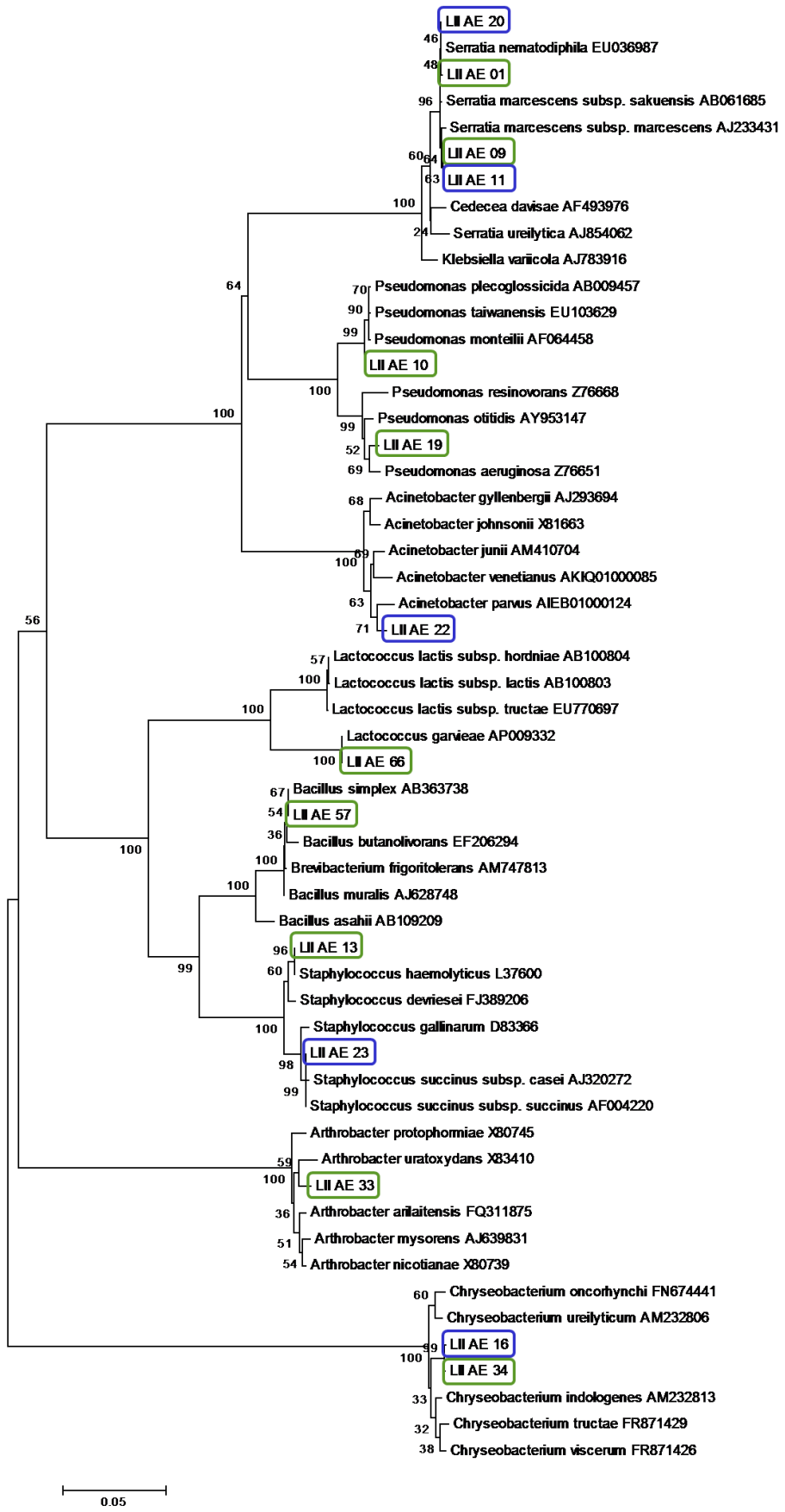

Figura 4 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Armitermes euamignathus*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo

No trato digestivo de soldados e operários de *C. gestroi* foi encontrada microbiota cultivável menos diversa daquela apresentada por *A. euamignathus.* Comparações das sequências do 16S do rDNA obtidas com aquelas depositadas no banco de dados e-EzTaxon mostram que a maioria dos filotipos apresentaram similaridade superior a 98.2% a sequências-tipos mais próximas, com exceção dos morfotipos LII_CG16 e LII_CG19, que apresentaram 95,53% e 97,88% de identidade, respectivamente. A baixa identidade desses filotipos em relação às sequências-tipos mais próximas (*Cronobacter condimenti* e Citrobacter youngae) indica que esses dois filotipos (LII_CG16 e LII_CG19) sejam entidades taxonômicas desconhecidas. Essa indicação é facilmente visualizada na análise filogenética realizada, visto que ambos filotipos formaram ramos próprios, com alta sustentação, dado os valores de bootstrap obtidos (Figura 5). À semelhança do que foi observado para os filotipos comuns a operários e soldados de *A. euamignathus,* filotipos de *C. gestroi* com identificação putativa semelhante (LII_CG2 e LII_CG26 – *Lactococcus lactis subsp. lactis;* LII_CG21 e LII_CG30 – *Citrobacter farmeri*) agruparam juntos em ramos bem definidos (Figura 5, Tabela 1).

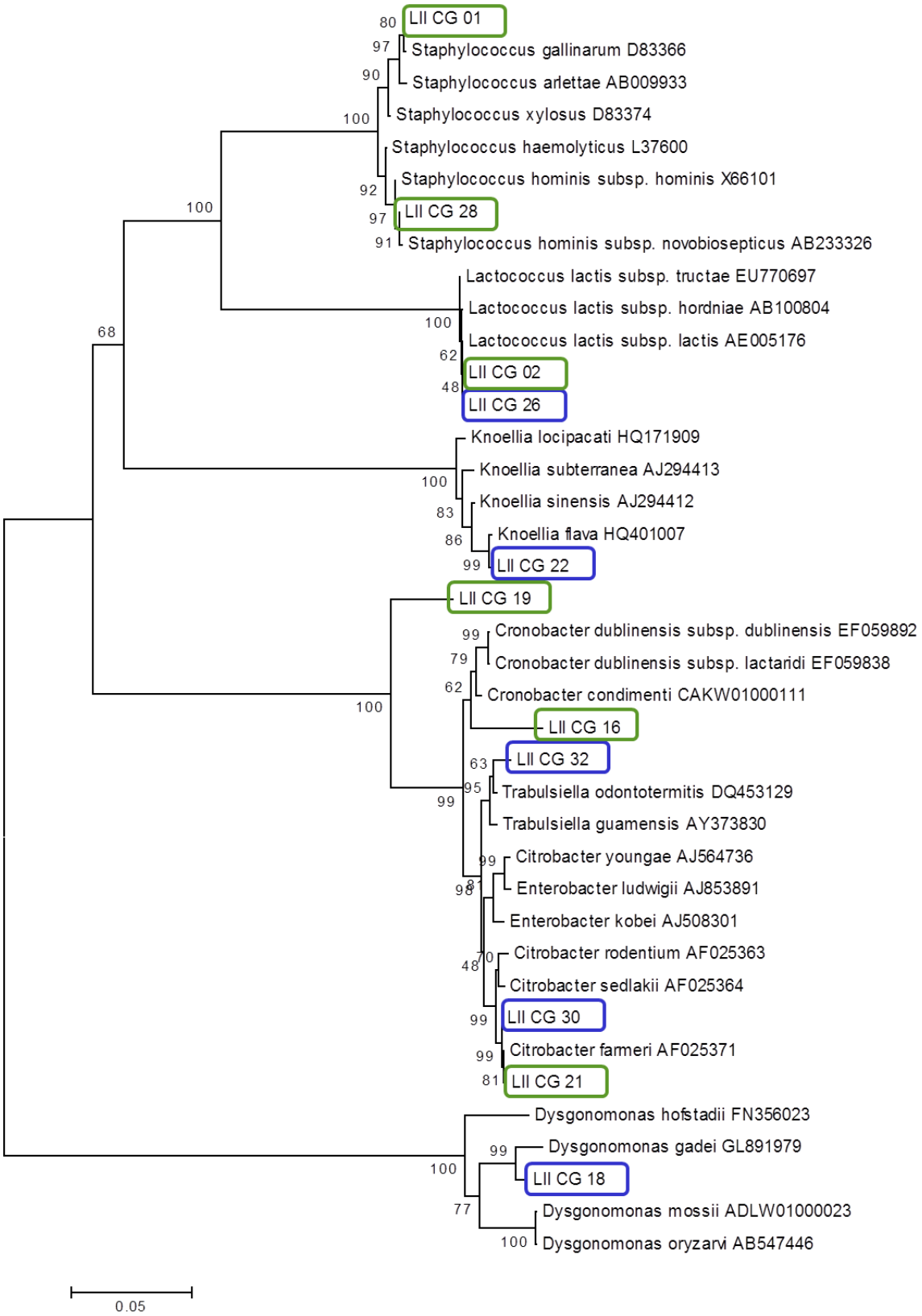

Figura 5 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Coptotermes gestroi*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo

4.2 Isolamento e caracterização molecular de bactérias simbiontes não-cultiváveis associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi*

A caracterização da microbiota não-cultivável associada às diferentes castas (soldados e operários) das espécies de cupins aqui analisadas levou à identificação de 17 filotipos em operários e 3 em soldados de *A. euamignathus*, enquanto em *C. gestroi* foi possível identificar 6 filotipos em operários e 8 em soldados (Tabela 2).

O filo Firmicutes foi o mais abundante em *A. euamignathus* com representantes distribuídos em sete famílias (Ruminococcaceae, Peptococcaceae, Clostridiaceae, Caldicoprobacteraceae, Lachnospiraceae, Paenibacilaceae, Christensenellaceae). O Filo Proteobacteria se encontra representado por duas famílias Desulfovibrionaceae e Enterobacteriaceae e por uma bactéria do gênero Thiobacter cuja classificação da família ainda é incerta. No Filo Bacterioidetes encontramos representantes das famílias Porphyromonadaceae e Porphyromonadaceae (Figura 6).

Em *C. gestroi*, Proteobacteria foi o filo com maior número de filotipos representados e distribuídos em duas famílias Enterobacteiaceae e Pseudomonadaceae. Em Firmicutes, os filotipos estão distribuídos em três famílias, Ruminococcaceae, Veillonellaceae e Streptococcaceae, enquanto Bacterioidetes foi representado apenas por Porphyromonadaceae. Nesta espécie de cupim, foi encontrado ainda um filotipo pertencente a Spirochaetes, família Spirochaetaceae (Figura 6).

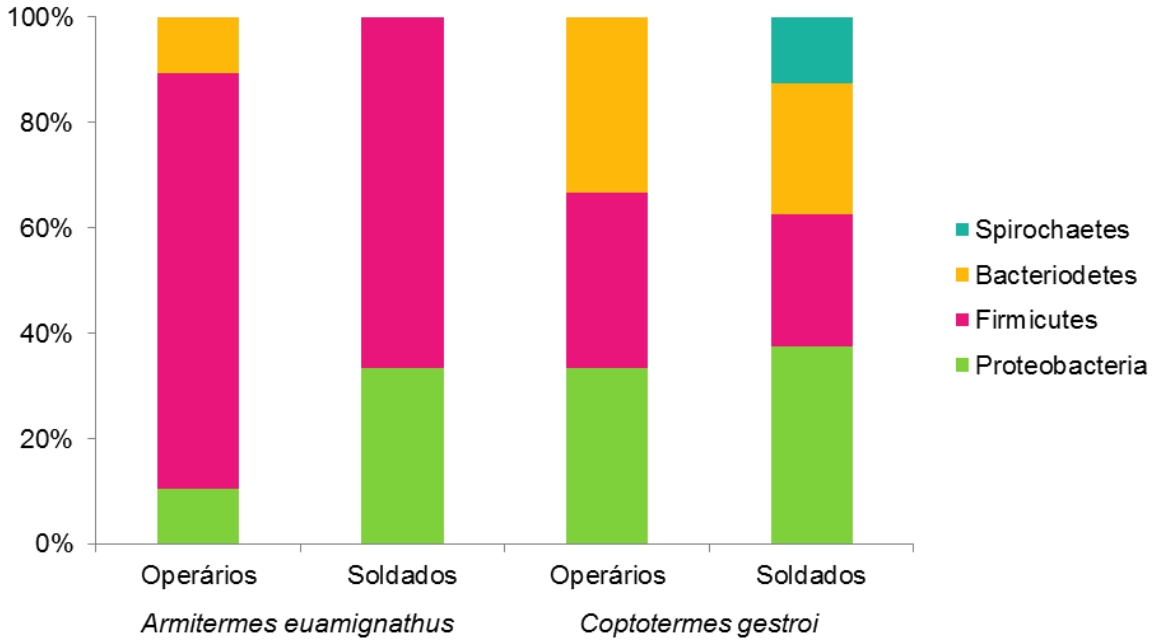

Figura 6 – Abundância relativa dos filotipos isolados do trato digestivo *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* ao nível de Família, após análise de sequência do 16S do rDNA

Foi encontrada maior diversidade de bactérias não-cultiváveis no trato digestivo de operários (17) do que em soldados (3) de *A. euamignathus*. No caso de *C. gestroi* a casta dos soldados foi a que apresentou maior diversidade. Os filotipos *Clostridium neopropionicum* e *Sporobacter termitidis* ocorreram tanto na casta dos operários quanto na dos soldados de *A. euamignathus*. No cupim inferior *C. gestroi*, *Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae genomovar* e *Citrobacter farmeri* foram os únicos filotipos a ocorrer em ambas as castas (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes não-cultiváveis associadas ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, após análise de fragmento de 1.400 pb do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon

(continua)

Filotipo	Casta	Correspondente mais próximo	N° de acesso	Identidade (%)
LII_AE_OP1	Operário	*Papillibacter cinnamivorans*	AF167711	89.34
LII_AE_OP2	Operário	*Clostridium aldrichii*	X71846	85.48
LII_AE_OP3	Operário	*Desulfosporosinus acidiphilus*	AGJG01000012	87.79
LII_AE_OP4	Operário	*Sporobacter termitidis*	Z49863	89.25
LII_AE_OP5	Operário	*Clostridium neopropionicum*	X76746	86.04
LII_AE_OP9	Operário	*Acetomicrobium faecale*	FR749980	84.98
LII_AE_OP10	Operário	*Thiobacter subterraneus*	AB180657	92.89
LII_AE_OP12	Operário	*Candidatus Symbiothrix dinenymphae*	AB088917	89.00
LII_AE_OP13	Operário	*Paludibacter propionicigenes*	CP002345	89.20
LII_AE_OP14	Operário	*Clostridium colinum*	X76748	88.46
LII_AE_OP15	Operário	*Natranaerovirga pectinivora*	GQ922846	85.45
LII_AE_OP16	Operário	*Oscillibacter valericigenes*	AP012044	87.01
LII_AE_OP17	Operário	*Anaerotruncus colihominis*	ABGD02000032	89.74
LII_AE_OP18	Operário	*Clostridium cellobioparum*	X71856	88.51
LII_AE_OP20	Operário	*Desulfovibrio oxamicus*	DQ122124	80.00
LII_AE_OP21	Operário	*Paenibacillus sonchi*	DQ358736	84.57
LII_AE_OP24	Operário	*Christensenella minuta*	AB490809	84.12
LII_AE_S6	Soldado	*Sporobacter termitidis*	Z49863	91.73
LII_AE_S7	Soldado	*Cedecea neteri*	AB086230	99.50
LII_AE_S14	Soldado	*Clostridium neopropionicum*	X76746	94.51
LII_CG_OP4	Operário	*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae genomovar*	AP010656	95.87
LII_CG_OP7	Operário	*Lactococcus piscium*	DQ343754	94.89
LII_CG_OP13	Operário	*Dysgonomonas mossii*	ADLW01000023	85.52
LII_CG_OP23	Operário	*Trabulsiella odontotermitis*	DQ453129	98.93
LII_CG_OP27	Operário	*Dendrosporobacter quercicolus*	AJ010962	88.08
LII_CG_OP35	Operário	*Citrobacter farmeri*	AF025371	99.39

Tabela 3 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes não-cultiváveis associadas ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, após análise de fragmento de 1.400 pb do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon.

(conclusão)

Filotipos	**Casta**	**Correspondente mais próximo**	**N° de acesso**	**Identidade (%)**
LII_CG_S1	Soldado	*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae genomovar*	AP010656	95.67
LII_CG_S2	Soldado	*Azomonas insignis*	AB175658	89.64
LII_CG_S11	Soldado	*Clostridium straminisolvens*	AB125279	82.18
LII_CG_S42	Soldado	*Pseudomonas jessenii*	AF068259	89.51
LII_CG_S44	Soldado	*Spirochaeta caldaria*	CP002868	85.80
LII_CG_S60	Soldado	*Citrobacter farmeri*	AF025371	99.33
LII_CG_S62	Soldado	*Eubacterium siraeum*	ABCA03000019	89.89
LII_CG_S63	Soldado	*Dysgonomonas gadei*	GL891979	95.76

A maioria dos filotipos identificados apresenta similaridade muito baixa com as linhagens-tipo depositadas no banco de dados, demostrando que as mesmas se referem a entidades taxonômicas desconhecidas, ao nível de espécie, gênero e família. Esse fato fica muito claro quando da análise das árvores filogenéticas produzidas, visto que os filotipos obtidos dos cupins em estudo formam ramos isolados com alto valor de *bootstrap* (Figuras 7 e 8).

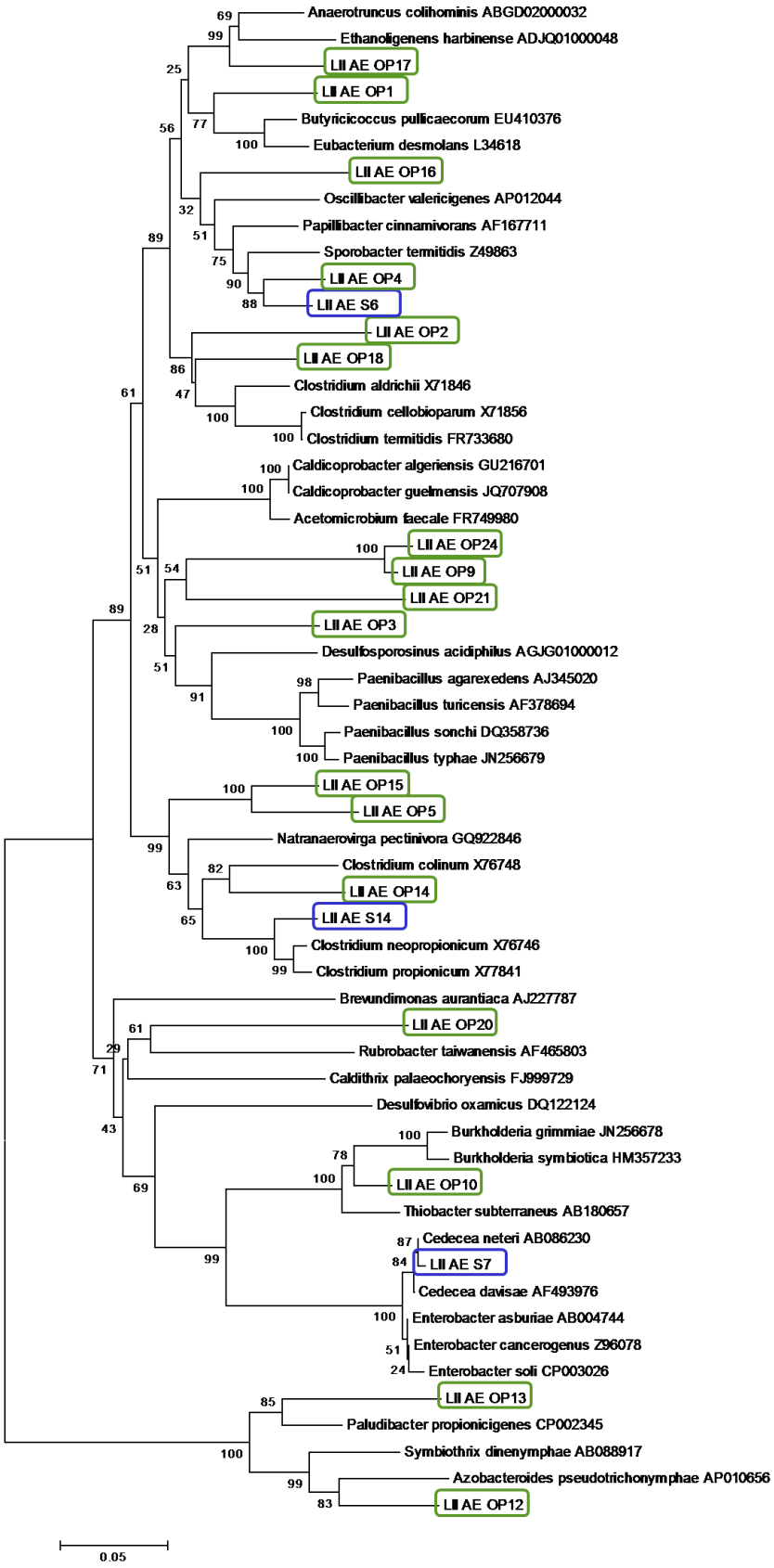

Figura 7 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Armitermes euamignathus*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo

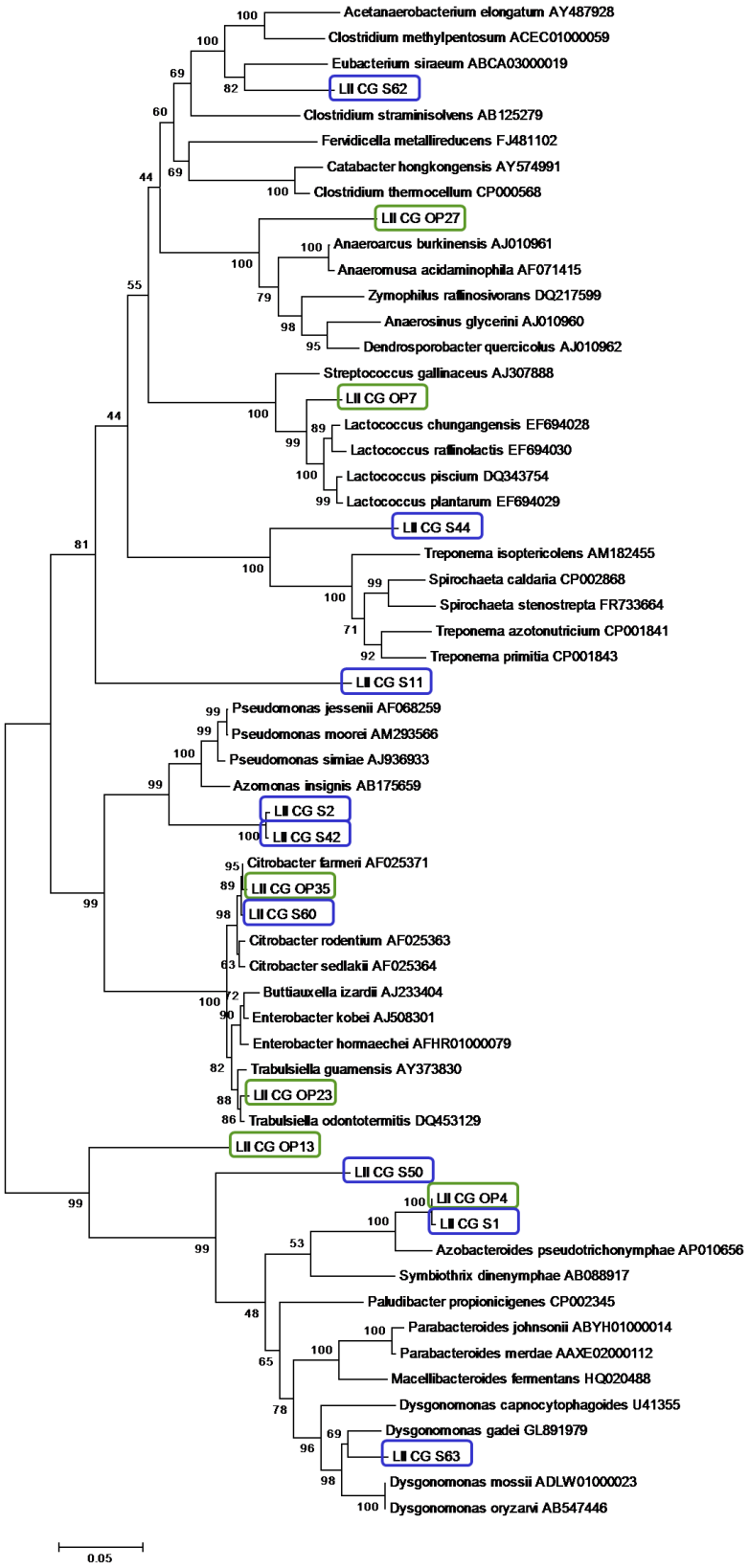

Figura 8 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Coptotermes gestroi*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,05 substituição por posição de nucleotídeo

4.3 Seleção e caracterização molecular de bactérias associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi* em meios seletivos com celulose, xilana ou pectina

O isolamento de bactérias pelo cultivo em meio M9 enriquecido com CMC, xilana ou pectina levou à seleção de microbiota pouco diversificada, tanto para *A. euamignathus* (oito morfotipos), quanto para *C. gestroi* (cinco morfotipos) (Figura 9).

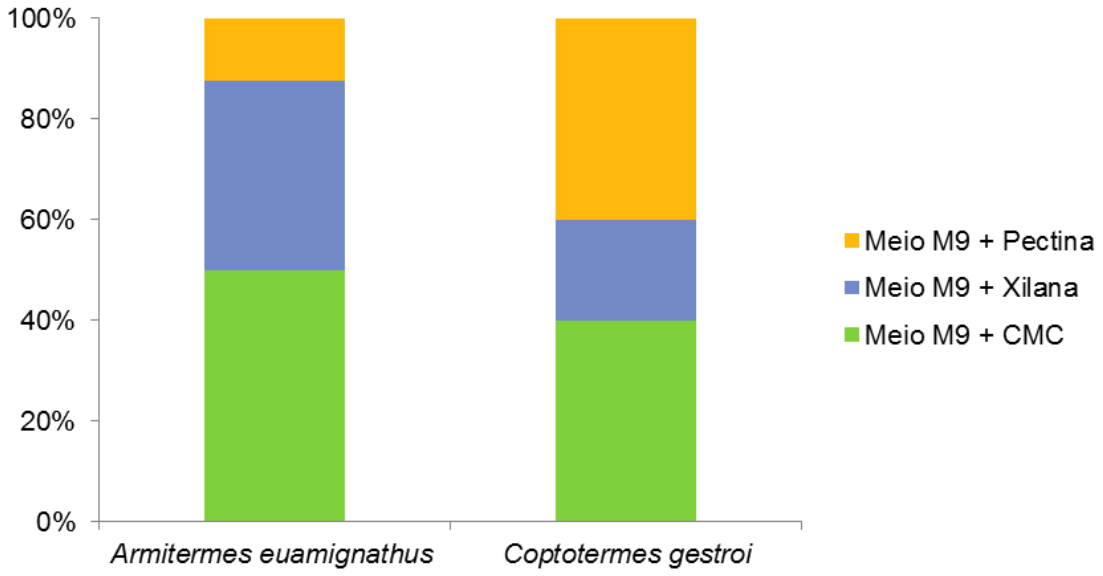

Figura 9 – Frequência relativa dos morfortipos isolados em meio seletivo (M9) acrescido de CMC, xilana ou pectina para *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi.*

A análise molecular dos diferentes morfotipos de bactérias associadas ao intestino de *A. euamignathus* e *C. gestroi*, selecionados em meios de cultivo seletivos, permitiu a identificação de bactérias pertencentes a Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria. Proteobacteria foi representado por Xanthomonadaceae e Burkholderiaceae. Em Firmicutes foram encontrados representantes de Bacillaceae e Paenibacillaceae e em Actinobacteria de Micrococcaceae e de Microbacteriaceae (Figura 10).

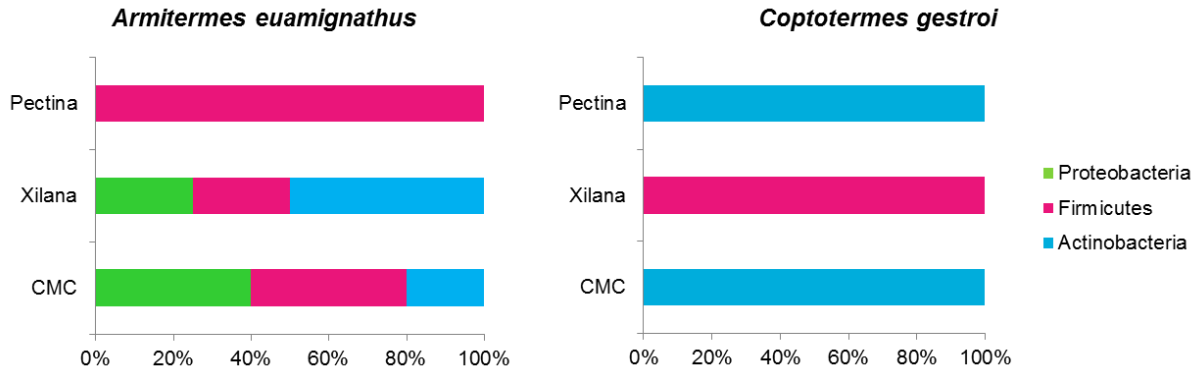

Figura 10 – Frequência relativa de sequencias do gene do gene 16S rDNA dos morfotipos isolados do trato digestivo *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* distribuídas nos diferente filos, para os diferentes meio de cultivo

A análise comparativa das sequências do 16S do rDNA obtidas com as linhagens-tipo depositadas no banco de dados e-EzTaxon permitiram a identificação dos morfotipos isolados para as duas espécies de cupins estudadas, sendo a identidade apresentada superior a 98.1% (Tabela 3).

Tabela 4 – Identificação putativa de bactérias endossimbiontes associados ao intestino de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* após análise de 1400 pb de sequências do gene do 16S do rDNA. Identidade dada por comparação com sequências depositadas no banco de dados e-EzTaxon

Filotipo	**Meio de Cultivo**	**Castas**	**Linhagem mais próxima**	**N° de acesso**	**Identidade (%)**
LII_AE C1	CMC	Operário	*Bacillus megaterium*	D16273	99.79
LII_AE C5	CMC	Soldado			99.81
LII_AE C2	CMC	Soldado	*Microbacterium azadirachtae*	EU912487	99.93
LII_AE C3	CMC	Operário	*Luteimonas aestuarii*	EF660758	98.14
LII_AE C4	CMC	Soldado	*Stenotrophomonas panacihumi*	GQ856217	99.30
LII_CG C1	CMC	Soldado	*Arthrobacter nicotinovorans*	X80743	99.84
LII_AE X1	Xilana	Operário			99.85
LII_AE X4	Xilana	Soldado			99.89
LII_CG P1	Pectina	Operário			99.78
LII_AE X2	Xilana	Operário	*Bacillus aryabhattai*	EF114313	99.70
LII_AE X3	Xilana	Operário	*Cupriavidus pampae*	FN430567	99.21
LII_CG X1	Xilana	Operário	*Paenibacillus pabuli*	AB073191	99.86
LII_AE P1	Pectina	Operário	*Paenibacillus illinoisensis*	D85397	99.72

Apesar dos altos valores de similaridade das sequências do 16S rDNA dos filotipos isolados àqueles das sequências-tipo mais próximas, muitos dos filotipos resolveram em ramos com valores de bootstrap que sustentam a sua diferenciação taxonômica em relação àquelas entidades taxonômicas representadas pelas sequências-tipo, como, por exemplo, LII_AEP1 e LII_AEX3, entre outros (Figura 11). Além disso, foi possível verficar a proximidade quanto ao posicionamento sistemático dos filotipos LII_AEC1 e LII_AEX2 (Figura 11). Essa análise ainda permitiu identificar que os isolados próximos ao filotipo *Arthrobacter nicotinovorans*, isolado nos três meios de cultivo seletivo utilizado, e encontrado nas duas espécies de cupins em estudo, formou um clado separado (Figura 11).

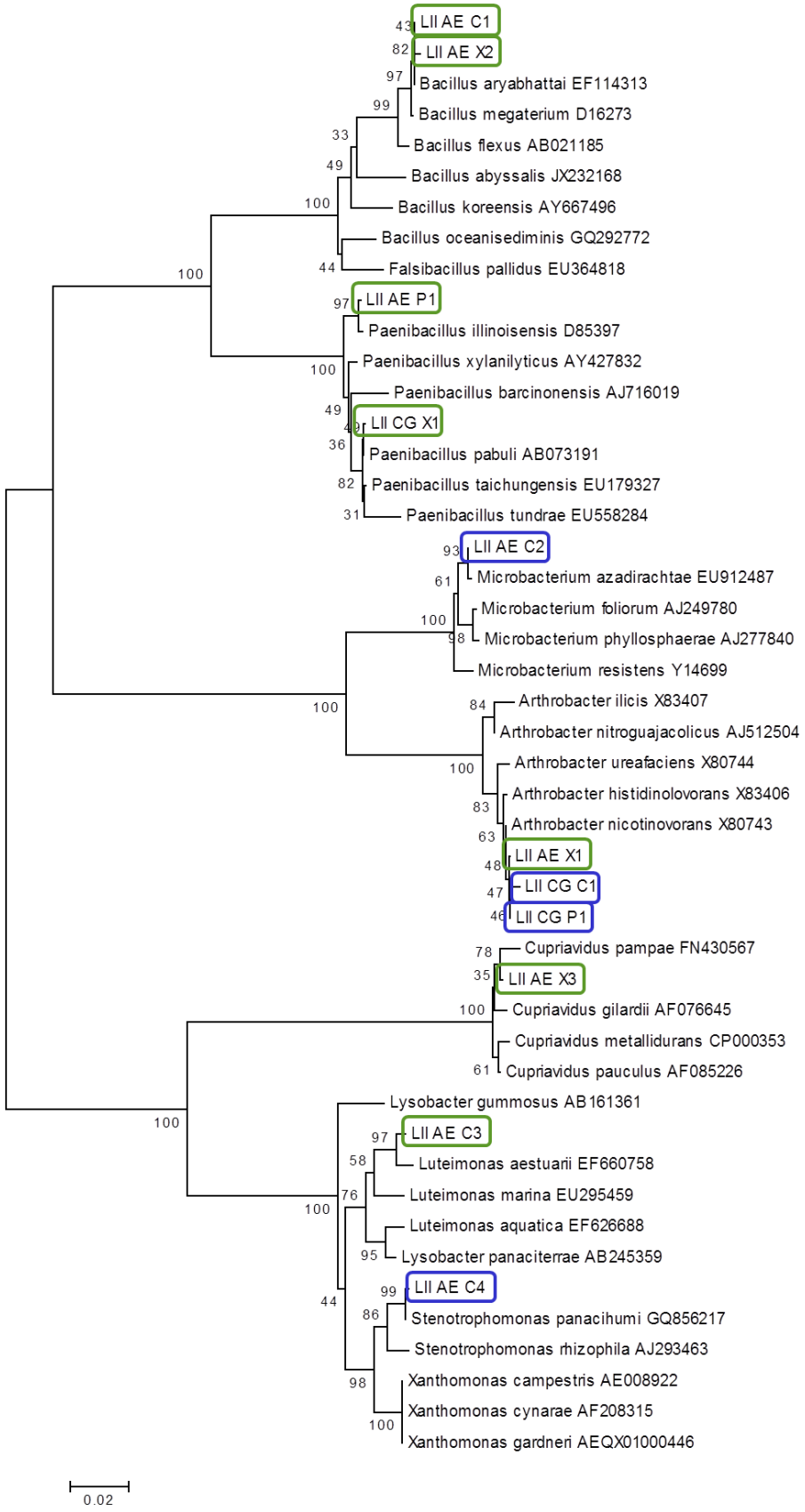

Figura 11 – Relações filogenéticas de bactérias associadas ao trato digestivo de soldados (circundados em azul) e operários (circundados em verde) de *Coptotermes gestroi*, inferida sobre o critério de *neighbor-joining* a partir de informações da sequência do gene 16S rDNA. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Clustal W e a árvore construída por meio do programa MEGA 5.0.5 Os valores associados aos diferentes ramos se refere aos valores de *bootstrap*. A barra de escala indica 0,02 substituição por posição de nucleotídeo

4.4 Determinação da capacidade de crescimento de bactérias associadas ao trato digestivo de *A. euamignathus* e *C. gestroi* isoladas em meios enriquecidos com celulose, xilana ou pectina

As bactérias associadas ao trato digestivo de operários e soldados de *A. euamignathus* e *C. gestroi* isoladas em meio seletivo com CMC, xilana ou pectina foram avaliadas quanto a capacidade de crescimento em meio mínimo (M9) enriquecido com um dos três substratos, originalmente utilizados no processo de seleção, com o propósito de verificar o isolado mais ativo de cada substrato.

Entre as bactérias isoladas em M9+CMC, os filotipos *Luteimonas aestuarii* e *Stenotrophomonas panacihumi* foram os que apresentaram maior capacidade de crescimento, atingindo densidade celular de 10^8 UFC/mL após seis e sete dias de cultivo, respectivamente, enquanto *Bacillus megaterium* e *Microbacterium azadirachtae* necessitaram de nove dias de cultivo para alcançar a mesma densidade celular (Figura 12A).

Arthrobacter nicotinovorans foi a bactéria que apresentou crescimento mais rápido quando utilizando xilana como única fonte de carbono, atingido 10^8 UFC/mL no sétimo dia de cultivo (Figura 12B). As demais bactérias isoladas em meio enriquecido com xilana apresentaram capacidade de crescimento similar, sendo que todas atingiram 10^7 UFC/mL; porém, *Paenibacillus pabuli* atingiu essa densidade em um período de tempo menor que as demais bactérias (Figura 12B). Das bactérias isoladas em meio enriquecido com pectina, *A. nicotinovorans* foi a que apresentou o maior crescimento no menor espaço de tempo, atingindo 10^7 UFC/mL logo no segundo dia de cultivo, enquanto *Paenibacillus illinoisensis* demorou cerca de seis dias para atingir a mesma densidade (Figura 12C).

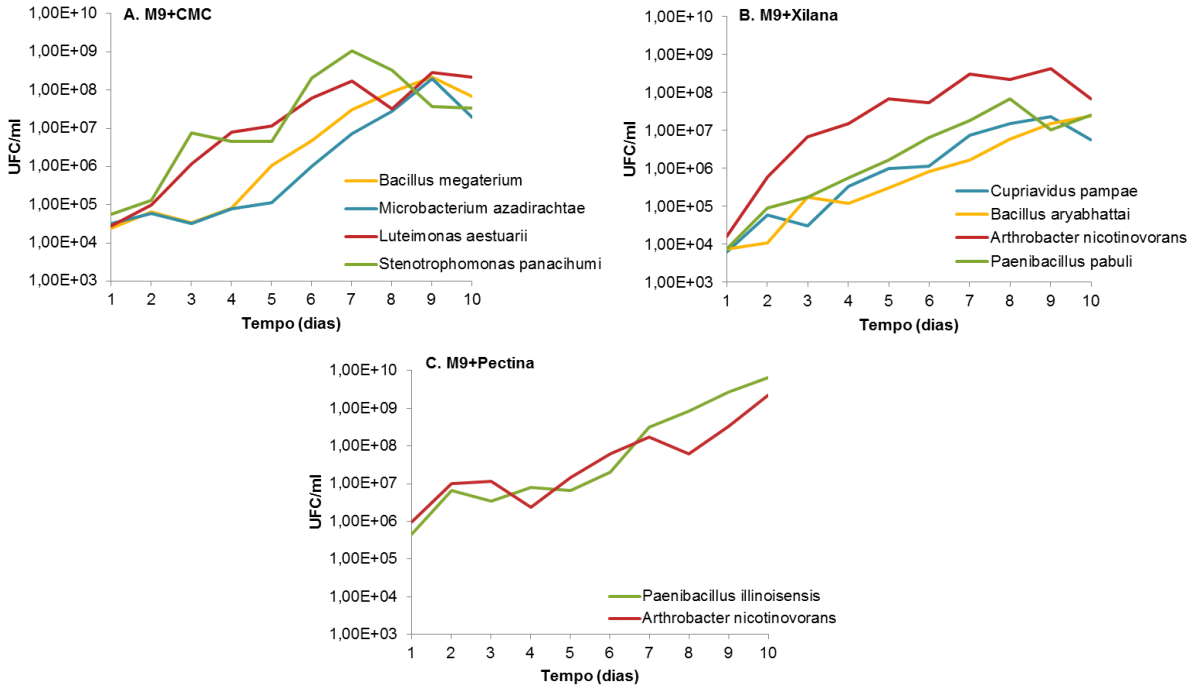

Figura 12 – Crescimento, em meio mínimo M9 + CMC, xilana ou pectina como única fonte de carbono, de bactérias associadas ao trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*

4.5 Verificação do potencial de hidrólise dos produtos de secreção de simbiontes selecionados

As bactérias isoladas das duas espécies de cupins em estudo em meio M9+CMC, apesar de apresentarem um ótimo crescimento, não foram capazes de secretar enzimas com potencial de hidrolisar celulose nas condições avaliadas. Essas bactérias também não apresentarem qualquer capacidade celulolítica detectável sobre os substratos *p*-nitrofenil-β-D-celobiosídeo e *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo.

Nos ensaios enzimáticos realizados com as bactérias isoladas em meio M9+xilana, todas as bactérias apresentaram capacidade de degradar o substrato nas condições avaliadas (Figura 13).

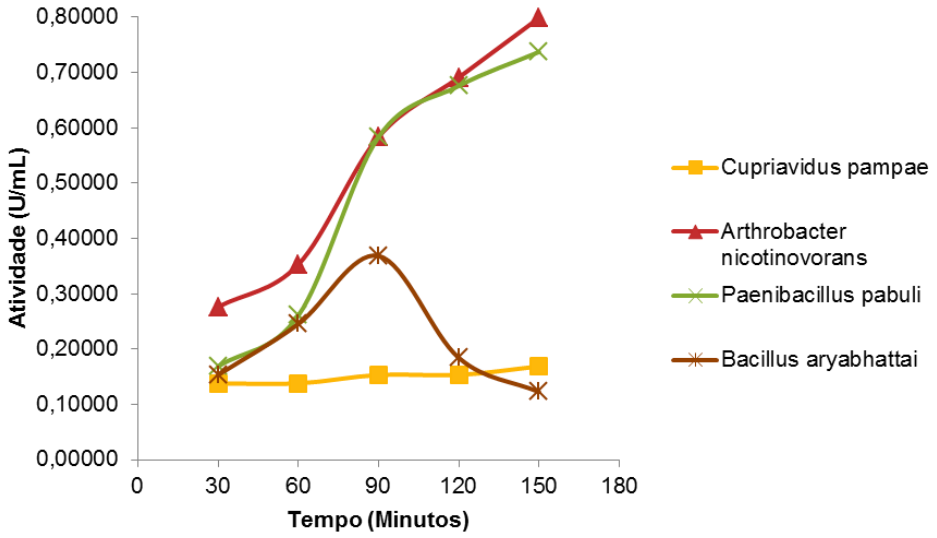

Figura 13 – Atividade das xilanases secretadas pelas bactérias isoladas do trato digestivo de ao trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, em meio seletivo com xilana

A. nicotinovorans e *P. pabuli* foram as bactérias que apresentaram melhor potencial de hidrólise de xilana e foram selecionadas para determinação das condições ótimas de hidrólise do substrato. Para *A. nicotinovorans*, o pH ótimo foi 5,0 e de 5,6 para *P. pabuli*. A temperatura ótima de atividade da xilanase para as duas bactérias foi 50°C (Figura 14).

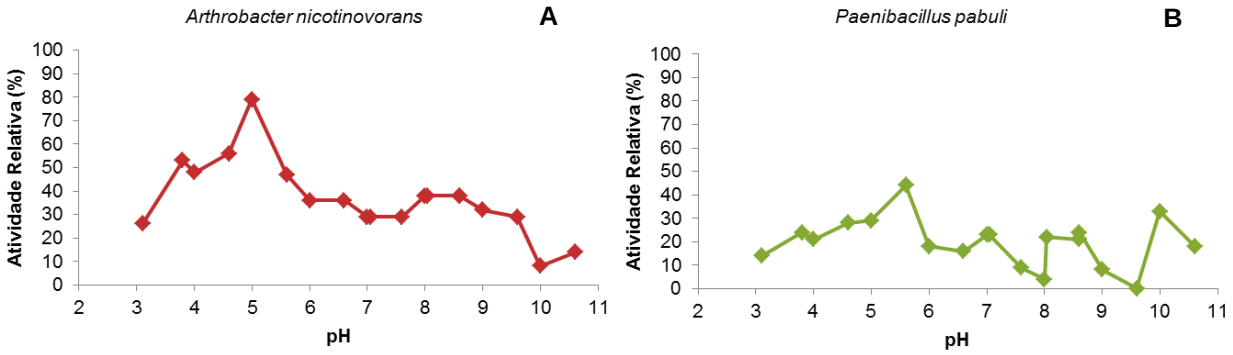

Figura 14 – Efeito do pH sobre as xilanases secretadas por *Arthrobacter nicotinovorans* (A) e *Paenibacillus pabuli* (B)

As duas espécies de bactérias isoladas em meio M9+pectina apresentaram capacidade de hidrólise de pectina e tiveram suas condições ótimas de pH e temperatura determinados. *A. nicotinovorans* apresentou melhor atividade de pectinase no pH 5,0, enquanto *P. illinoisensis* no pH 7,0. A temperatura ótima para atividade das pectinases foi de 50°C para as duas espécies de bactéria (Figura 15).

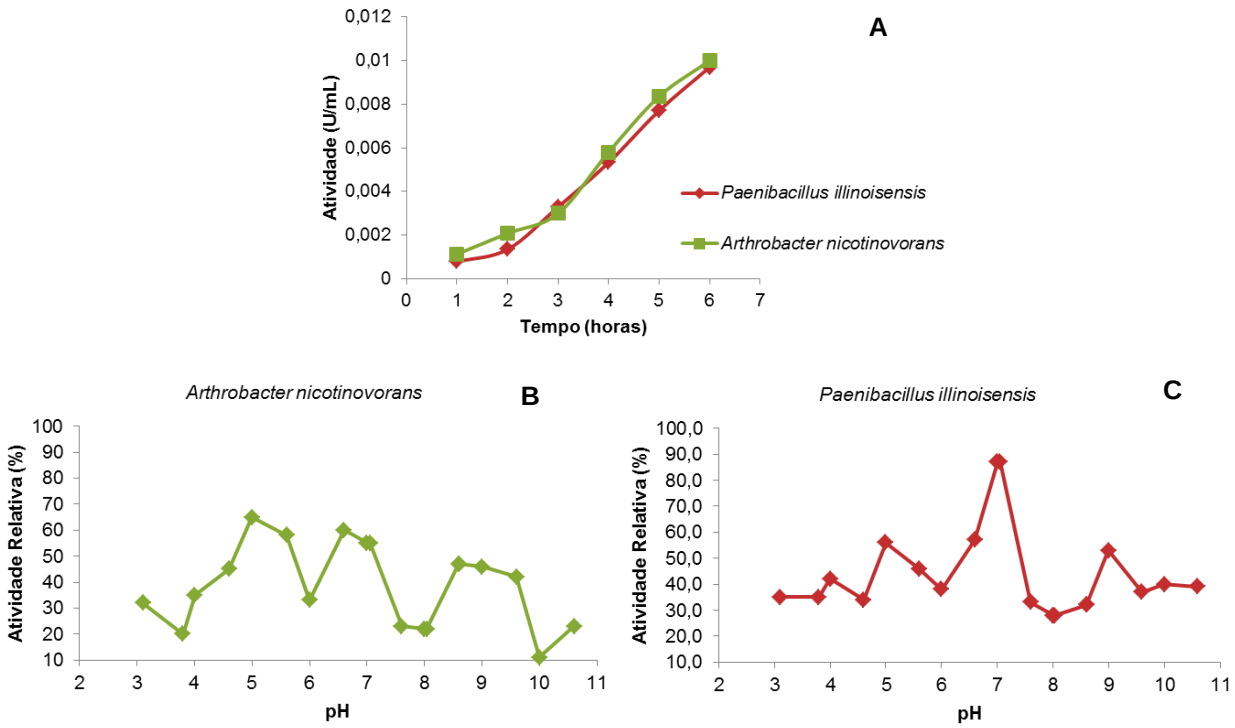

Figura 15 – Atividade das pectinas secretadas pelas bactérias isoladas do trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, em meio seletivo de pectina (A); Efeito do pH sobre as pectinases secretadas por *Arthrobacter nicotinovorans* (B) e *Paenibacillus illinoisensis* (C)

O extrato enzimático de todas as bactérias isoladas em meio seletivo foi submetido a ensaio para quantificação de proteínas totais (Tabela 5). Dentre as bactérias isoladas em CMC, *M. azadirachtae* foi a que apresentou maior dosagem de proteínas totais (0,83 µg/mL). Já entre as bactérias isoladas em meio com xilana, *B. aryabhattai* foi a que apresentou menor concentração proteica total (0,62 µg/mL). As demais bactérias isoladas nesse meio apresentarem valores de proteínas totais superiores a 1 µg/mL. As bactérias isoladas em meio com pectina foram as que

apresentaram os maiores valores de proteínas totais 1,55 µg/mL e 1,76 µg/mL, para *A. nicotinovorans* e *P. illinoisensis* respectivamente.

Tabela 5 – Dosagem de proteínas totais encontradas nas bactérias isoladas do trato digestivo de operários e soldados de *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi*, em meio seletivo com CMC, xilana e pectina

Filotipo	**µg/mL**
Bacillus megaterium	0,62
Microbacterium azadirachtae	0,83
Luteimonas aestuarii	0,62
Stenotrophomonas panacihumi	0,52
Paenibacillus illinoisensis	1,76
Arthrobacter nicotinovorans	1,55
Cupriavidus pampae	1,34
Bacillus aryabhattai	0,62
Arthrobacter nicotinovorans	1,55
Paenibacillus pabuli	1,14

5 DISCUSSÃO

A comunidade de bactérias cultiváveis isoladas dos cupins *A. euamignathus* e *C. gestroi* apresentaram algumas similaridades. Todos os filotipos isolados pertencem aos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacterioidetes e Actinobacteria, sendo que Proteobacteria representa a maioria dos filopitos para as duas espécies de cupins. Porém, esse mesmo padrão não foi observado entre os filotipos não-cultiváveis isolados dessas espécies. Neste caso, *A. euamignathus* apresentou maior abundância de Firmicutes, enquanto *C. gestroi* de Proteobacteria. Além disso, da diversidade apresentada entre os filotipos não-cultivaveis não foi encontrada nenhuma bactéria pertencente a Actinobacteria para as duas espécies de cupins em estudo. No caso de *C. gestroi*, esse método de caracterização permitiu encontrar um representante de Spirochaetes.

Essas diferenças entre as comunidades de bactérias encontradas pelo uso das duas técnicas, cultivo e clonagem, pode ser explicada, pois os meios de cultivos utilizados no isolamento, apesar de serem diversificados, nem sempre atendem a todas as particularidades que as bactérias precisam para crescer, assemelhando-se aos resultados obtidos em diversos estudos comparativos da diversidade da microbiota intestinal associada de insetos (BRODERICK et al., 2004; RANI et al., 2009). Uma gama de variáveis pode ser modificada em cada meio como, por exemplo, o pH, tornando mais apto ou não ao crescimento de diferentes espécies de bactérias. As limitações da técnica dependente de cultivo no estudo da diversidade da microbiota pode ser atestada pela estimativa de que apenas 0,1% da microbiota associada ao solo seja cultivável (TORSVIK et al., 1990ab; HILL et al., 2000), assim como muitos dos simbiontes associados a insetos, principalmente os endocitobiontes (KIKUCHI, 2009).

O isolamento de bactérias através do uso de meios seletivos, que oferecem como única fonte de carbono CMC, xilana ou pectina, permitiu identificar algumas espécies de bactérias que não haviam sido identificadas pelas duas outras técnicas utilizadas neste trabalho, indicando que questões específicas ligadas à nutrição desses microrganismos (método dependente de cultura) ou da abundância do organismo em sua comunidade ou relativas ao funcionamento das reações de amplificação do marcador molecular alvo (16S rDNA) (método independente de cultura), possam também influenciar a determinação da estrutura completa da comunidade de microrganismos existentes. Abordagens recentes de metagenômica

pelo uso de sequenciamento em larga escala tem buscado fornecer uma cobertura mais próxima da real diversidade de microrganismos associados a ambientes de interesse; porém, há também o risco de se perder informação taxonômica dos componentes de uma determinada comunidade devido às limitações ainda existentes quanto ao tamanho das sequências geradas por essas novas tecnologias, que restringem o tamanho da sequência do marcador molecular utilizado no estudo (KAUTZ et al., 2013; LOGARES et al., 2013).

A análise filogenética dos morfotipos isolados, sejam eles cultiváveis ou não, mostrou que a diversidade bacteriana no trato digestivo dos cupins em estudo é alta. Assim como já era esperado, *A. euamignathus,* por apresentar um sistema digestivo mais complexo, também apresentou maior diversidade de bactérias em relação a *C. gestroi*. Isso se deve também ao fato de *A. euamignathus* pertencer ao grupo de cupins superiores, cuja associação a microrganismos simbiontes se dá estritamente a bactérias. Estudos realizados por HONGOH et al. (2005) demonstraram uma grande diferença de espécies de bactérias presentes no intestino de quatro espécies de *Reticulitermes (R. speratus*, *R. okinawanus*, *R. amamianus* e *Reticulitermes* sp1) (cupim inferior) e quatro de *Microcerotermes* (*M. crassus*, *M. minutus*, *Microcerotermes* sp1 e *Microcerotermes* sp2) (cupim superior), em decorrência da presença ou não de protozoários no intestino desses insetos.

Por serem insetos eusociais, os cupins possuem diferentes castas com diferentes funções dentro da colônia. A casta dos operários é responsável pela alimentação de todas as outras castas que compõe a colônia. Através do processo de trofalaxia, realizado pelos operários, simbiontes são transferidos verticalmente às demais castas, o que dá a ideia de que esses indivíduos de castas diferentes possam abrigar uma microbiota semelhante. Estudos realizados com os cupins inferiores *Reticulitermes grassei* e *Reticulitermes flavipes* demostraram haver grande semelhança na microbiota intestinal de soldados e operários (BERLANGA et al., 2011), contrastando com nossos resultados. Dentre as espécies caracterizadas no presente trabalho, nota-se a ocorrência de bactérias semelhantes às duas castas; porém, a grande maioria dos simbiontes foi exclusiva a apenas uma das castas, sendo a casta dos operários a mais diversa.

Bactérias dos gêneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Citrobacter* e *Staphylococcus* são comumente relatadas em associações com cupins e estão presentes na microbiota de *A. eumignathus* e *C. gestroi*. Há inclusive relatos

da participação de espécies de *Bacillus* na degradação de celulose e xilana nos intestinos de cupins aos quais estavam associadas (KÖNIG, 2006). Já *Serratia* e *Citrobacter*, simbiontes anaeróbicos facultativos, são descritos como peças chaves para o sequestro do oxigênio presente no trato digestivo de cupins, criando condições para que simbiontes anaeróbicos possam realizar a degradação da celulose ingerida pelos mesmos (ADAMS; BOOPATHY, 2005).

Bactérias do gênero *Dysgonomonas*, também presente no trado digestivo de *C. gestroi,* é comumente associada a este gênero de cupim e está diretamente relacionada à produção de vitamina B12, um complemento importante para a nutrição de seu hospedeiro (HUSSENEDER; BERESTECKY; GRACE, 2009).
Bactérias pertencentes ao filo das Actinobacterias também já foram isoladas do trato digestivo de cupins. Essas bactérias apresentam grande importância na reciclagem ecológica e, por muitas vezes, estão associadas à degradação de xilana, amido solúvel, proteínas, lipídeos, ácido úrico e de carboximetilcelulose (BERLANGA et al., 2011; KHUCHAROENPHAISAN et al., 2011). No trato digestivo de *A. eumignathus* e *C. gestroi*, foram encontradas quatro espécies de actinobactérias, pertencentes as famílias Micrococcaceae, Intrasporangiaceae, Microbacteriaceae e Micrococcaceae. A família Microbacteriaceae é comumente encontra no intestino de cupins e por apresentar atividade celulolítica, estão associadas a degradação material lignocelulósico (BERLANGA et al., 2011; LE ROES-HILL, ROHLAND, BURTON, 2011).

Sabe-se que os cupins são altamente eficientes na conversão de materiais lignocelulósicos em metabólitos utilizáveis e que essa eficiência se deve não somente a presença de enzimas endógenas, mas principalmente a ação dos simbiontes. Desta forma, a elucidação e compreensão dessa complexa relação inseto-simbionte se torna importante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que existe a possibilidade do emprego das enzimas produzidas por estes simbiontes em processos biotecnológicos que objetivam a degradação dos compostos celulósicos de interesse, como, por exemplo, a palha da cana. Países como EUA têm investido em pesquisas sobre avaliações do potencial das enzimas isoladas de cupins para essa finalidade (KINTISCH, 2006).

O isolamento de bactérias utilizando meios seletivos que fornecem componentes da matriz lignocelulósica (celulose, xilana ou pectina) como única fonte de carbono é uma via para se identificar simbiontes com potencial de degradação

desses compostos. Porém, nenhuma das bactérias isoladas do intestino de *A. euamignathus* e *C. gestroi* demostrou capacidade significativa de hidrólise, nas condições avaliadas, das matrizes lignocelulósicas aqui testadas,. Estudos de metagenômica do trato digestivo de cupins *Reticulitermes speratus* e *Nasutitermes* sp. identificaram diversas famílias de glicosil hidrolases, celobiohidrolases, betaglucosidases e xilanases, enzimas essenciais ao processo de conversão da biomassa, além de genes relacionados à vida microbiana nesse microambiente (TOKUDA et al., 2007; WARNECKE et al., 2007). No estudo com *Nasutitermes* foram descritos 12 filos de bactérias presentes e mais de 200 genes desta espécie de cupim relacionados com a degradação da lignocelulose, colaborando com a hipótese de que a lignina não é degradada somente pelos endossimbiontes (WARNECKE et al., 2007). Apesar de *Microbacterium azadirachtae* não ter apresentado atividade de celulase, esse gênero de bactéria é relatado como sendo capaz de produzir celulases (BERLANGA, et al., 2011;KOHLER et al., 2012)

Das bactérias isoladas em meio M9+xilana e M9+pectina, *Arthrobacter nicotinovorans* foi a que apresentou maior capacidade de hidrólise dos dois substratos. MONGODIN et al. (2006) relatam que bactérias do gênero *Arthrobacter* são capazes de degradar polímeros naturais como xilana e pectina. Bactérias do gênero *Paenibacillus* também se mostram eficientes na quebra de xilana e pectina (BUDI et al., 2000), apesar da baixa atividade dos extratos desses isolados aqui indetificados.

6 CONCLUSÕES

- A microbiota de operários de *A. euamiganthus* é mais diversa que a de operários de *C. gestroi*;

- A microbiota de sodados de *C. gestroi* apresentou maior número de filotipos que a de soldados de *A. euamignathus*;

- Na caracterização da microbiota cultivável, o filo Proteobacteria foi o mais abundante, tanto para *A. euamiganthus,* quanto para *C. gestroi*;

- As bactérias cultiváveis *Serratia nematodiphila, Serratia marcescens subsp. sakuensis* e *Chryseobacterium viscerum* e os filotipos não-cultiváveis *Clostridium neopropionicum* e *Sporobacter termitidis* foram encontradas nas castas de operários e soldados de *A. euamignathus;*

- No cupim inferior, *C. gestroi*, foram comuns aos operários e soldados as bactérias cultiváveis *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Citrobacter farmeri* e os filotipos não-cultiváveis *Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae genomovar* e *Citrobacter farmeri*;

- Firmicutes predominam na microbiota não-cultivavel associada ao intestino de *A. euamiganthus*, enquanto Proteobacteria no de *C. gestroi*;

- O isolamento de bactérias em meio seletivo permitiu demostrar que ambas as espécies em estudo possuem bactérias capazes de utilizar celulose, xilana e pectina como única fonte de carbono;

- As bactérias isoladas em meio seletivo com celulose não demostraram potencial significativo de hidrólise do substrato nas condições avaliadas;

- As bactérias isoladas em meio seletivo com xilana e pectina se mostraram capazes de hidrolisar o substrato de origem;

REFERÊNCIAS

ADAMS, L.; BOOPATHY, R. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of the Formosan termite. **Bioresource Technology**, Essex, v.96, p.1592-1598, 2005.

ANDERSON, W.F.; AKIN, D.E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. J**ournal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.35, p.355–366, 2008.

ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Role of Glycerol Addition on Xylose-to-Xylitol Bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, New York, v.58, n.3, p.274-278, 2009.

ATLAS, R.M. **Handbook of media for environmental microbiology.** 2nd ed. Flórida: CRC Press, 2005. 673p.

BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: STUMPF, P.k.; CONN, E.E. (Ed). **The Biochemistry of Plants.** New York: Academic Press, v.14, p.297–371, 1988.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.59, p.155-189, 2005.

BAUMANN, P. Diversity of prokaryote-insect associations within the Sternorrhyncha (psyllids, whiteflies, aphids, mealybugs). In: BOURTZIS,K. MILLER, T.A.(Ed.). **Insect Symbiosis,** Bacon Raton, FL.:CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, 2006.v.2 p. 1-24.

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.56, p.326 –338, 2001.

BERLANGA, M.; PASTER, B.J.; GRANDCOLAS, P.; GUERRERO, R. Comparison of the gut microbiota from soldier and worker castes of the termite *Reticulitermes grassei*. International Microbiology, v.1, p.83-93, 2011. Disponível em: <http://www.im.microbios.org/1402/03_083_Berlanga.pdf>. Acesso em: 14 set 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BREZNACK, J.A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.39, p.453-487, 1994.

BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 293-300, 2004.

BUDI, S.W.; VAN TUINEN, D.; ARNOULD, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 191–199, 2000.

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. **Papeis Avulsos Zoologia**, São Paulo, v.40, n.25, p.387- 448, 1999.

CORTEZ, E.V.; PESSOA, A. Xylanase and β-xylosidase separation by fracional precipitation. **Process Biochemistry**, London, v.35, p.277-283, 1999.

COSTA-LEONARDO, A.M. **Cupins-praga:** morfologia, biologia e controle. Ana Maria Costa-Leonardo, Rio Claro, 2002. 128p.

COUTINHO-ABREU, I.V.; ZHU, K.Y.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. **Parasitology International**, Tokyo, v.59, p.1-8, 2010.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. (Ed). **Data for biochemical research.** New York: Oxford University Press, 1989. 580p.

DHEERAN, P.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S.; JAISWAL, Y.K.; ADHIKARI, D.K. A novel thermostable xylanase of *Paenibacillus macerans* IIPSP3 isolated from the termite gut**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.39, p.851–860, 2012.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.49, p.71–92, 2004

DOUGLAS, A.E. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.25, p.338-342, 2007.

DOUGLAS, A.E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, Oxford, v.23, p.38–47, 2009.

EGGLETON, P. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. BIGNELL, D.E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Ed.). **Biology of Termites:** A Modern Synthesis. Dorderecht: Springer, 2011. 576p.

ENGEL, M.S.; KRISHNA, K. Family-Group Names for Termites (Isoptera). **American Museum Novitate**s, New York, v.3432, p.1-9, 2004.

ENGEL, P.; MORAN, N.A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. FEMS **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.37, p.699-735, 2013.

FAVIA, G.; RICCI, I.; MARZORATI, M.; NEGRI, I.; ALMA, A.; SACCHI, L.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D. Bacteria of the genus Asaia: a potential paratransgenic weapon against malaria. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.627, p.49-59, 2008.

FELDHAAR, E. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, London, v.36, p.533–543, 2011.

FONTES, L.R.; ARAUJO, R.L. Os cupins. In: MARICONI, F.A.M. (Org.). **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ. 1999. p. 35-90.

HANSEN,A.K.; MORAN,N.A. Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.108, p.2849–2854, 2011. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/early/2011/01/25/1013465108>. Acesso em: 24 jul 2013.

HAYAKAWA, M.; NONOMURA, H. Humic-acid vitamins agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. **The Journal of Pharmacy Technology**. Cincinnati, v.65, p.501–509, 1987.

HILL, G.T.; MILTKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L .; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, n. 15, p. 25-36, 2000.

HONGOH,Y.; DEEVONG, P. INOUE, T. MORIYA, S.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; VONGKALUANG, C.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. Intra- and Interspecific Comparisons of Bacterial Diversity and Community Structure Support Coevolution of Gut Microbiota and Termite Host. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11 p. 6590–6599, 2005.

HONGOH,Y.; EKPORNPRASIT, L.; INOUE, T.; MORIYA, S.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus.* **Molecular Ecology**, Oxford, v.15, p. 505–516, 2006.

HONGOH, Y. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. **Cellular and Molecular Life Sciences,** Basel, n.68, p.1311–1325, 2011.

HUSSENEDER, C. BERESTECKY, J.M. GRACE, J.K. Changes in composition of culturable bacteria community in the gut of the formosan subterranean termite depending on rearing conditions of the host. Annals Of The Entomological Society Of America, Annapolis, v. 102, n. 3, p. 498-507, 2009.

INOUE, T.; MURASHIMA, K.; AZUMA, J.; SUGIMOTO, A.; SLAYTOR, M. Cellulose and xylan utilisation in the lower termite *Reticulitermes speratus*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, n.43, p.235–242, 1997.

INOUE, T.; MORIYA, S.; OHKUMA, M.;KUDO, T. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. **Gene**, Netherlands, v. 349, p.67–75, 2005.

KALTENPOTH, M., ENGL, T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. **Functional Ecology.** Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2435.12089/pdf>. Acesso em: 17 set 2013.

KAUTZ, S.; RUBIN, B.E.R.; RUSSELL, J.A.; MOREAU, C.S. Surveying the microbiome of ants: comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n.79, p. 525-534, 2013.

KIKUCHI, Y. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. **Microbes and Environment**, n. 24, v.3, p. 195-204, 2009.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 716–721, 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.16, p. 111-120, 1980.

KINTISCH, E. "Biofuels to be focus of DOE centers." **Science**, Washington, v. 313, p. 746a, 2006.

KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KÖNIG, H. Bacillus species in the intestine of termites and other soil invertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.101, n.3, p.620-627, 2006.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.23, p. 411-456, 1999.

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature,** London, v. 202, p. 928–929, 1964.

LEE, K.E.; WOOD, T.G. **Termites and soils**. London: Academic Press, 1971. 251p.

LIMA, J.T.; COSTA-LEONARDO, A.M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, Campinas, v.7, n.2, p.243-250, 2007.

LOGARES, R.; SUNAGAWA, S.; SALAZAR, G.; CORNEJO-CASTILLO, F. M.; FERRERA, I.; SARMENTO, H.; HINGAMP, P.; OGATA, H.; DE VARGAS, C.; LIMA-MENDEZ, G.; RAES, J.; POULAIN, J.; JAILLON, O.; WINCKER, P.; KANDELS-LEWIS, S.; KARSENTI, E.; BORK, P.; ACINAS, S. G. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. **Environmental Microbiology**, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12250/pdf>. Acesso em: 25 set 2013.

MILLER, T.A.; LAMPE, D.J.; LANZON, C.R. Transgenic and paratransgenic insects in crop protection, pp. 87-104. In: ISHAAYA, I.; HOROWITZ, T. ; NAUEN, R. (Ed.). **Insecticides design using advanced technologies**. Berlin:Springer-Verlag, 2007. 314p.

MORAN, N.A. Bacterial menageries inside insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.4, p.1339-1340, 2001. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/98/4/1338.full>. Acesso em: 02 ago 2013.

MORAN, N.A. Symbiosis. **Current Microbiology**, New York, v.16, n.20, p.R866-R871, 2006.

MORAN, N.A.; BAUMANN, P. Bacterial endosymbionts in animals. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.3, p.270-275, 2000.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III – La β-amylase: Dosage d'activité et controle de l'absence d'α-amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.31, p.286-290, 1948.

ODELSON D.A.; BREZNAK J.A. Cellulase and other polymerhydrolyzing activities of *Trichomitopsis termopsidis*, a symbiotic protozoan from termites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, p.622–626, 1985.

OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, n.61, p.1–9, 2003.

RALPH J, LUNDQUIST K, BRUNOW G, LU F, KIM H, SCHATZ PF, MARITA JM, HATFIELD RD, RALPH SA, CHRISTENSEN JH, BOERJAN, W. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.29–60, 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1854/LU-303057>. Acesso em: 02 ago 2013.

RANI, A.; SHARMA, A.; RAJAGOPAL, R.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R.K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected Anopheles stephensi – an Asian malarial vector. **BMC Microbiology**, n.9, p. 96, 2009.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; VALVERDE, A.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. **Electrophoresis**, Weinheim, v.22, p. 1086–1089, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning:** A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001. 2344p.

SCHARF, M.E.; BOUCIAS, D.G. Potential of termite-based biomass pre-treatment strategies for use in bioethanol production. **Insect Science**, v.17, p.166–174, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7917.2009.01309.x/full>. Acesso em: 02 ago 2013.

SCHARF, M.E.; TARTAR, A. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v.6, n.2, p.540-552, 2008.

SCHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.16, n.3, p. 313-340, 1966.

SERBUS, L.R.; CASPER-LINDLEY, C.; LANDMANN, F.; SULLIVAN, W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.42, p.683–707, 2008.

SIOZIOS, S.; SAPOUNTZIS, P.; IOANNIDIS, P.; BOURTZIS, K. *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. **Insect Science**, v.15, p.89-100, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7917.2008.00189.x/pdf>. Acesso em: 02 ago 2013.

SUN, J.Z.; SCHARF, M.E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. **Insect Science**, v.17, p.163–165, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7917.2010.01348.x/full>. Acesso em: 4 ago 2013.

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.13, p. 510-524, 1996.

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

TAN, G.Y.A.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Exploration of Amycolatopsis diversity in soli using genus specific primers and novel selective media. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, p. 557-569, 2006.

TOKUDA, G.; WATANABE, H.; MATSUMOTO, T.; NODA, H. (1997). Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo-β-1,4-glucanase. **Zoological Science**, Tokyo, v.14, p.83–93, 1997. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.2108/zsj.14.83 >. Acesso em: 02 ago 2013.

TOKUDA G, Lo N, WATANABE H, SLAYTOR M, MATSUMOTO T, NODA H. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v.1447, p.146–159, 1999.

TOKUDA, G.; YAMAOKA, I.; NODA, H. Localization of Symbiotic Clostridia in the Mixed Segment of the Termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p.2199-2207, 2000.

TOKUDA, G.; NAKAMURA, T.; MURAKAMI, R.; YAMAOKA, I. Morphology of the digestive system in the wood-feeding termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki) (Isoptera: Termitidae). **Zoological Science**, Tokyo, v.18, p. 869–877, 2001. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2108/zsj.18.869>. Acesso em 04 ago 2013.

TOKUDA, G.; MIYAGI, M.; MAKIYA, H.; WATANABE, H.; ARAKAWA, G. Digestive beta-glucosidases from the wood-feeding higher termite, *Nasutitermes takasagoensis*: intestinal distribution, molecular characterization, and alteration in sites of expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.39, p.931–937, 2009.

TORSVIK, V.; GOLSOYR, J.; DAAR, F. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 56, p. 782-787, 1990a.

TORSVIK, V,; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacterial. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 56, p. 776-781,(1990b)

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.388-394, 2007.

WALLER, D.A.; LA FAGE, J.P. Nutritional ecology of termites. In: . SLANSKY Jr, F.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.).**Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates** New York:John Wiley, 1986. p.487-532.

WARNECKE, F.; LUGINBÜHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T.H.; STEGE, J.T.; CAYOUETTE, M.; MCHARDY, A.C.; DJORDJEVIC, G.; ABOUSHADI, N.; SOREK, R.; TRINGE, S.G.; PODAR, M.; MARTIN, H.G.; KUNIN, V.; DALEVI, D.; MADEJSKA, J.; KIRTON, E.; PLATT, D.; SZETO, E.; SALAMOV, A.; BARRY, K.; MIKHAILOVA, N.; KYRPIDES, N.C.; MATSON, E.G.; OTTESEN, E.A.; ZHANG, X.; HERNANDEZ, M.; MURILLO, C.; ACOSTA, L.G.; RIGOUTSOS, I.; TAMAYO, G.; GREEN, B.D.; CHANG, C.; RUBIN, E.M.; MATHUR, E.J.; ROBERTSON, D.E.; HUGENHOLTZ, P.; LEADBETTER, J.R. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, London, v.450, p.560–565, 2007.

WATANABE, H.; NAKAMURA, M.; TOKUDA, G.; YAMAOKA, I.; SCRIVENER, A.M.; NODA, H. Site of secretion and properties of endogenous endo-beta-1,4-glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese subterranean termite. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.27, p.305–313,1997.

WATANABE, H. ; TOKUDA, G. Animal cellulases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.58, p.1167–1178, 2001.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in Isects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.55, p. 609-623. 2010.

YUKI, M.; MORIYA, S.; INOUE, T.; KUDO, T. Transcriptome analysis of the digestive organs of Hodotermopsis sjoestedti, a lower termite that hosts mutualistic microorganisms in its hindgut. **Zoological Science**, Tokyo, v.25, p.401–406, 2008. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/full/10.2108/zsj.25.401>. Acesso em: 2 ago 2013.ZCHORI-FEIN, E.; PERLMAN, S.J.; KELLY, S.E.; KATZIR, N.; HUNTER, M.S. Characterization of a '*Bacteroidetes*' symbiont in *Encarsia wasps* (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of '*Candidatus* Cardinium hertigii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.961-968, 2004.

ZOOK, D. A new symbiosis language. **Symbiosis News**, Plymouth v.1, n.3, p.1-3, 1998.