

**UFRRJ**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**TESE**

**Estudo de Diversidade Genética e Produção de  
Enzimas Celulolíticas em Bactérias Associadas ao  
Trato Intestinal de Invertebrados Saprófagos**

**Dayana da Silva Correia**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS EM BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO TRATO  
INTESTINAL DE INVERTEBRADOS SAPRÓFAGOS**

**DAYANA DA SILVA CORREIA**

*Sob a Orientação da Pesquisadora*  
**Maria Elizabeth Fernandes Correia**

*e Co-orientação do Pesquisador*  
**Gustavo Ribeiro Xavier**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Agrobiologia.

Seropédica, RJ  
Março de 2014

631.46  
C824e  
T

Correia, Dayana da Silva, 1983-  
Estudo de diversidade genética e produção de enzimas  
celulolíticas em bactérias associadas ao trato intestinal  
de invertebrados saprófagos / Dayana da Silva  
Correia. – 2014.  
109 f.: il.

Orientador: Maria Elizabeth Fernandes Correia.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência,  
Tecnologia e Inovação Agropecuária, 2014.  
Bibliografia: f. 74-91.

1. Microbiologia agrícola - Teses. 2. Bactérias -  
Teses. 3. Invertebrado – Teses. 4. Simbiose - Teses. 5.  
Celulose – Teses. 6. Resíduos vegetais – Teses. I.  
Correia, Maria Elizabeth Fernandes, 1967- II.  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia  
e Inovação Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
EM AGROPECUÁRIA**

**DAYANA DA SILVA CORREIA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora** no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de Concentração em Agrobiologia.

TESE APROVADA EM 26/03/2014.

---

Maria Elizabeth F. Correia. Dra. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Osmar Klauberg Filho Dr. UDESC/CAV

---

Ricardo Luis Louro Berbara. Ph.D. UFRRJ

---

Marcia Reed R. Coelho. Dra. Embrapa Agrobiologia

---

Éderson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobiologia

## **DEDICATÓRIA**

*A minha família, e em especial  
A minha Avó Cecilia e minha mãe Anadir, que  
sempre me deram amor, coragem e apoio para seguir a  
vida!*

*“Tem sido uma amarga penitência para mim digerir a conclusão de que, essa corrida é para os fortes, e que eu provavelmente farei pouco mais do que me contentar em admirar os avanços que outros obtiveram na ciência”*

***Charles Robert Darwin***

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me acompanha em todos os caminhos, me dando luz e força para vencer e compreender todos obstáculos da vida. A ele também agradeço por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho, que fizeram desta trajetória, muito mais simples e prazerosa.

A minha Família, que sempre me apoiou com muito, amor, e bons exemplos. Minha mãe Anadir, minha avó Cecília, meus irmãos Wilson, Leonardo, Harisson e Luines, os meus queridos tios e tias, primos e primas, amo vocês!

Ao meu amor Eduardo, obrigada pelo seu carinho e toda a compreensão. Mesmo distante você foi sempre esteve presente!

A minha querida UFRRJ, aos mestres do Programa de Pós- Graduação em Ciência Tecnologia e Inovação em Agropecuária em especial a professora Lúcia Helena Cunha dos Anjos, um exemplo de sabedoria e dedicação.

A Minha querida orientadora Dra. Maria Elizabeth Fernandes Correia pela grande oportunidade deste aprendizado e por acreditar em mim, Muito Obrigada!

Ao Dr. Gustavo Ribeiro Xavier pela co - orientação, auxílio e incentivo.

A Embrapa Agrobiologia pelo suporte logístico e por ter cedido seus espaços para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, aqui expresso, minha admiração a todo.

A professora Paula Morais da Universidade de Coimbra de Portugal, pela orientação e auxílio na realização deste trabalho. Aos amigos Portugueses Sara, Tania, Gabriel, Pedro Zulu, Pedro Farias, Diogo, Fellipa, Katarina, Katarina Júnior, muito obrigada pelo carinho e aconchego, nos seis meses de trabalho distante de casa.

Aos amigos do laboratório de Fauna do solo Claudinha, Mirian, Khadidja, Itaynara, Eloisa, Fernanda, Mariana e Rafael, pelas descontraídas conversas na hora do cafézinho e das ajudas sempre bem vindas.

Aos amigos do laboratório de Ecologia Microbiana Renatinha, Jakson, Gleyson, Gustavo, Tatiane, Karine, Silvana, Fernanda, Sumya, Elson, Carlos, Rafaela, Samuel e Andreinha, pelos momentos agradáveis e de companheirismo que passamos ao longo desses quatro anos.

A minha grande amiga, conselheira e irmã Sandra Lima, um verdadeiro anjo. Obrigada por tudo amiga.

Aos meus amigos do alojamento, a primeira morada em Seropédica, saudades infinitas.

Aos técnicos e amigos Roberto Silva, João Luis Bastos e Tatiana Vidal, muito obrigada pelo apoio nas horas mais difíceis e principalmente pelo carinho que recebi de todos vocês.

Aos meus vizinhos e amigos, Daiana, Matheus, Cassia, Greyce e Fellipe, pela amizade fraterna, sempre pode contar com vocês, obrigada!

A CAPES e ao CNPq, pelas bolsas concedidas durante o curso de Doutorado.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

## RESUMO GERAL

CORREIA, Dayana da Silva. **Estudo de diversidade genética e produção de enzimas celulolíticas em bactérias associadas ao trato digestivo de invertebrados saprófagos**. 2014. 91f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A simbiose entre invertebrados do solo e microrganismos é um grande aliado no auxílio da decomposição de resíduos vegetais presentes no solo. Os microrganismos por sua vez, apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas, uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares que auxiliam na mineralização da matéria orgânica. A possibilidade de desenvolver novos processos biotecnológicos com base na prospecção da diversidade microbiana é imensa, em decorrência da grande variabilidade que existe entre os sistemas biológicos e que podem ser aperfeiçoados para melhorar os sistemas de produção agrícolas de forma sustentável. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil da comunidade bacteriana e potencial celulolítico de bactérias isoladas de três diferentes espécies de invertebrados saprófagos. Os experimentos foram montados no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro. Gongôlos, da espécie *Trigoniulus corallinus*, foram coletados em pilhas de compostos vegetais presentes em torno do campo experimental, que posteriormente foram incubados durante 60 dias, sob seis diferentes dietas. A diversidade bacteriana do trato intestinal dos invertebrados foi analisada através da técnica de PCR-DGGE por amplificação do gene 16S rDNA PCR por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE); foram utilizados dois domínios *Bacteria* e *Actinobactéria*. Algumas bandas do gel de DGGE foram extraídas e sequenciadas. Para avaliar o potencial quanto à produção de celulasas em resposta à presença de carboxi-metil-celulose (CMC) das bactérias isoladas, foi utilizada a técnica de coloração vermelho Congo, e os valores foram expressos através de (Ie) índice enzimático. A partir dos maiores valores de (Ie), foram selecionadas vinte e três bactérias para a análise de sequenciamento do gene 16S rDNA. Após a identificação filogenética, foi avaliado o potencial celulolítico, através de testes de atividade celulolítica de endoglucanases (CMCase) e endo e exoglucanases (FPase). Para determinar a massa molecular e atividade das enzimas foram realizados géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma. Os resultados obtidos na técnica de DGGE, os perfis de bandas de DGGE mostrou que a microbiota intestinal dos invertebrados, detém grupos bacterianos distintos. Pode-se inferir neste ponto, que apesar das comunidades possuírem abundância similar, como as espécies de *Trigoniulus corallinus* e *Cubaris murina*, os grupos que compõem esta abundância foram diferentes entre as espécies de invertebrados. A partir dos clones de bandas incisadas, foram sequenciados membros de três filos, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Através da análise filogenética, foi possível identificar as 23 espécies de bactérias. Apresentando dois filos distintos Actinomicetos e Firmicutes, o maior gênero identificado foi *Streptomyces*, seguido de um isolado para *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*. O trato intestinal das três espécies de invertebrados saprófagos revelou ser um ambiente hábil à prospecção de bactérias com eficiência celulolítica, com alto potencial para futuros estudos biotecnológico.

**Palavras chave:** Simbiose. DGGE. Prospecção de bactérias.



## GENERAL ABSTRACT

CORREIA, Dayana da Silva. **Study of genetic diversity and production of cellulolytic enzymes in bacteria associated to the intestinal tract of saprophages invertebrates.** 2014. 91p. Thesis (Doctor in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The symbiosis between soil invertebrates and micro-organisms is a major ally in promoting the decomposition of plant residues in the soil. The micro-organisms in turn, have an immense genetic diversity and play crucial roles in maintaining ecosystems. One of these functions is the production of extracellular enzymes that assist the mineralization of organic matter. The possibility of developing new biotechnological processes based on the exploration of microbial diversity is immense, due to the great variability that exists between biological systems and it can be optimized to improve the agricultural production systems in a sustainable manner. The objective of this work was to study the profile of the bacterial community and cellulolytic potential of bacteria isolated from three different species of invertebrates saprophages. The experiments were performed at the Experimental Station of Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro State. Millipede, of the *Trigoniulus corallinus* species, were collected in piles of plant compounds from local experimental field sites, which were subsequently incubated for 60 days under six different diets. Bacterial diversity in the intestinal tract of invertebrates was analyzed by PCR-DGGE of 16S rDNA gene amplification by PCR electrophoresis in denaturing gradient gel (DGGE); two domains were used, Bacteria and Actinobacteria. Some bands of the DGGE gel were extracted and sequenced. To assess the potential for production of cellulases in response to the presence of carboxy methyl cellulose (CMC) of isolates, the technique Congo red stain was used and the values were expressed as means (Ie) enzymatic index. From the highest values of (Ie) twenty-three bacteria were selected for the analysis of 16S rDNA. After the phylogenetic identification, the cellulolytic potential was rated, through cellulolytic activity of endoglucanase (CMCase), and endo- and exoglucanases (FPase) tests. To determine the molecular weight and activity of the enzymes polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and zymography were performed. The results obtained in the technique of DGGE, the profiles of DGGE bands, showed that the intestinal microbiota of the invertebrates has distinct bacterial groups. It is possible to infer that, despite the communities having similar abundance, such as in the *Trigoniulus corallinus* and *Cubaris murine* species, the groups that make up this abundance were different among the invertebrate's species. From the clones of the incised bands, three phyla members, Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes, were sequenced. Through phylogenetic analysis, it was possible to identify the 23 species of bacteria. Presenting two distinct Actinomycetes and Firmicutes phylum, the largest genus identified was *Streptomyces*, followed by an isolated *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Staphylococcus*. The intestinal tract of the three species of saprophages invertebrates showed to be an adequate environment for prospection of bacteria with cellulolytic efficiency, with high potential for future biotechnological studies.

**Key-words:** Symbiosis. DGGE. Prospection of bacteria.

## RESUMEN AMPLIADO

CORREIA, Dayana da Silva. **Estudio de la diversidad genética y la producción de enzimas celulolíticas en bacterias asociadas con el tracto digestivo de los invertebrados saprófagos**. 2014. 91p. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación en Agropecuaria). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

### 1. Introducción

Los invertebrados del suelo muestran una exuberante diversidad de especies con características variadas. Los saprófagos invertebrados actúan en el consumo y la fragmentación de la materia orgánica del suelo en las primeras etapas del proceso de descomposición, a través de la acción de fragmentación. Microorganismos a su vez, son actores esenciales en el intestino de muchos invertebrados macro, la producción de una serie de enzimas de degradación (Hopkin & Read, 1992). Esta interacción entre los invertebrados y microorganismos, es un factor clave en el ciclo de los nutrientes esenciales para el buen funcionamiento de los ecosistemas del suelo.

La investigación de las relaciones simbióticas entre los microorganismos e invertebrados, son uno de los principales campos de la ecología microbiana del suelo. La simbiosis implica la coexistencia de dos o más especies con el mayor grado de asociación, tanto en el exterior, el interior de los tejidos y órganos (Byzov et al. 2008). El sistema digestivo de los invertebrados del suelo presenta una amplia variedad de microorganismos e implica varias asociaciones entre ellos. Un ejemplo bien conocido es la simbiosis del tracto digestivo de las termitas, así como sus funciones (König et al, 2006). Además de los estudios de la simbiosis con otros microorganismos de termitas y especies de invertebrados también se estudian en *Oligochaeta*, milpiés, isópodos entre otros.

En esta simbiosis también se relaciona en el desempeño importante en el ciclo natural del carbono, que comienza en la biosíntesis de los componentes de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, la energía solar y termina con la mineralización y la liberación de estos componentes, como resultado de la descomposición causada por organismos presentando biodegradación eficiente (Arantes y Milagres, 2009). Es importante destacar que la biodegradación de los materiales lignocelulósicos se produce en el suelo, un lugar donde los polisacáridos se acumulan en grandes cantidades sistema abierto. Cuando una amplia diversidad de microorganismos e invertebrados saprófagos responsable de la descomposición de materiales vegetales enunciados en ellos.

La diversidad de organismos que producen celulasas es notable pero sólo unos pocos son conocidos como celulolítica verdadera, es decir, capaces de degradar celulosa natural (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004). Entre estos microorganismos son actinomicetos o actinomicetos, que son bacterias filamentosas gram-positivas, como se describe en la literatura y la producción de enzimas industriales importantes implicadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica (Flores et al. 1997).

Basándose en esta información, la hipótesis es que saprófagos invertebrados, la las milpiés *Trigoniulus corallinus*, las bolas armadillos *Cubaris murina* y cucaracha *Pycnoscelus surinamensis* son sitios con alta perspectiva potencial de degradar los microorganismos compuestos lignocelulósicos y que comunidad microbiana asociada con el tracto digestivo variará dependiendo de las especies de invertebrados.

Así, el objetivo de este estudio fue investigar la diversidad microbiana del tracto intestinal de tres especies de invertebrados *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* y *Pycnoscelus*

*surinamensis*, utilizando técnicas moleculares. Además, se evaluó la capacidad celulolítica de veintitrés aislamientos bacterianos provenientes del tracto intestinal de los invertebrados estudiados.

## **2. Material y Métodos**

Este estudio se realizó en la Estación Experimental de Embrapa Agrobiología laboratorios Fauna del Suelo Ecología Microbiana y Biología Molecular multiusuario Embrapa Agrobiología, Seropédica, Río de Janeiro. Los análisis de los clones de bandas incisas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Vida, de la Universidad de Coimbra, Portugal.

En el capítulo 1 se determinó la diversidad bacteriana asociada con el tracto intestinal de los tres saprófagos invertebrados. Los dos experimentos, se usaron diferentes residuos orgánicos con composición lignocelulósica y C / N distinta. Los residuos se añaden a la base de legumbres: Flemingia (*Flemingia macrophylla*) y Gliricidia (*Gliricidia sepium*) (Jacq), hierba (Willd.): Hierba (*Paspalum notatum*) (Flugge) y materiales recalcitrantes: cartón, mazorca de maíz y fibra de coco que más tarde se les ofreció y consumidos por especies milpiés *Trigoniulus corallinus* (Gervais, 1847) (Diplopoda: Spirobolida) En este experimento, se produjo la adición deliberada de 500 ml aproximadamente 900 individuos de *T. corallinus* como agentes de abono de estos residuos por período de 60 días en condiciones de temperatura y humedad controladas Las otras dos especies de invertebrados investigados en este estudio : *Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blaberidae) y *Cubaris murina* (Brandt, 1833) (Crustacea: isópodos) espontáneamente colonizado el experimento.

En el Capítulo 2 presenta la identificación y evaluación filogenético de las enzimas celulolíticas de bacterias aisladas del tracto intestinal de tres invertebrados saprófagos Para la técnica de prueba de índice enzimática tinción de Rojo Congo fue utilizado. Las bacterias se inocularon en cultivo sólido CMC durante 5 días a 28 C. Las bacterias que mostraron los más altos índices enzimáticos tuvieron su gen 16S secuenciado. Después de confirmar la posición filogenética de bacterias, las pruebas para determinar la actividad de endoglucanasa (CMCasa) y endo-y exoglucanasas (FPasa) se realizaron. Para determinar el peso molecular y la actividad de las enzimas carreras con geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y zimografía se realizaron. Para esta prueba las bacterias se cultivaron en medio con 1% de CMC adición de 0,5% de extracto de levadura y se incubaron durante 7 días.

## **3. Resultados y Discusión**

Con el objetivo de evaluar la diversidad de microorganismos en el tracto intestinal de tres invertebrados en seis dietas diferentes, este estudio demostró que el principal factor que contribuye a la agrupación de los perfiles fue el origen del DNA microbiano, es decir, las especies de invertebrados, que era posible observar la formación de clusters en diferentes niveles de similitud, estos resultados quedan diferencias en grados de intimidad y la complejidad de la comunidad de microorganismos asociados con el tracto intestinal de los diferentes saprófagos. Un análisis global de la diversidad bacteriana asociada con el tracto intestinal de tres especies de invertebrados revela un muy bajo solapamiento entre las comunidades (10% de similitud).

En general, los perfiles de bandas obtenidos revelaram no hay fuertes diferencias entre las dietas mediante la técnica de DGGE. La similitud más alta en el dendrograma fueron algunos de los perfiles de los individuos de la misma especie de invertebrados. Una hipótesis para la baja influencia de la dieta entre los perfiles de las comunidades, es que el período de recolección de la muestra (60 días de incubación) puede no ser ideal para comprobar este efecto. En este caso, el largo período de incubación, había un stand-por el cual sin embargo

puede haber proporcionado una estabilización de la población microbiana en el tracto intestinal de los tres invertebrados estudiados.

Veintitrés bacterias asociadas con la porción final (intestino grueso) del tracto intestinal de los animales saprófagos, que mostraron mayor actividad celulolítica correspondían a la enzima proporciones que van de 3,0 a 5,0. El T2T3, T4T3, T3C5 y aislamientos T1P1 fueron aislados que mostraron los valores más altos para el índice enzimática, es decir, 5.0. En general, cuanto mayor el índice mayor es la cantidad o intervalo de celulasa libera en el medio. El resto de los aislados mostraron que los índices iban de 3,0 a 4,5.

Basado en el análisis de secuencia de la relación filogenética de los aislados tenía la región secuenciada 16S rDNA fue establecido. La más frecuente fue phylum Actinobacteria, las bacterias que pertenecen al género *Streptomyces* y con menor frecuencia las bacterias phylum Firmicutes de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* fueron identificados que se observa.

#### 4. Conclusiones

Los perfiles de bandas de DGGE para las bacterias y los dominios Actinobacteria eran diferentes, sin embargo los perfiles de invertebrados de la misma especie fuertemente agrupadas después de 60 días de incubación;

Dietas influenciados sutilmente diversidad. La presencia de leguminosas Gliricidia, la composición de las dietas que se ofrecen a los invertebrados, respondió de manera significativa, los perfiles de DGGE para los dos dominios, Bacteria y Actinobacteria, con similitudes superiores a 70%, dentro de las especies *Trigoniulus corallinus* y *Cubaris murina*. Perfiles con baja similitud se encontraron con el tratamiento T1 (Flemingia + + hierba de cartón) que está distanciado de los otros tratamientos, la separación de la especie *Trigoniulus corallinus* y *Pycnoscelus surinamensi* sus grupos.

Los clones obtenidos a partir de bandas incisas, se encontraron secuencias afiliadas tres phyla Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes;

De los datos aquí reportados diversidad bacteriana está estrechamente relacionado con los invertebrados propia. Que presentan en su tracto digestivo, las bacterias especializadas para su nutrición e importante en la producción de compuestos antimicrobianos en la defensa contra los patógenos presentes en los alimentos ingeridos.

En conclusión, los aislados mostraron una actividad enzimática, incluyendo complejo mayor de celulasas, con capacidad de liberar glucosa a partir de CMC y pasto elefante.

El tracto intestinal de tres especies de invertebrados saprófagos demostró un entorno propicio para la prospección de las bacterias con el medio ambiente la eficiencia celulolítica, lo que demuestra su potencial para futuros estudios biotecnológicos.

**Palabras-clave:** Simbiosis. DGGE. Prospección de bacterias.

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Tratamentos de resíduos vegetais oferecidos para o diplópode da espécie <i>Trigoniulus corallinus</i> (GERVAIS, 1847). .....  | 18 |
| <b>Tabela 2.</b> Sequências de nucleotídeo e grupo alvo dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação de PCR/DGGE do fragmento do gene 16S rDNA. ....  | 23 |
| <b>Tabela 3.</b> Classificação das sequências de clonagem para o domínio <i>Bacteria</i> , das de bandas DGGE, mediante análise comparativa entre BLAST e as de sequencias do NCBI. ....   | 35 |
| <b>Tabela 4.</b> Índices enzimáticos dos isolados mais promissores, obtidos do trato intestinal de <i>Trigoniulus corallinus</i> , <i>Cubaris murina</i> e <i>Pycnoscelus surinamensis</i> . ....  | 51 |
| <b>Tabela 5.</b> Características genética de isolados bacterianos oriundos do Trato Intestinal de Invertebrados Saprófagos, sequências do gene 16S rDNA, obtidas e comparadas com o banco de dados NCBI ( <a href="http://www.nlm.nih.gov">www.nlm.nih.gov</a> ) utilizando o programa BLAST. ....                                       | 54 |
| <b>Tabela 6.</b> Isolados selecionados para as análises enzimáticas. ....  | 56 |
| <b>Tabela 7.</b> Atividade enzimática (UEA ml/min) de CMCase (endoglucanase) em isolados de <i>Streptomyces</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> e <i>Bacillus</i> em função do meio de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose) e do tempo do tempo de incubação. ....  | 59 |
| <b>Tabela 8.</b> Atividade enzimática (UEA ml/min) de CMCase (endoglucanase) em isolados de <i>Streptomyces</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> e <i>Bacillus</i> em função do meio de cultivo Capim – Elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) e do tempo do tempo de incubação. ....                                    | 60 |
| <b>Tabela 9.</b> Atividade enzimática (UEA ml/min) de FPase (complexo enzimático endoglucanase e exoglucanase) em isolados de <i>Streptomyces</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> e <i>Bacillus</i> em função do meio de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose) e do tempo do tempo de incubação. ....                      | 62 |
| <b>Tabela 10.</b> Atividade enzimática (UEA ml/min) de FPase (complexo enzimático endoglucanase e exoglucanase) em isolados de <i>Streptomyces</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> e <i>Bacillus</i> em função do meio de cultivo Capim – Elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) e do tempo do tempo de incubação. .... | 63 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura da Celulose. Fonte: Fengel & Wegener (1989). ..... 4
- Figura 2.** Estrutura de Hemicelulose. Fonte: Mussato (2002). ..... 5
- Figura 3.** Precursores primários da Lignina. Fonte: Bom *et al* (2008). ..... 6
- Figura 4.** Área de experimentação de resíduos orgânicos oferecidos aos diplópodes no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) Seropédica, RJ. .... 19
- Figura 5.** (A) *Trigoniulus corallinus* (GERVAIS, 1847) (Diplopoda: Spirobolida). (B) *Cubaris murina* (Brandt, 1833) (Crustacea: Isopoda) e (C) *Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blaberidae). **Fotos A e B:** Maria Elizabeth Fernandes Correia, **Foto C:** Rafael Nogueira Scoriza). ..... 20
- Figura 6.** (A) Diagrama esquemático do trato intestinal *Craspedosoma alemannicum* com o trato intestinal seccionado em Foregut, Midgut e Hindgut (modificado de Köhler et al., 1991). (B) Anatomia do sistema O sistema digestivo de *Porcellio scaber*. (S) vista dorsal do estômago, (MG) glândula do intestino médio, (AC) hindgut consistindo de câmara anterior, com tifossolo (T), (P) papilata região e (R) reto (Kostanjšek et al., 2006). (C) Morfologia do trato intestinal de Dictyoptera (F) intestino anterior, (M) intestino médio, (C) colon e (R) reto (Brune, 2006). ..... 20
- Figura 7.** Trato digestivo de *Trigoniulus corallinus*. A: Diplópode ainda intacto já desinfestado superficialmente. B: Diplópode com carapaça retirada e o trato intestinal ou “gut” exposto. C: Figura detalhando as divisões do trato intestinal em intestino média ou “midgut”, zona de tamponamento (transição), intestino posterior ou “hindgut” e ânus (Final gut). (Esquema: Passos, 2010). ..... 21
- Figura 8.** Gel de agarose a 1,0% contendo DNA amplificado das seguintes amostras: **A - *Trigoniulus corallinus*:** Marcador 1Kb, 1 (T1T), 2(T2T), 3(T3T), 4(T4T), 5(T5T), 6(T6T), **B - *Cubaris murina*:** Marcador 1Kb,1(T1C), 2(T2C), 3(T3C), 4(T4C), 5(T5C), 6(T6C); **C - *Pycnoscelus surinamensis*:** Marcador 1Kb; 1(T1P), 2(T2P), 3(T3P), 4(T4P), 5(T5P), 6(T6P). ..... 25
- Figura 9.** PCR-DGGE de amostras de DNA total isolado a partir do trato intestinal de três espécies de invertebrados saprófagos, submetidos a seis diferentes dietas. ***Trigoniulus corallinus*:** (T1T), (T2T), (T3T), (T4T), (T5T), (T6T); ***Cubaris murina*:** (T1C), (T2C), (T3C), (T4C), (T5C), (T6C); ***Pycnoscelus surinamensis*:** (T1P), (T2P), (T3P), (T4P), (T5P), (T6P). Dendrograma de similaridade foi calculado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de correlação Pearson. A análise foi conduzida no programa Gel Compare (BioNumerics Applied Maths). ..... 27
- Figura 10.** Gel de agarose a 1,0% contendo DNA amplificado para actinobacteria das seguintes amostras: **A - *Trigoniulus corallinus*:** Marcador 1Kb, 1 (T1T), 2(T2T), 3(T3T), 4(T4T), 5(T5T), 6(T6T), **B - *Cubaris murina*:** Marcador 1Kb,1(T1C), 2(T2C), 3(T3C), 4(T4C), 5(T5C), 6(T6C); **C - *Pycnoscelus surinamensis*:** Marcador 1Kb; 1(T1P), 2(T2P), 3(T3P), 4(T4P), 5(T5P), 6(T6P). ..... 28
- Figura 11.** PCR-DGGE domínio actinobacteria, de amostras de DNA total isolado a partir do trato intestinal de três espécies de invertebrados saprófagos, submetidos a seis diferentes dietas. ***Trigoniulus corallinus*:** (T1T), (T2T), (T3T), (T4T), (T5T), (T6T); ***Cubaris murina*:** (T1C), (T2C), (T3C), (T4C), (T5C), (T6C); ***Pycnoscelus surinamensis*:** (T1P),

- (T2P), (T3P), (T4P), (T5P), (T6P). Dendrograma de similaridade foi calculado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de correlação Pearson. A análise foi conduzida no programa Gel Compare (BioNumerics Applied Maths)..... 30
- Figura 12.** PCR-DGGE domínio *Bacteria*, de amostras de DNA total isolado a partir do trato intestinal de três espécies de invertebrados saprófagos, submetidos a seis diferentes dietas. *Trigoniulus corallinus*: (T1T), (T2T), (T3T), (T4T), (T5T), (T6T); *Cubaris murina*: (T1C), (T2C), (T3C), (T4C), (T5C), (T6C); *Pycnoscelus surinamensis*: (T1P), (T2P), (T3P), (T4P), (T5P), (T6P). ..... 31
- Figura 13.** Placa de meio LB/ampicilina. As colônias brancas, indicada pela seta, indicam a presença do vetor/ inserto nas células competentes de *E.coli* DH5  $\alpha$ . Os clones foram comparados com base de dados de sequências de rDNA 16S do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e foram classificadas, mediante a criação de grupos de afiliação filogenética. .... 32
- Figura 14.** Separação dos plasmídeos digeridos pGEM..... 32
- Figura 15:** Primeiro Hit, das sequências de clonagem para o domínio *Bacteria*, das bandas de DGGE. .... 33
- Figura 16.** Segundo Hit, das sequências de clonagem para o domínio *Bacteria* das bandas de DGGE. A) Filo, B) Família e C) Genêro. .... 34
- Figura 17.** Árvore filogenética dos clones identificados oriundos do Trato da Intestinal de Animais Saprófagos. A diversidade correspondente ao sequenciamento parcial de 447pb do gene 16S rDNA. A similaridade entre as sequências dos isolados e as existentes no GenBank foram correlacionadas a partir de suas similaridades e agrupadas pelo método *Neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* também são apresentados, sendo calculados por 1000 sub-amostragem no grupo das sequências. Foi utilizando o programa MEGA 5.1..... 38
- Figura 18.** Colônias bacterianas com cinco dias de crescimento em meio de carboximetilcelulose..... 50
- Figura 19.** Gel de agarose a 1,0% contendo DNA amplificado dos seguintes isolados: **A** - *Trigoniulus corallinus*: Marcador 1Kb, 1 (T1T1), 2(T1T2), 3(T2T3), 4(T3T4), 5(T3T5), 6(T4T3), 7(T5T3), 8(T6T4); **B** - *Cubaris murina*: Marcador 1Kb,1(T1C1), 2(T1C4), 3(T2C3), 4(T2C4), 5(T3C5), 6(T4C4), 7(T5C1), 8(T6C2); **C** - *Pycnoscelus surinamensis*: Marcador 1Kb; 1(T1P1), 2(T2P2), 3(T3P3), 4(T3P4), 5(T4P5), 6(T5P5), 7(T6P4). (1500pb)..... 53
- Figura 20.** Árvore filogenética dos isolados identificados oriundos do Trato da Intestinal de Animais Saprófagos. A diversidade correspondente ao sequenciamento parcial de 1423pb do gene 16S rDNA. A similaridade entre as sequências dos isolados e as existentes no GenBank foram correlacionadas a partir de suas similaridades e agrupadas pelo método *Neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* também são apresentados, sendo calculados por 1000 sub-amostragem no grupo das sequências. Foi utilizando o programa MEGA 5.1 ♦: Isolados do trato intestinal de *T. corallinus*; ◆: *C. murina* e ◆: *P. surinamensis*. .. 55
- Figura 21.** Curva de crescimento dos isolados em com 1% CMC (carboxi-metil-celulose), em agitação de 120 r.p.m, por durante 11 dias a 30° C. A) Absorbância dos isolados do gêneros *Staphylococcus saprophyticus*, *Paenibacillus chondroitinus* e *Bacillus methylotroohicus*. B) Média da massa celular dos isolados do gênero *Streptomyces*. ..... 57

- Figura 22.** Atividade enzimática de CMCase ao longo do crescimento bacteriano utilizando duas fontes de carbono, CMC e Capim- elefante. A figura esta representada com seis isolados sendo eles: (A) *Staphylococcus saprophyticus*, (B) *Streptomyces yanglinensis*, (C) *Bacillus methylotroohicus*, (D) *Paenibacillus chondroitinus*, (E) *Streptomyces mexicanus* (F) *Streptomyces althioticus*. Cultivados por 12 dias. .... 65
- Figura 23.** Atividade enzimática de FPase (Celulase Total) ao longo do crescimento bacteriano utilizando duas fontes de carbono, CMC e Capim- elefante. A figura esta representada com seis isolados sendo eles: (A) *Staphylococcus saprophyticus*, (B) *Streptomyces viridodiastaticus*, (C) *Bacillus methylotroohicus*, (D) *Paenibacillus chondroitinus*, (E) *Streptomyces mexicanus* (F) *Streptomyces althioticus*. Cultivados por 12 dias. .... 67
- Figura 24.** Média de atividade enzimática de CMCase e FPase, com os diferentes meios de cultivo CMC : carboxi-metil-celulose e Capim- Elefante (*Pennisetum purpureum*) por cada dia de incubação. Barras de erro representam o erro padrão, letras iguais não diferem seguido teste de Wilconxon a 5% de similaridade. .... 68
- Figura 25.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE -12%), (M) Marcador molecular, (1) *Streptomyces parvulus*, (2) *Streptomyces griseoaurantiacus*, (3) *Streptomyces werraensis*, (4) *Streptomyces viridodiastaticus*, (5) *Staphylococcus saprophyticus*, (6) *Streptomyces albogriseolus*, (7) *Streptomyces carnosus*, (8) *Streptomyces thinghirensis*, (9) *Streptomyces yanglinensis*, (10) *Paenibacillus chondroitinus*, (11) *Bacillus methylotroohicus*, (12) *Streptomyces althioticus*, (13) *Streptomyces collinus*, (14) *Streptomyces viridochromogenes*, (15) *Streptomyces coerulescens*, (16) *Streptomyces mexicanus*. .... 71
- Figura 26.** Gel de poliacrilamida (Zimograma -12%), (M) Marcador molecular, (1) *Streptomyces parvulus*, (2) *Streptomyces griseoaurantiacus*, (3) *Streptomyces werraensis*, (4) *Streptomyces viridodiastaticus*, (5) *Staphylococcus saprophyticus*, (6) *Streptomyces albogriseolus*, (7) *Streptomyces carnosus*, (8) *Streptomyces thinghires*, (9) *Streptomyces yanglinensis*, (10) *Paenibacillus chondroitinus*, (11) *Bacillus methylotroohicus*, (12) *Streptomyces althioticus*, (13) *Streptomyces collinus*, (14) *Streptomyces viridochromogenes*, (15) *Streptomyces coerulescens*, (16) *Streptomyces mexicanus*. .... 71



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 1  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 3  |
| 2.1 Resíduos Vegetais.....  | 3  |
| 2.1.1 Celulose .....  | 3  |
| 2.1.2 Hemicelulose.....   | 4  |
| 2.1.3 Lignina .....   | 5  |
| 2.2 Biodegradação de Resíduos Vegetais .....  | 6  |
| 2.2.1 Invertebrados saprófagos .....  | 6  |
| 2.2.2 Microrganismos de interesse na biodegradação de material vegetal.....   | 7  |
| 2.3 Estudos de Interações entre Invertebrados e Microrganismos .....  | 9  |
| 2.4 Avaliação da Diversidade Microbiana com Ferramentas Moleculares .....   | 10 |
| 2.5 Celulases.....  | 11 |
| <b>3 CAPÍTULO I - DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO TRATO DIGESTIVO DE INVERTEBRADOS SAPRÓFAGOS</b> .....                             | 13 |
| 3.1 RESUMO .....  | 14 |
| 3.2 ABSTRACT .....  | 15 |
| 3.3 INTRODUÇÃO .....  | 16 |
| 3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 18 |
| 3.4.1 Coleta e descrição dos invertebrados saprófagos.....  | 18 |
| 3.4.2 Extração do trato intestinal posterior (hindgut), dos invertebrados saprófagos.....   | 21 |
| 3.4.3 Extração do DNA da comunidade bacteriana associado à porção final (hindgut) do trato intestinal dos invertebrados saprófagos..... | 21 |
| 3.4.4 Iniciadores universais para DGGE, usados para a amplificação do gene 16S rDNA.....  | 21 |
| 3.4.5 Iniciadores para o grupo Actinomicetos para DGGE, usados para a amplificação do gene 16S rDNA .....                               | 22 |
| 3.4.6 Iniciadores domínio Bacteria para DGGE, usados para a amplificação do gene 16S rDNA e clonagem de bandas .....                    | 22 |
| 3.4.7 Eletroforese em gel de agarose.....   | 23 |
| 3.4.8 Análises por PCR-DGGE (Gel de eletroforese em gradiente de desnaturante).....   | 23 |
| 3.4.9 Amostras para clonagem em vetor .....   | 24 |
| 3.4.10 Análise filogenética das sequências .....  | 24 |
| 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 25 |
| 3.5.1 Análise de diversidade através do 16S rDNA utilizando iniciadores universais ...  | 25 |
| 3.5.2 Análise de diversidade através do 16S rDNA utilizando iniciadores para Actinobactérias .....                                      | 28 |
| 3.5.3 Análise de sequências de bandas extraídas dos géis de DGGE .....  | 30 |
| 3.5 CONCLUSÕES .....  | 39 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4 CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E AVALIAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO INTESTINAL DE INVERTBRADOS SAPRÓFAGOS.....</b> | <b>40</b> |
| 4.1 RESUMO .....   | 41        |
| 4.2 ABSTRACT .....   | 42        |
| 4.3 INTRODUÇÃO .....   | 43        |
| 4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 45        |
| 4.4.1 Seleção de microrganismos com capacidade celulolítica .....  | 45        |
| 4.4.2 Identificação de atividades celulolíticas .....  | 45        |
| 4.4.3 Extração de DNA .....  | 45        |
| 4.4.4 Amplificação do gene 16S rRNA.....   | 46        |
| 4.4.5 Eletroforese em gel de agarose.....  | 46        |
| 4.4.6 Purificação do rDNA 16S presente nas “bandas” do gel de agarose .....  | 46        |
| 4.4.7 Análise das sequencias do gene 16S rDNA .....  | 47        |
| 4.4.8 Curva de crescimento .....   | 47        |
| 4.4.9 Produção de enzimas em CMC (carboxi-metil-celulose).....   | 47        |
| 4.4.10 Produção de enzimas em capim-elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) .....   | 47        |
| 4.4.11 Determinação da atividade de CMCase.....  | 47        |
| 4.4.12 Determinação da atividade de FPase .....  | 48        |
| 4.4.13 Curva de calibração .....   | 48        |
| 4.4.14 Análise através de zimograma para celulase e protease .....   | 48        |
| 4.4.15 Análise através de eletroforese desnaturante SDS-PAGE.....  | 48        |
| 4.4.16 Análise estatística .....   | 49        |
| 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 50        |
| 4.5.1 Seleção dos microrganismos com capacidade celulolítica em placas com carboxi-metil- celulose (CMC).....  | 50        |
| 4.5.2 Identificação filogenética do gene 16S rDNA dos 23 isolados.....   | 52        |
| 4.5.3 Seleção dos isolados e curva de crescimento.....   | 56        |
| 4.5.4 Produção de CMCase e FPase dos isolados submersas em CMC (carboxil- metil-celulose) e ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) capim- elefante.....                       | 57        |
| 4.5.5 Influência dos tratamentos sobre a atividade enzimática produzida pelos isolados.....  | 68        |
| 4.5.6 Análises das enzimas pela técnica eletroforética de zimograma e SDS-PAGE .....   | 69        |
| 4.4 CONCLUSÕES .....   | 72        |
| 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....   | 73        |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 74        |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A interação entre invertebrados e microrganismos edáficos, é um fator chave para a ciclagem de nutrientes no solo e indispensável para o bom funcionamento dos ecossistemas. A complexidade destas interações ultrapassa a decomposição da matéria orgânica e caracterizam-se pela exploração de novos nichos, como por exemplo, o trato digestivo dos animais ou os coprólitos dos invertebrados, tendo como consequência uma ampla variedade de comunidades microbianas com diferentes níveis de diversidade.

Os invertebrados do solo apresentam uma exuberante diversidade de espécies com as mais variadas funcionalidades. Dentre eles, os saprófagos invertebrados da fauna especializados no consumo e fragmentação da matéria orgânica do solo, atuando nas fases iniciais do processo de decomposição dos materiais vegetais expostos sobre o solo, através da ação de fragmentação. Os microrganismos por sua vez, são operadores essenciais dentro do intestino de muitos macro-invertebrados, produzindo uma série de enzimas degradantes (Hopkin & Read, 1992). Geralmente estas bactérias são de vida livre, ou estão associadas com os organismos superiores.

De acordo com Correia (2003), os tipos de associação que ocorre entre os microrganismos e invertebrados de solo são tão ou mais diversos quantas essas duas comunidades. Apesar da imensa diversidade de organismos presente no solo, pesquisas sobre associação de invertebrados com micror-organismos ainda são escassas. O conhecimento desta associação pode atingir os mais diferentes campos do conhecimento, principalmente nas áreas biotecnológicas, como por exemplo, a simbiose de invertebrados do solo com microrganismos para a decomposição de polímeros estruturais de ligninocelulose, que vem sendo amplamente estudada, principalmente no que tange a simbiose em térmitas (Tokuda & Watanabe, 2007), para fins de produção de bioenergia (Ohkuma, 2008). Segundo este autor, a capacidade dos térmitas em degradar complexos ligninocelulósicos ocorre devido à comunidade microbiana especializada composta por protozoários flagelados e procariotos.

É importante ressaltar que os mecanismos de associação fauna e microrganismos são diferenciados, ou seja, as atuações podem ser tanto no meio interno “no intestino”, quanto no meio externo “no solo ou serapilheira”. Lavelle *et al.* (1995 *apud*, Correia, 2003), agrupam essas interações em quatro tipos distintos: (I) digestão direta de microrganismos pelos invertebrados do solo, que em alguns casos podem ser uma fonte nutricional importante para a fauna do solo (Byzov *et al.*, 1998), (II) ocorrência de um “rúmen externo”, que permite a ação de microrganismos nas fezes dos invertebrados, promovendo uma maior disponibilidade de nutrientes (Martin & Mariniessen, 1993), (III) mutualismos facultativo, onde a microflora é ingerida acidentalmente com o solo ou a serapilheira, e encontra no tubo digestivo dos invertebrados uma condição favorável para a sua multiplicação, (IV) simbioses obrigatórias, interação entre térmitas inferiores e protozoários flagelados e bactérias, em regiões especializadas do tubo digestivo

Evidências recente, indicam que as enzimas celulolíticas são produzidas em uma ampla variedade de invertebrados saprófagos, os quais utilizam biomassa celulósica como alimento, no entanto para que ocorra digestão deste material ingerido, é necessária uma simbiose intestinal. Atualmente pesquisas científicas estão sendo realizadas no Brasil e em vários países para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos com base na prospecção da variabilidade que existe entre os sistemas biológicos e que podem ser aperfeiçoados para gerar bioprocessos para degradação de resíduos vegetais, até então ignorados, e que representam um campo à inovação tecnológica.

O desenvolvimento de tecnologia capaz de transformar esses resíduos da agroindústria ou mesmo de outros subprodutos e produtos agrícolas com potencial futuro, principalmente na geração de agroenergia, pode ser estratégico para a valorização comercial, aproveitamento e geração de divisas. Com a efervescência dos programas energéticos derivados da biomassa, buscam-se freneticamente matérias-primas que sejam baratas, possíveis de se obter em grandes quantidades e que possam gerar novos produtos e tecnologias através de processos com baixo investimento energético.

Assim, a possibilidade de se desenvolver novos processos biotecnológicos com base na prospecção da diversidade microbiana é imensa, em decorrência da grande variabilidade que existe entre os sistemas biológicos e que podem ser aperfeiçoados para melhorar os sistemas de produção agrícolas de forma sustentável. Desta forma, a prospecção destes microrganismos de interesse tem maiores chances de sucesso se for orientada para sítios específicos de alta atividade celulolítica do que se for aleatória.

Com base nestas informações, a hipótese deste trabalho é que os invertebrados saprófagos, o gongolo *Trigoniulus corallinus*, o tatuzinho-de-jardim *Cubaris murina* e a barata *Pycnoscelus surinamensis*, são sítios com alto potencial de prospecção de microrganismos degradadores de compostos lignocelulósicos e que a comunidade microbiana associada ao tubo digestivo varia em função da espécie de invertebrado.

Assim o objetivo geral deste estudo foi investigar a diversidade microbiana do trato intestinal de três espécies de invertebrados *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensis*, utilizando técnicas moleculares. Além disso, avaliamos a capacidade celulolíticas de vinte e três isolados bacterianos oriundos do trato intestinal dos invertebrados estudados.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

Analisar a comunidade bacteriana do trato intestinal das três espécies de invertebrados, submetidos a diferentes dietas no período de sessenta dias de incubação;

Comparar a comunidade bacteriana entre as três espécies;

Analisar isolados com potencial enzimático.

Para melhor apresentar os resultados, a tese foi dividida em dois capítulos, que são conduzidos por uma revisão de literatura, com uma abordagem geral do assunto.

Capítulo I: Diversidade bacteriana associada ao trato digestivo de invertebrados saprófagos.

Capítulo II: Identificação filogenética e avaliação de enzimas celulolíticas dos microrganismos de invertebrados saprófagos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Resíduos Vegetais

Os resíduos vegetais, também chamados de materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, representando 50 % da biomassa terrestre (Sarko, 1997) abrangendo a maioria dos materiais agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras de angiospermas e gimnospermas. A geração de resíduos vegetais vem crescendo demasiadamente, em função da alta atividade agrícola (Correia, 2009). Estima-se que anualmente são produzidos em todo o mundo cerca de 20 a 50 bilhões de toneladas de material lignocelulósico, dos quais apenas quatro bilhões de toneladas são efetivamente utilizados (Ashwini & Sridhar, 2005), entretanto sugere-se que estes materiais tenham um aproveitamento mais racional (Bon et al., 2008).

A biomassa lignocelulósica refere-se à parte vegetal que forma a parede celular, formada por agrupamentos de macromoléculas de natureza heterogênea, com composição química muito diversificada. Constituída por três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina), caracterizada por uma matriz dura e fibrosa, que contém 30-40% de celulose, 25-30% de hemicelulose e 25-30% de lignina, onde também estão presentes compostos como pectinas, proteínas, carboidratos solúveis, terpenos, alcalóides, saponinas, polifenóis, gorduras, etc (Mohan et al., 2006).

Do ponto de vista tecnológico, os carboidratos contidos na parede celular na forma celulósica (glicose) e hemicelulósicas (fucose, arabinoses, galactoses, glicose, xilose e manose) representam os substratos que podem ser convertido em bioprodutos. Entretanto, a complexidade das interligações das três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) na estrutura da parede celular, é o principal desafio na recuperação dos carboidratos (monômeros) com elevado grau de pureza (Sun & Cheng, 2002).

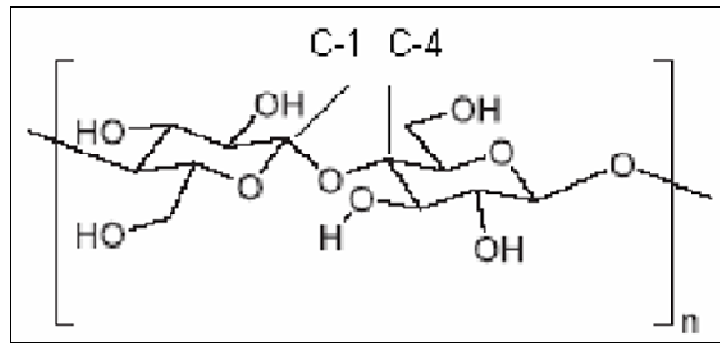
Desta forma a degradação dos materiais lignocelulósicos é um evento importante no processo de ciclagem do carbono devido à abundância desses materiais na maioria dos ecossistemas terrestres. De acordo com Singh & Gupta (1977) a formação da matéria orgânica a partir dos materiais lignocelulósicos, desempenha um papel relevante na determinação da estrutura e função de um ecossistema, por sua atuação como fonte de energia para organismos heterotróficos e como reservatório de nutrientes para a ciclagem dentro de um ecossistema.

#### 2.1.1 Celulose

A celulose é um polímero natural, um homopolissacarídeo linear constituído unicamente por moléculas de glicose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1,4) (Figura 1) que resultam da perda de uma molécula de água (Fengel & Wegener, 1989). Sua fórmula geral é  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , estas cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, que são rígidas e em forma de fita (Bon et al., 2008), formando dois monômeros de glicose adjacentes que são ligados pela eliminação de uma molécula de água, e esta ligação química dá origem à molécula de celobiose.

A molécula de celulose pode conter até 10.000 unidades de glicose (Fengel & Wegener, 1989). Esta organização molecular determina a propriedade mecânica da célula e promove o suporte e resistência da parede celular (Emons et al., 2002). Na estrutura microfibrilar da celulose existem diferentes graus de ordenação, desde regiões cristalinas muito ordenadas a regiões de menor ordenação (amorfa). Estas características conferem à molécula elevada resistência à hidrólise ácida e enzimática (Zhang & Lynd, 2004a).

A celulose quando hidrolisada com ácidos ou enzimas produz exclusivamente monômeros de glicose (Klemm et al., 2005). A glicose pode ser fermentada para produzir etanol ou entrar em uma cadeia reacional industrial e produzir inúmeros compostos tais como: etileno, buteno, propileno, ácidos acrílicos, poliésteres entre outros (Schuchardt, 2001). Assim a molécula de celulose tem enorme valor comercial para diversos setores industriais (Englehardt, 1995).



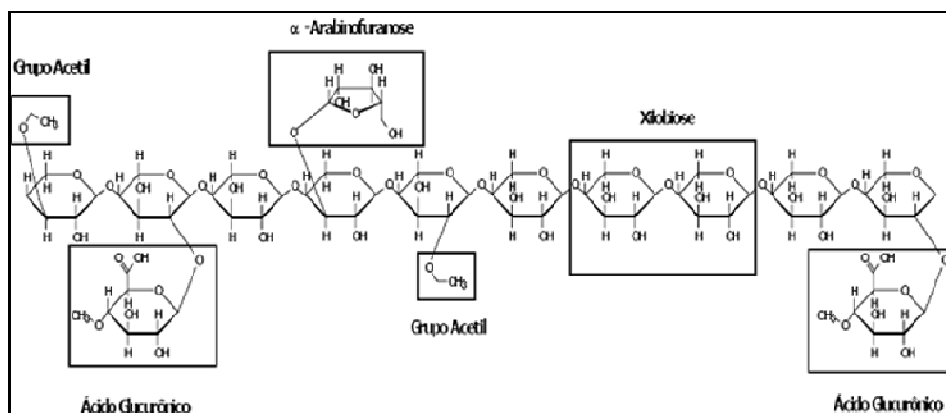
**Figura 1:** Estrutura da Celulose. Fonte: Fengel & Wegener (1989).

### 2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeos com cadeias menores que a celulose, porém com muitas ramificações (Brogatto, 2010). As cadeias hemicelulósicas são formadas por diversos grupos distintos de polissacarídeos constituídos por açúcares do grupo das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (Fengel & Wegener, 1989) (Figura 2).

O principal componente da fração hemicelulósica é a xilana, polímero constituído por unidades de xilose, facilmente hidrolisada com ácidos minerais (Khuad & Singh, 1993). A xilana possui estrutura linear constituída de xilopiranosil unidos por ligações  $\beta$  (1,4). Esta hemicelulose faz ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e lignina, formando o complexo lignina- carboidratos (*Lignin- Carbohydrate Complexes – LLC*) (Lawoko et al., 2005).

As duas principais enzimas capazes de despolimerizar a cadeia de hemicelulose são a endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase e a endo-1,4- $\beta$ -D-mananase, ambas glicosil hidrolases (Singh et al., 2003). Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, e é, portanto, mais suscetível a hidrólise química sob condições mais brandas. As hemiceluloses são decompostas por um conjunto de microrganismos, em particular fungos filamentosos e actinomicetos (Bon et al., 2008).



**Figura 2.** Estrutura de Hemicelulose. Fonte: Mussato (2002).

### 2.1.3 Lignina

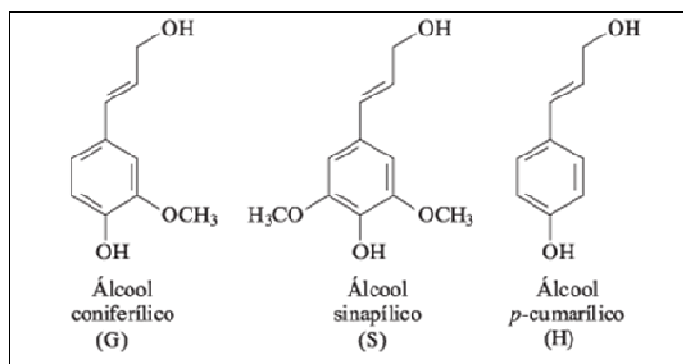
A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na superfície terrestre, sua decomposição é indispensável para a reciclagem do carbono, representando um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza. A lignina retém 50% mais carbono do que a celulose sendo o maior depósito natural de estrutura química aromática, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química (Bon et al., 2008). A biodegradação da lignina é um processo oxidativo que envolve um complexo sistema enzimático extracelular de baixa especificidade, produzidas por fungos que vivem em madeiras, entre os quais o fungo *Phanaerochatae chysosporiu* e algumas bactérias, em especial os actinomicetos, que são capazes de degradar a lignina (Bon et al., 2008). As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina são: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. De acordo com Breen & Singleton (1999), essas enzimas apresentam grande potencial de utilização na indústria de papel e no tratamento de efluentes recalcitrantes.

Sua estrutura química é apresentada por um polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominado  $C_6C_3$  ou, simplesmente, unidades  $C_9$ , repetidas de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico (Saliba et al., 2001). É caracterizada por apresentar rigidez, impermeabilidade à água, resistência mecânica e ataque de microrganismos nos tecidos vegetais. Com base em sua suscetibilidade relativa à hidrólise Lapierre (1993) classificou a lignina em *não core* e *core*.

*Lignina não core*: consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é representada por ácidos *p*-hidroxicinâmico éster-ligados.

*Lignina core*: consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem (Figura 3).

Lai & Sarkanem (1971) observaram que a quantidade relativa da fração molar de aldeídos produzidos pela reação de oxidação com nitrobenzeno é um indicador da abundância relativa das unidades  $C_9$  (H,G e S). Assim em uma classificação inicial de ligninas segundo a presença dessas unidades, tem-se que: ligninas de madeiras duras, ou angiospermas, são formadas principalmente de unidades G e S; ligninas de madeiras moles, gimnospermas, são formadas fundamentalmente de unidade G; ligninas de gramíneas compreendem G-S-H. Porém, existem ligninas de certas espécies de gimnospermas e de gramíneas que apresentam abundância de G e S (Chen, 1991).



**Figura 3.** Precursores primários da Lignina. Fonte: Bon *et al* (2008).

## 2.2 Biodegradação de Resíduos Vegetais

A biodegradação de resíduos vegetais é um processo natural da reciclagem de matéria orgânica e a compreensão deste processo contribui no entendimento do ciclo natural do carbono, que tem início na biossíntese dos seus constituintes a partir de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e energia solar e termina com a mineralização destes constituintes e liberação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, em decorrência da decomposição causada principalmente por fungos, por apresentarem maior eficiência na biodegradação (Arantes & Milagres, 2009), embora outros microrganismos possam estar envolvidos na biodegradação, dentre eles, alguns parasitas e bactérias (Fengel & Wegener, 1989). Os invertebrados saprófagos atuam neste processo. De acordo com Facelli & Pickett, (1991) a ordem dos eventos de biodegradação são: (I) quebra e fragmentação do material vegetal, por invertebrados saprófagos, (II) digestão do material vegetal ingerido pelos invertebrados saprófagos, (III) e a degradação enzimática de compostos químicos presentes no material vegetal, por enzimas liberadas pelos microrganismos presentes no solo; e associados com o tudo digestivo dos invertebrados saprófagos.

### 2.2.1 Invertebrados saprófagos

Em ecossistemas terrestres incluem representantes de diferentes ordens de invertebrados que desempenham o papel de fragmentar os resíduos vegetais. Como exemplos podem ser citados os gongolos, que são os miriápodes da classe Diplopoda, tatuzinhos-de-jardim, que são crustáceos da ordem Isopoda (Crustacea, Isopoda) (Showalter, 2006) e inúmeras ordens de insetos, como as baratas (Blattodea), cupins (Isoptera), Archaeognatha, Thysanura, Psocoptera e algumas espécies de Coleoptera (Hopkin & Read 1992).

Os diplópodes e isópodes estão distribuídos geograficamente em quase todas as regiões de clima temperado e tropical, em áreas oceânicas, em grandes altitudes e florestas de várzea a desertos (Vandel, 1945; Crawford, 1991; Adis & Junk, 2002; Golovatch & Kime, 2009; David & Handa, 2010). Ambos apresentam um estilo de vida muito semelhante, desde hábito alimentar até habitat. Na sua maioria vivem na serapilheira, sendo que algumas espécies são encontradas em diferentes profundidades no solo, estão presentes também em pilhas de compostagem, o que mostra sua eficiência na digestão e decomposição do material vegetal. Entretanto vale ressaltar que ambos são decompositores primários, pois são eficientes em promover a fragmentação da serapilheira.

A ordem Blattodea, apresenta um estilo de vida muito distinto dos diplópodes e isópodes, a maioria habita as florestas (Pellens & Grandcolas, 2008a) e menos de vinte espécies são consideradas sinantrópicas (que vivem associadas ao ambiente humano), e cinco destas, *Blatella germanica* (Linnaeus, 1758), *Supella longipalpa* (Fabricius, 1798), *Periplanet*



*americana* (Linnaeus, 1758), *P. australasiae* (Fabricius, 1798) e *Blatta orientalis* (Linnaeus, 1758) são praticamente onipresentes nas habitações humanas em diversas regiões do mundo (Grandcolas, 1998a). Algumas espécies que habitam locais como jardim, florestas e sistemas agrícolas, são considerados saprófagos, e em alguns casos são consideradas pragas.

Alguns invertebrados saprófagos que habitam o solo, também são classificados conforme a sua funcionalidade no ambiente. No caso dos diplópodes, isópodes e outros artrópodes não-sociais, são classificados como “Transformadores da Serapilheira” (Lavelle et al., 1997; Wardle, 2002), que compreendem organismos que normalmente ingerem material orgânico puro e desenvolvem um mutualismo externo com a microflora baseado em um “rumem externo” (Swift et al., 1979). Estudos realizados por Pollierer et al., (2009), através de análise de isótopos estáveis, confirma a estreita dependência dos artrópodes, sobre a camada de serapilheira, devido a sua importância nos processos de decomposição (Schaefer, 1991; Wolters, 2000; Schowalter, 2006; David & Handa, 2010).

Os invertebrados saprófagos normalmente se alimentam de serapilheira em decomposição, sendo que, alguns materiais apresentam componentes impalátáveis, porém alguns microrganismos são capazes de melhorar a palatabilidade da serrapilheira pelo enfraquecimento da estrutura física e química (Hassal & Rushton, 1982). Esta dieta pobre em proteínas é um dos principais entraves para muitos organismos saprófagos, que preferem serapilheira relativamente rica em nitrogênio, com um baixo teor de carbono (Loranger-Merciris et al, 2008). A diminuição da relação C/N durante a decomposição explicar em parte porque muitas espécies de plantas se tornam progressivamente mais palatável ao envelhecer (Pobozsny, 1978; Szlavecz, 1985; David & Gillon, 2002). Além disso, a dieta de organismos saprófagos deve ser diversificada, devido à necessidades não apenas de nitrogênio, mas também de outros nutrientes, principalmente cálcio fósforo e magnésio (Carefoot, 1984; Scheu & Schaefer, 1998). Ocasionalmente alguns animais alimentam - se com variedades de alimentos de alta qualidade, tais como frutas caídas, sementes, fezes de artrópodos e mamíferos, e de invertebrados mortos (Hoffman & Payne, 1969; Warburg, 1987; Zimmer & Topp, 2002; Saska, 2008).

Sabe - se que os diferentes tipos de material vegetal existentes na natureza, apresentam uma diferenciada composição químicas (celulose, hemicelulose, lignina, pectina, polifenóis), qual irá influenciar o tempo de decomposição. A alta relação C/N e elevado teor de lignina e de compostos polifenóis inibem a ação dos animais saprófagos do solo, sendo neste caso necessária uma etapa preliminar de atuação por microrganismos, capazes de metabolizar estes compostos (Correia, 2009). Este mesmo autor relata que os artrópodes da serapilheira podem digerir parte da biomassa microbiana ou desenvolver interações mutualísticas nos seus excrementos. Nessas estruturas, os recursos orgânicos que foram fragmentados e umedecidos durante a passagem pelo tubo digestivo, são ativamente digeridos pela microflora. Após alguns dias de incubação, os artrópodes frequentemente reingerem estes excrementos e absorvem os compostos orgânicos assimiláveis que foram disponibilizados pela atividade microbiana, e ocasionalmente parte da biomassa microbiana (Hassal & Rushton, 1982).

### **2.2.2 Microrganismos de interesse na biodegradação de material vegetal**

Os microrganismos produzem grande variedade de enzimas intracelulares, porém em pequenas quantidades, que são usadas na catálise das suas reações metabólicas (Pereira Júnior et al., 2008). No entanto, alguns microrganismos em ambientes naturais produzem enzimas extracelulares em maior quantidade do que enzimas intracelulares, muitas dessas degradam macromoléculas que estão no ambiente, como celulose, amido, lignina e proteínas.

A biodegradação a partir de fungos decompositores inicia-se com a penetração de hifas fúngicas pelo lúmen da célula vegetal. Para se estabelecer, o fungo produz uma variedade de metabólitos extracelulares, especialmente enzimas, atuando na degradação dos componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), ocorrendo a conversão destes em moléculas menores, as quais podem ser transportadas através da membrana plasmática fúngica e adentrar o metabolismo extracelular (Kirk & Cullen, 1998).

Os fungos que pertence à classe Basidiomycetes, são classificados como fungos de decomposição branca (*white-rot fungi*) que são capazes de degradar os três componentes lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina); fungos de decomposição parda ou castanha (*brown-rot fungi*) degradam principalmente as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) e os fungos de decomposição branda (*soft-rot fungi*) são pertencentes às divisões Ascomycota e Deuteromycota, que podem degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, porém em velocidade muito reduzida (Kirk & Cullen, 1998).

Os fungos produzem várias enzimas durante a colonização no material lignocelulósico e, basicamente, os complexos enzimáticos produzidos constituem-se dos sistemas hidrolítico e oxidativo. Porém, as enzimas que degradam os materiais lignocelulósicos são representadas por: enzimas hidrolíticas, celulases e hemicelulases, relacionadas à despolimerização da celulose e da hemicelulose, e enzimas oxidativas, que produzem peróxido de hidrogênio.

Entre as bactérias as Actinobacterias desempenham um papel crucial na decomposição de compostos orgânicos e poluentes ativos na natureza (Groth et al., 1999). Eles são ativos na decomposição de materiais orgânicos no solo, incluindo a lignina e outros polímeros recalcitrantes e podem degradar resíduos agrícolas e urbanos (Heuer et al., 1997). Em *Streptomyces* e outros gêneros de actinobacterias, a degradação da lignina ocorre durante o crescimento primário e presume-se ser o resultado da atividade metabólica primária (Ramachandra et al., 1998). Nestas bactérias a mineralização da lignina a CO<sub>2</sub> é baixa, porém a sua solubilização é alta e esta associada a formação de húmus em solos e sedimentos (Ball et al., 1990). Em *Streptomyces viridosporus* T7A, onde a degradação da lignina tem sido mais bem estudada, observou-se a oxidação, despolimerização e solubilização da lignina com produção de uma lignina modificada, a lignina polimérica precipitável em ácido (Appl), como o maior produtor de degradação da lignina (Thomas & Crawford, 1998). Diferente do que ocorre em fungos, a degradação da lignina não é inibida em altas concentrações de nitrogênio orgânico e inorgânico a produção de peroxidase, uma enzima envolvida no catabolismo inicial da lignina, também não é inibida por altos níveis de nitrogênio, porém esta sujeita a repressão catabólica da glicose (Ramachandra et al., 1998).

A capacidade celulolítica de actinobacterias já foi verificada e envolve a ação sinérgica de várias enzimas, como: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidade. A primeira possui a habilidade de clivar substitutos derivados da celulose, tais como carboximetil – celulose, a segunda libera unidades de celobiose de cadeias inais não reduzidas de celulose microcristalina (Avicel); e a terceira catalisa a hidrólise de celobiose e celooligosacarídeos à glicose (Wachinger, 1989). *Micromonospora bispora* parece ser a actinobacteria termofílica mais fortemente celulolítica e possui estratégia similar à utilizada por fungos, que é a secreção de múltiplas enzimas, incluindo celobiohidrolase, que agem de forma sinérgica para afetar a degradação e permitir a ramificação das hifas sobre o substrato (McCarthy & Willians, 1992). A celulase pode ser identificada na forma extracelular ou associada ao micélio, e sua produção parece ser controlada por repressão catabólica. Wachinger (1989) observou forte inibição da produção de enzimas na presença da glicose.

Os *Streptomyces* possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas com variada potencialidade de uso industrial. Os principais grupos de enzimas são: oxidoredutase, transferase, hidrolases, liases, isomerases e sintases. Na natureza eles

desempenham um papel importante na formação de húmus, especialmente pela produção de enzimas extracelulares com capacidade de degradar compostos celulolíticos (Padilha, 1998).

No entanto a utilização de enzimas tem ganhado bastante espaço em virtude da crescente preocupação com os problemas ambientais causados pelas indústrias, tais como: o acúmulo de rejeitos, descarte de produtos tóxicos gerados em etapas de produção e uso de compostos tóxicos no combate de pragas (Schoemaker et al., 2003).

### **2.3 Estudos de Interações entre Invertebrados e Microrganismos**

Durante o século XIX e XX, muitos microrganismos foram isolados a partir de técnicas de cultura pura, com isso acarretou um rápido desenvolvimento da microbiologia industrial (Thair et al., 2005). Atualmente, é cada vez mais difícil o uso das técnicas de cultura pura, para isolar novos microrganismos, o que limita o progresso da microbiologia.

Além do interesse intrínseco de identificar e caracterizar os organismos e suas associações há um interesse especial na preservação desses organismos em coleção de culturas, com o propósito essencial de utilizá-los em aplicações biotecnológicas. A procura de novos produtos é enorme; em função disso, a exaustiva exploração de novos habitats com características específica para o isolamento de microrganismos. Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos das mais variadas espécies (Knietch et al, 2003). Este pool de microrganismos representa uma mina de ouro de genes envolvidos em aplicações industriais e farmacêuticas (Van et al., 2008) e na biodegradação de poluentes de origem humana e industrial (Boubakri et al., 2006).

O avanço nas técnicas moleculares conduziu a ciências a novos paradigmas, dentre eles, técnicas com gens 16S rRNA, com DGGE (Eletroforese em Gel com gradiente desnaturante químico), técnica que permite o estudo da diversidade microbiana em um determinado habitat. De acordo com Prosser (2002), essas técnicas separam produtos de mesmo tamanho, nas diferentes sequências, por desnaturação química.

Em ecossistemas naturais, a maioria dos microrganismos existentes mantém forte relação com outros organismos. Sabe-se que os microrganismos intestinais desempenham papel importante na degradação de componentes da dieta de invertebrados. As interações entre organismos invertebrados e microrganismos vêm sendo estudada há décadas, mas teve estudos diferenciados a partir dos anos 80 (O'Brien & Slaytor, 1982; Tokuda & Watanabe, 2007), principalmente com térmitas superiores.

Os primeiros estudos da simbiose entre térmitas e microrganismos foram conduzidos na década de vinte, por Cleveland, que demonstrou vários trabalhos, de simbiose entre térmitas inferiores e protozoários flagelados (Moore, 1969). A partir destes trabalhos, novos estudos vêm mostrando a associação de térmitas e outros organismos da fauna, com o intuito de analisar os mais variados tipos de associações com microrganismos.

Com a utilização de técnicas moleculares, Warnecke et al (2007) analisaram a diversidade microbiana do intestino posterior de térmitas da espécie *Nasutitermes sp.*, e constataram a ocorrência de representantes de 12 filos e 216 filotipos de bactérias. Foram caracterizados mais de 100 genes, sendo que a grande maioria com funções celulolíticas. Os autores ressaltaram que devido à alta quantidade de carbono presente nos resíduos de madeira, a decomposição e posterior incorporação aos tecidos animais devia ser acrescida de nitrogênio, para que a relação C/N fosse a mais próxima do organismo do térmita. Para isto os autores avaliaram a diversidade de genes *nifH* na microbiota do intestino posterior, sendo identificados 12 genes *nifH* homólogos, e entre 31 e 100 homólogos para outros componentes da nitrogenase com *nifD*, *nifK*, *nifE* e *nifN*, comprovando a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio. Lilburn et al (2001) atribuíram a FBN no intestino posterior de térmitas à bactérias

simbióticas do gênero *Treponema* sp.e à espiroquetas de vida livre, baseando-se também na presença de genes *nifH* no DNA genômico.

Nestas interações é importante considerar que a espécie de invertebrado, assim como o tipo de resíduo vegetal tem forte influência na composição da comunidade microbiana. Ohkuma & Kudo (1999) ao investigarem as comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a diferentes espécies de térmitas, concluíram que cada térmita apresentava uma comunidade simbiótica permanente e particular da espécie, diferindo tanto das outras espécies, como da comunidade do ambiente natural (Correia, 2009).

No caso dos diplópodes, Byzov et al (1993) iniciou os primeiros estudos de associações, que demonstrou possíveis simbioses com leveduras, actinomicetos e anos mais tarde com bactérias. No entanto, como esses estudos foram conduzidos utilizando métodos de cultivo em placa, uma grande quantidade da comunidade microbiana, representada pelos micror-organismos não cultiváveis sequer foi detectada.

Correia (2003) avaliou o efeito de diferentes tipos de resíduos sobre a interação “microrganismos-diplópodes” ao avaliar a transformação de serapilheira por diplópodes em três tipos de resíduo vegetal, nas camadas L e F da serapilheira. Os resíduos foram das espécies arbóreas *Pseudosamanea guachapele*, *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*, os quais foram oferecidos a três espécies de diplópodes: *Leptogoniulus sorornus*, *Trigoniulus corallinus* e *Rhinocricus padbergi*. A interação com a comunidade microbiana foi avaliada em meios de culturas para bactérias totais, fungos, actinomicetos e pseudomonas presentes na serapilheira e nas fezes das três espécies de diplópodes. Os resultados demonstraram que a passagem da serapilheira pelo tubo digestivo promoveu um aumento no número de bactérias, redução no número de fungos e actinomicetos e dependendo da espécie de diplópodes ambos os efeitos para pseudomonas.

Neste mesmo estudo, uma análise através da amplificação do gene 16s rDNA e *fingerprint* feita por DGGE (Eletroforese em Gel com gradiente desnaturante químico), verificou-se que a microbiota bacteriana associada à serapilheira era diferente da encontrada nas fezes das espécies de diplópodes. Além disso, as comunidades bacterianas de *Trigoniulus corallinus* e *Leptogoniulus sorornus* foram mais similares entre si do que em relação a *Rhinocricus padbergi*. Como estas duas primeiras espécies possuem uma grande proximidade taxonômica e filogenética, tendo sido inclusive já classificadas dentro do mesmo gênero (Shelley & Lehtinen, 1999), é possível que os mecanismos de regulação das populações microbianas tenham evoluído a partir de interações já existentes em um ancestral comum a estas espécies. Ao longo do tempo evolutivo, as modificações que foram ocorrendo durante o processo de especiação destes diplópodes estiveram mais relacionadas à forma do corpo e à estrutura dos gonopódios do que a características anatômicas e fisiológicas do tubo digestivo.

## **2.4 Avaliação da Diversidade Microbiana com Ferramentas Moleculares**

O estudo da diversidade de microrganismos sempre foi analisado através de características fenotípicas ou genotípicas dos organismos isolados. Tradicionalmente as identificações de bactérias eram feitas de acordo com os meios de obtenção de carbono e energi, exigências nutricionais, meio de cultivo para seu crescimento, e observações diretas através do microscópio (Kennedy et al., 1999). Entretanto, o uso dessas metodologias fornecia informações limitadas com necessidade de maior refinamento (Zak et., 1994). Atualmente várias metodologias têm sido desenvolvidas, dentre as quais se destacam aquelas baseadas nas seqüências de nucleotídeos.

Nas últimas décadas vários métodos moleculares estão sendo desenvolvidos aprimorados no avanço de estudos na variabilidade genética de microrganismos. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restriction

Analysis) que consiste na análise de restrição do rDNA amplificado; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) que se baseia no polimorfismo do tamanho do fragmento; RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) amplificação aleatória do DNA polimórfico; RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) análise do espaço ribossomal intergênico; DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) eletroforese em gel de gradiente desnaturante (Fagbola & Abang, 2004).

Associada as análises do gene 16S rDNA, a Metagenômica, surge nesse contexto, com uma perspectiva de análise genômica de comunidades microbiana que independe de cultivo (Schloss & Handelsman, 2005). Esta metodologia envolve extração direta de DNA de amostras ambientais, clonagem em vetor adequado, construção de bibliotecas genômicas e análise das sequências obtidas, que poderão ser utilizadas para estudos filogenéticos, distribuição e redundância de funções na comunidade, ligações gênicas, organização do genoma e transferência horizontal (Cowan et al., 2005).

Com estes avanços, o estudo da diversidade microbiana ambiental, os grupos de microrganismos nunca antes cultivados foram detectados no ambiente pela análise das sequências de 16S e por meio da comparação com sequências depositadas em banco de bases de dados públicos, observou que muitas delas pertenciam a organismos filogeneticamente não relacionados às divisões bacterianas já existentes (Hugenholtz et al., 1998).

## 2.5 Celulases

As enzimas do grupo das celulases é um complexo multienzimático, que clivam ligações *O*-glicosídicas, e são divididas em três grandes grupos, de acordo com seus locais de atuação no substrato celulósico: Endoglucanases-EG que clivam ligações internas da fibra celulósica; Exoglucanase –EX que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidase –BG (EC 3.2.1.21), que hidrolisa oligossacarídeos solúveis em glicose (Lynd et al, 2002; Castro & Pereira Jr, 2010).

As Endoglucanases (EG I,II,III e V; EC 3.2.1.4) - 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucano-hidrolase. É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise (Castro & Pereira Jr, 2010) esta enzima hidrolisa com mais afinidade as regiões amorfas da fibra celulósica, produzindo oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (Lynd et al., 2002). Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), avicel (celulose cristalina),  $\beta$ -glicana e xilana. A estrutura das EnGs foi estudada e revelaram a presença de curtos laços que criam um canal que provavelmente permite a entrada da cadeia de celulose para a quebra (Rabelo, 2010).

Exoglucanase (EG I e II; EC 3.2.1.91): é constituída por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH).

As CBHs (EC 3.2.1.91) – 1,4- $\beta$ -D-glucana-celobio-hidrolase. Embora a IUBMB defina a CBH como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos com (grau de polimerização) GP>3 em celobiose, há relatos do ataque de terminais redutores por enzimas (Lynd et al, 2002; Castro & Pereira Jr, 2010).

A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais (Castro & Pereira Jr, 2009). A amorfogênese promove aumento na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais expostas às celulases (Zhang & Lynd 2004b). A CBH ainda pode ser dividida em dois tipos:

enzima do tipo (CBHI), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a enzima (CBHII) hidrolisa terminais não redutores (NR) ((Lynd et al, 2002; Castro &Pereira Jr, 2010) estas enzimas as celobio- hidrolases apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato (CBD – *cellulose binding domain*) e sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (Awafo, 1998). Os modelos padrões de inibição, ou seja, inibição competitiva, não-competitiva, ou uma mistura destas, tem se mostrado dependente do tipo de ligação com a celulase, da concentração de enzimas, da área de superfície da celulase acessível às enzimas, da razão enzima/substrato, da natureza e concentração do substrato e da variação da atividade de  $\beta$ -glicosidase (Gruno et al., 2004).

As GH (EC 3.2.1.74) – 1,4- $\beta$ -D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (Lynd et al., 2002).

$\beta$ -glucosidases (BG) ou  $\beta$ -glicosídeo gluco-hidrolase –(EC 3.2.1.21) – esta enzima tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (Lynd & Zhang, 2002). Assim como a CBH, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (Awafo et al., 1998).

Individualmente, uma única enzima do complexo celulolítico é incapaz de hidrolisar a celulose de maneira eficiente, sendo necessária a ação complementar e sinérgica do complexo celulolítico e da  $\beta$ -glicosidase (Bon et al., 2008).

**3      CAPÍTULO I**

**DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO TRATO DIGESTIVO  
DE INVERTEBRADOS SAPRÓFAGOS**

### 3.1 RESUMO

Interações entre invertebrados saprófagos e microrganismos são essenciais para a manutenção e funcionamento dos ecossistemas do solo. Estas interações afetam diretamente a degradação da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes. O trato intestinal de invertebrados é habitado por uma grande diversidade de microrganismos, e esta diversidade está intimamente associada ao alimento ingerido por estes invertebrados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de procariotos associados ao trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensis*. A espécie *Trigoniulus corallinus*, foi coletada e incubada durante 60 dias. Dentro das diferentes dietas oferecidas incluía duas leguminosas: Flemingia (*Flemingia macrophylla*) (Willd.) e Gliricidia (*Gliricidia sepium*) (Jacq), uma gramínea: grama (*Paspalum notatum*) (Flüggé) e três materiais recalcitrantes: papelão, sabugo de milho e fibra de coco. A partir destes materiais obtivemos seis tratamentos, sendo eles: Tratamento 1 (30% de flemingia + 40% de grama + 30% papelão), Tratamento 2 (30% de flemingia + 40% de grama + 30% sabugo de milho), Tratamento 3 (30% de flemingia + 40% de grama + 30% fibra de coco), Tratamento 4 (30% de gliricidia + 40% de grama + 30% papelão), Tratamento 5 (30% de gliricidia + 40% de grama + 30% sabugo de milho) e Tratamento 6 (30% de gliricidia + 40% de grama + 30% fibra de coco). As outras duas espécies de invertebrados também foram investigadas neste estudo: *Pycnoscelus surinamensis* e *Cubaris murina*, que colonizaram espontaneamente o experimento. As amostras foram coletadas após 60 dias de incubação. Foram selecionados aleatoriamente cinco indivíduos de cada espécie, para remover o terço posterior do trato intestinal, em seguida foram tratados em ultrassom e estocado a -60°C. Procedeu-se a extração de DNA, que posteriormente foram realizadas análise PCR/DGGE utilizando o gene 16S rDNA, para o domínio *Bacteria* foram utilizados os primers 968 GC e 1401R, para o domínio actinobactérias 243F e 1401R. Bandas de DGGE foram clonadas e sequenciadas utilizando o domínio *Bacteria* com os seguintes primers 341F e 907R. Os resultados obtidos mostraram que os perfis de bandas de DGGE para os domínios *Bacterias* e *Actinobactéria* se agruparam fortemente entre os invertebrados da mesma espécie, após 60 dias de incubação. Os perfis do tratamento T1 (flemingia + grama + papelão) apresentaram-se mais distante dos demais, a presença da leguminosa gliricidia na composição dos tratamentos, respondeu sensivelmente, apresentando uma alta similaridade entre os perfis. E as sequências das bandas clonadas identificou de três filos, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, o filo Proteobacteria, apresentou o maior número de gêneros identificados, sendo eles *Enterobacter*, *Buttiauxella*, *Serratia*, *Kluyvera* e *Pantoea*.

**Palavras chave:** Invertebrados saprófagos. Diversidade de microrganismos. Análise de DGGE.



### 3.2 ABSTRACT

Interactions between saprophages invertebrates and micro-organisms are essential for the maintenance and functioning of the soil ecosystem. These interactions directly affect the degradation of organic matter and nutrient cycling. The invertebrate intestinal tract is populated by a large variety of microorganisms, and this diversity is closely related to food ingested by these invertebrates. The aim of this study was to evaluate the profile of prokaryotes associated with the intestinal tract of *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murine* and *Pycnoscelus surinamensis*. The species, *Trigoniulus corallinus* was collected and incubated for 60 days. Within the different diets offered included two legumes: Flemingia (*Flemingia macrophylla*) (Willd.) And Gliricidia (*Gliricidia sepium*) (Jacq), a grass: grass (*Paspalum notatum*) (Flüggé) and three recalcitrant materials: paperboard, corn cob and coconut fiber. From these materials they had six treatments, as follows: Treatment 1 (30% flemingia + 40% grass + 30% paperboard), Treatment 2 (30% flemingia + 40% grass + 30% corn cob), Treatment 3 (30% flemingia + 40% grass + 30% coconut fiber), Treatment 4 (30% gliricidia + 40% grass + 30% paperboard), treatment 5 (30% gliricidia + 40% grass + 30% corn cob) and treatment 6 (30% gliricidia + 40% grass + 30% coconut fiber). The other two species of invertebrates were also investigated in this study: *Pycnoscelus surinamensis* and *Cubaris murine* that spontaneously colonized the experiment. Samples were collected after 60 days of incubation. Randomly five individuals of each species were selected to remove the posterior third of the intestinal tract, and then were treated in ultrasound and stored at -60 C. Proceeded to the extraction of DNA, which subsequently PCR / DGGE analysis were performed using the 16S rDNA gene for the domain *Bacteria primers* 968 GC and 1401R were used for actinomycetes domain 243F and 1401R. DGGE bands were cloned and sequenced using the Domain *Bacteria* with the following *primers* 341F and 907R. The results showed that the profiles DGGE bands for *Bacteria* and *Actinobacteria* areas heavily clustered between the invertebrate species of the same after 60 days of incubation. The profiles of the T1 (Flemingia + grass + paperboard) had become more distant from the others, the presence of the legume gliricidia in the composition of the treatments, responded significantly, presenting a high similarity between profiles. And the sequences of the cloned bands identified three phyla Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes, phylum Proteobacteria, with the largest number of genera identified, namely *Enterobacter*, *Buttiauxella*, *Serratia*, *Kluyvera* and *Pantoea*.

**Key words:** Saprophages invertebrates. Diversity of microorganisms. DGGE of analysis.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A comunidade microbiana do solo é altamente diversificada (Robe et al., 2003), com o mais alto nível de diversidade procariótica (Roesch et al., 2007). Assim, aspectos ecológicos são interessantes no estudo das associações de microrganismos e invertebrados do solo.

A investigação das relações simbióticas entre microrganismos e invertebrados é um dos principais campos da ecologia microbiana do solo. A simbiose envolve a coexistência de duas ou mais espécies, com o mais elevado grau de associação, tanto na parte externa, quanto no interior de tecidos e órgãos (Byzov et al., 2008).

O sistema digestivo dos invertebrados de solo apresenta uma vasta variedade de microrganismos e envolve várias associações entre eles. Uma delas é responsável pela manutenção do ecossistema do solo, com os processos de decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Um exemplo bem conhecido é a simbiose do trato digestivo de térmitas, assim como suas funções (König et al., 2006). Além dos térmitas, estudos de simbiose com outras espécies de invertebrados e microrganismos também são estudados em oligoquetos, diplópodes, isópodes entre outros.

As interações entre invertebrados e microrganismos são reconhecidas por diversos autores, que relatam que alguns microrganismos contribuem para a nutrição dos invertebrados e produzem enzimas responsáveis pela quebra de alimentos ingeridos, e em alguns casos liberam enzimas contra patógenos (Walker et al., 1999). As interações nutricionais da microbiota intestinal podem aumentar a sobrevivência dos invertebrados, sob condições de dietas abaixo do ideal, e melhorar a eficácia da digestão e fornecer enzimas digestivas ou até mesmo vitaminas (Dillon & Dillon, 2004). Além do aspecto nutricional, as interações produzem vasta variedade de enzimas digestivas do material vegetal ingerido pelos invertebrados.

Mudanças no uso da terra e aporte de resíduos vegetais alteram a dieta de invertebrados que conseqüentemente irá alterar a comunidade de microrganismo no trato intestinal, assim como as taxas do processo de decomposição.

Para estudos de avaliação de comunidades microbianas no trato intestinal de invertebrados, Knapp et al (2009 a) usaram PCR- DGGE e avaliaram alteração da diversidade no trato intestinal de *C. Fulviceps*, sob diferentes dietas. A análise de DGGE é uma ferramenta que expressa impressão digital rápida e simultânea de várias amostras, podendo estabelecer comparativo da diversidade local com base em perfis de banda. A técnica PCR-DGGE é muito usada nos estudos de diversidade, para caracterizar a população microbiana. Contudo a técnica mostra apenas a filogenia de organismos dominantes e as informações de sequências obtidas por excisão de bandas em gel são limitadas (Muyzer et al., 1993).

Em contraste, a clonagem do DNA genômico é mais demorada, porém proporciona informações detalhadas sobre a sequência estendida (Ward et al., 1990). A combinação de métodos moleculares, incluindo DGGE e clonagem é, portanto adequada para ter uma visão profunda da comunidade microbiana, e tem sido aplicado com sucesso para o trato intestinal de cupins e espécies de coleópteros (Schmitt -Wagner et al., 2003; Egert et al., 2005).

É importante salientar que o objetivo inicial deste trabalho era investigar somente uma espécie de invertebrado o gongolô *Trigoniulus corallinus*, o qual foi coletado em pilhas de compostagem e incubado em dietas com: leguminosas sendo elas, *Flemingia* (*Flemingia macrophylla*) (Willd.) e *Gliricidia* (*Gliricidia sepium*) (Jacq), gramínea: grama (*Paspalum notatum*) (Flüggé) e materiais recalcitrantes: papelão, sabugo de milho e fibra de coco. No entanto, duas semanas após o início do experimento, observamos a colonização espontânea de

duas espécies de invertebrados saprófagos: o tatuzinho- de- jardim *Cubaris murina* (Brandt, 1833) e a barata *Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758).

Referindo-se a duas espécies saprófagas de importância na fragmentação de resíduos vegetais e na decomposição da matéria orgânica, a *C. murina* e *P. surinamensis*, o objetivo deste capítulo foi avaliar também a estrutura da comunidade bacteriana de ambas as espécies que posteriormente foram comparadas dentro das análises realizadas neste trabalho.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, nos Laboratórios de Fauna do Solo, Ecologia Microbiana e Multiusuário de Biologia Molecular da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro. As análises de clones das bandas incisadas foram realizadas no laboratório de Microbiologia, no Departamento de Ciência da Vida, na Universidade de Coimbra, Portugal.

#### 3.4.1 Coleta e descrição dos invertebrados saprófagos

Os invertebrados foram obtidos a partir de um experimento montado no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) no município de Seropédica, RJ, (Figura 4), no período de janeiro a março de 2011 e abril a junho de 2012. Estes experimentos foram repetidos duas vezes para fins de comparações de dados. Os dois experimentos foram utilizados, diferentes resíduos orgânicos, com composição ligninocelulósicas e relação C/N distintas. Os resíduos adicionados eram à base de leguminosas: Flemingia (*Flemingia macrophylla*) (Willd.) e Gliricidia (*Gliricidia sepium*) (Jacq), gramínea: grama (*Paspalum notatum* (Flüggé) e materiais recalcitrantes: papelão, sabugo de milho e fibra de coco, que posteriormente foram oferecidos e consumidos pelos diplópodes da espécie *Trigoniulus corallinus* (Gervais, 1847) (Diplopoda: Spirobolida). Neste experimento, houve a adição intencional de 500 ml, aproximadamente 900 indivíduos de *T. corallinus*, como agentes da compostagem deste resíduos, pelo período de 60 dias, em condições de umidade controlada e temperatura ambiente. As outras duas espécies de invertebrados investigadas neste estudo: *Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blaberidae) e *Cubaris murina* (Brandt, 1833) (Crustacea: Isopoda), colonizaram espontaneamente o experimento. O experimento foi constituído por seis tratamentos distribuídos em blocos ao acaso com quatro repetições, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Tratamentos de resíduos vegetais oferecidos para o diplópode da espécie *Trigoniulus corallinus* (GERVAIS, 1847).

| Tratamentos | Leguminosas     | Gramíneas   | Materiais Recalcitrantes | Relação C/N |
|-------------|-----------------|-------------|--------------------------|-------------|
| T1          | Flemingia 30 %  | Gramma 40 % | Papelão 30 %             | 134,85      |
| T2          | Flemingia 30 %  | Gramma 40 % | Sabugo de milho 30 %     | 46,53       |
| T3          | Flemingia 30 %  | Gramma 40 % | Fibra de coco 30 %       | 47,63       |
| T4          | Gliricidia 30 % | Gramma 40 % | Papelão 30 %             | 127,67      |
| T5          | Gliricidia 30 % | Gramma 40 % | Sabugo de milho 30%      | 39,36       |
| T6          | Gliricidia 30 % | Gramma 40 % | Fibra de coco 30 %       | 40,45       |

Os três invertebrados saprófagos estudados neste trabalho são decompositores primários, se alimentam de material ligninocelulósico, e a partir de interações simbióticas realizam a digestão deste material consumido. De modo geral a forma e complexidade do aparelho digestivo esta relacionada com os hábitos alimentares dos invertebrados.

A espécie *Trigoniulus corallinus* (Gervais, 1847) (Diplopoda: Spirobolida), é um diplópode, conhecido popularmente como gongolo, embuá e piolho-de-cobra (Figura 5/A), com provável origem no sudoeste asiático. Este invertebrado é facilmente encontrado em pilhas de compostagem e serapilheira em áreas de clima tropical (Passos, 2010). Apresentam um trato intestinal dividido em três partes: a primeira é o intestino anterior (foregut), o segundo o intestino médio (midgut) e o terceiro é o intestino posterior (hindgut) (Figura 6/A).

O intestino posterior é um compartimento tamponado, aeróbico e onde ocorre a maior atividade microbiana na ordem de  $1,5 \pm 6,7 \times 10^{10}$  UFC (Cazemier et al., 1997).

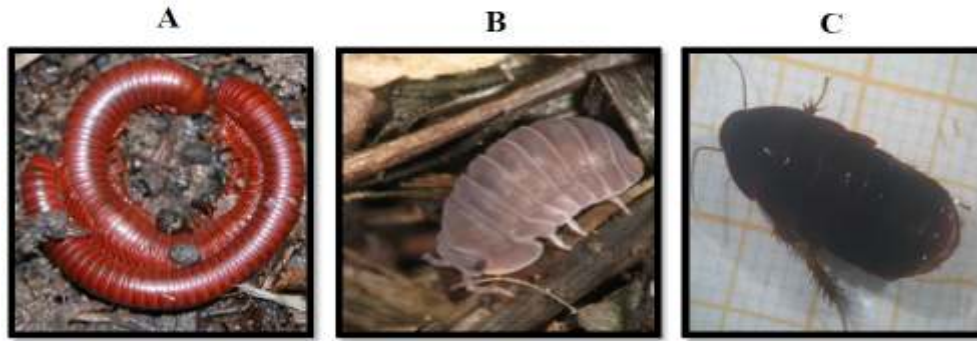


**Figura 4.** Área de experimentação de resíduos orgânicos oferecidos aos diplópodes no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) Seropédica, RJ.

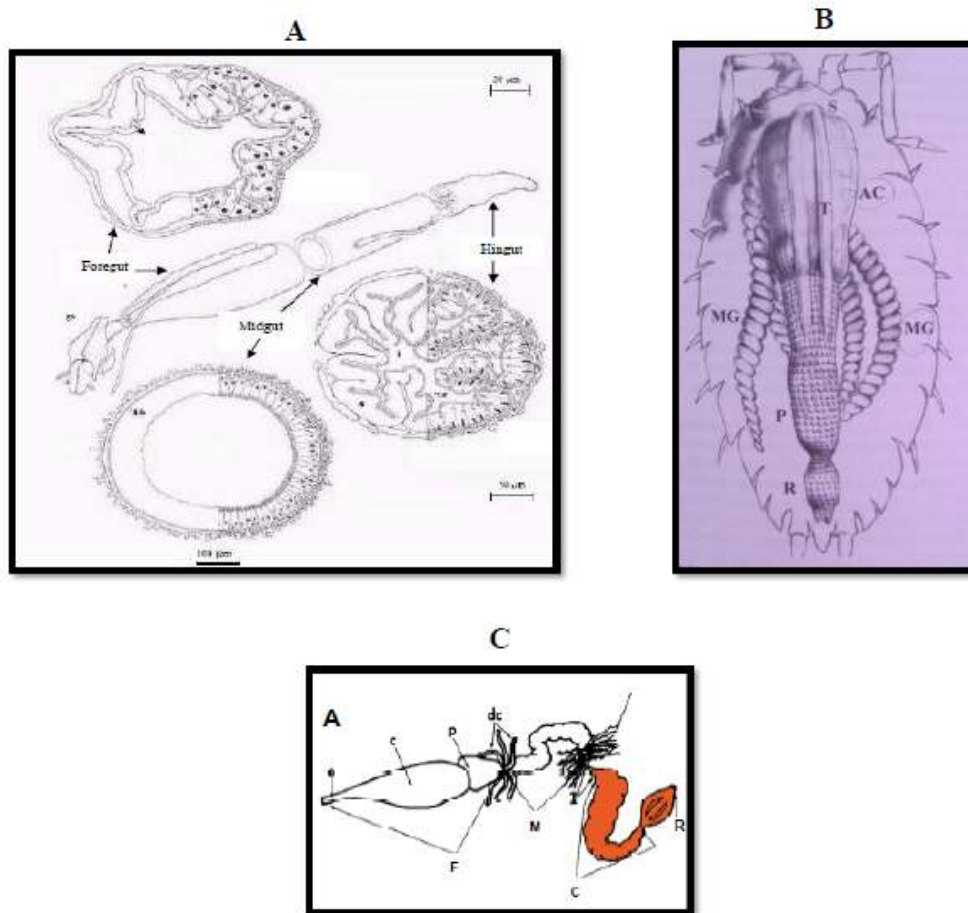
*Cubaris murina* (Brandt, 1833) (Crustacea: Isopoda), o tatuzinho-de-jardim, é uma espécie introduzida no Brasil (e em muitas partes do mundo; tem distribuição pantropical) (Figura 5/B). Apresentam um importante papel na reciclagem de matéria orgânica, pois são capazes de fragmentar uma grande quantidade de serapilheira. O sistema digestivo tripartite de isópodes terrestres (Figura 6/B) consiste em um intestino anterior (foregut) compreendendo esôfago e estômago (proventrículo), um intestino médio (midgut) representado principalmente pelas glândulas do intestino médio tubular (hepatopâncreas) e um intestino grosso. Este último consiste em duas partes anatomicamente e funcionalmente diferentes, uma câmara anterior e a região papilas com reto, que são inervados por nervos separados (Molnar et al., 1998).

*Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blaberidae), é uma espécie exótica, e única do gênero *Pycnocelus* Scudder encontrada no Brasil (Figura 5/C).

Encontra-se em ambientes tropicais e subtropicais de todo o mundo (Pallens & Grandcolas, 2002 a). É considerada uma espécie peridoméstica, ou seja, não são encontradas em ambientes domésticos (Grandcolas, 1998 b). Esta espécie se estabelece em áreas perturbadas por atividade antrópica (construção, jardins, estufas, granjas) (Pallens & Grandcolas, 2002b). No entanto é frequentemente relatada que a *P. surinamensis* é uma praga, uma vez que pode ser facilmente transportado em vasos de plantas e é capaz de destruir grande variedade de plantas e culturas (Bell et al., 2007). O sistema digestivo dos Blattodea é muito semelhante aos dos térmitas (Figura 6/C). Em geral, compreende boca, esôfago, glândulas salivares, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Seu sistema digestivo é distintamente grande (Watanabe & Tokuda, 2010) e o intestino grosso de térmitas superiores mostra uma estrutura mais complexa em comparação com os de Blattodea.



**Figura 5.** (A) *Trigoniulus corallinus* (GERVAIS, 1847) (Diplopoda: Spirobolida). (B) *Cubaris murina* (Brandt, 1833) (Crustacea: Isopoda) e (C) *Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blaberidae). Fotos A e B: Maria Elizabeth Fernande Correia, Foto C: Rafael Nogueira Scoriza).

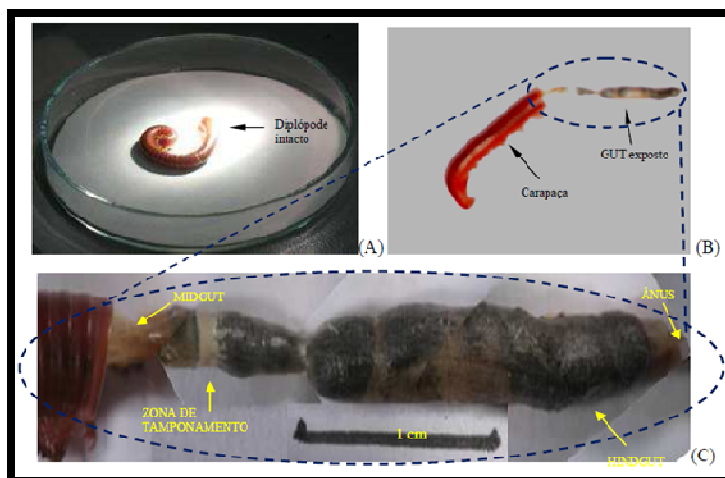


**Figura 6.** (A) Diagrama esquemático do trato intestinal *Craspedosoma alemannicum* com o trato intestinal seccionado em Foregut, Midgut e Hindgut (modificado de Köhler et al., 1991). (B) Anatomia do sistema O sistema digestivo de *Porcellio scaber*. (S) vista dorsal do estômago, (MG) glândula do intestino médio, (AC) hindgut consistindo de câmara anterior, com tifossole (T), (P) papilate região e (R) reto (Kostanjšek et al., 2006). (C) Morfologia do trato intestinal de Dictyoptera (F) intestino anterior, (M) intestino médio, (C) colon e (R) reto (Brune, 2006).

### 3.4.2 Extração do trato intestinal posterior (*hindgut*), dos invertebrados saprófagos

Após o período de 60 dias os organismos foram retirados do experimento, sendo amostrada a comunidade bacteriana associada à porção final do trato intestinal dos invertebrados saprófagos coletados: *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensis*.

Desta forma, foram selecionados ao acaso cinco indivíduos de cada espécie por tratamento (Tokuda & Watanabe, 2007). Estes foram anestesiados em éter por 10 minutos e em seguida desinfestados superficialmente com álcool a 70% e dissecados em lupa. O sistema digestivo foi todo removido e seccionado a porção posterior (*hindgut*), o qual foi acondicionado em 1,0 mL de solução de Ringer: 47 mM NaCl, 183 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8 (Cazemier et al., 1997) (Figura 7).



**Figura 7.** Trato digestivo de *Trigoniulus corallinus*. A: Diplópode ainda intacto já desinfestado superficialmente. B: Diplópode com carapaça retirada e o trato intestinal ou “gut” exposto. C: Figura detalhando as divisões do trato intestinal em intestino media ou “midgut”, zona de tamponamento (transição), intestino posterior ou “hindgut” e ânus (Final gut). (Esquema: Passos, 2010).

### 3.4.3 Extração do DNA da comunidade bacteriana associado à porção final (*hindgut*) do trato intestinal dos invertebrados saprófagos

Após a extração da porção final, descrita no item 3.2.2, foi retirada uma amostra de cerca de 1g para extração do DNA dos microrganismos aderidos em 1,0 mL de solução de Ringer. As amostras foram então tratadas em vórtex por 30 segundos a velocidade máxima, deixadas por 15 minutos em geladeira e tratados em um ultrassom por 45 segundos. Os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 9300g, sendo descartado o sobrenadante e o “pellet” submetido à extração de DNA. Utilizou-se o kit comercial “Ultra Clean Soil DNA Kit” (MoBio), seguindo-se as instruções do fabricante. A eficiência da extração do DNA genômico purificado foi comprovada mediante eletroforese em um gel de agarose 1%. Em seguida o DNA foi amplificado por PCR, cujos procedimentos estão descritos nos itens 3.2.7.

### 3.4.4 Iniciadores universais para DGGE, usados para a amplificação do gene 16S rDNA

As análises das estruturas da comunidade de bactérias do trato intestinal dos animais saprófagos estudados foram realizadas por PCR-DGGE. O DNA template, foi utilizado para a

amplificação da região variável V6 - V8, utilizando-se os iniciadores 968GC e 1401R da região do gene 16S rDNA (Tabela 2).

A reação de PCR foi realizada para um volume final de 30µl, contendo 3µl de DNA template, 1,25µM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µM de dNTP; 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase, Kit PCR - Master Mix 2X (Promega ®); 0,2µM de cada oligonucleotídeos iniciador. A reação foi conduzida em um termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 93°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 93°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

#### **3.4.5 Iniciadores para o grupo Actinomicetos para DGGE, usados para a amplificação do gene 16S rDNA**

Para a amplificação do grupo dos Actinomicetos em reação de PCR-DGGE. O DNA template, foi utilizado para a amplificação, utilizando-se aos iniciadores 243F e 1401R (Tabela 2).

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 30µl contendo 3µl de DNA template, 1,25µM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µM de dNTP; 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase, Kit PCR - Master Mix 2X (Promega ®); 0,2µM de cada oligonucleotídeos iniciador. A reação foi conduzida em um termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos com desnaturação de 93°C por 1 minuto, anelamento a 63°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

#### **3.4.6 Iniciadores domínio Bacteria para DGGE, usados para a amplificação do gene 16S rDNA e clonagem de bandas**

Para o DGGE e Clonagem de bandas foi utilizado o par de *primers* 341F-GC/907 e para a reamplificação de bandas do gel de DGGE, foi utilizados o mesmo par de *primers*, porém, sem a cauda de GC (Tabela 2).

A reação de PCR foi dimensionada para volume final de 30µl contendo 3µl de DNA template, 1,25µM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µM de dNTP; 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase, Kit PCR - Master Mix 2X (Promega ®); 0,2µM de cada oligonucleotídeos iniciador.

A reação foi conduzida em um termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 32 ciclos com desnaturação de 95°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.



**Tabela 2.** Sequências de nucleotídeo e grupo alvo dos *primers* utilizados para a amplificação de PCR/DGGE do fragmento do gene 16S rDNA.

| Primer  | Sequência (5' – 3')                | Grupo Alvo (Eubacterias)  | Referência         |
|---------|------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 27F     | AGA GTT TGA TCC<br>TGG CTC AG      | RNAr 16S/ <i>Bacteria</i> | Lane, 1991         |
| 1492R   | ACG GCT ACC TTG<br>TTA CGA CTT     | Universal/16S             | Lane, 1991         |
| 968F*GC | AAC GCG AAG AAC<br>CTT AC          | Universal/16S             | Heuer et al., 1997 |
| 1401R   | CGG TGT GTA CAA<br>GGC CCG GGA ACG | <i>Bacteria</i>           | Heuer et al., 1997 |
| 243F    | GGA TGA GCC CGC<br>GGC CTA         | <i>Actinomycetales</i>    | Heuer et al., 1997 |
| 341F*GC | CCT ACG GGA GGC<br>AGC AG          | <i>Bacteria</i>           | Muyzer et al.,1993 |
| 907R    | CCG TCA ATT CCT<br>TTG AGT TT      | Universal/16S             | Muyzer et al.,1998 |

\*Para estabilizar a migração das bandas durante o DGGE, uma sequência rica em GC foi unida à extremidade 5' do primer: 5' CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGACGGGGG-3'. (Muyzer et al.,1993)

### 3.4.7 Eletroforese em gel de agarose

Os ácidos nucleicos, tais como extratos de DNA genômico e produto de PCR, foram analisados mediante eletroforese horizontal. Para isto foram preparados géis de agarose 1% em TBE 0,5X (89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico e 2,0 mM EDTA, pH 8,0) e utilizando-se 2 uL da amostra e 2 uL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol/L de EDTA, 5% de SDS). Para determinar o peso molecular e a concentração do DNA foi utilizado o marcador de 1Kb *DNA Ladder* (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 10ppm e fotografados em sistema Kodak GL100.

### 3.4.8 Análises por PCR-DGGE (Gel de eletroforese em gradiente de desnaturante)

O acesso à comunidade de bactérias independentemente de isolamento e cultivo foi feito pela técnica de PCR-DGGE, no qual amostras de trato intestinal de invertebrados saprófagos tiveram o DNA total extraído e a regiões do 16S rDNA de bactérias amplificadas por PCR para análise de DGGE. Para a obtenção do DNA total e amplificações, procedimentos descritos nos itens (3.2.4), (3.2.5) e (3.2.6). Após a confirmação da amplificação das amostras, 30 µL de cada amostra amplificada foi aplicado ao gel, adicionada de 5 µL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol/L de EDTA, 5% de SDS) e submetidos à eletroforese em gradiente de desnaturante químico. O gradiente de 45% - 65% desnaturação de uréia-formamida TAE 0,5X (120 V - 70 mA) por 16 horas (ZILLI et al., 2003), com o equipamento Bio-Rad. Como marcador para normalização dos géis foi utilizada uma amostra formada pela mistura da amplificação do DNA do gene 16S de quatro microrganismos (*Sinorhizobium fredii*, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia sp.*, *Rhizobium tropici* IIA) cujas posições das bandas no gel são conhecidas.

Os géis forma corados em brometo de etídio (1µg/mL) por trinta minutos, lavados em água destilada por cinco minutos e logo depois observados em um transiluminador com luz ultravioleta. A imagem do gel foi digitalizada e com o auxílio do programa BioNumerics, foi montado dendrograma de similaridade entre os tratamentos, utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard e o método de agrupamento UPGMA (“*Unweighted pair-group method*”).

### 3.4.9 Amostras para clonagem em vetor

Para a clonagem foram utilizados os *primers* 341F-GC e 907R. As bandas que apresentaram maiores contraste, ou seja, os padrões de bandas de DGGE mais evidentes, foram recortadas e novamente amplificadas, seguindo o mesmo protocolo descrito no item (3.2.6), exceto para o primer 341F sem a cauda GCclamp. Após a confirmação da amplificação, estas foram purificadas com o Kit OMEGA Bio-Tek<sup>®</sup> conforme orientação do fabricante.

A clonagem foi realizada segundo o protocolo do *pGEM-T easy vector* (Promega, Madison, Estados Unidos). O sistema se baseia na inserção do fragmento a ser clonado, neste caso o rDNA / 16S, em um vetor plasmidial. A enzima T4 DNA ligase foi utilizada para catalisar a ligação entre as extremidades adesivas do plasmídio aberto (timina) e os resíduos de adenina das extremidades do inserto gerado durante a amplificação pela *Taq* polimerase. Os produtos das ligações vetor/inserto foram introduzidos em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* e plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB)/ ampicilina. Nas placas de Petri que apresentam colônias brancas, contêm os plasmídeos com os genes clonados de rDNA / 16S e as azuis, que contêm os plasmídeos sem os genes do rDNA / 16S. Cinco colônias brancas de cada placa foram inoculadas em 5ml de meio -líquido LB, e incubadas em agitação a 37°C durante 12 horas, para obter o DNA plasmidial a partir destes cultivos. A extração do DNA plasmidial foi purificada com o Kit Plasmid OMEGA E.Z.N.A<sup>®</sup> seguindo orientação do fabricante.

### 3.4.10 Análise filogenética das sequências

As sequências de DNA dos isolados e o DNA plasmidial, foram sequenciados na Macrogen (Holanda).

As sequências obtidas após o sequenciamento, foram comparadas com o banco de dados NCBI, utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a identificação das sequências mais próximas e em seguida a confecção da árvore filogenética.

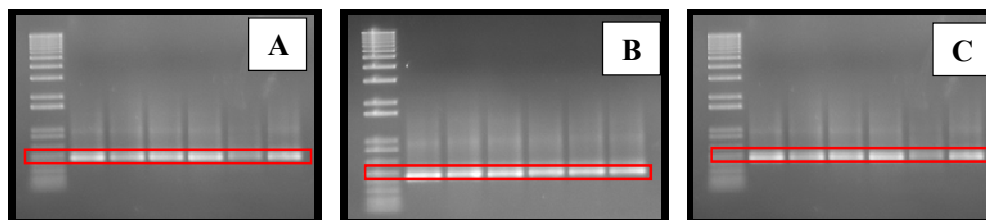
As amostras foram alinhadas com outras sequências de mesma afiliação taxonômica em nível de filo ou classe. A partir deste alinhamento, foi construída uma árvore filogenética aplicando-se o método *Neighbor-Joining* no Programa Mega 5.1, Análise de Bootstrap com 100 réplicas.

## 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.5.1 Análise de diversidade através do 16S rDNA utilizando iniciadores universais

A partir do extrato bruto do trato intestinal das três espécies de invertebrados saprófagos *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensis*, foi realizada a extração de DNA, da comunidade microbiana. O DNA extraído foi utilizado, para a amplificação dos fragmentos específicos da região V3 do rDNA 16S de microrganismos de domínio *Bacteria*, utilizando - se os seguintes pares de iniciadores: 968F/GC e 1401R. Estes iniciadores amplificaram um fragmento do DNA de 433pb. Para confirmar a amplificação e concentração DNA suficiente para serem utilizadas nas técnicas de DGGE, as amostras foram submetidas em gel de agarose a 1% como mostra a (Figura 8), onde foi possível visualizar bandas com tamanho correspondente para o par de iniciadores utilizados, indicando que os fragmentos de DNA amplificados podem ser empregados na realização da técnica proposta.

O método da PCR-DGGE é um método utilizado para analisar a diversidade de um modo geral. Várias amostras podem ser analisadas simultaneamente, tornando possível acompanhar a evolução da população microbiana, em um sítio de interesse (Muyzer & Smalla, 1998). A PCR- DGGE pode detectar apenas 1-2% da população microbiana representando espécies dominantes (Muyzer et al., 1993). Análises de clones do 16S rDNA foram abordadas para ser mais representativo em termos qualitativos. A PCR-DGGE revelou complexos perfis de bandas, nas diferentes amostras avaliadas.



**Figura 8.** Gel de agarose a 1,0% contendo DNA amplificado das seguintes amostras: **A - *Trigoniulus corallinus*:** Marcador 1Kb, 1 (T1T), 2(T2T), 3(T3T), 4(T4T), 5(T5T), 6(T6T), **B - *Cubaris murina*:** Marcador 1Kb, 1(T1C), 2(T2C), 3(T3C), 4(T4C), 5(T5C), 6(T6C); **C - *Pycnoscelus surinamensis*:** Marcador 1Kb; 1(T1P), 2(T2P), 3(T3P), 4(T4P), 5(T5P), 6(T6P).

O agrupamento dos diferentes perfis é apresentado na figura 9. De acordo com o dendrograma, o principal fator que contribuiu para o agrupamento dos perfis foi à origem do DNA microbiano, ou seja, a espécie de invertebrado. É possível observar a formação de agrupamentos em níveis distintos de similaridade (indicados pelas setas). Esses resultados relevam diferenças nos graus de intimidade e complexidade da comunidade dos microrganismos associados no trato intestinal dos diferentes saprófagos.

Uma análise global da diversidade bacteriana associada ao trato intestinal das três espécies de invertebrados revela uma sobreposição muito baixa entre as comunidades (10 % de similaridade). É possível identificar três grupos distintos (1,2 e 3). O grupo 1 é formado por perfis de amostras do trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*, submetido às seis diferentes dietas. Este grupo apresenta similaridade interna mínima de 30%. Os perfis T5T e T6T apresentaram a maior similaridade de 75% dentro do grupo. Esta similaridade entre estes perfis pode estar relacionada à composição da dieta oferecida, embora sejam diferentes,

ambos apresentam relação C/N muito próxima (Tabela 1) estes tratamentos T5 e T6 apresentam em sua estrutura materiais recalcitrantes diferentes (sabugo e fibra de coco) que neste caso não foi sensível para diferir os tratamentos, porém apresentam a mesma leguminosa (*Gliricidia*) o que pode ter sido determinante na alta similaridade destes perfis.

O grupo 2 inclui perfis de amostras vindas do trato intestinal de *Cubaris murina* e um perfil de amostra oriunda de (T1T) de *Trigoniulus corallinus*. Embora o perfil da amostra T1T tenha sido agrupada juntos com os perfis de amostras de *Cubaris murina*, esta foi considerada um *outgroup*, mostrando ser diferentes das demais amostras do grupo 2. De maneira semelhante os perfis T5T e T6T do (grupo 1), os perfis T5C e T6C dentro do grupo 2, apresentaram uma alta similaridade de (85%) , confirmando que os tratamentos provenientes de *Gliricidia*, podem ter influenciado sensivelmente na população microbiana do trato intestinal de *Cubaris murina*. *Gliricidia sepium* é uma espécie de leguminosa arbórea, cujos resíduos apresentam baixa relação C/N.

Por fim o grupo 3 foi formado por amostras do trato intestinal de *Pycnoscelus surinamensis*. Dentro deste grupo os perfis T3P e T5P foram os que apresentaram a maior similaridade de (84%), embora sejam tratamentos com composições diferentes T3 e T5 (Tabela 1), ambos apresentam uma baixa relação C/N, que neste caso, pode ter ocasionado um equilíbrio na população bacteriana no trato intestinal de *Cubaris murina* aproximando estes perfis. Entretanto, a comunidade microbiana de *P. surinamensis* mostrou-se mais distinta quando comparada à comunidades dos grupos 1 e 2, apresentando similaridade de 10% com os demais grupos. Por outro lado, o *T. corallinus* (grupo 1) e *C. murina* (grupo 2), possuem comunidades bacterianas intestinais mais semelhantes. Onde foi possível verificar que elas possuem 28% de similaridade, no entanto mesmo sendo mais semelhantes, entre os três grupos formados, é considerada uma similaridade baixa.

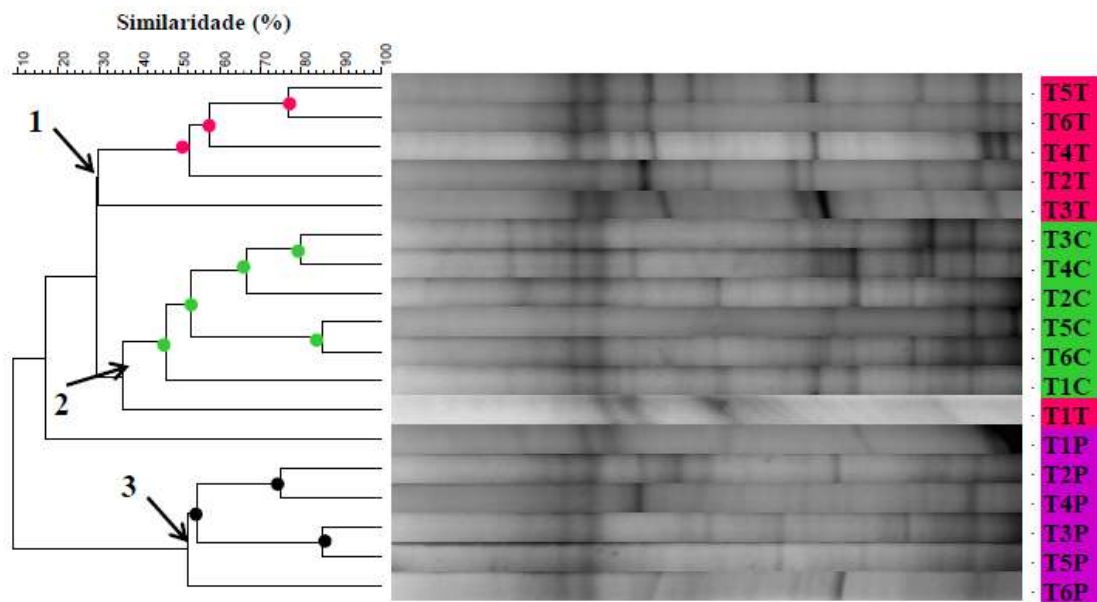
Nota-se que o perfil T1P, uma amostra proveniente das comunidades microbianas associadas ao trato intestinal de *P. surinamensis*, apareceu isolado, sem agrupamento consistente. Este perfil T1P apareceu distante do seu grupo 3, apresentando somente 10 % de similaridade, e com maior similaridade com os perfis das comunidades vindas dos tratos intestinais de *T. corallinus* (grupo 1) e *C. murina* (grupo 2). Este resultado de distanciamento do perfil, do tratamento T1 flemingia + grama + papelão, juntamente com os outros perfis de T1T e T1C, pode estar relacionado à composição do tratamento, com a alta relação C/N de 134,85, onde as comunidades bacterianas mostram-se mais sensíveis a esta dieta. Com base nestes padrões, é possível deduzir que as comunidades bacterianas dos tratamentos T1T e T1P, durante 60 dias, foram sensíveis à dieta T1 oferecida.

A maior semelhança entre os perfis de comunidades bacterianas das espécies *T. corallinus* (grupo 1) e *C. murina* (grupo 2), pode estar relacionada, ao fato que estas duas espécies apresentam hábitos alimentares e sistema digestivos mais semelhantes entre si, em relação a espécie *P. surinamensis* (grupo 3). Outro fator importante é a mobilidade mais reduzida em busca de alimentos da espécie *P. surinamensis*, comparado com as demais espécies. Pertencente à ordem Blattodea a espécie *P. surinamensis*, apresenta um sistema digestivo mais especializado. De acordo com Kunkel JG (1981) ao estudar uma espécie de barata alemã, *Blattella germanica*, avaliaram que esta espécie é altamente sensível às privações de alimentos e a limitação de nutrientes específicos, em particular proteínas.

O teor de nitrogênio no material vegetal é um fator atrativo para a fauna do solo que preferencialmente se alimenta de material rico em N (Mangenot & Toutain, 1981). Estudos de preferência alimentar de diplópodes tem sido bem documentados por (Warren & Zou, 2002; Ashwini & Sridhar, 2005) podendo ser importante na regulação de populações microbianas, na degradação do material consumido. Dados presentes na literatura afirmam que, invertebrados teriam uma habilidade fragmentadora limitada sobre resíduos vegetais mais lignificados, no entanto uma colonização prévia por microrganismos facilitaria esta

fragmentação. Embora isto seja parcialmente verdadeiro, já que há uma preferência por resíduos vegetais mais ricos nutricionalmente, isso não significa que haja um comportamento alimentar restrito a resíduos com menores valores de relação C/N (Correia, 2009).

De modo geral, os perfis de bandas obtidas, não revelaram fortes diferenças entre as dietas, pela técnica de DGGE. As maiores similaridades no dendrograma (Figura 9 **Error! Reference source not found.**) foram entre os perfis de indivíduos da mesma espécie de invertebrados. Uma hipótese para a baixa influência da dieta entre os perfis das comunidades, é que o período de coleta das amostras (60 dias de incubação) talvez não seja o ideal para verificar este efeito. Neste caso, o longo período de incubação, ocorreu um Stand-by que, no entanto pode ter proporcionado uma estabilização da população microbiana dos tratos intestinais dos três invertebrados estudados.



**Figura 9.** PCR-DGGE de amostras de DNA total isolado a partir do trato intestinal de três espécies de invertebrados saprófagos, submetidos a seis diferentes dietas. *Trigoniulus corallinus*: (T1T), (T2T), (T3T), (T4T), (T5T), (T6T); *Cubaris murina*: (T1C), (T2C), (T3C), (T4C), (T5C), (T6C); *Pycnoscelus surinamensis*: (T1P), (T2P), (T3P), (T4P), (T5P), (T6P). Dendrograma de similaridade foi calculado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de correlação Pearson. A análise foi conduzida no programa Gel Compare (BioNumerics Applied Maths).

Dados semelhantes foram encontrados por Passos (2010) em analisar a diversidade bacteriana do trato intestinal de espécies *Trigoniulus corallinus*, submetido a duas diferentes dietas (sabiá e grama), em um período de incubação de 15 a 75 dias. O mais interessante é que nos tratamentos de 75 dias de incubação e o tratamento controle foram agrupados juntos, manifestando a capacidade de resiliência da comunidade microbiana do trato intestinal da espécie *Trigoniulus corallinus*. Sendo que os tratamentos de 30 e 45 dias foram similares, não ocorrendo diferença, enquanto o tempo de incubação 15 dias se distanciou dos demais, fato este resultante da mudança e adaptação da comunidade bacteriana em função da fonte alimento. Outros resultados similares, foram demonstrados por Knapp et al (2009 b), ao analisar *Cylindroiulus fulviceps*, uma espécie de diplópode encontrada em regiões de clima temperado. Os autores analisaram comunidade bacteriana de *C. Fulviceps* incubados por 45 dias em esterco bovino e com dois diferentes resíduos vegetais de *Vaccinium gaultheroides* e

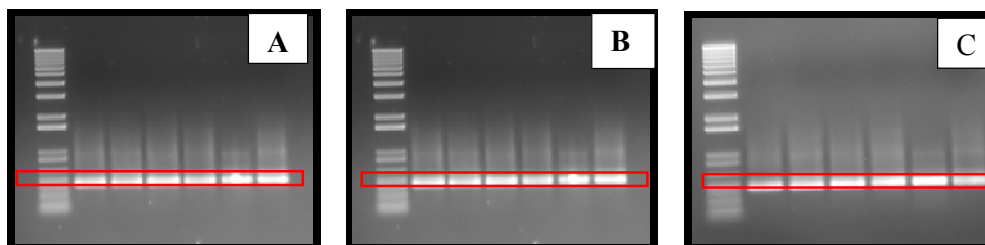
*Luzula sp.* Estes autores mostraram que aos 45 dias um perfil de DGGE do gene 16S rDNA com agrupamentos condicionais por trato intestinal e fonte de alimento. Obtiveram também uma correlação da dieta, condicionando a comunidade microbiana no trato intestinal.

As análises de géis por DGGE mostrou que a microbiota intestinal dos invertebrados, detém grupos bacterianos distintos. Pode se inferir neste ponto, que apesar das comunidades possuírem perfis de DGGE similares, como as espécies de *Trigoniulus corallinus* e *Cubaris murina*, os grupos que compõem estes perfis mostram-se diferentes entre as espécies de invertebrados.

### 3.5.2 Análise de diversidade através do 16S rDNA utilizando iniciadores para Actinobactérias

Esta análise foi feita utilizando-se o extrato bruto do trato intestinal de três espécies de invertebrados. A partir deste extrato foi realizada a extração de DNA, para a amplificação. As amostras de DNA foram submetidas à técnica de PCR, utilizando os iniciadores 243F/1401R. A figura 10 mostra que o produto de amplificação do DNA é suficiente para ser utilizado na técnica de DGGE.

Após a amplificação do 16S rDNA das amostras, o produto foi submetido à análise de DGGE. No dendrograma Figura 11 é mostra os perfis das comunidades de actinobactérias associadas ao trato intestinal das três espécies em estudos. É possível observar que os perfis das comunidades de Actinobactérias se agruparam em diferentes grupos (indicados pelas setas) em resposta à comunidade dos microrganismos associados.



**Figura 10.** Gel de agarose a 1,0% contendo DNA amplificado para actinobacteria das seguintes amostras: **A** - *Trigoniulus corallinus*: Marcador 1Kb, 1 (T1T), 2(T2T), 3(T3T), 4(T4T), 5(T5T), 6(T6T), **B** - *Cubaris murina*: Marcador 1Kb,1(T1C), 2(T2C), 3(T3C), 4(T4C), 5(T5C), 6(T6C); **C** - *Pycnoscelus surinamensis*: Marcador 1Kb; 1(T1P), 2(T2P), 3(T3P), 4(T4P), 5(T5P), 6(T6P).

Considerando a diversidade geral de Actinobactérias associadas ao trato intestinal das três espécies de invertebrados, foi possível identificar que as três espécies de invertebrados formaram grupos assim representados, *Pycnoscelus surinamensis* (grupo 1), *Trigoniulus corallinus* e *Cubaris murina* (grupo 2).

Os perfis representados pela comunidade microbiana do trato intestinal de *P. surinamensis* (grupo 1) apresentou 30 % de similaridade com o grupo 2, uma similaridade baixa. Entretanto os perfis oriundos das amostras de *T. corallinus* e *C. murina*, formaram um subgrupo, se agruparam com pouco mais de 50% de similaridade. Este resultado reforça o que foi encontrado ao avaliar a diversidade de bactérias item 3.3.1, em que os perfis oriundos de *Trigoniulus corallinus* e *Cubaris murina* se agruparam com 30% de similaridade, ao modo que são organismos que apresentam hábitos alimentares e palatabilidade muito semelhante. O grupo 1, representado pelos perfis da comunidade de actinobactérias do trato intestinal de *Pycnoscelus surinamensis*, apresentaram os perfis T4P e T5P, com a maior similaridade de 70% dentro deste grupo, os tratamentos T4 e T5 apresentam em sua estruturas materiais recalcitrantes e relação C/N bem diferentes, porem apresentam a mesma leguminosa, mais

uma vez de *Gliricidia*, podendo ter respondido sensivelmente a população microbiana do trato intestinal de *Pycnoscelus surinamensis*. O perfil T1P apareceu distante do grupo 1, apresentando somente 15 % de similaridade com os grupos 1 e 2. Este resultado também foi observado ao avaliarmos bactérias (item 3.3.1), confirmando que a dieta T1 (flemingia + grama + papelão), pode ter influenciado na comunidade de actinobactérias em relação aos demais tratamentos.

O grupo 2 foi agrupado a partir dos perfis de *Trigoniulus corallinus* e *Cubaris murina*. Dentro deste grupo os perfis que com maior similaridade entre si, foram os perfis oriundos da mesma espécie de invertebrados T3C e T4C com 75% de similaridade. Dentro da espécie de *T. corallinus* os perfis que apresentaram uma alta similaridade foram T5T e T6T com 70% de similaridade. Estes elevados valores de similaridade dentro dos tratamentos T5 e T6 também foram observados no item 3.3.1.

Assim como dados obtidos anteriormente para o domínio *Bacteria*, que manifesta a variação de toda a comunidade microbiana; as bandas obtidas pelo domínio Actinobactéria, não revelaram fortes similaridades entre as dietas pela técnica de DGGE, somente entre os grupos de invertebrados, levantando a mesma hipótese de que o tempo de incubação promove a estabilização da comunidade microbiana dos tratos intestinais dos três invertebrados estudados. As amostras das espécies *T. corallinus* e *C. murina* apresentaram um maior número de bandas no gel, comparando-se com o material oriundo da espécie *P. surinamensis*. O número elevado de bandas do gene 16S rDNA de actinobactérias, também foram encontrados por Passos (2010), ao estudar a espécie *T. corallinus*, ao submeter este organismo à dietas com serapilheira da leguminosa arbórea conhecida como sábia, (*Mimosa caesalpinifolia*), e com grama (*Papalum notatum*) durante 75 dias.

Lefebvre et al., (2009) utilizando *primers* específicos para Actinobacteria, observaram várias sequências de actinobactérias no trato intestinal de térmitas da espécie *Nasutitermes corniger*. Estes mesmos autores relatam a hipótese que a comunidade de actinobactérias no trato intestinal deste térmita foi totalmente influenciada pela microbiota presente na dieta oferecida.

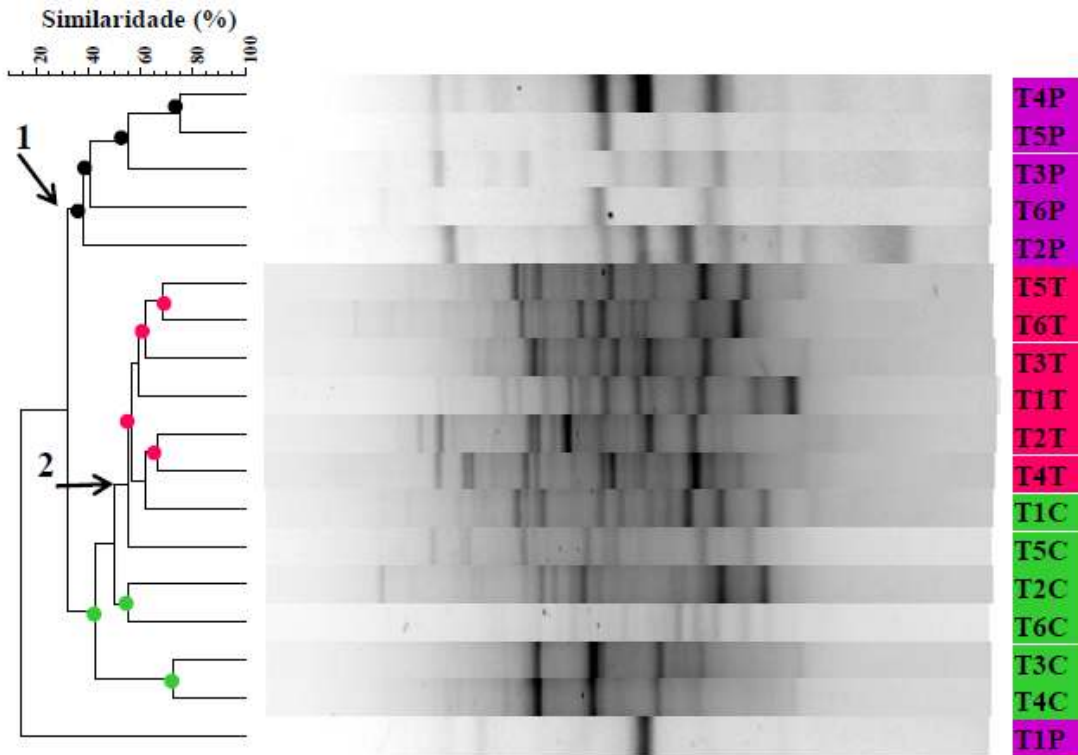
De acordo com Byzov (2008), a maioria das bactérias isoladas do intestino de diplópodes pertence à subclasse de gama-proteobactérias e do filo actinobacteria. Entre as proteobactérias estão as bactérias anaeróbicas facultativas da família Enterobacteriaceae, dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Plesiomonas*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Escherichia*, e a família Vibrionaceae, gênero *Vibrio*. E o segundo grupo de bactérias mais numerosos, que habitam o intestino de diplópodes, são as do filo actinobactéria. Entre eles estão representadas as famílias Promicromonospora, Cellulomonadaceae, Streptomycetaceae e o grupo de Nocardioform actinomycetes, sendo que os *Streptomyces* são predominantes.

Uma vez que a PCR-DGGE proporciona uma melhor descrição das comunidades microbianas do que o previsto por métodos baseados em cultivo, a comunidade de actinobactéria descrita neste estudo pode dar uma imagem sutil da diversidade deste grupo bacteriano específico no trato intestinal das três espécies de invertebrados. No entanto, a abundância dos táxons, exibidos por bandas pode não refletir uma composição quantitativa absoluta da comunidade de actinobactéria devido às polarizações do método em PCR (Von Wintzingerode et al., 1997).

Membros do filo Actinobacteria que habitam o intestino de invertebrados, são diversos e amplamente distribuídos entre as diferentes famílias da ordem Actinomycetales. A maioria das sequências relacionadas com actinobactérias revelou a presença de novas espécies bacterianas que resultam a partir do intestino de invertebrados (Lefebvre et al., 2009). Investigações adicionais são necessárias, para explorar mudanças na comunidade de actinobactéria no intestino de invertebrados, com respeito aos componentes alimentares, tempo de dieta e determinação do impacto resultante na degradação de resíduos vegetais.



Apesar de uma alta diversidade de actinobactérias, isoladas a partir do trato intestinal de diferentes espécies de térmitas (Davison & Blaxter, 2005), eles representam apenas uma pequena fração presente (Demura & Fukuda, 2007). No entanto, a comunidade de actinobacteria no trato intestinal de térmitas parece depender mais da origem geográfica do que da proximidade taxonômica entre as espécies (Tamaru, 1998). Um provável papel das actinobactérias no trato intestinal dos cupins, esta relacionado à nutrição, através da degradação de compostos lignocelulósicos (Demura & Fukuda, 2007).



**Figura 11.** PCR-DGGE domínio actinobacteria, de amostras de DNA total isolado a partir do trato intestinal de três espécies de invertebrados saprófagos, submetidos a seis diferentes dietas. *Trigoniulus corallinus*: (T1T), (T2T), (T3T), (T4T), (T5T), (T6T); *Cubaris murina*: (T1C), (T2C), (T3C), (T4C), (T5C), (T6C); *Pycnoscelus surinamensis*: (T1P), (T2P), (T3P), (T4P), (T5P), (T6P). Dendrograma de similaridade foi calculado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de correlação Pearson. A análise foi conduzida no programa Gel Compare (BioNumerics Applied Maths).

### 3.5.3 Análise de sequências de bandas extraídas dos géis de DGGE

Esta análise ocorreu através do extrato bruto do trato intestinal de três espécies de invertebrados. A partir deste extrato foi realizada a extração de DNA, para a amplificação. As amostras de DNA foram submetidas à técnica de PCR, utilizando os iniciadores 341F/907R.

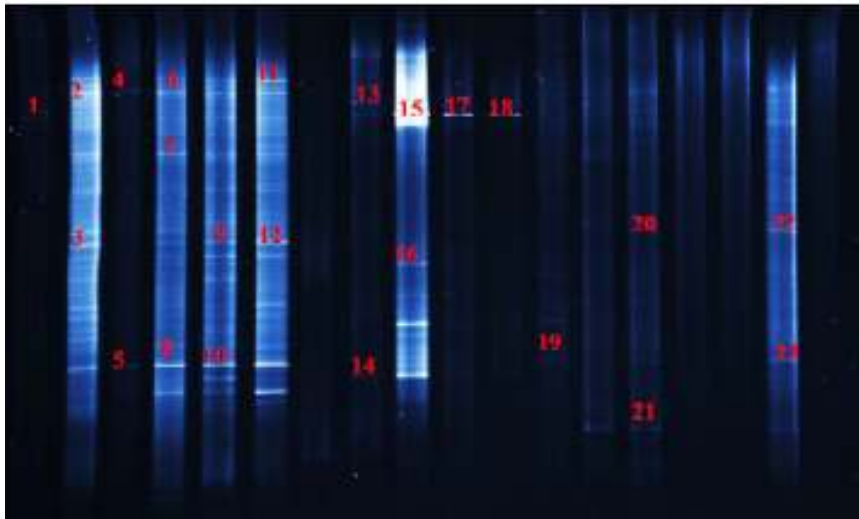
Após a amplificação do gene 16S rDNA as amostras, foram submetidas à análise de DGGE Figura 12, é possível observar que a baixa resolução de algumas amostras não forneceram a nitidez necessária, restringindo o uso deste gel na análise de dendrograma, no programa Gel Compare (BioNumerics).

Das 132 bandas visualizadas no gel, 52 foram incisadas, e em seguida tratadas em TEA-BUFFER, para a remoção do DNA aderido no gel na poliacrilamida, para realizar a segunda amplificação por PCR. Após a confirmação da PCR, apenas 23 foram amplificadas.



A Figura 12 está numerada as bandas obtidas na segunda amplificação bem sucedida, utilizando estas amostras para a clonagem.

T1T, T2T, T3T, T4T, T5T, T6T, T1C, T2C, T3C, T4C, T5C, T6C, T1P, T2P, T3P, T4P, T5P, T6P.



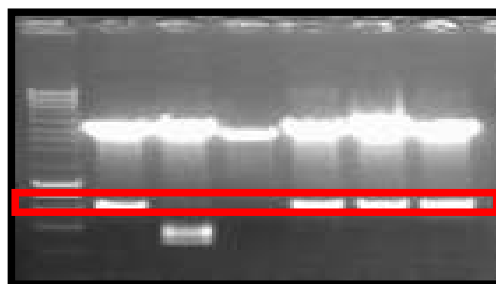
**Figura 12.** PCR-DGGE domínio *Bacteria*, de amostras de DNA total isolado a partir do trato intestinal de três espécies de invertebrados saprófagos, submetidos a seis diferentes dietas. *Trioniulus corallinus*: (T1T), (T2T), (T3T), (T4T), (T5T), (T6T); *Cubaris murina*: (T1C), (T2C), (T3C), (T4C), (T5C), (T6C); *Pycnoscelus surinamensis*: (T1P), (T2P), (T3P), (T4P), (T5P), (T6P).

Os produtos da reação de PCR foram purificados, para inseri-los no vetor de clonagem pGEMgem-T. Os plasmídeos recombinantes, foram inseridos por choque térmico em bactérias *E. coli* DH5  $\alpha$  competentes. As bactérias transformadas foram semeadas em placa de Petri contendo meio LB, ágar, ampicilina, X-gal e ITPG e crescidas *overnight* em estufa por incubação a 37°C. A Figura 13, mostra exemplo dos resultados obtidos com a transformação das bactérias DH5  $\alpha$ .

Várias colônias brancas e azuis cresceram na placa. A seleção dos transformantes foi realizada pela capacidade de crescer em presença do antibiótico ampicilina e através da coloração branca de algumas colônias transformantes indicativas da presença do inserto dentro da região codificadora. As colônias brancas resistentes foram escolhidas aleatoriamente, inoculadas em tubos estéreis contendo meio LB líquido com ampicilina e submetidas à incubação *overnight* em estufa por incubação a 37°C sob agitação. Após o crescimento individual destas colônias seus plasmídeos foram extraídos, quantificados, clivados por enzimas de restrição para checar a presença do inserto, para serem sequenciados. A figura 14 mostra algumas amostras que foram submetidas ao protocolo de restrição. Os clones foram comparados com base de dados de sequências de rDNA 16S do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e foram classificadas, mediante a criação de grupos de afiliação filogenética.



**Figura 13.** Placa de meio LB/ampicilina. As colônias brancas, indicada pela seta, indicam a presença do vetor/ inserto nas células competentes de *E.coli* DH5  $\alpha$ .



**Figura 14.** Separação dos plasmídeos digeridos pGEM.

As amostras foram alinhadas com outras sequências de mesma afiliação taxonômica em nível de Gênero, Filo e Família mais próximos. Tais valores estão apresentados na Tabela 3, bem como as unidades taxonômicas, cobertura, identidade, tamanho do fragmento e número de acesso. Nota-se que algumas sequências foram muito similares, isto ocorreu porque as amostras de amplificação da reação de PCR pode produzir mais de uma banda de DGGE devido aos múltiplos e heterogêneos *operons* de rDNA.

Na tabela 3, constam os resultados de dois *Hits*, o primeiro *Hit* identificado com a letra (A), são sequências na sua maioria, de bactérias não cultiváveis e o segundo *Hit* identificados com a letra (B), são sequências de bactérias cultiváveis. Estes estão ilustrados nas e figuras 15 e 16. É possível observar que as sequências de bactérias cultiváveis *Hits* 2, obtiveram coberturas mais baixas porém uma alta identidade, isto significa que são regiões do 16S altamente conservadas e que os organismos presentes nas amostras oriundas do trato intestinal dos invertebrados estudados estão fortemente relacionados a estas sequências. No entanto as sequências de bactérias não cultiváveis *Hits* 1, apresentam uma alta coberturas, e identidades baixas. Apesar dos clones encontrados terem apresentado alta identidade com bactérias cultiváveis no segundo *Hit*, a maior parte foi relacionada a bactérias não cultiváveis. Entretanto, neste caso, as informações produzidas pela análise molecular são relativas, e não permitem estabelecer uma identidade exata das sequências. Quando os microrganismos mais próximos não estão descritos é difícil deduzir o possível papel metabólico/ funcional da sua posição filogenética (Köchling, 2007).

Algumas amostras, provenientes do primeiro e segundo *Hits*, que apresentaram baixa identidade entre (88 e 97%) possivelmente pertencem a novos gêneros ou espécies. No entanto, esta análise revela que o trato intestinal de invertebrados, apresenta uma diversidade de microrganismos ainda desconhecidos, podendo eventualmente, ser realizada uma análise

mais detalhada das bactérias cultiváveis (envolvendo a aplicação de vários meios de cultivo, incluindo os meios anaeróbios).

Das sequências obtidas no segundo *Hit* representado pela letra (B) foram identificados membros de três linhagens filogenéticas, afiliadas ao domínio *Bacteria*, sendo eles: Proteobacteria (Gamma e Alpha), seguido de Bacteroidetes e Firmicutes. Desta forma ocorrendo uma baixa diversidade filogenética. Dentro dos filos, foram identificados nove gêneros, sendo eles: *Enterobacter* (nove sequências), *Chitinophaga* (quatro sequências), *Buttiauxella* (uma sequência), *Ochrobactrum* (duas sequências), *Serratia* (uma sequência), *Kaistia* (três sequências), *Bacillus* (duas sequências), *Kluyvera* (uma sequência) e *Pantoea* (duas sequências).

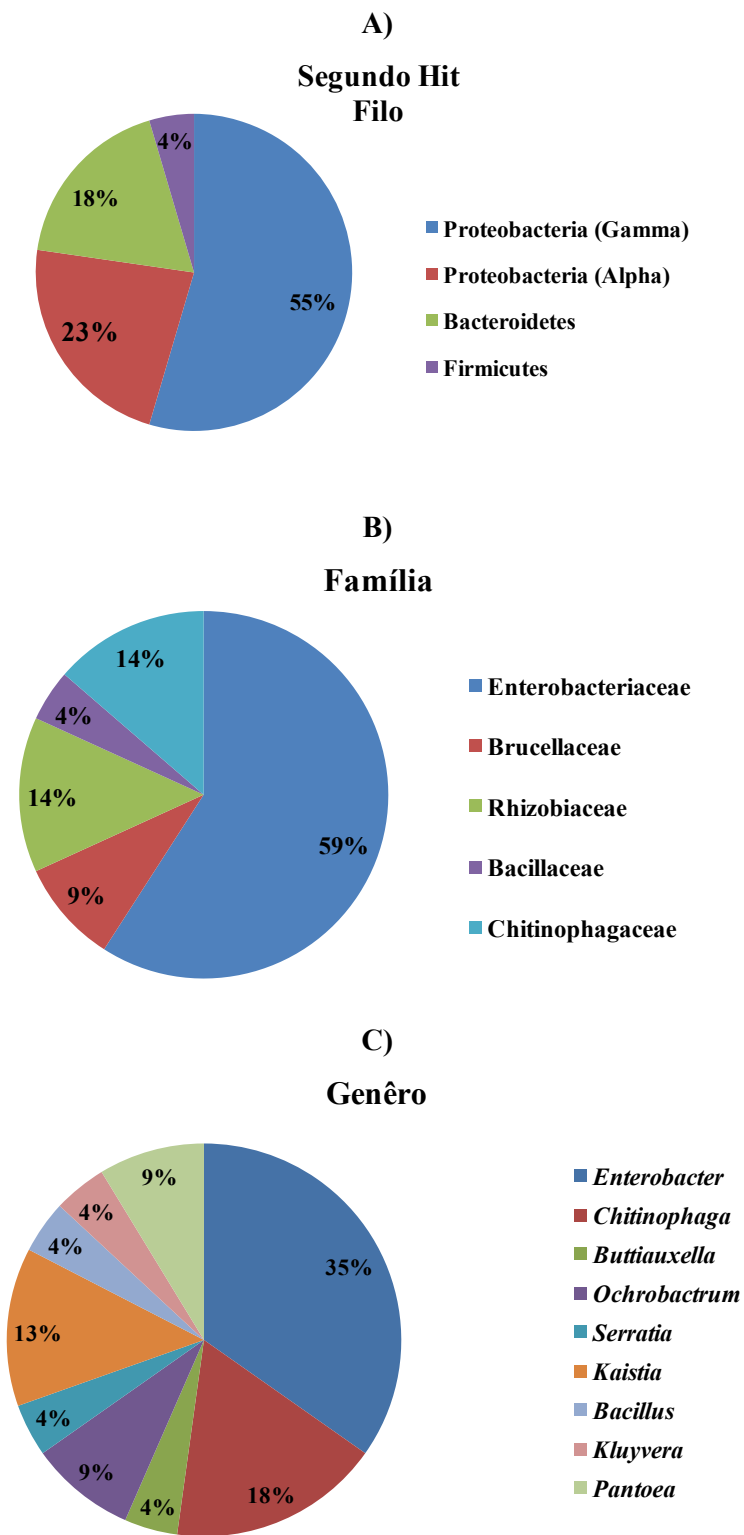
Para obter árvores filogenéticas mais robustas, é necessário que ocorram sequências acima de 1000 pares de base. No entanto as amostras deste estudo apresentaram sequências pequenas, com apenas 447 pares de base, não permitindo uma inferência filogenética. Entretanto estas sequências foram excelentes para inferências entre os grupos (família). Por esta razão foram utilizadas apenas as sequências de bactérias cultiváveis para a construção da árvore filogenética, como mostra a figura 17. As amostras pertencem às famílias Enterobacteriaceae, Brucellaceae, Rhizobiaceae, Bacillaceae e Chitinophagaceae.

Dentro da classe  $\gamma$ - Proteobacteria, representada pela família Enterobacteriaceae, têm sido reconhecidos por dominar intestinos de vários invertebrados do solo. Alguns representantes da classe  $\delta$ -Proteobacteria, que consiste principalmente de bactérias redutoras de sulfato de enxofre, também eram filiados a sequências provenientes de térmitas (Warneck et al., 2007). Dentro da  $\gamma$ - Proteobacteria, conhecido por sua capacidade de metabolizar diversos compostos de carbono (Kerstens et al., 2006), os membros da família Enterobacteriaceae foram relatos como abundantes na flora intestinal de invertebrados (Dillon et al., 2008; Lee et al., 2008) e é suposto pertencente às famílias predominantes dentro do trato intestinal de diplópodes (Byzov et al., 1996).

### Primeiro Hit



**Figura 15:** Primeiro Hit, das sequências de clonagem para o domínio *Bacteria*, das bandas de DGGE.



**Figura 16.** Segundo Hit, das sequências de clonagem para o domínio *Bacteria* das bandas de DGGE. A) Filo, B) Família e C) Genêro.

**Tabela 3.** Classificação das seqüências de clonagem para o domínio *Bacteria*, das de bandas DGGE, mediante análise comparativa entre BLAST e as de seqüências do NCBI.

| Banda | Hits* | Seqüências mais similares no GeneBank (BLAST)                                | Cobertura (%) | Identidade (%) | Tamanho da seqüência | Número de Acesso | Filo                   | Família            |
|-------|-------|--|---------------|----------------|----------------------|------------------|------------------------|--------------------|
| 1     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L09-0m-0.8microm-B13     | 93            | 90             | 955                  | HE647140         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Enterobacter aerogenes</i> BD18ACC-R05                                    | 61            | 99             |                      | HF585066         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 2     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L09-0m-0.8microm-B13     | 92            | 89             | 951                  | HE647140         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Enterobacter aerogenes</i> BD18ACC-R05                                    | 60            | 99             |                      | HF585066         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 3     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 17RHF23                    | 57            | 99             | 1004                 | AJ863366         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Chitinophaga terrae</i> KP01  | 57            | 97             |                      | NR_041540        | Bacteroidetes          | -                  |
| 4     | A     | <i>Enterobacter aerogenes</i> A23  | 60            | 100            | 970                  | KC434976         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
|       | B     | <i>Enterobacter aerogenes</i> Lb15   | 60            | 99             |                      | KF726081         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 5     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8microm-B7      | 87            | 88             | 1031                 | HE647137         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Butiauxella bremerae</i> LHC20  | 56            | 95             |                      | KC951916         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 6     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8microm-B7      | 94            | 89             | 952                  | HE647137         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Enterobacter aerogenes</i> A23  | 61            | 99             |                      | KC434976         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 7     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8microm-B7      | 94            | 88             | 963                  | HE647137         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Enterobacter aerogenes</i> A23  | 60            | 98             |                      | KC434976         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 8     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 3-L03-0m-0.8microm-B203    | 87            | 93             | 997                  | HE647145         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Ochrobactrum</i> sp. LM19   | 55            | 99             |                      | KF769963         | Proteobacteria (Alpha) | Brucellaceae       |
| 9     | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 3-Ocean-20m-0.8microm-B219 | 91            | 93             | 973                  | HE647148         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Ochrobactrum</i> sp. LM19   | 57            | 99             |                      | KF769963         | Proteobacteria (Alpha) | Brucellaceae       |
| 10    | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L09-0m-0.8microm-B13     | 86            | 89             | 1021                 | HE647140         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51   | 56            | 95             |                      | NR_042356        | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |
| 11    | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-10m-0.8microm-B9     | 86            | 91             | 1014                 | HE647138         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Kaistia granulii</i> N106   | 54            | 99             |                      | HM244947         | Proteobacteria (Alpha) | Rhizobiaceae       |
| 12    | A     | <i>Bacillus</i> sp. Pb-WC11221   | 56            | 99             | 1036                 | JX913836         | Firmicutes             | Bacillaceae        |
|       | B     | <i>Bacillus flexus</i> CSMCRL-1108   | 56            | 99             |                      | JQ665371         | Firmicutes             | Bacillaceae        |
| 13    | A     | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8microm-B7      | 79            | 90             | 996                  | HE647137         | -                      | -                  |
|       | B     | <i>Kluyvera cryocrescens</i> KC46282   | 53            | 99             |                      | KC686601         | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae |

|    |   |  |    |     |     |           |                        |                    |                    |
|----|---|--|----|-----|-----|-----------|------------------------|--------------------|--------------------|
| 14 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8microm-B7  | 94 | 89  | 957 | HE647137  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Pantoea agglomerans</i> 4GW7  | 61 | 100 |     | GU991862  | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae | Enterobacteriaceae |
| 15 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L09-0m-0.8microm-B13 | 93 | 90  | 954 | HE647140  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Pantoea agglomerans</i> 4GW7  | 61 | 99  |     | GU991862  | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae | Enterobacteriaceae |
| 16 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-0m-0.8microm-B7  | 94 | 89  | 954 | HE647137  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Enterobacter aerogenes</i> A23  | 61 | 99  |     | KC434976  | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae | Enterobacteriaceae |
| 17 | A | Uncultured bacterium clone B137  | 93 | 99  | 480 | JX515438  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Kaistia granulii</i> N106   | 93 | 99  |     | HM244947  | Proteobacteria (Alpha) | Rhizobiaceae       | Rhizobiaceae       |
| 18 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L09-0m-0.8microm-B13 | 92 | 90  | 961 | HE647140  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Enterobacter aerogenes</i> A23  | 60 | 99  |     | KC434976  | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae | Enterobacteriaceae |
| 19 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L03-10m-0.8microm-B9 | 90 | 92  | 986 | HE647138  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Kaistia granulii</i> N106   | 56 | 99  |     | HM244947  | Proteobacteria (Alpha) | Rhizobiaceae       | Rhizobiaceae       |
| 20 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 1-L09-0m-0.8microm-B13 | 93 | 90  | 953 | HE647140  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Enterobacter aerogenes</i> A23  | 61 | 99  |     | KC434976  | Proteobacteria (Gamma) | Enterobacteriaceae | Enterobacteriaceae |
| 21 | A | Uncultured bacterium clone KD9-162                                       | 61 | 92  | 949 | AY218659  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Chitinophaga</i> sp. RA12   | 61 | 91  |     | JNS85676  | Bacteroidetes          | Chitinophagaceae   | Chitinophagaceae   |
| 22 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 17RHF23                | 60 | 99  | 960 | AJ863366  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Chitinophaga terrae</i> KP01  | 60 | 97  |     | NR_041540 | Bacteroidetes          | Chitinophagaceae   | Chitinophagaceae   |
| 23 | A | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 17RHF23                | 61 | 99  | 946 | AJ863366  | -                      | -                  | -                  |
|    | B | <i>Chitinophaga terrae</i> KP01  | 61 | 97  |     | NR_041540 | Bacteroidetes          | Chitinophagaceae   | Chitinophagaceae   |

\* A = 1° hit no GeneBank. B = 1° ou 2° hit de bactéria cultivável

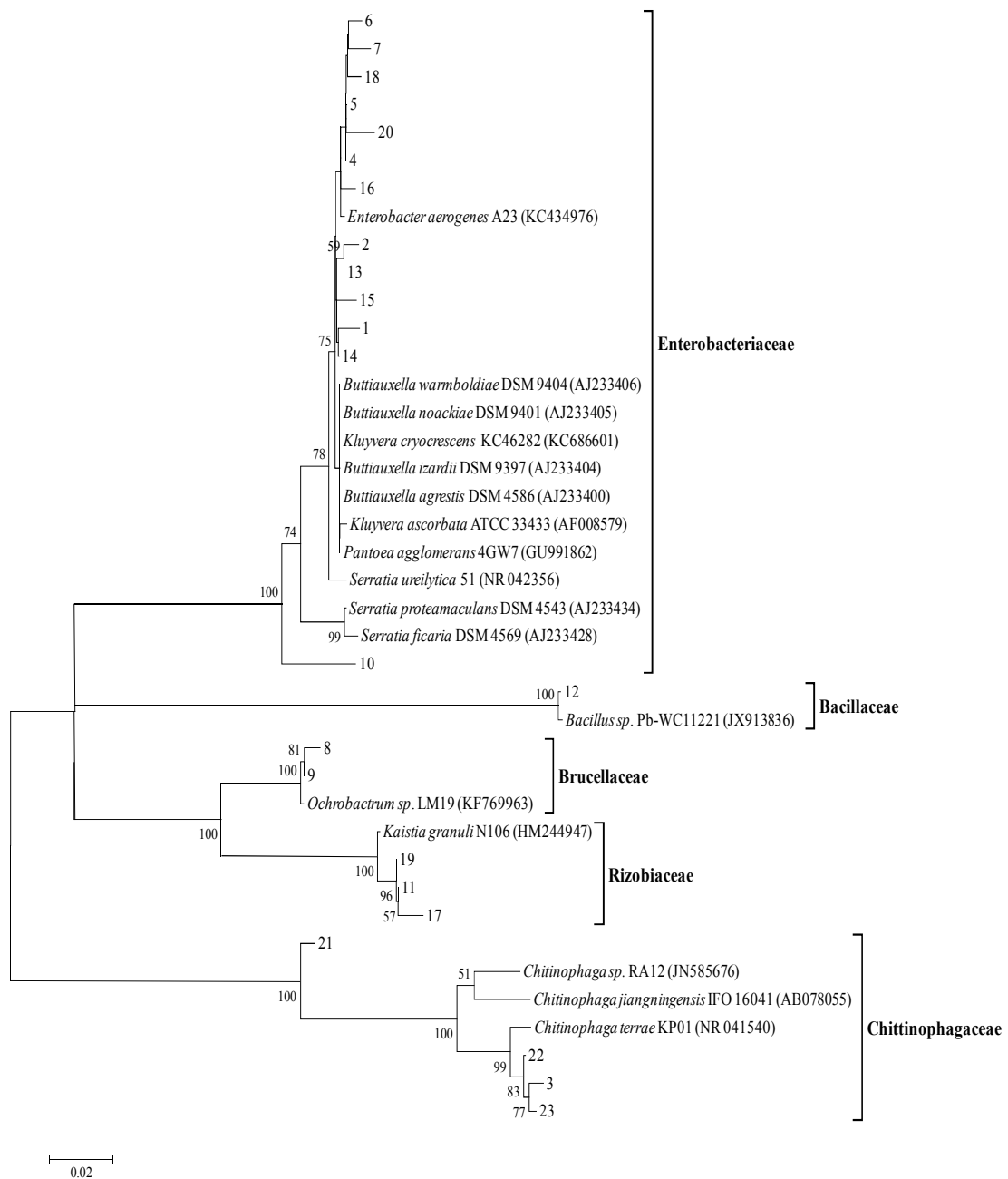
Os gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae, encontrados neste trabalho, já foram identificados em outros trabalhos em simbiose com minhocas e cupins (Byzov et al., 2008, König et al., 2007 e König et al., 2013). Da mesma forma, o gênero *Pantoea*, foi encontrado em intestino de larva de uma espécie de Coleóptera (Vasanthakumar et al., 2008). Numerosos filotipos atribuídos a Bacteroides foram intimamente relacionados com os clones resultantes a partir do trato intestinal de térmitas (Hongoh et al., 2003; Yang et al., 2005; Nakajima et al., 2006) e Coleóptera (Egert et al., 2003). Juntamente com os membros do Filo Firmicutes, foi demonstrado como dominantes no intestino de térmitas (Shimitt & Wagner et al., 2003; Yang et al., 2005; Hongoh et al., 2006), incluindo representantes com o metabolismo fermentativo dos filo Bacteroidetes e Firmicutes, assumindo-se então a sua contribuição na decomposição de resíduos vegetais (Hongoh et al., 2006).

No entanto, a abundância de Proteobacteria, Bacteroides e Firmicutes entre bactérias cultivadas, em bibliotecas de clones podem ser atribuídas à sua preferência por ambientes com microaerofilia (baixíssimas concentrações de oxigênio) previamente detectados no intestino de diplópodes (Byzov et al., 2006).

Schrott et al., (2009) analisando amostras do intestino derivados do trato intestinal de uma espécie de diplópodes, *C.fulviceps*, em condições de cultivo anaeróbicas, isolaram bactérias anaeróbicas facultativas do filo Firmicutes (Bacillales e Clostridiales), mas nenhum representante da Bacteroides e  $\delta$  – Proteobacteria.

Não identificados nas sequências de clones, o filo Actinobacterias, que estão bem representadas em coleções de culturas, muitas vezes, são sub - representadas em bibliotecas de clones (Hugenholtz et al., 1998). Devido à dificuldade de lise celular e o seu elevado conteúdo de GC, a extração de DNA, bem como sua amplificação por PCR pode ser dificultada (Mühling et al., 2008; Feinstein et al., 2009). Por estas razões a falta de Actinobacteria dentro de bibliotecas de clone, pode ser atribuída à sua restrição metodológica (Knapp et al., 2010), porém em métodos de cultivo, este resultado já se mostra opoente, como mostrados no Capítulo 2.

Para concluir, simbioses entre invertebrados saprófagos e microrganismos, atuam como um filtro no solo, o que implica na regulação da ciclagem de nutrientes e no ciclo do carbono. Embora esta simbiose já seja conhecida, a função específica no organismo do hospedeiro, devem ser mais bem investigadas. A estrutura e dinâmica da comunidade microbiana do trato intestinal de invertebrados, não podem ser apenas avaliadas por um único método, é necessária uma verificação cruzada dos resultados obtidos por diferentes métodos.



**Figura 17.** Árvore filogenética dos clones identificados oriundos do Trato da Intestinal de Animais Saprófagos. A diversidade correspondente ao sequenciamento parcial de 447pb do gene 16S rDNA. A similaridade entre as sequências dos isolados e as existentes no GenBank foram correlacionadas a partir de suas similaridades e agrupadas pelo método *Neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* também são apresentados, sendo calculados por 1000 sub-amostragem no grupo das sequências. Foi utilizando o programa MEGA 5.1.



### 3.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, os resultados sobre a diversidade de Bactérias e Actinobactérias no trato intestinal de três espécies de invertebrados *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensi*, nos levaram as seguintes conclusões:

- a. Os perfis de bandas de DGGE para os domínios *Bacterias* e *Actinobactéria* foram diferentes entre si, no entanto os perfis de invertebrados da mesma espécie se agruparam fortemente, após 60 dias de incubação;
- b. As dietas influenciaram de forma sutil a diversidade. A presença da Leguminosa *Gliricidia*, na composição das dietas oferecidas aos invertebrados, respondeu se sensivelmente, nos perfis de DGGE para os dois domínios, *Bacterias* e *Actinobactéria*, apresentando similaridades superiores a 70%, dentro das espécies *Trigoniulus corallinus* e *Cubaris murina*. Perfis com baixa similaridade foram encontrados com o tratamento T1 (flemingia + grama + papelão) que se distanciou dos demais tratamentos, separando as espécies *Trigoniulus corallinus* e *Pycnoscelus surinamensi* de seus grupos;
- c. A partir de clones de bandas incisadas, foram encontradas sequências afiliadas a três filos, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes;
- d. O filo Proteobacteria, apresentou o maior número de gêneros identificados por sequenciamento, sendo eles *Enterobacter*, *Buttiauxella*, *Serratia*, *Kluyvera* e *Pantoea*;
- e. A partir dos dados aqui relatados a diversidade bacteriana esta fortemente relacionada ao próprio invertebrado. Que apresentam em seu trato digestivo, bactérias especializadas para sua nutrição e importantes na produção de compostos antimicrobianos em defesa contra patógenos presentes no alimento ingerido.

## **4      CAPÍTULO II**

### **IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E AVALIAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO INTESTINAL DE INVERTBRADOS SAPRÓFAGOS**

#### 4.1 RESUMO

Em geral os macro e microrganismos presentes no solo fragmentam e decompõem o material vegetal, também chamado de biomassa residual como, por exemplo, raízes, folhas, trocos, galhos, palhas, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar entre outros. Para que ocorra esta decomposição é necessário um sinergismo entre os organismos presentes no solo. Bactérias com ação celulolítica, isoladas do trato intestinal de invertebrados saprófagos foram identificadas e analisadas para avaliar seu potencial quanto à produção de celulases em resposta à presença de carboxi-metil-celulose (CMC) como a única fonte de carbono. Para o teste de índice enzimático foi utilizada a técnica de coloração vermelho Congo. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido, durante 5 dias a 28°C. As bactérias que apresentaram os maiores índices enzimáticos, tiveram seu gene 16S sequenciado. Após a confirmação da posição filogenética das bactérias, foram realizados testes para determinar a atividade das endoglucanases (CMCase) e endo e exoglucanases (FPase). A fim de comparar duas fontes de carbono para crescimento, as bactérias foram inoculadas em dois meios líquidos diferentes: 1) com 1% carboxi-metil-cellulose (CMC) e 10% de MMBH, e 2) com 5% de *Pennisetum purpureum* (Capim-elefante) moído, com adição de 0,5% de extrato de levedura. As bactérias foram mantidas durante 12 dias de incubação, sob agitação a 120 rpm a 30°C. Para determinar a massa molecular e atividade das enzimas foram realizadas corridas com géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Zimograma. Para este teste as bactérias foram crescidas apenas em meio CMC 1% com adição de 0,5% de extrato de levedura e incubadas durante 7 dias. Vinte e três isolados de bactérias, provenientes do trato intestinal das espécies de invertebrados, *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina*, *Pycnoscelus surinamensis*, apresentaram no teste de hidrólise; valores de índice enzimático superiores a 3,0 Ie, considerado uma ótima atividade hidrolítica. Através da análise filogenética, foi possível identificar as 23 espécies de bactérias. Dois filos distintos Actinomicetos e Firmicutes, o maior gênero identificado foi *Streptomyces*, seguido de um isolado para *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*. O trato intestinal das três espécies de invertebrados saprófagos se mostrou um ambiente propício à prospecção de bactérias com eficiência celulolítica, evidenciando seu potencial, para futuros estudos biotecnológicos.

**Palavras chave:** Celulases. Zimograma. *Streptomyces*.

## 4.2 ABSTRACT

In general the macro and microorganisms in the soil fragment and decompose the plant material, also called residual biomass, eg, roots, leaves, loose change, twigs, straw, corn cobs, bagasse from sugarcane others. For this decomposition occurs synergism between soil organisms is necessary. Bacteria with cellulolytic action isolated from the intestinal tract of saprophages invertebrates have been identified and examined to assess their potential to produce cellulolytic enzymes in response to the presence of carboxy methyl cellulose (CMC) as a sole carbon source. For the enzymatic index test technique Congo red stain was used. Bacteria were inoculated in solid culture for 5 days at 28 C. Bacteria that showed the highest enzyme levels, had their 16S gene sequenced. After confirming the phylogenetic position of bacteria, testing to determine the activity of endoglucanase (CMCase) and endo- and exoglucanases (FPase) were performed. In order to compare two carbon sources for growth, bacteria were inoculated into two different liquid media: 1) with 1% carboxymethyl cellulose (CMC) and 10% MMBH, and 2) 5% *Pennisetum purpureum* (elephant grass) ground, with 0.5% yeast extract. Bacteria were maintained for 12 days of incubation under agitation at 120 rpm at 30C. To determine the molecular weight and activity of enzymes races with polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and zymography were performed. For this test bacteria were grown in medium with 1% CMC addition of 0.5% of yeast extract and incubated for 7 days. Twenty-three isolates of bacteria from the intestinal tract of the invertebrate species, *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murine*, *Pycnoscelus surinamensis* showed the hydrolysis test; enzymatic index values greater than 3.0 Ie, considered a great hydrolytic activity. Through phylogenetic analysis, it was possible to identify 23 species of bacteria. Two distinct actinomycetes and Firmicutes phylum, the largest genus *Streptomyces* identified was followed for an isolated *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Staphylococcus*. The intestinal tract of three species of invertebrates saprophages proved an environment conducive to prospecting for bacteria with cellulolytic efficiency environment, demonstrating their potential for future biotechnological studies.

**Key words:** Cellulases. Zymography. *Streptomyces*.

### 4.3 INTRODUÇÃO

A biodegradação da biomassa lignocelulósica, é um processo natural da reciclagem da matéria orgânica que, conseqüentemente, desempenha um papel importante no ciclo natural do carbono, que tem início na biossíntese dos seus constituintes a partir de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, energia solar e finaliza com a mineralização e liberação destes constituintes, em decorrência da decomposição causada por organismos que apresentam eficiência na biodegradação (Arante & Milagres, 2009). É importante salientar que a biodegradação de materiais lignocelulósicos ocorre no solo, um sistema aberto, local onde os polissacarídeos se acumulam em grande quantidade. Onde se encontra uma ampla diversidade de microrganismos e invertebrados saprófagos responsáveis pela decomposição de materiais vegetais ali expostos.

A biomassa lignocelulósica é referida como a fonte renovável mais abundante encontrada na natureza. A sua degradação se dá por um vasto número de bactérias e fungos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos, que conseguem utilizar os produtos resultantes da hidrólise da parede vegetal como fonte de carbono e energia, sendo capazes de degradar de forma sinérgica a celulose, hemicelulose e lignina, a partir da liberação de enzimas hidrolíticas e oxidativas (Pérez et al., 2002). Do ponto de vista filogenético, a capacidade bacteriana celulolítica tem uma ampla distribuição, no solo estas bactérias são bastante heterogêneas e pertencem a vários filos, incluindo Firmicutes, Actinobactérias, Bacteroidetes e Proteobacteria (Lynd et al., 2002).

Há microrganismos que apresentam funcionalidades específicas atuando na transformação da biomassa, alguns mostram eficiência em produzir metabolitos com atividade enzimática específica, por exemplo: celulase e protease entre outras (Arias et al., 2005). No solo, as enzimas acumuladas são primariamente provenientes de células microbianas (Ladd, 1978), entretanto um pequeno percentual pode ser originado de resíduos vegetais e animais (Tabatabai, 1994). As enzimas são encontradas no solo na forma livre excretadas por células vivas (exoenzimas), ou liberadas por células que se rompem (endoenzimas) e enzimas ligadas a constituintes celulares (Moreira & Siqueiral, 2006).

A diversidade de microrganismos que produzem celulasas é extraordinária, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, capazes de degradar a celulose natural (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004). Dentre esses microrganismos, estão os actinomicetos ou actinobactérias, que são bactérias filamentosas, gram-positivas, citadas na literatura como produtoras de importantes enzimas industriais e envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica (Flores et al., 1997).

Os micro-organismos secretam numerosas enzimas celulolíticas, denominadas celulasas, que são muitas vezes descritas como complexos enzimáticos, que atuam de forma sinérgica. Este grupo reúne três principais enzimas que estão envolvidas na degradação da celulose para glicose, que são: endoglucanases (endo-1,4β-D-glucanase, EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (exo-1,4-β-D-glucanase, EC 3.2.1.91) e β-glicosidases (1,4-β-D-glicosidase EC 3.2.1.21). A endoglucanase age de forma aleatória, clivando a beta- endoglucanase, dentro da molécula da celulose; a celobiohidrolase remove as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e a β-glicosidase quebra a celobiose em duas unidades de glicose (Lee et al., 2002).

Acreditava-se que a maioria dos animais, não poderia utilizar celulose em sua dieta, no entanto, há evidências que enzimas celulolíticas estão distribuídas em uma variedade de animais vertebrados (Davison & Blater, 2005, Watabanabe & Tokuda, 2001), e que alguns vertebrados herbívoros utilizam biomassa celulósica com ajuda de simbiontes intestinais.

Esses chamados ruminantes consomem principalmente vegetais, como gramíneas e até mesmo plantas lenhosas. Em contraste, invertebrados xilófagos e saprófagos e (algumas espécies de coleópteros e térmitas) são bem adaptados à alimentação de materiais mais recalcitrantes (Ryan et al., 2012). Suas habilidades incluem a mastigação, estrutura do intestino, enzimas digestivas, e sistemas simbióticos especializados, que lhes permite ingerir materiais com diferentes relações de C/N. Neste contexto, invertebrados saprófagos que habitam o solo, possuem interações com microrganismos presentes no trato digestivo eficientes na bioconversão de biomassa celulósica ingerida.

O objetivo deste capítulo foi identificar bactérias com propriedades celulolíticas, para fins de aplicação biotecnológica. As quais foram isoladas do trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensis*. A partir da identificação filogenética, foram realizados experimentos, para quantificar a produção de CMCase e FPase dos isolados em meio líquido de cultivo com (Carboxi-Metil-Celulose) CMC e (*Pennisetum purpureum*) Capim – Elefante, como substratos. Análise de atividade enzimática e peso molecular, através de Zimograma e SDSpage com (carboxi-metil-celulose) CMC, também foram realizadas.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Ecologia Microbiana e de Bioprocessos da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro. As análises filogenéticas, e eletroforese de Zimograma e SDS-PAGE, foram realizadas no laboratório de Microbiologia, no Departamento de Ciência da Vida, na Universidade de Coimbra.

### 4.4.1 Seleção de microrganismos com capacidade celulolítica

Durante a coleta do conteúdo do trato intestinal, uma alíquota de 100 uL obtida após a fase de tratamento em ultrassom foi plaqueada em meio de cultivo mineral mínimo Bushnell-Haas (MMBH) – 0,2g MgSO<sub>4</sub>; 0,02g CaCl<sub>2</sub>; 1,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,05g FeCl<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1,0L, contendo como única fonte de carbono o carboximetil-celulose (CMC) a 1 %, mais o inibidor fúngico cicloheximida na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, adaptado por Pointing (1999). As placas foram incubadas a 28°C por cinco dias em condições de aerobiose e anaerobiose. O processo de repicagem foi repetido até o isolamento de colônias individuais, baseando-se na análise visual. As colônias já isoladas foram estocadas em tubos de 1,5mL contendo 1% CMC, 10% de MMBH e 50% de glicerol e mantidas a -60° C.

### 4.4.2 Identificação de atividades celulolíticas

Para esta análise foram escolhidos aleatoriamente 90 isolados. Esses isolados foram novamente crescidos em placas de Petri contendo o meio CMC, como descrito no item anterior. O teste de atividade hidrolítica foi realizado em triplicata, conduzido em capela de fluxo vertical constituindo-se de incubação das placas em solução de vermelho congo 0,1% por 30 minutos (Saleh-Rastin et al., 1991), seguida de duas lavagens com água destilada estéril para retirar o excesso de corante. Adicionou-se 5 mL por placa de solução de NaCl 1,0M por 5 min (2x) para retirar todo o corante que não estivesse preso às ligações β1-4 da celulose. Utilizou-se como revelador o ácido acético glacial a 1,0M, aumentando a nitidez da visualização.

Os resultados foram detectados pela formação de halos de degradação dos substratos ao redor das colônias. Os diâmetros dos halos e das colônias foram medidos e expressos em índices enzimáticos (IE) – relação entre o diâmetro do halo de degradação dos substratos e os diâmetros das respectivas colônias. A partir do teste atividade hidrolítica, os isolados que obtiveram maiores índices enzimáticos, foram selecionados para, as análises de identificação filogenética a partir do gene 16S rDNA.

### 4.4.3 Extração de DNA

O DNA bacteriano, extraído a partir dos isolados puros, mantido em microtubos de estoque à -60° C. De cada microtubo retirou-se, com o auxílio de uma alça estéril descartável, uma alíquota da suspensão congelada que foi estriada em uma placa contendo o meio LB e incubada a uma temperatura de 28°C por quatro dias. O DNA genômico das bactérias foi extraído através da adaptação do protocolo proposto por Pitcher et al. (1989), como se segue:

**1ª- Passo:** Com o auxílio de uma alça estéril descartável, adicionou-se uma porção de uma colônia a um microtubo tipo Eppendorf, contendo 100µl de Lisozima (10 mg/ml de TE 1x), esta solução é para romper a parede celular das bactérias Gram positivas, as células foram mantidas nesta solução por 2 horas a 37°C;

**2ª- Passo:** O microtubo foi transferido para um recipiente resfriado e foram adicionados 500µl de GES (60g de Guanidina-Tiocianato, 20g de EDTA 1M pH 8,0, 1g de N-

lauril-sarcosina e completado com 100ml de água Milli-Q), as células foram mantidas nesta solução durante 10 minutos em gelo, esta solução é utilizada para a quebra celular;

**3<sup>a</sup>- Passo:** Para remover as proteínas adicionaram-se 250µl de acetato de amônio (7,5 M), mantidos em gelo por 10 minutos;

**4<sup>a</sup>- Passo:** Foram adicionados 500µl de solução de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-se manualmente e então centrifugou por 15 minutos a 14.000 rpm. Após esta centrifugação transferiu-se a fase aquosa da solução para um novo microtubo 1,5ml onde foram novamente adicionados 500µl de solução de clorofórmio/ álcool isoamílico, repetindo-se o procedimento;

**5<sup>a</sup>- Passo:** Transferiu-se aproximadamente 700µl do sobrenadante obtido no passo anterior, e adicionaram 600µl de isopropanol na temperatura de (-20°C). Procedeu-se uma leve homogeneização até se tornar monofásico sendo então centrifugado novamente por 15 minutos a 14.000 rpm. Neste passo ocorre a precipitação do DNA;

**6<sup>a</sup>- Passo:** Após a centrifugação foi descartado todo o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 200µl de solução de etanol (70%), repousando por 1 minuto; procedendo-se uma centrifugação por 3 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante restante foi descartado com o auxílio de uma micropipeta e o microtubo contendo o DNA precipitado foi incubado em uma estufa a 50°C. Após seco o DNA foi hidratado com a adição de 30µl de água ultra pura e mantida em temperatura ambiente durante 2 horas.

**7<sup>a</sup>- Passo:** Ao término do processo o microtubo contendo o DNA extraído foi armazenado em freezer (-20°C). A confirmação do processo de extração foi realizada em gel de agarose a 1% e amplificado por PCR, cujos procedimentos estão descritos nos itens 4.2.4 e 4.2.5.

#### 4.4.4 Amplificação do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA das amostras de DNA dos vinte e três isolados e dos DNA da comunidade bacteriana, foram amplificados por PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio *Bacteria*: 27F e 1492R.

A reação de PCR foi realizada para um volume final de 30µl, contendo 2µl de DNA, 1,25µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25µM de dNTP; 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase, Kit PCR - Master Mix 2X (Promega ®); 0,2µM de cada oligonucleotídeos iniciador. A reação foi conduzida em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

#### 4.4.5 Eletroforese em gel de agarose

Os ácidos nucleicos, tais como extratos de DNA genômico e produto de PCR, foram analisados mediante eletroforese horizontal. Para isto foram preparados géis de agarose 1% em TBE 0,5X (89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico e 2,0 mM EDTA, pH 8,0) e utilizando-se 2 uL da amostra e 2 uL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol/L de EDTA, 5% de SDS) Para determinar o peso molecular e a concentração do DNA foram utilizados o marcador de 1Kb *DNA Ladder* (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 10ppm e fotografados em sistema Kodak GL100.

#### 4.4.6 Purificação do rDNA 16S presente nas “bandas” do gel de agarose

Depois da confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA de cada amostra dos isolados, as “bandas” foram cortadas e acondicionadas individualmente em microtubos de (2,0mL). Em seguida cada “banda” foi purificada em Kit OMEGA Bio-Tek®, seguindo se instruções do fabricante. O processo de purificação, foi necessário para separar os fragmentos de rDNA 16S do gel e também retirar os resíduos dos reagentes utilizados na reação, pois este



ultimo podem interferir no sucesso das etapas de sequenciamento. Após a purificação das bandas, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento na Empresa Sequenciamento MACROGEN-HOLANDA.

#### **4.4.7 Análise das sequencias do gene 16S rDNA**

As sequências obtidas após o sequenciamento, foram comparadas com o banco de dados NCBI, utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar a homologia e em seguida a confecção da árvore filogenética.

As amostras foram alinhadas com outras sequências de mesma afiliação taxonômica em nível de filo ou classe. A partir deste alinhamento, foi construída uma árvore filogenética aplicando-se o método *Neighbor-Joining* no Programa Mega 5.1, Análise de Bootstrap com 100 réplicas.

#### **4.4.8 Curva de crescimento**

Para determinar o tempo de crescimento necessário para a produção de enzimas dos isolados, foi realizada a curva de crescimento. Onde um pré- inóculo de 5 ml, crescido por 24 horas, foi adicionado em Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultivo, suplementado com 1% de glicose. Os frascos foram incubados à temperatura de 30 °C a 120 r.p.m., durante dez dias. Em intervalos de 24 horas uma alíquota de 2ml das amostras eram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet era pesado determinando a massa do peso fresco das amostras provenientes dos isolados de *Streptomyces*, para os demais gêneros foi obtido a densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm.

#### **4.4.9 Produção de enzimas em CMC (carboxi-metil-celulose)**

Para cada isolado foram utilizados dois frascos de Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio de cultivo mineral mínimo Bushnell-Haas (MMBH) – 0,2g MgSO<sub>4</sub>; 0,02g CaCl<sub>2</sub>; 1,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,05g FeCl<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1,0L, contendo como única fonte de carbono o carboxi-metil-celulose (CMC) a 1 %. Em cada frasco, foram inoculados os isolados pré- crescidos por 24 horas, utilizando um branco como controle negativo. As culturas foram crescidas em agitação a 30 °C a 120 r.p.m durante 12 dias, os frascos não inoculados foram incubados nestas mesmas condições. Em dias alternados eram realizadas coletas do sobrenadante, para as posteriores análises.

#### **4.4.10 Produção de enzimas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*)**

Para cada isolado foi empregado dois frascos de Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio de cultivo mineral mínimo Bushnell-Haas (MMBH) – 0,2g MgSO<sub>4</sub>; 0,02g CaCl<sub>2</sub>; 1,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,05g FeCl<sub>3</sub>; 5g de extrato de levedura, H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1,0L, contendo como única fonte de carbono o (*Pennisetum purpureum*) Capim – Elefante a 5 % (triturado e sem prévio tratamento). Em cada frasco, foram inoculados os isolados pré - crescidos por 24 horas, utilizando um branco como controle negativo. As culturas foram crescidas em agitação a 30 °C a 120 r.p.m durante 12 dias, os frascos não inoculados foram incubados nestas mesmas condições. A cada 24 horas eram realizadas coletas do sobrenadante, para as posteriores análises.

#### **4.4.11 Determinação da atividade de CMCase**

Esse método determina a atividade de CMCase, que representa a dosagem de endoglucanases, no sobrenadante das culturas, através da determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboxi-metil-celulose (CMC), diluída previamente na solução de citrato de sódio com pH4,8. Os ensaios foram conduzidos em

microtubos (tipo eppendorf), adicionando-se 0,5ml de solução tampão de citrato de sódio e CMC, 0,5ml de extrato enzimático dos inóculos. Em outro tubo o “branco” continha , 0,5 ml de DNS e ,0,5 ml se solução tampão. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos, e a reação foi interrompida com a adição de 0,5 ml de DNS. Os microtubos foram submergidos em água fervente à 100°C por 5 minutos, sendo em seguida resfriados a temperatura ambiente para posterior medição de absorvância em 540nm realizada em espectrofotômetro.

#### **4.4.12 Determinação da atividade de FPase**

Esse método determina a atividade *filter paper cellulose* (FPase) e avalia a ação sinérgica das enzimas celulolíticas Endoglucanases, Exo- glucanases e  $\beta$ - glicosidase sobre a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. Em microtubos, foi adicionado 0,5ml de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50mM, 0,5 ml de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. No controle negativo foi adicionando 0,5ml de DNS e 0,5ml de solução tampão e, 0,5 ml de extrato enzimático (sem inoculação). As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por uma hora e a reação foi interrompida com a adição de 1 mL DNS. Os tubos foram alocados em água fervente por 5 minutos, logo após foram resfriados a temperatura ambiente para posterior medição de absorvância em 540 nm. Este método foi adaptado do procedimento descrito por Ghose (1987).

#### **4.4.13 Curva de calibração**

A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,0 a 0,8 g/l pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS (Miller, 1959). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores, por minuto a 50°C, onde a atividade enzimática expressa em U por grama de substrato (U/g). A absorvância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm.

#### **4.4.14 Análise através de zimograma para celulase e protease**

Zimograma é uma técnica eletroforética que permitir observar a atividade de enzimas intra e extracelulares, utilizando um gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel –SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), ao qual foi adicionado um substrato específico de acordo com a atividade da enzima (Heussen & Dowdle, 1980).

O conteúdo proteico (proteínas totais) e as atividades celulolíticas das amostras foram avaliados dos sobrenadantes livres de células, em gel de poliacrilamida. A massa molecular e a atividade das celulases produzidas pelos isolados foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (PAGE/SDS). Para detectar a atividade das celulases empregou-se um gel de poliacrilamida (12%) com 0,2% CMC para determinar Enzimas Totais. Uma alíquota de 30 $\mu$ l das amostras foi empregada, sendo adicionado tampão de corrida. A migração eletroforética foi realizada em tampão Tris/Glicina a uma voltagem 120 Volts a 4°C, durante 4 horas. Para a determinação de celulases o gel foi corado com uma solução de azul de Coomassie Blue R-250, para visualização das zonas de hidrólise das enzimas produzidas.

#### **4.4.15 Análise através de eletroforese desnaturante SDS-PAGE**

Foi analisado o perfil de proteínas separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, desnaturante. O gel separador foi preparado nas concentrações de 15%. O gel

concentrador foi preparado a 4%. Uma alíquota de 20µl das amostras foi fervida em banho-maria por 5 minutos, resfriadas e aplicadas nas canelatas, bem como o marcador molecular (Kit MSW/SDS/200 e Promega V8499A). Inicialmente a voltagem aplicada foi de inicial de 200V durante 1 hora. Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram fixados e corados por 20 minutos com azul de Coomassie R-250, em seguida descorados com solução de Metanol, durante 12 horas. Após a descoloração foi possível observar o padrão de proteínas separadas através da eletroforese, incluindo na maioria dos casos, as proteínas expressas.

#### **4.4.16 Análise estatística**

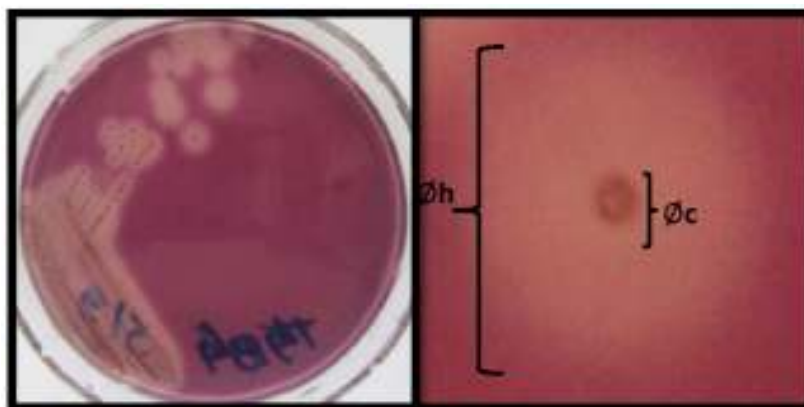
Para o teste de Homogeneidade e Normalidade dos dados, foi aplicado o Teste de Cochran e Bartlett e Teste de Lilliefors. Diante da constatação da não normalidade dos dados foram utilizadas ferramentas da estatística não paramétrica. Assim para a comparação de três ou mais tratamentos foi utilizado o Teste de Kruskal- Wallis à 5%. E para a comparação de dois tratamentos foi usado o Teste de Lilliefors.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Seleção dos microrganismos com capacidade celulolítica em placas com carboxi-metil- celulose (CMC)

Após o período de incubação de cinco dias em meio CMC 1%, observou-se a formação de halos em 90 isolados avaliados, isolados estes associados à porção final do trato intestinal (hindgut), das três espécies de invertebrados *Trigoniulus corallinus* (Gervais, 1847), *Cubaris murina* (Brandt, 1833) e *Pycnoscelus surinamensis* (Linnaeus, 1758).

A formação de halos em meio CMC sólido resulta da quebra da CMC, gera fragmentos menores que celohexose, à qual o vermelho Congo não se liga. Esta quebra da CMC que gera fragmentos pequenos o suficiente para serem removidos da placa de Petri, durante o processo de lavagem, como mostrado na figura 18. Neste teste apenas a atividade da endoglucanases pode ser esperada para produzir zonas de hidrólises (Wood, 1980). O vermelho Congo apresenta forte afinidade pelas ligações  $\beta$ 1-4 (polissacarídeos), ligados em unidade D-glucopiranosil fornecendo a base para um ensaio sensível para a detecção de colônias de bactérias produtoras de celulase (Teather & Wood, 1982).



**Figura 18.** Colônias bacterianas com cinco dias de crescimento em meio de carboximetilcelulose.

Vinte e três isolados foram capazes de hidrolisar a carboxi-metil-celulose. A Tabela 4 mostra o resultado dos 23 isolados que apresentaram os maiores valores de IE o índice enzimático extracelular relativo à atividade celulolítica. Este índice é uma relação entre o diâmetro médio do halo de degradação ( $\text{Øh}$ ) e o diâmetro médio da colônia ( $\text{Øc}$ ), de tal modo que quanto maior o índice ( $\text{Íe}$ ), maior a capacidade do micror-organismo degradar celulose.

Os 23 isolados associados à porção final (hindgut) do trato intestinal dos animais saprófagos, que apresentaram maior atividade celulolítica, corresponderam a índices enzimáticos variando entre 3,0 a 5,0. Os isolados T2T3, T4T3, T3C5 e T1P1 foram os isolados que apresentaram os maiores valores para o índice enzimático, ou seja, 5,0 (Tabela 4). Em geral, quanto maior o índice, maior a quantidade ou variedade de celulases liberadas no meio. Os demais isolados apresentaram índices que variaram de 3,0 a 4,5.

**Tabela 4.** Índices enzimáticos dos isolados mais promissores, obtidos do trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina* e *Pycnoscelus surinamensis*.

| <i>Trigoniulus corallinus</i> |     | <i>Cubaris murina</i> |     | <i>Pycnoscelus surinamensis</i> |     |
|-------------------------------|-----|-----------------------|-----|---------------------------------|-----|
| Isolados                      | Íe  | Isolados              | Íe  | Isolados                        | Íe  |
| T1T1                          | 4,0 | T1C1                  | 3,0 | T1P1                            | 5,0 |
| T1T2                          | 4,0 | T1C4                  | 4,0 | T2P2                            | 4,0 |
| T2T3                          | 5,0 | T2C3                  | 3,5 | T3P3                            | 4,5 |
| T3T4                          | 3,0 | T2C4                  | 3,5 | T3P4                            | 3,0 |
| T3T5                          | 4,0 | T3C5                  | 5,0 | T4P5                            | 4,0 |
| T4T3                          | 5,0 | T4C4                  | 4,0 | T1P5                            | 4,0 |
| T5T3                          | 3,0 | T5C1                  | 4,0 | T6P4                            | 4,0 |
| T6T4                          | 4,0 | T6C2                  | 3,5 |                                 |     |

**Tratamentos:** T1(Flemingia +Gramma +Papelão); T2(Flemingia +Gramma + Sabugo de milho); T3(Flemingia +Gramma + Fibra de coco); T4 (Gliricidia +Gramma +Papelão); T5(Gliricidia +Gramma +Sabugo de milho); T6 (Gliricidia +Gramma + Fibra de coco). T: *Trigoniulus corallinus*, C: *Cubaris murina* e P: *Pycnoscelus surinamensis*.

Resultados semelhantes foram observados por Passos (2010) ao estudar isolados provenientes do trato intestinal de *Trigoniulus corallinus*, quando o autor obteve 19 bactérias com potencial celulolítico onde os índices enzimáticos variaram de 1,33 a 3,5. Alguns autores relatam que a produção de enzimas, pode estar relacionada aos compartimentos do trato intestinal dos invertebrados. Taylor (1982), ao estudar espécies de diplópodes, *Orthoporus ornatos* e *Comachelus* sp. observou que a degradação de celulose e xilano ocorreram no intestino médio (Midgut), enquanto a degradação de pectina foi encontrada no intestino grosso (Hidgut). No intestino anterior (Foregut) de uma heteroptera *Deraeocoris nebulosus*, foi encontrado  $\alpha$  – glicosidade e pectinase (Boyd et al., 2002). Haloí et al (2011) ao estudar três espécies de invertebrados: baratas (*Periplaneta americana*), térmitas (*Odontotermes obesus*) e bicho da seda (*Philosomia ricini*) mostrou a relevância em nível biotecnológico da prospecção de enzimas oriundas destes invertebrados, encontrando altos níveis de atividade celulolítica, com valores superiores a 125U/mg.

Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) utilizaram este índice na avaliação de atividade celulolítica de alguns fungos isolados de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins– SP e utilizando também a CMC como fonte de carbono os índices enzimáticos variaram de 1,2 a 5,9. Das 80 linhagens avaliadas 15 não cresceram no meio com CMC e 29 não apresentaram atividade celulolítica, perfazendo um total de 55% dos isolados sem atividade. O teste de atividade hidrolítica, é realizado em diversos trabalhos quando se busca a eficiência celulolítica de fungos e bactérias de ambientes naturais como solo e água (rios, lagos, mares) e também oriundos de resíduos agrícolas e industriais.

No ambiente natural o mecanismo de hidrólise enzimática da celulose atua em sinergismo, onde vários microrganismos ficam aderidos ao substrato, podendo produzir enzimas extracelulares com diferentes modos de aderência para diferentes configurações do substrato, o que chamamos de modos de ligação. Isso pode significar que uma população de microrganismos pode adotar estratégias distintas na produção enzimática e até mesmo inibir a produção e atuação de outras enzimas. O mesmo pode acontecer no trato intestinal de

invertebrados saprófagos, que ao se alimentarem de resíduos vegetais inoculam bactérias e fungos havendo uma competição no crescimento e inibição de excreções do componente metabólico dos microrganismos que compõe o micro-habitat.

#### 4.5.2 Identificação filogenética do gene 16S rDNA dos 23 isolados

As análises de extração de DNA genômico, utilizando o protocolo de Pitcher et al.(1989) foi eficiente para todas as amostras. Após a purificação os extratos de DNA, foram submetidos à técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) para a amplificação de seus genes 16S rDNA, utilizando os seguintes iniciadores 27F e 1492R. A Figura 19 mostra a amplificação do 16S rDNA. As amostras foram submetidas em gel de agarose a 1%, onde foi possível visualizar bandas com tamanho correspondente para o par de iniciadores utilizados, indicando que os fragmentos de DNA amplificados poderiam ser sequenciados posteriormente.

Com base na análise de sequências foi estabelecida a relação filogenética dos isolados que tiveram a região do 16S rDNA sequenciada. A árvore filogenética contendo as diferentes sequências de bactérias associadas ao tubo digestivo dos três invertebrados saprófagos estudados pode ser observada na Figura 19 e na Tabela 5. O filo mais frequente foi Actinobacteria, sendo observadas bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* e em menor frequência foram identificadas bactérias do filo Firmicutes, dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*. É possível observar também que as sequências de bactérias oriundas do trato intestinal dos invertebrados obtiveram uma alta similaridade comparadas com as sequências do GenBank (Tabela 2) e que as sequências do isolados, comparadas com as sequências do banco de dados, apresentaram valores de *bootstrap* altos, isto justifica, que os microrganismos estudados estão fortemente relacionados a estas sequências.

O gênero *Streptomyces*, pertencente ao filo Actinobacteria, compreendem um grupo diverso de bactérias filamentosas, muitas das quais são importantes ecologicamente e possuem potencial para a produção de enzimas, antibióticos, vitaminas, substâncias inibidoras da atividade enzimática e entre outros componentes biologicamente ativos (Berdy, 2005). Alguns actinomicetos podem degradar a celulose e solubilizar lignina, e são capazes de tolerar temperaturas e pH mais elevados do que os fungos, sendo agentes indispensáveis na degradação de materiais ligninocelulósicos durante o processo de compostagem.

Por ocorrerem em uma grande variedade de habitats os *Streptomyces* crescem em uma vasta diversidade de substrato. Existem estudos a respeito desses microrganismos em diferentes locais, no deserto (Takahashi et al., 1996; Okoro, 2009), em esponjas marinhas (Jiang et al., 2007; Zhang et al., 2008), em plantas (Vasconcellos, 2008; Khamna, 2009), em amostras de solo da Floresta Amazônica (Souza; Moriya; Souza, 2009), na Terra Preta do Índio (Garcia, 2006), em salamandras (Lauer, 2008). Além disso, são encontrados no trato intestinal de várias espécies de invertebrados incluindo cupins, besouros, diplópodes, minhocas e baratas (Watanabe et al., 2003; Jayasinghe & Parkinson, 2009; Zhou et al., 2011).

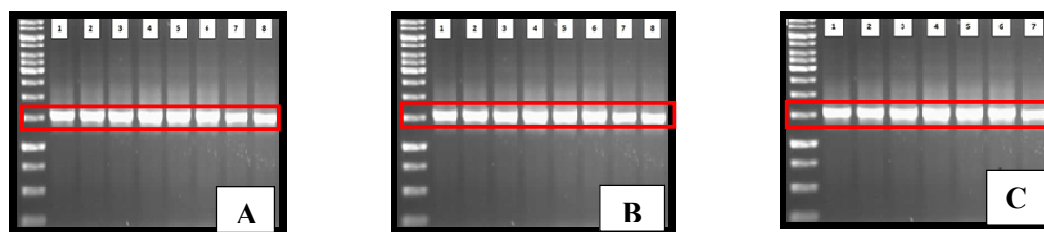
Apesar de serem encontrados facilmente em diferentes invertebrados, verificou-se que na sua maioria, produzem endoenzimas específicas, com atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* (Gebhardt et al., 2002; Krastel et al., 2002). Ainda não se sabe ao certo a funcionalidade deste simbiótico em vivo, ou seja, suas atividades dentro do trato intestinal dos invertebrados (Ryan et al, 2012). As espécies de *Streptomyces* encontradas no trato intestinal de invertebrados apresentam uma alta similaridade com as espécies que habitam o solo, entretanto, o trato intestinal dos invertebrados é um ambiente anaeróbico e altamente tamponado.

Vale ressaltar que as três espécies estudadas *T. corallinus*, *C. murina* e *P. surinamensis*, não são filogeneticamente aparentadas, deste modo deduz-se que a origem filogenética, não tenha tanta influência na estrutura da comunidade de *Streptomyces* no

intestino dos invertebrados. O que levanta a questão da relação entre a composição da comunidade bacteriana associada aos alimentos ingeridos pelos invertebrados, ou até mesmo na defesa contra patógenos presentes no alimento.

Kaltenpoth (2009) relata em uma revisão, que o gênero *Streptomyces* e outras actinobactérias são bem adaptados a viver em simbiose com invertebrados, onde a maioria deles desempenha um papel na proteção, produzindo antibióticos que são usados para defender hospedeiros contra infecção por patógenos presentes no ambiente e no alimento ingerido. Além de formar simbiose com invertebrados, as actinobactérias também formam associações estáveis com invertebrados marinhos (Kaltenpoth, 2009). Esta área de pesquisa tem sido em grande parte estimulada pela busca de novas classes de antibióticos naturais e agentes de controle biológico contra patógenos (Piel 2009 e Gulder & Moore, 2009).

Tanaka et al (2006) demonstraram que a variação de fontes de carbono em dietas artificiais resulta em mudanças na comunidade microbiana do trato intestinal de cupins. Um estudo *in vitro*, demonstrou que actinobactérias presentes no intestino de diplópodes da espécie *Pachyurus flavipes* podem inibir o crescimento e proliferação de *Debarymyces hanseniida*, uma espécie de levedura comumente distribuída em ambiente natural e predominante no intestino de diplópodes (Byzov, 2006).



**Figura 19.** Gel de agarose a 1,0% contendo DNA amplificado dos seguintes isolados: **A** - *Trigoniulus corallinus*: Marcador 1Kb, 1 (T1T1), 2(T1T2), 3(T2T3), 4(T3T4), 5(T3T5), 6(T4T3), 7(T5T3), 8(T6T4); **B** - *Cubaris murina*: Marcador 1Kb,1(T1C1), 2(T1C4), 3(T2C3), 4(T2C4), 5(T3C5), 6(T4C4), 7(T5C1), 8(T6C2); **C** - *Pycnoscelus surinamensis*: Marcador 1Kb; 1(T1P1), 2(T2P2), 3(T3P3), 4(T3P4), 5(T4P5), 6(T5P5), 7(T6P4). (1500pb).

O filo Firmicutes representado por *B. siamenses*, *P. chondroitinus* e *S. saprophyticus*, contém gêneros frequentemente associados aos invertebrados saprófagos. Este filo é comumente encontrado no trato intestinal de diplópodes (Szabó et al., 1983), fezes de diplópodes (Byzov et al., 1996), no trato intestinal de minhocas (Krištufek et al., 1999) e também esporos de *Bacillus* são encontrados nas fezes de minhocas (Fischer et al., 1994);

Assim como os *Streptomyces*, o gênero *Bacillus* é bem conhecido como produtores de antibióticos, com atividade contra fungos e bactérias patogênica (Krebs, 1998). Eles formam esporos que podem ser facilmente formulados, e tem alta viabilidade comparada com células vegetativa (Bochow et al., 1995). Outra interação é que algumas espécies de *Streptomyces* e *Bacillus*, presentes em ninhos de formigas e térmitas, produzem compostos antimicrobianos para proteger as colônias (Currie et al., 1999; Barbosa, 2004; Favarin, 2005).

Algumas espécies de *Streptomyces* e *Bacillus* foram avaliadas como interferentes no ciclo dos fitonematóides apresentando potencial para utilização no controle dos parasitas no solo (Kavitha et al., 2007). Espécies de *Bacillus* presentes no solo proporcionaram a redução na reprodução de nematóides na raiz da cana-de-açúcar (Cardozo & Araújo, 2011). Estudando o mesmo efeito do *Bacillus*, agora sobre *Meloidogyne incógnita*, em beterraba açucareira, Kavitha et al.(2007), concluíram que o aumento na atividade de enzimas de defesa em plantas tratadas com a bactéria pode ter contribuído para o controle do parasita.

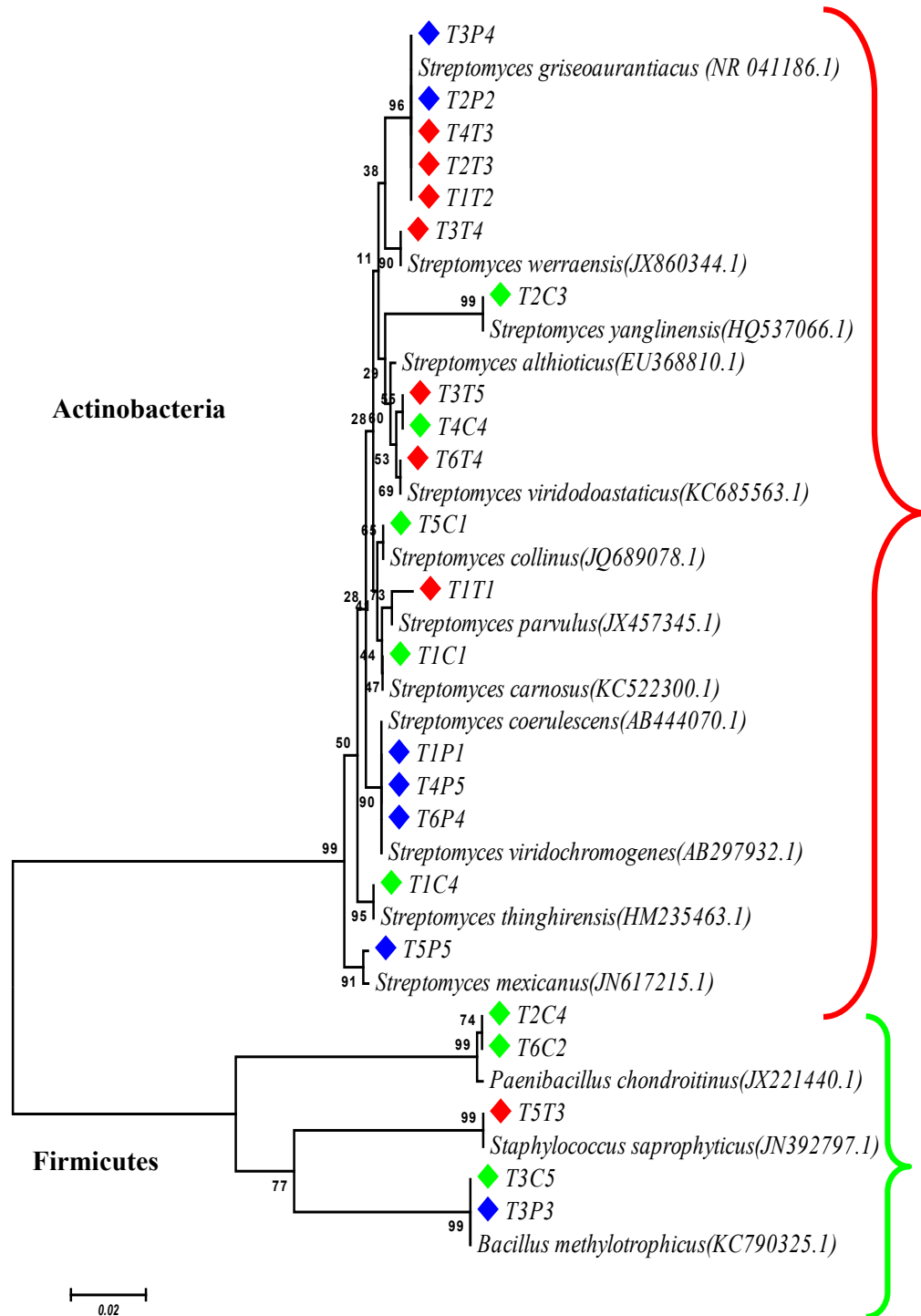
Algumas espécies do gênero *Bacillus* apresentam espécies com alta produção de enzimas celulolítica, muitas destas espécies foram isoladas do trato intestinal de térmitas (Kuhnigk et al., 1995; Pasti & Belli 1985; Wenzel et al., 2002; Li et al., 2006). No trato intestinal de térmitas encontra-se uma diversidade de bactérias estritamente anaeróbias celulolíticas que pertencem aos gêneros *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* e *Bacteroides*, na sua maioria são bactérias anaeróbias facultativas ou microaerófilia (König et al., 2013).

Dezesseis isolados celulolíticos de *Dyella sp.*, *Chryseobacterium sp.* e *Bacillus sp.* foram isolados do intestino de térmitas (*Reticulitermes speratus*). Todos os isolados apresentaram valores baixos de EG (endoglucanases) em meio artificial e os autores afirmaram que as bactérias podem não produzir celulases no sistema intestinal devido a atividade celulolíticas de protozoários presentes no trato intestinal (Cho et al., 2010). Por outro lado a análise metagenômica da microbiota bacteriana do intestino de *Nasutitermes sp.* exibiu um conjunto diversificado de genes para a atividade de bactérias celulolíticas e xilanolíticas (Warnecke et al., 2007). A partir de outra espécie de térmita superior de (*Microcerotermes sp.*) foi isolado um *Bacillus subtilis* do trato intestinal com alta capacidade hidrolítica (endoglucanases, FPase,  $\beta$ -glucosidade) (Teachapoempol et al., 2011).

**Tabela 5.** Características genética de isolados bacterianos oriundos do Trato Intestinal de Invertebrados Saprófagos, sequências do gene 16S rDNA, obtidas e comparadas com o banco de dados NCBI ([www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)) utilizando o programa BLAST.

| Isolado | Correspondente                        | Identidade (%) | Tamanho do Fragmento | Número de Acesso |
|---------|---------------------------------------|----------------|----------------------|------------------|
| T1T1    | <i>Streptomyces parvulus</i>          | 99,58          | 1463                 | JX457345         |
| T1T2    | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 100            | 1461                 | NR_041186        |
| T2T3    | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 100            | 1461                 | NR_041186        |
| T3T4    | <i>Streptomyces werraensis</i>        | 100            | 1465                 | JX860344         |
| T3T5    | <i>Streptomyces viridodiataticus</i>  | 99,72          | 1463                 | KC685563         |
| T4T3    | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 100            | 1461                 | NR_041186        |
| T5T3    | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   | 99,79          | 1511                 | JN392797         |
| T6T4    | <i>Streptomyces albogriseolus</i>     | 99,62          | 1485                 | KC685563         |
| T1C1    | <i>Streptomyces carnosus</i>          | 100            | 1461                 | KC522300         |
| T1C4    | <i>Streptomyces thinghirensis</i>     | 98,59          | 1462                 | HM235463         |
| T2C3    | <i>Streptomyces yanglinensis</i>      | 99,49          | 1425                 | HQ537066         |
| T2C4    | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    | 99,02          | 1416                 | JX221440         |
| T3C5    | <i>Bacillus methylotroohicus</i>      | 100            | 1508                 | KC790325         |
| T4C4    | <i>Streptomyces althioticus</i>       | 99,78          | 1473                 | EU368810         |
| T5C1    | <i>Streptomyces collinus</i>          | 99,9           | 1484                 | JQ689078         |
| T6C2    | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    | 99,02          | 1416                 | HQ236042         |
| T1P1    | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | 99,24          | 1463                 | AB297932         |
| T2P2    | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 100            | 1461                 | NR_041186        |
| T3P3    | <i>Bacillus methylotroohicus</i>      | 100            | 1508                 | KC790325         |
| T3P4    | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 100            | 1461                 | NR_041186        |
| T4P5    | <i>Streptomyces coerulescens</i>      | 99,31          | 1436                 | AB444070         |
| T5P5    | <i>Streptomyces mexicanus</i>         | 100            | 1450                 | JN617215         |
| T6P4    | <i>Streptomyces coerulescens</i>      | 99,3           | 1436                 | AB444070         |





**Figura 20.** Árvore filogenética dos isolados identificados oriundos do Trato da Intestinal de Animais Saprófagos. A diversidade correspondente ao sequenciamento parcial de 1423pb do gene 16S rDNA. A similaridade entre as sequências dos isolados e as existentes no GenBank foram correlacionadas a partir de suas similaridades e agrupadas pelo método *Neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* também são apresentados, sendo calculados por 1000 sub-amostragem no grupo das sequências. Foi utilizando o programa MEGA 5.1 ♦: Isolados do trato intestinal de *T. corallinus*; ◆: *C. murina* e ◆: *P. surinamensis*.

### 4.5.3 Seleção dos isolados e curva de crescimento

A partir da identificação filogenética, foram escolhidos dezesseis isolados para as análises enzimáticas. Dos dezesseis isolados, treze são pertencentes ao gênero *Streptomyces*, seguidos de *Staphylococcus*, *Paenibacillus* e *Bacillus* conforme mostra a (Tabela 36)

**Tabela 6.** Isolados selecionados para as análises enzimáticas.

| Origem                          | Numeração | Isolado | Identificação Filogenética            |
|---------------------------------|-----------|---------|---------------------------------------|
| <i>Trigoniulus corallinus</i>   | 1         | T1T1    | <i>Streptomyces parvulus</i>          |
|                                 | 2         | T1T2    | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> |
|                                 | 3         | T3T4    | <i>Streptomyces werraensis</i>        |
|                                 | 4         | T3T5    | <i>Streptomyces viridodiastaticus</i> |
|                                 | 5         | T5T3    | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   |
|                                 | 6         | T6T4    | <i>Streptomyces albogriseolus</i>     |
| <i>Cubaris murina</i>           | 7         | T1C1    | <i>Streptomyces carnosus</i>          |
|                                 | 8         | T1C4    | <i>Streptomyces thinghirensis</i>     |
|                                 | 9         | T2C3    | <i>Streptomyces yanglinensis</i>      |
|                                 | 10        | T2C4    | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    |
|                                 | 11        | T3C5    | <i>Bacillus methylotrophicus</i>      |
|                                 | 12        | T4C4    | <i>Streptomyces althioticus</i>       |
| <i>Pycnoscelus surinamensis</i> | 13        | T5C1    | <i>Streptomyces collinus</i>          |
|                                 | 14        | T1P1    | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> |
|                                 | 15        | T4P5    | <i>Streptomyces coerulescens</i>      |
|                                 | 16        | T5P5    | <i>Streptomyces mexicanus</i>         |

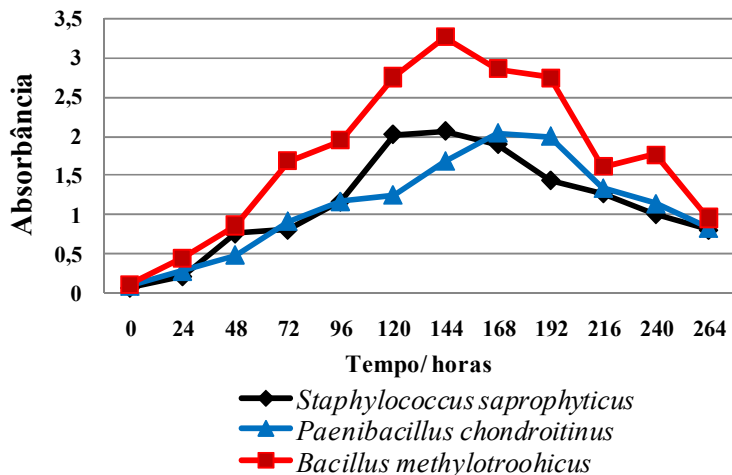
Com o objetivo de se estabelecer as condições de crescimento em culturas submersas, os dezesseis isolados, foram crescidos no meio líquido com 1% de CMC complementado com meio mínimo mineral (MMBH). Para a análise da atividade enzimática é necessário primeiramente determinar o tempo de reação do ensaio, no qual a velocidade de formação do produto deve ser constante. No entanto a partir dos dados obtidos pela curva de crescimento estabeleceu-se o tempo de crescimento de 12 dias (264 horas), e intervalos em dias alternados para realizar os ensaios. Para avaliar a atividade de celulasas, a concentração de açúcares redutores nas amostras foi determinada, empregando glicose como padrão.

Por serem microrganismos diferentes a curva de crescimento foi determinada a partir da média dos isolados do gênero *Streptomyces*, além disso, a curva foi determinada pelo peso fresco devido ao crescimento granulado deste gênero. Os valores dos demais gêneros foram determinados através da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, como mostra a Figura 21 A/B. O crescimento exponencial dos microrganismos foi observado por um longo período de tempo, iniciado logo após as 24 horas de incubação e finalizando após as 144 horas. A partir deste tempo, a velocidade do crescimento foi reduzida e as culturas entraram em declínio. Durante esta fase, quando as culturas já haviam alcançado o máximo crescimento ou até mesmo a máxima produtividade enzimática, a atividade de celulasas pode ter sido reduzida drasticamente, o que sugere que a produção de enzimas pode estar associada ao crescimento e que a mesma foi produzida quando a cultura estava metabolicamente ativa (Delatorre, 2009).

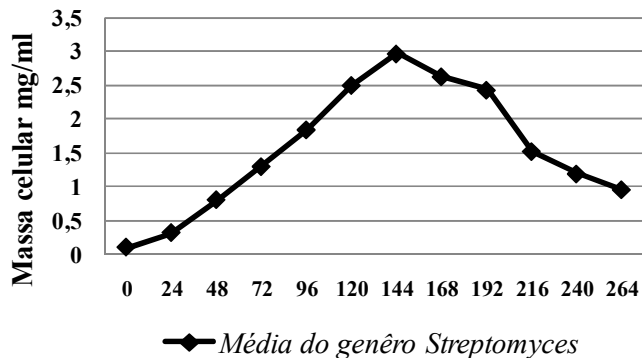
As celulasas, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos, para que estes cresçam em celulose (Kubicek et al., 1993). A atividade de celulase foi realizada através de análise de

atividade enzimática de CMCase e FPase do sobrenadante com o intuito de verificar quantidade de dias ideais para a produção de enzimática dos isolados testados.

A)



B)



**Figura 21.** Curva de crescimento dos isolados em com 1% CMC (carboxi-metil-celulose), em agitação de 120 r.p.m, por durante 11 dias a 30° C. A) Absorbância dos isolados do gênero *Staphylococcus saprophyticus*, *Paenibacillus chondroitinus* e *Bacillus methylotrophicus*. B) Média da massa celular dos isolados do gênero *Streptomyces*.

#### 4.5.4 Produção de CMCase e FPase dos isolados submersas em CMC (carboxil- metil- celulose) e (*Pennisetum purpureum*) capim- elefante

A escolha de substrato adequado, normalmente, compõem o primeiro passo na otimização de um processo, e é importante para a obtenção de elevada produção enzimática (Grise, 2011). O substrato, além de ser fonte de carbono, fornece para o microrganismo diversos compostos indutores, que agem por um prolongado período, propiciando uma extensão da fase de produção que pode resultar em um aumento da produtividade do processo (Kulkarni et al., 1999).

Com o intuito de verificar a produção de enzimas liberados pelos isolados em meio líquido, foi realizada análise de atividade enzimática do sobrenadante para determinar CMCase e FPase. A produção de celulases pelos dezesseis isolados foi realizada utilizando duas diferentes fontes de carbono, uma sintética carboxil- metil- celulose (CMC) e outra

natural *Pennisetum purpureum* (Capim- elefante). A atividade celulolítica, da CMCase (endoglucanases) e FPase (exoglucanases /celulase total) foram avaliadas em dias alternados e os valores da atividade foram expressos em UAE/ ml (Unidade de atividade enzimática).

Durante o processo de fermentação ocorre à sacarificação, esse processo consiste na conversão enzimática de polissacarídeos em açúcares fermentáveis. A celulose por sua vez, é hidrolisada inicialmente pelas endoglucanases, que ao decomporem os polissacarídeos, de forma aleatória produzem terminais para as exoglucanases atuarem (Balat & Balat, 2008). Nas tabelas 7, 8, 9 e 10 são apresentados os valores de endoglucanases e exoglucanases de cada isolado ao longo dos doze dias de incubação.

Nas tabelas 7 e 8, estão os valores de CMCase (endoglucanase). Na Tabela 7 esta apresentando os valores do meio de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose) e na Tabela 8 valores do meio de cultivo Capim – Elefante (*Pennisetum purpureum*), as tabelas expressam os valores de cada isolado para cada dia de avaliação.

A expressão máxima da atividade de CMCase foi obtida após 6 dias de incubação com capim-elefante (3,86 UAE/ml) e (3,04 UAE/ml) em CMC, ambos os valores foram encontrados para o isolado T5P5 (*Streptomyces mexicanus*). Este isolado manteve valores altos de atividade até o dia 12 no final da incubação. Com o mesmo comportamento, porém com valores inferiores, o isolado T4C4 *Streptomyces althioticus* que apresentou valores de (2,96 UAE/ml) em capim-elefante e (2,91 UAE/ml) em CMC.

Para os isolados T3C5 (*Bacillus methylotroohicus*) e T2C4 (*Paenibacillus chondroitinus*), os maiores valores de CMCase, nos dois tratamentos, foram elevados nos dias iniciais com picos de (1,93 UAE/ml) e (2,84 UAE/ml), após este período ocorre uma queda significativa na atividade enzimática dos dois isolados.

O isolado T5T3 (*Staphylococcus saprophyticus*), apresentou valores iniciais baixos comparados com os demais isolados do filo Firmicutes, porém suas maiores taxas de atividade foram detectadas a partir do dia 8 com (2,04 UAE/ml) em CMC e dia 10 com (2,40 UAE/ml) em Capim-elefante. Os demais isolados apresentaram valores de atividade enzimática de CMCase nos dias iniciais variando entre (0,35 e 0,95 UAE/ml) nos dias finais (1,09 e 2,00 UEA/ml).

**Tabela 7.** Atividade enzimática (UEA ml/min) de CMCase (endoglucanase) em isolados de *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* e *Bacillus* em função do meio de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose) e do tempo de incubação.

| Isolados | Identificação Filogenética            | Dia 2        | Dia 4                   | Dia 6        | Dia 8        | Dia 10       | Dia 12       |
|----------|---------------------------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| T1T1     | <i>Streptomyces parvulus</i>          | 0,63ab       | 1,44ab                  | <b>1,94a</b> | <b>2,00a</b> | 1,86ab       | 1,64ab       |
| T1T2     | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 0,37b        | 1,12b                   | 0,95b        | 1,74ab       | 1,85ab       | 1,59ab       |
| T3T4     | <i>Streptomyces werraensis</i>        | 0,36b        | 1,11b                   | 0,97b        | 1,70ab       | 1,88ab       | 1,53ab       |
| T3T5     | <i>Streptomyces viridodiataticus</i>  | 0,38ab       | 1,14b                   | 1,06ab       | 1,63b        | 1,44b        | 1,30b        |
| T5T3     | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   | 0,80ab       | 1,43ab                  | 1,15ab       | <b>2,04a</b> | 1,92ab       | 1,78ab       |
| T6T4     | <i>Streptomyces albogriseolus</i>     | 0,35b        | 1,15b                   | 0,95b        | 1,72b        | 1,86ab       | 1,78ab       |
| T1C1     | <i>Streptomyces carnosus</i>          | 0,35b        | 1,13b                   | 0,93b        | 1,76ab       | 1,77ab       | 1,67ab       |
| T1C4     | <i>Streptomyces thinghirensis</i>     | 0,55ab       | 1,17ab                  | 1,65ab       | 1,68b        | 1,56b        | 1,28b        |
| T2C3     | <i>Streptomyces yanglinensis</i>      | 0,61ab       | 1,40ab                  | 1,13ab       | <b>2,01a</b> | <b>2,15a</b> | 1,72ab       |
| T2C4     | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    | <b>1,84a</b> | <b>1,97<sup>a</sup></b> | 1,52ab       | 1,73ab       | 1,68ab       | 1,45ab       |
| T3C5     | <i>Bacillus methylotroohicus</i>      | <b>1,93a</b> | <b>2,84<sup>a</sup></b> | 1,79ab       | 1,67ab       | 1,80ab       | 1,65ab       |
| T4C4     | <i>Streptomyces althioticus</i>       | 0,63ab       | <b>2,35<sup>a</sup></b> | <b>2,91a</b> | <b>2,81a</b> | <b>2,25a</b> | <b>2,12a</b> |
| T5C1     | <i>Streptomyces collinus</i>          | 0,64ab       | 1,48ab                  | 1,16ab       | 1,81ab       | 1,86ab       | 1,65ab       |
| T1P1     | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | 0,44ab       | 1,16ab                  | 1,89ab       | 1,70ab       | 1,87ab       | 1,77ab       |
| T4P5     | <i>Streptomyces coeruleus</i>         | <b>0,95a</b> | 1,45ab                  | 1,17ab       | 1,14b        | 1,18b        | 1,09b        |
| T5P5     | <i>Streptomyces mexicanus</i>         | 0,36b        | 1,81ab                  | <b>3,04a</b> | <b>2,62a</b> | <b>2,29a</b> | <b>2,10a</b> |

\*Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal –Wallis a 5%.

**Tabela 8.** Atividade enzimática (UEA ml/min) de CMCase (endoglucanase) em isolados de *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* e *Bacillus* em função do meio de cultivo Capim – Elefante (*Pennisetum purpureum*) e do tempo do tempo de incubação.

| Isolados | Identificação filogenética            | Dia2         | Dia4         | Dia6         | Dia8         | Dia10        | Dia12        |
|----------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| T1T1     | <i>Streptomyces parvulus</i>          | 0,75b        | 1,64ab       | 2,18ab       | 2,01a        | 2,08ab       | 1,48ab       |
| T1T2     | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 0,78b        | 1,29b        | 1,78ab       | 1,76ab       | 2,07ab       | <b>1,85a</b> |
| T3T4     | <i>Streptomyces werraensis</i>        | 0,74b        | 1,29b        | 1,89ab       | 1,78ab       | <b>2,80a</b> | 1,44ab       |
| T3T5     | <i>Streptomyces viridodiataticus</i>  | 0,75b        | 1,61ab       | 1,78ab       | 1,58b        | 1,72b        | 1,54ab       |
| T5T3     | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   | 0,92ab       | 1,83ab       | 1,98ab       | <b>2,00a</b> | <b>2,40a</b> | <b>2,07a</b> |
| T6T4     | <i>Streptomyces albogriseolus</i>     | 0,93ab       | <b>1,94a</b> | 1,80ab       | 1,76ab       | 1,84ab       | 1,38ab       |
| T1C1     | <i>Streptomyces carnosus</i>          | 0,79b        | 1,66ab       | 1,83ab       | 1,77ab       | 1,93ab       | <b>1,80a</b> |
| T1C4     | <i>Streptomyces thinghirensis</i>     | 0,95ab       | 1,26b        | 1,78b        | 1,67b        | 1,53b        | 1,32b        |
| T2C3     | <i>Streptomyces yanglinensis</i>      | 0,90ab       | 1,63ab       | 2,08ab       | 2,00ab       | 1,86ab       | 1,58ab       |
| T2C4     | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    | <b>1,78a</b> | <b>2,02a</b> | 1,86ab       | 1,78ab       | 1,81b        | 1,24b        |
| T3C5     | <i>Bacillus methylotrophicus</i>      | <b>1,80a</b> | <b>1,92a</b> | <b>2,87a</b> | 1,81ab       | 1,89ab       | 1,44ab       |
| T4C4     | <i>Streptomyces althiolicus</i>       | <b>1,61a</b> | <b>2,88a</b> | <b>2,96a</b> | <b>2,84a</b> | <b>2,76a</b> | 1,48ab       |
| T5C1     | <i>Streptomyces collinus</i>          | 0,91ab       | <b>1,91a</b> | 1,76b        | 1,84ab       | 1,89ab       | 1,67ab       |
| T1P1     | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | 0,92ab       | 1,79ab       | 1,69b        | 1,76ab       | 1,93ab       | 1,42ab       |
| T4P5     | <i>Streptomyces coeruleus</i>         | 0,94ab       | 1,46b        | 1,87ab       | 1,82ab       | 1,96ab       | 1,23b        |
| T5P5     | <i>Streptomyces mexicanus</i>         | <b>1,55a</b> | 1,81ab       | <b>3,86a</b> | <b>2,89a</b> | <b>2,68a</b> | <b>1,78a</b> |

\*Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal – Wallis a 5%.

Na Tabela 9 e na Tabela 10, estão os valores de FPase (Celulase total - endoglucanases e exoglucanases), a tabela 9 esta representada pelo meio de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose), e na tabela 10 pelo meio de cultivo Capim – Elefante (*Pennisetum purpureum*) respectivamente. É interessante notar que todos os isolados apresentaram valores significantes de FPase, mesmo sendo valores de nível baixo. O que sugere que mais de uma celulase está sendo produzida por estes isolados, visto que os ensaios apresentam picos de atividade em dias diferentes. Os resultados analisados no gel de zimograma permitem caracterizar a massa molecular das enzimas produzidas.

A máxima atividade observada na produção de FPase, foi no dia 6 com o isolado T5P5 (*Streptomyces mexicanus*), em capim-elefante apresentou o valor de (2,24 UAE/ml) e com CMC de (1,88 UAE/ml). Para o isolado T4C4 (*Streptomyces althioticus*) os valores de FPase, nos substratos utilizados foram muito próximos, em capim-elefante (1,97 UAE/ml) e com CMC (1,93 UAE/ml).

Assim como a maioria dos isolados, T3T5 (*Streptomyces viridodiataticus*), apresentou no dia 4 a maior atividade de (1,69 UAE/ml) em CMC e os maiores valores em capim-elefante foram a partir do dia 8 (1,72 UAE/ml) e dia 10 (1,65 UAE/ml).

O isolado T3C5 *Bacillus methylotroohicus*, apresentou o maior valor em CMC no dia 6 (1,51 UAE/ml), e para o capim-elefante, no dia 8 (1,76 UAE/ml).

O isolado T2C4 (*Paenibacillus chondroitinus*), apresentou valores em CMC no dia 6 de (1,73 UAE/ml) e em capim-elefante (além disso, apresentaram uma alta atividade de FPase até o dia 8 (2,06).

Do mesmo modo, da atividade de CMCase o isolado T5T3 *Staphylococcus saprophyticus* apresentou em FPase valores baixos comparados com os demais isolados do filo Firmicutes, porem suas maiores taxas de atividade foram detectadas a partir do dia 6 com (1,32 UAE/ml) em CMC e dia 8 com (1,76 UAE/ml) em Capim-elefante.

Os demais isolados apresentaram valores de atividade enzimática de FPase nos dias iniciais variando entre (0,32 e 0,97 UAE/ml) nos dias finais (0,82 e 1,28UAE/ml).

**Tabela 9.** Atividade enzimática (UEA ml/min) de FPase (complexo enzimático endoglucanase e exoglucanase) em isolados de *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* e *Bacillus* em função do meio de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose) e do tempo do tempo de incubação.

| Isolados | Identificação filogenética            | Dia 2        | Dia 4                   | Dia 6        | Dia 8        | Dia 10       | Dia 12       |
|----------|---------------------------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| T1T1     | <i>Streptomyces parvulus</i>          | 0,36ab       | 0,87ab                  | 1,04ab       | 1,12ab       | 0,89ab       | 0,82ab       |
| T1T2     | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 0,38ab       | 0,83ab                  | 0,94b        | 1,14ab       | 1,18ab       | <b>1,16a</b> |
| T3T4     | <i>Streptomyces werraensis</i>        | 0,31b        | 0,80ab                  | 0,95b        | 1,22ab       | <b>1,29a</b> | 0,83ab       |
| T3T5     | <i>Streptomyces viridodiataticus</i>  | 0,32ab       | <b>1,69<sup>a</sup></b> | 1,02ab       | 1,21ab       | 1,04ab       | 0,82ab       |
| T5T3     | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   | <b>0,94a</b> | 0,96ab                  | 1,32ab       | 1,27ab       | 1,22ab       | <b>1,19a</b> |
| T6T4     | <i>Streptomyces albogriseolus</i>     | 0,47ab       | 0,96ab                  | 1,05ab       | 1,03b        | 0,87ab       | 1,07ab       |
| T1C1     | <i>Streptomyces carnosus</i>          | 0,36ab       | 0,83ab                  | 1,03ab       | <b>1,73a</b> | 0,92ab       | 0,94ab       |
| T1C4     | <i>Streptomyces thinghirensis</i>     | 0,31b        | 0,51b                   | 0,78b        | 0,86b        | 0,55b        | 0,33b        |
| T2C3     | <i>Streptomyces yanglinensis</i>      | 0,35ab       | 0,58b                   | 0,96b        | 1,45ab       | 1,24ab       | 0,44b        |
| T2C4     | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    | <b>0,80a</b> | 0,95ab                  | <b>1,51a</b> | <b>1,03b</b> | 1,31ab       | 0,94ab       |
| T3C5     | <i>Bacillus methylotroohicus</i>      | <b>0,97a</b> | 0,94ab                  | <b>1,73a</b> | 1,07ab       | 0,89ab       | 0,85ab       |
| T4C4     | <i>Streptomyces althioticus</i>       | 0,77ab       | <b>1,37<sup>a</sup></b> | <b>1,93a</b> | <b>1,45a</b> | 1,22ab       | <b>1,14a</b> |
| T5C1     | <i>Streptomyces collinus</i>          | 0,34ab       | 0,87ab                  | 1,04ab       | 0,97ab       | 1,24ab       | 1,07ab       |
| T1P1     | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | 0,38ab       | 0,82ab                  | 0,96b        | 1,31ab       | 1,25ab       | 0,77b        |
| T4P5     | <i>Streptomyces coeruleus</i>         | 0,35ab       | 0,71b                   | 1,27ab       | 1,11ab       | 1,15ab       | 1,06ab       |
| T5P5     | <i>Streptomyces mexicanus</i>         | 0,42ab       | <b>1,37<sup>a</sup></b> | <b>1,88a</b> | <b>1,57a</b> | <b>1,29a</b> | <b>1,23a</b> |

\*Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal–Wallis a 5%



**Tabela 10.** Atividade enzimática (UEA ml/min) de FPase (complexo enzimático endoglucanase e exoglucanase) em isolados de *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* e *Bacillus* em função do meio de cultivo Capim – Elefante (*Pennisetum purpureum*) e do tempo do tempo de incubação.

| Isolados | Identificação filogenética            | Dia 2        | Dia 4        | Dia 6        | Dia 8        | Dia 10       | Dia 12       |
|----------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| T1T1     | <i>Streptomyces parvulus</i>          | 0,35b        | 1,08ab       | 1,12ab       | 1,63ab       | 1,59ab       | 0,98ab       |
| T1T2     | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> | 0,35b        | 0,96b        | 1,33ab       | 1,46ab       | 1,28ab       | <b>1,23a</b> |
| T3T4     | <i>Streptomyces werraensis</i>        | 0,52ab       | 0,93b        | 1,35ab       | 1,76ab       | <b>1,74a</b> | 0,96ab       |
| T3T5     | <i>Streptomyces viridodiataticus</i>  | 0,36b        | 1,03ab       | 1,34ab       | 1,72ab       | <b>1,65a</b> | <b>1,27a</b> |
| T5T3     | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   | <b>0,93a</b> | 1,37ab       | 1,54ab       | 1,76ab       | <b>1,57a</b> | <b>1,24a</b> |
| T6T4     | <i>Streptomyces albogriseolus</i>     | 0,70ab       | 1,07ab       | 1,24ab       | 1,35b        | 1,32ab       | 1,14ab       |
| T1C1     | <i>Streptomyces carnosus</i>          | 0,86ab       | 1,04ab       | 1,36ab       | 1,46ab       | 1,29ab       | 0,97ab       |
| T1C4     | <i>Streptomyces thinghirensis</i>     | 0,46ab       | 0,80ab       | 0,98b        | 1,25b        | 0,94b        | 0,65b        |
| T2C3     | <i>Streptomyces yanglinensis</i>      | 0,48ab       | 0,88b        | 1,07b        | 1,36b        | 0,95b        | 0,64b        |
| T2C4     | <i>Paenibacillus chondroitinus</i>    | <b>1,21a</b> | 1,48ab       | <b>1,67a</b> | 1,76ab       | 1,23ab       | 1,17ab       |
| T3C5     | <i>Bacillus methylotrophicus</i>      | <b>1,23a</b> | 1,69ab       | <b>1,87a</b> | <b>2,06a</b> | 1,36ab       | 1,06ab       |
| T4C4     | <i>Streptomyces althioiticus</i>      | 0,87ab       | <b>1,91a</b> | <b>1,97a</b> | 1,76ab       | 1,41ab       | 1,14ab       |
| T5C1     | <i>Streptomyces collinus</i>          | 0,44ab       | 1,06ab       | 1,11b        | 1,52ab       | 1,45ab       | <b>1,26a</b> |
| T1P1     | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | 0,56ab       | 0,90b        | 1,25ab       | 1,36b        | 1,27ab       | 1,07ab       |
| T4P5     | <i>Streptomyces coeruleus</i>         | 0,65ab       | 1,26ab       | 1,28ab       | 1,41ab       | 1,23ab       | 1,03ab       |
| T5P5     | <i>Streptomyces mexicanus</i>         | 0,85ab       | <b>1,95a</b> | <b>2,24a</b> | <b>2,14a</b> | <b>1,60a</b> | <b>1,28a</b> |

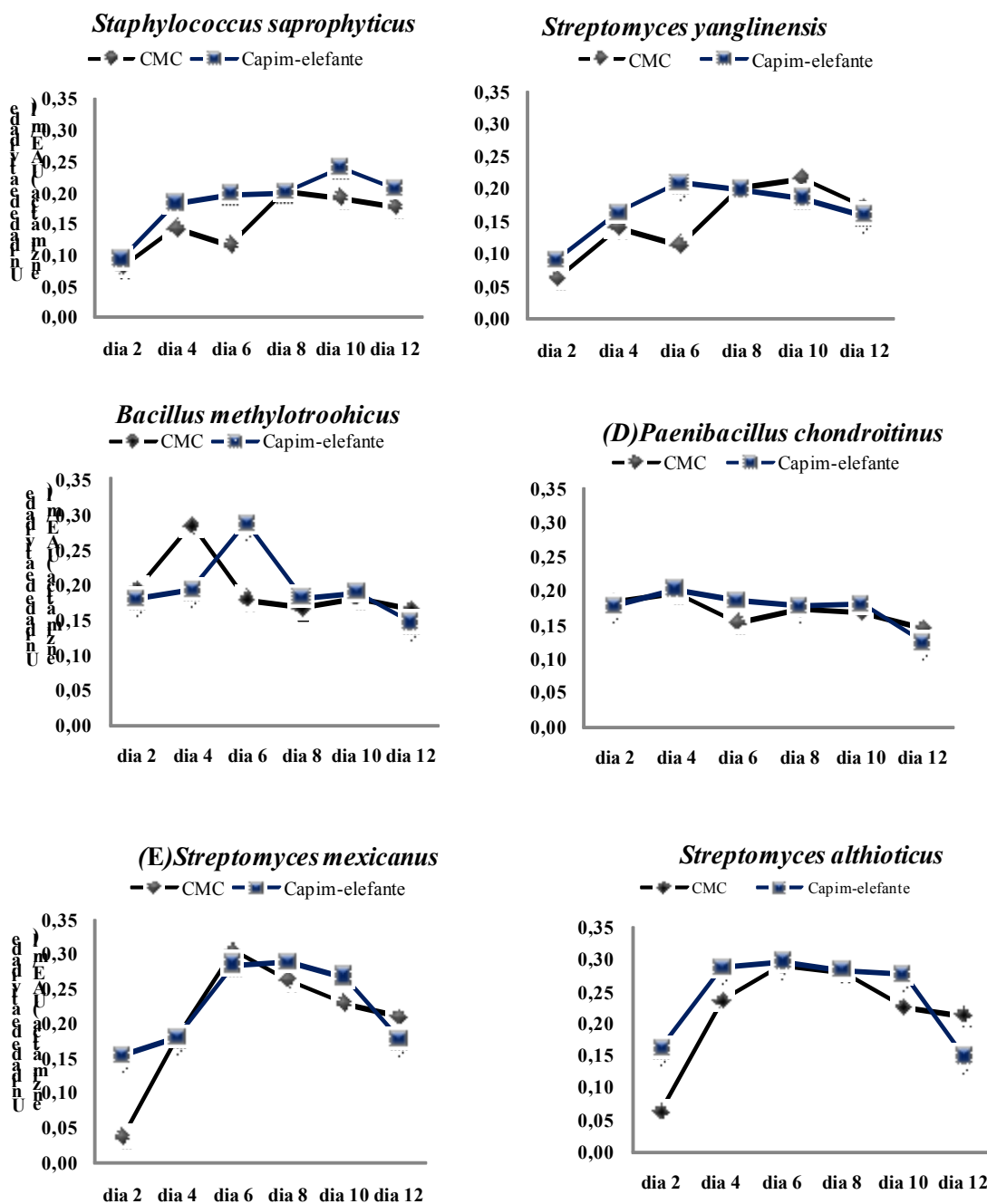
\*Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal – Wallis a 5%.

A Figura 22 mostra a atividade da CMCase (endoglucanases) nas culturas de bactérias que obtiveram os maiores valores como descritos nas tabelas 7 e 8. Verifica-se que os picos de atividade enzimática variaram em função de cada espécie de bactéria e do meio de cultivo. Para *Staphylococcus saprophyticus* (A), a atividade de CMCase, foi maior no cultivo com Capim-elefante em que seu pico de atividade foi maior nos últimos dias de incubação. Nestas condições, podemos observar que o isolado *Streptomyces yanglinensis* (B), obteve comportamento semelhante, porém com uma menor atividade comparada com *S. saprophyticus*.

Para *Bacillus methylotrophicus* (C) os picos de atividade de CMCase foram nos dias iniciais de incubação, ocorrendo posteriormente, uma queda na atividade da enzima, nota-se também que para este isolado os meios de cultivo não influenciaram na atividade de CMCase. O mesmo comportamento é observado em *Paenibacillus chondroitinus* (D), entretanto com valores de atividade bem inferiores. Segundo Keum & Li (2004), a instabilidade das enzimas celulolíticas pode ser atribuída a vários fatores, como desnaturação por valores muito baixos de pH, degradação por proteases e desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas as enzimas. Trabalhos recentes de isolamento de *Bacillus*, com prospecção celulolítica, são relatado na literatura, em solos da caatinga (Soares et al., 2012), e em solos agrícolas e florestais (Kim et al., 2012). De acordo com o nosso trabalho o gênero *Paenibacillus* também foi encontrado, e na literatura algumas espécies apresentam potencial celulolítico e xilanolítico, tais espécies foram encontradas no intestino de minhocas (Pavana et al., 2010), solos agrícolas (Alves et al., 2010) e em solos florestais ricos em húmus (Lee et al., 2010). Neste trabalho a *Paenibacillus chondroitinus* apresentou um desempenho interessante na produção de endoglucanases e exoglucanases.

Resultados interessantes foram os encontrados com os isolados de *Streptomyces mexicanus* (E) e *Streptomyces althioticus* (F), que apresentaram altos valores de CMCase, nota-se que os maiores picos se estenderam ao longo dos dias, do quarto dia até o décimo dia de incubação. Na literatura encontram-se diferentes valores de produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces*, em diferentes substratos, os resultados mostram que esta variação esta intimamente associada com a estirpe em avaliação e com o meio de cultivo utilizado. Gupta & Gautam (2010), ao estudarem um estirpe eficiente de *Streptomyces*, a T3-1, uma estirpe transformante, esta produziu 40,3 U/ml em 1,5% de CMC e juntamente com peptona, os nutrientes utilizados não eram substratos de custo.

Em outro estudo *Streptomyces* sp. isolada de solo do Canadá foi cultivada em um solução salina de sais de Mandel contendo peptona e celulose cristalina, produziu 11,8 U/ml de CMCase (Jorgensen & Olsson, 2006). A espécie *Thermomonospora* sp., um actinomiceto alcalotermofílico, quando cultivado em meio contendo celulose de papel em pó e extrato de levedura, apresentou um pico de atividade de 23 U/ml, enquanto que cultivada em farelo de trigo a atividade foi de 8,5 U/ml (Alani et al., 2008).



**Figura 22.** Atividade enzimática de CMCase ao longo do crescimento bacteriano utilizando duas fontes de carbono, CMC e Capim- elefante. A figura esta representada com seis isolados sendo eles: (A) *Staphylococcus saprophyticus*, (B) *Streptomyces yanglinensis*, (C) *Bacillus methylotroohicus*, (D) *Paenibacillus chondroitinus*, (E) *Streptomyces mexicanus* (F) *Streptomyces althioticus*. Cultivados por 12 dias.

A Figura 23, mostra a atividade da FPase (Celulase total) das culturas das bactérias *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptomyces viridodiastaticus*, *Bacillus methylotroohicus*, *Paenibacillus chondroitinus*, *Streptomyces mexicanus* e *Streptomyces althioticus*, ambas apresentaram os maiores valores de FPase como descritos nas tabelas 9 e 10. Assim como os

valores encontrados para CMCase os picos de atividade enzimática variaram em função de cada espécie de bactéria e do meio de cultivo.

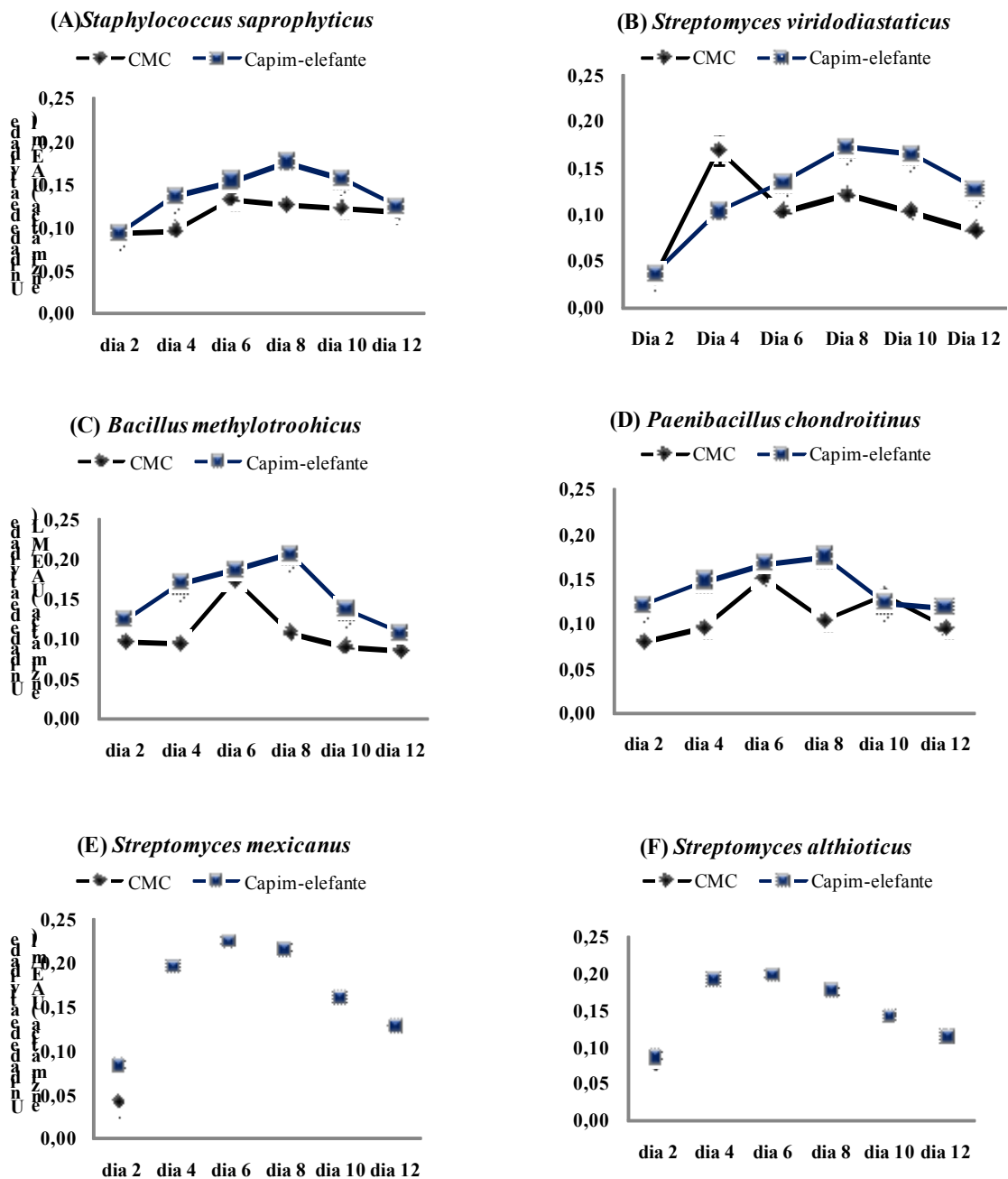
A atividade de FPase, constitui um fator importante na avaliação para a escolha da melhor condição de produção de enzimas celulósicas, quando esta presente vai apresentar uma atividade de (endoglucanases) e outra de (exoglucanases) celulase e portanto, é capaz de atuar tanto nas regiões cristalinas como nas regiões amorfas da celulose. É bem relatado na literatura que a maioria dos microrganismos celulolíticos apresenta atividade de CMCase (endoglucanases) (Bhat & Bhat, 1997), entretanto nem sempre apresentam exoglucanases e por conseguinte, a atividade de FPase é um diferencial (Franco, 2009).

*Staphylococcus saprophyticus* (A), apresentou um pequeno pico de atividade enzimática, no oitavo dia de incubação em meio de cultivo em Capim-elefante. Entretanto ao longo dos dias a atividade apresentou uma flutuação, de modo que para esta bactéria os dias tiveram pouca influência sobre a atividade de FPase.

Para *Streptomyces viridodiastaticus* (B), obteve comportamentos diferentes com os meios de cultivo utilizado, em CMC obteve um pico acentuado no quarto dia de incubação, após este período ocorreu uma queda, estabilizando a atividade de FPase ao longo dos dias restantes. Porém em meio de Capim-elefante a atividade foi exponencial até oitavo dia.

Para *Bacillus methylotrophicus* (C) e *Paenibacillus chondroitinus* (D) obtiveram picos semelhantes aos encontrados para CMCase, os maiores picos foram até o oitavo dia de incubação, depois ocorreu uma queda na atividade de FPase. Além disso, os maiores valores foram em culturas crescidas em Capim-elefante.

O isolado *Streptomyces mexicanus* (E) foi o isolado que apresentou a maior atividade de FPase, tendo seus maiores picos no sexto e oitavo dia de incubação. E por último *Streptomyces althioticus* (F), que apresentou os maiores valores no sexto dia em meio de Capim-elefante. Em trabalhos envolvendo a quantificação da atividade de FPase por fungos, observam-se valores mais baixo desta atividade enzimática. Jorgensen & Olsson (2006) obtiveram para *Penicilium brasilianum* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de um tipo de pinheiro submetido à explosão a vapor, os valores variaram entre 0,56 e 0,59 U/ml de FPase. *Tricoderma viride* NCIM 1051 em 1,0% de bagaço de cana tratado com NaOH, com 10 dias incubação resultou em uma atividade FPase de 0,4/ml (Adsul et al., 2004). A estirpe *Streptomyce* sp. M23 forneceu atividade de 61,2 U/L em meio contendo farelo de trigo, e de 37,8 U/L quando cultivada em meio contendo bagaço de cana, durante 3 e 4 dias de incubação (Franco, 2009).

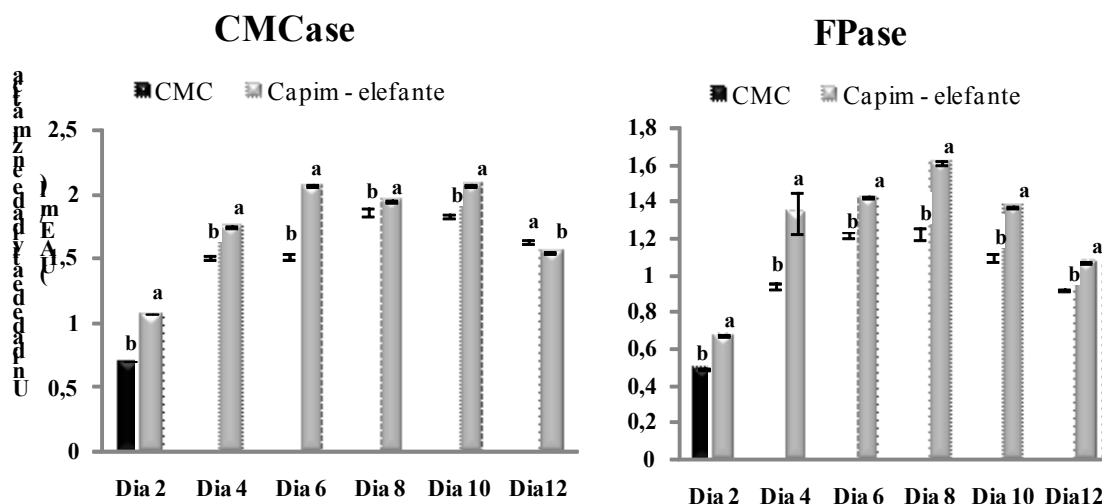


**Figura 23.** Atividade enzimática de FPase (Celulase Total) ao longo do crescimento bacteriano utilizando duas fontes de carbono, CMC e Capim- elefante. A figura esta representada com seis isolados sendo eles: (A) *Staphylococcus saprophyticus*, (B) *Streptomyces viridodiataticus*, (C) *Bacillus methylotroohicus*, (D) *Paenibacillus chondroitinus*,(E) *Streptomyces mexicanus* (F) *Streptomyces althioticus*. Cultivados por 12 dias

#### 4.5.5 Influência dos tratamentos sobre a atividade enzimática produzida pelos isolados

Para comparar os resultados referentes à atividade das enzimas nos diferentes meios de cultivo CMC (carboxi-metil-celulose) e Capim – Elefante (*Pennisetum purpureum*), foi montada a Figura 24, que mostra a média da atividade de CMCase e FPase nos tratamentos.

A atividade das enzimas celulolíticas foi maior nas culturas crescidas sobre Capim – Elefante. É importante lembrar que neste meio de cultivo foi adicionado extrato de levedura, o que provavelmente também, tenha favorecido estes resultados. O extrato de levedura é um ingrediente muito importante na maioria dos meios de cultura concebido para actinomicetos, sendo uma fonte rica de nitrogênio e outros nutrientes (Lima et al., 2005). Existem poucos dados na literatura sobre o uso da CMC como fonte de carbono para a produção de endoglucanases por actinomicetos. Um estudo recente mostrou que a CMC a 1% foi melhor do que outras fontes de carbono, tais como glicose para a produção de endoglucanase por um *Streptomyces sp.* (Jan & Chen, 2003). No entanto, as comparações neste estudo são difíceis, devido às diferenças nas várias condições utilizadas. Além disso, estudos sobre o uso de Capim-elefante com adição de extrato de levedura para a produção de celulases por *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*, não são encontradas na literatura, porém Malek (1988) avaliaram a produção de celulases por *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* na presença de substratos naturais e comerciais (bagaço de cana, juta, avicel e CMC), analisaram que a máxima atividade celulases foi atingida no crescimento com substrato natural, o bagaço de cana, para as *Streptomyces* atingiu o maior valor (22 UAE/ml) comparado a produção de *Bacillus* e *Pseudomonas* (20 e 18 UAE/ml). No substrato CMC os valores foram respectivamente (20, 14, 2 e 17 UAE/ml).



**Figura 24.** Média de atividade enzimática de CMCase e FPase, com os diferentes meios de cultivo CMC : carboxi-metil-celulose e Capim- Elefante (*Pennisetum purpureum*) por cada dia de incubação. Barras de erro representam o erro padrão, letras iguais não diferem seguido teste de Wilconxon a 5% de similaridade.

Jecu et al (2000) testaram farelo de trigo para a produção de celulases por um fungo, *Aspergillus niger*, com resultados de atividades superiores a 11,5 UAE. A produção de celulases por *Aspergillus niger*, utilizando diferentes resíduos agroindustriais tais como substrato foi investigado por Farinas et al., (2009). De acordo com estes autores o substrato que proporcionou maior atividade das celulases foi o farelo de soja, os outros substratos avaliados forneceram valores bastante inferiores provavelmente, devido à composição dos

diferentes substratos, uma vez que a hemicelulose e a lignina conferem uma limitação para assimilação da fonte de carbono pelo microrganismo agente da fermentação. De acordo com Karunanandaa et al., (1995), a celulose de plantas é composta por estruturas cristalinas e amorfas, sendo que a primeira é mais resistente à degradação microbiana. Estudos realizados por Silva (2001) mostram que o bagaço de cana não foi uma boa fonte de carbono para a produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens do gênero *Pleurotus*.

Na literatura são reportados muitos trabalhos de produção de celulases na presença de celulose microcristalina por diferentes gêneros de actinomicetos como *Streptomyces*, *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces*, sendo esta produção extremamente dependente da origem do substrato, do seu grau de cristalinidade e de pureza (Hägerdal et al., 1978). Entretanto, neste trabalho observamos que a produção de celulases na presença dos dois substratos utilizados mostrou-se variável não somente entre os diferentes grupos, mas também entre diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero.

Conclui-se que, a utilização do Capim-elefante como substrato natural, induziu a síntese das enzimas endoglucanases e exoglucanases em níveis de atividade superiores aos observados com CMC. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que é possível a produção de enzimas celulolíticas a partir do cultivo das bactérias estudadas, juntamente com a suplementação do meio com solução de sais e fonte de nitrogênio.

#### **4.5.6 Análises das enzimas pela técnica eletroforética de zimograma e SDS-PAGE**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é muito utilizada para caracterizar proteínas e baseia-se na migração de moléculas de diferentes tamanhos (massa moleculares) em meio gelatinoso poroso, que age como uma peneira para moléculas menores. Sendo assim, as moléculas maiores ficam localizadas na parte superior, enquanto que as moléculas menores, que migram mais facilmente, são encontradas em sua parte inferior (Castro, 2006). A técnica de Zimograma pode ser associada a eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção da atividade específica de enzimas (Benoliel et al., 2010), que neste trabalho detectamos as (Enzimas Totais).

Para a determinação da atividade das enzimas celulolíticas e da massa molecular, das celulases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal dos invertebrados saprófagos, foram visualizados em géis de poliacrilamida (12%), em condições desnaturantes (SDS-PAGE), corados com azul de Coomassie para visualizar a massa molecular. O mesmo foi utilizado para o Zimograma, devido à baixa resolução na coloração com vermelho Congo que visualiza a atividade enzimática de (Celulase e Xilanase) adotamos o azul de Coomassie que visualiza a atividade enzimática de (Enzimas Totais).

Nesta análise, os isolados foram crescidos apenas no meio CMC 1% juntamente com 5% de extrato de levedura. Como relatado anteriormente em que os maiores picos de atividade celulolítica foram aos dias 6 e 8, sendo assim optamos pelo tempo de incubação de 7 dias para todos os isolados, neste ensaio. Após a corrida Eletroforética, a qual seguiu as condições descritas no item 4.2.14, obtivemos dois géis: o primeiro (Figura 25) que determina a massa molecular e o segundo (Figura 26) a atividade enzimática.

Na figura 25, é possível identificar bandas correspondentes a proteínas com cerca de 10 a 66 kDa. Na figura 26 o gel de zimograma representa a atividade enzimática (Enzimas Totais), o interessante é que todas as amostras apresentaram uma alta atividade, com bandas bem distintas, e com tamanhos diferentes para cada isolado, possivelmente por existirem vários tipos de enzimas produzidas por cada bactéria estudada. As produções de celulases apresentam massa molecular com altas variações. Mesmo algumas bactérias apresentando o mesmo gênero, como é o caso das *Streptomyces* a variação foi alta.

As celulases produzidas por bactérias, como as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, possuem massa molecular de 40kDa (Mawadza et al., 2000), no entanto estes

valores podem variar entre as espécies deste gênero. Samuel et al., (2010) verificaram uma celulase produzida por *Bacillus* isolado de resíduos, a qual apresentou massa molecular entre 6 e 20 kDa. Li et al., (2008) verificou uma endoglucanase produzida por *B. pumilus*, que foi purificada a qual apresentou massa molecular de 74,98 kDa. Uma celulase obtida de *B. circulans* apresentou 72 kDa, que apresentava atividade em CMCase e Avicelase (Kim et al, 1995). Para *B. subtilis* subsp. *Subtilis* A- 53, uma CMCase purificada apresentou massa molecular estimado em 56 kDa (Kim et al., 2009).

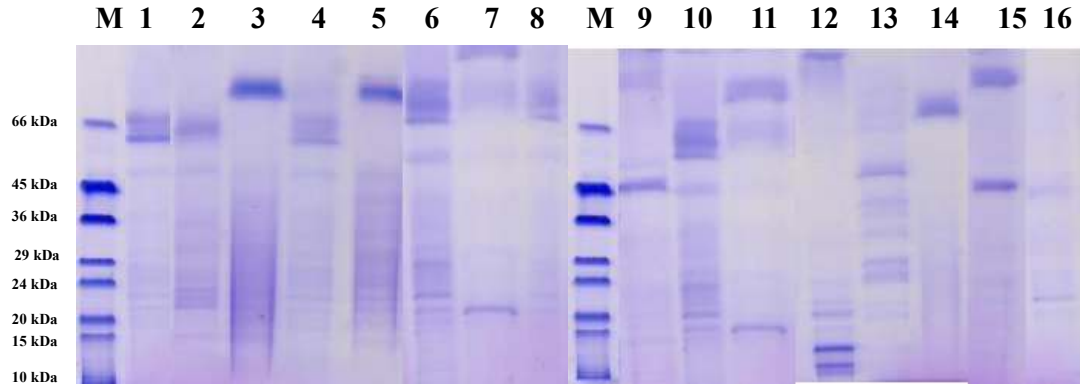
Apesar destas variantes encontradas entre as massas moleculares, ainda não foi estabelecida uma correlação entre a atividade enzimática e o tamanho da enzima, mas sabe-se que enzimas de baixo peso molecular, composta de uma única cadeia polipeptídica e que possuam pontos dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alta massa molecular (Furigo & Pereira, 2012).

A massa molecular de celulase purificadas produzidas por *Streptomyces* LX foi de 48 kDa com uma única banda segundo Li et al. (1998). Endoglucanases de massa molecular de 23 kDa e 38 kDa foram reportadas por Geroge et al. (2001).

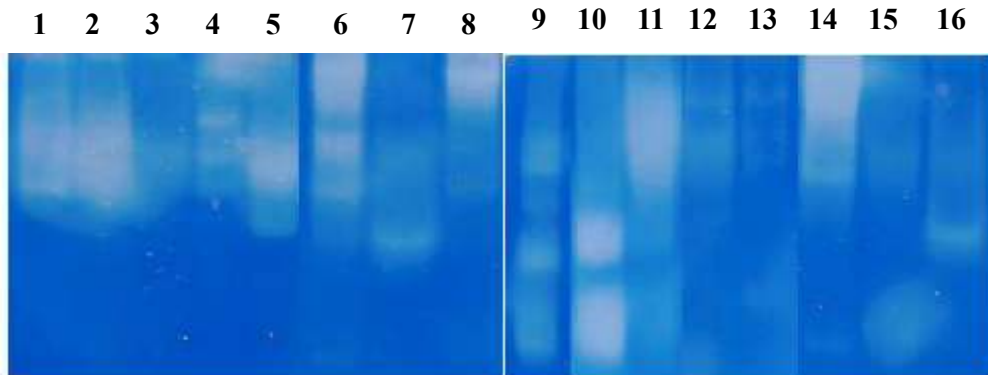
*S. rochei* produz celulases com 29 e 43 kDa (Perito, 1994), *S. lividans* tem massa molecular de 36 kDa (Wittmann, 1994). *Thermomonospora fusca* produz seis celulases, três endo, dois exo e um com atividade de endo/exo (Spiridonov & Wilson, 1999)

De acordo com a literatura, sabe-se bem que os gêneros *Streptomyces*, *Bacillus* e *Paenibacillus* são capazes de degradar os resíduos agroindustriais, incluindo a ligninocelulose através de enzimas celulolíticas. No entanto, trabalhos que descrevem produção de enzimas celulolíticas de isolados bacterianos oriundos do trato intestinal de invertebrados, com afinidade biotecnológica, ainda são poucos. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam uma perspectiva futura de isolados bacterianos de amostras do trato intestinal de invertebrados.





**Figura 25.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE -12%), (M) Marcador molecular, (1) *Streptomyces parvulus*, (2) *Streptomyces griseoaurantiacus*, (3) *Streptomyces werraensis*, (4) *Streptomyces viridodiataticus*, (5) *Staphylococcus saprophyticus*, (6) *Streptomyces albogriseolus*, (7) *Streptomyces carnosus*, (8) *Streptomyces thinghirensis*, (9) *Streptomyces yanglinensis*, (10) *Paenibacillus chondroitinus*, (11) *Bacillus methylotroohicus*, (12) *Streptomyces althioticus*, (13) *Streptomyces collinus*, (14) *Streptomyces viridochromogenes*, (15) *Streptomyces coeruleus*, (16) *Streptomyces mexicanus*.



**Figura 26.** Gel de poliacrilamida (Zimograma -12%), (M) Marcador molecular, (1) *Streptomyces parvulus*, (2) *Streptomyces griseoaurantiacus*, (3) *Streptomyces werraensis*, (4) *Streptomyces viridodiataticus*, (5) *Staphylococcus saprophyticus*, (6) *Streptomyces albogriseolus*, (7) *Streptomyces carnosus*, (8) *Streptomyces thinghirensis*, (9) *Streptomyces yanglinensis*, (10) *Paenibacillus chondroitinus*, (11) *Bacillus methylotroohicus*, (12) *Streptomyces althioticus*, (13) *Streptomyces collinus*, (14) *Streptomyces viridochromogenes*, (15) *Streptomyces coeruleus*, (16) *Streptomyces mexicanus*.

#### 4.4 CONCLUSÕES

De forma geral, os isolados apresentaram atividade enzimática, incluindo os principais complexos de celulase, com capacidade para liberar glicose da CMC e do Capim-elefante.

- a. Vinte e três bactérias, provenientes do trato intestinal das espécies de invertebrados *Trigoniulus corallinus*, *Cubaris murina*, *Pycnoscelus surinamensis*, apresentaram em teste de hidrólise, valores de índice enzimático superiores a 3,0 Ie, considerado uma ótima atividade hidrolítica;
- b. Através da análise filogenética, foi possível identificar as 23 espécies de bactérias, pertencentes a dois filos distintos, Actinomicetos e Firmicutes;
- c. O maior gênero identificado foi *Streptomyces*, seguido de um isolado para *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*;
- d. Dos dezesseis isolados selecionados para as análises de CMCase e FPase, todos apresentaram atividade, durante os 12 dias de incubação;
- e. Os maiores valores de CMCase foram apresentados por *Streptomyces mexicanus*, *Streptomyces althioticus*, com picos que variaram do dia 4 até o dia 10 de incubação;
- f. *Bacillus methylotroohicus*, também apresentou valores significativos de CMCase e FPase, porém os maiores picos foram nos primeiros dias de incubação;
- g. O meio de cultivo Capim – Elefante (*Pennisetum purpureum*), apresentou os maiores valores de atividade enzimática, comparado com CMC (carboxi-metil-celulose);
- h. O trato intestinal das três espécies de invertebrados saprófagos se mostrou um ambiente propício à prospecção de bactérias com eficiência celulolítica, evidenciando seu potencial, para futuros estudos biotecnológicos.

## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados são muito interessantes uma vez que representam microrganismos oriundos do trato intestinal de invertebrados saprófagos, sobre os quais ainda não se sabe ao certo sua funcionalidade dentro do intestino dos invertebrados.

No Capítulo I foi abordada a diversidade de microrganismos do trato intestinal das três espécies de invertebrados e se observou a estrutura de comunidade através de técnicas moleculares.

No Capítulo II foi utilizada a técnica de cultivo em meio seletivo, a qual permitiu identificar dois filos, Firmicutes e Actinobactérias. Esses resultados destacam a importância da abordagem de métodos moleculares para investigar a composição estrutural de habitats complexos, como é o caso do trato intestinal de invertebrados e podem ser útil para o estudo de vias metabólicas e habilidades funcionais de espécies bacterianas.

De modo geral, ainda são poucos os trabalhos que caracterizam bactérias isoladas do trato intestinal de invertebrados do solo, para conhecimento ou até mesmo aplicações biotecnológicas. No entanto, muitos dos trabalhos encontrados abordam a produção de celulases de fluídos oriundos do trato intestinal de invertebrados. Neste caso as celulases produzidas são dependentes de vários organismos presentes no trato intestinal do invertebrado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIS, J. & JUNK, W. J. Terrestrial invertebrates inhabiting lowland river floodplains of Central Amazonia and Central Europe: a review. **Fresh water Biology** 47, 711–731, 2002.

ALANI F.; ANDERSON W., MOO – YOUNG M. New isolate of *Streptomyces sp.* with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnology Letters**, 30 123-126, 2008.

ALVES-PRADO HF, PAVEZZI FC, LEITE RS, DE OLIVERA VM, SETTE LD, DASILVA R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Appl Biochem Biotechnol.** 161: 333-346, 2010.

ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, Vol. 32, No. 6, 1586-1595, 2009.

ARIAS, M. E. GONZÁLEZ-PÉREZ, J. A., GONZÁLEZ-VILA, F. J. BALL, A. S., Soil health-a new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology.** 8: 13-21, 2005.

ASHWINI KM, SRIDHAR KR Leaf litter preference and conversion by a saprophagous tropical pill millipede, *Arthrosphaera magna* Attems. **Pedobiologia** 49:307–316, 2005.

AWAFO, V.A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics.** 1997. 255 f.Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1998.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.** 15: 585–620, 1997.

BALAT M, BALAT H. Progress in bioethanol processing. **Progress Energy Combustion Sci** 34(1):551-73, 2008.

BALL, A.S. Lignocarbohidrate solubilization from straw by actinomycetes. **Applied an environmental microbiology**, Washington, v.56, n.10, p. 3017-3022, 1990.

BARBOSA, V. S. **Efeito da fragmentação florestal na taxa de parasitismo de fungos associados ao jardim da formiga cortadeira *Atta laevigata*.** Dissertação (Mestre em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

BELL, W. J.; ROTH, L. M.; NALEPA, C. A. **Cockroaches: ecology, behavior, and natural history.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 2007.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA Jr., N., Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCAR, R. B. de; COELHO, R. R. R., **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** – Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-271, 2008.

- BENOLIEL, B.; POÇAS-FONSECA, M. J.; TORRES, F. A. G.; de MORAES, L. M. P. Expression of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V.160(7), p. 2036-44, 2010.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v 58, n.1, p. 1-26, 1005.
- BOCHOW, H. Mode os action and practical use of the *Bacillus subtilis* as complex acting bioproduct. In: MANKA, M. (Ed.). **Enviromental biotic factors in integrated plant disease control**. Pozman: The Polish Phytopathological Society, 97 – 104. 1995.
- BOUBAKRI, H., M. BEUF, P. SIMONET, and T. M. VOGEL. Development of metagenomic DNA shuffling for the construction of a xenobiotic gene. **Gene** 375:87–94, 2006.
- BOYD DW, COHEN AC, ALVERSON DR. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a predacious plant bug. **Annals of the Entomological Society of America** 95(3): 395- 401, 2002.
- BREEN, A.; SINGLETON, F.L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 252-258, 1999.
- BROGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. Para a produção de biotenal**. Tese de Doutorado, (Doutorado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 38-67 p. 2010.
- BRUNE, A. Symbiotic associations between termites and prokaryotes. In: **The Prokaryotes**, 3rd ed., Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology, Vol. 1 (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (eds.), Eds. **Springer**, New York. p. 439-474, 2006.
- BYZOV, B. A.; THANH, V. N.; BABJEVA, I. P. Interrelationships between yeasts and soil diplopods. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 25, p. 1119-1126, 1993.
- BYZOV, B. A.; CHERNJAKOVSKAYA, T. F.; ZENOVA, G. M.; DOBROVOLSKAYA T. G. Bacterial communities associated with soil diplopods. **Pedobiologia**, v.40, p. 67-79, 1996.
- BYZOV B. A. Intestinal microbiota of millipedes, in H. König, A. Varma (Eds): **Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates**. Springer, Berlin, p. 89-114, 2006.
- BYZOV, B. A.; THANH, V. N.; BAB'EVA, I. P.; TRETYAKOVA, E. B.; DYVAK, I. A.; RABINOVICH, Y. M. Killing and hidrolytic activities of the gut fluid of the millipede *Pachyulus flavipes* C.L. Koch on yeast cells. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1137-1145, 1998.
- BYZOV, B. A.; NECHITAYLO, T. Y.; BUMAZHKIN, B. K.; KURAKOV, A. V.; GOLYSHIN, P. N.; ZVYAGINTSEV, D. G. Culturable Microorganisms from the Earthworm Digestive Tract. **Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 360–368, 2008.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, vol.33, n.1, pp. 181-188. 2010.

CARDOZO, R.B; ARAÚJO, F.F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revis ta Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.15, n.12, p.1283–1288, 2011.

CAREFOOT, T. H. Studies on the nutrition of the supra-littoral isopod *Ligia pallasii* using chemically defined artificial diets: assesment of vitamin, carbohydrate, fatty acid, cholesterol and mineral requirements. **Comparative Biochemistry and Physiology A – Comparative Physiology** 79, 655–665, 1984.

CAZEMIER, A. E.; HACKSTEIN, J. H. P.; DENCAMP, H.; ROSENBERG, J.; VANDERDRIFT, C. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. **Microbial Ecology**, v.33, p.189-197, 1997.

CHEN,C.L.; Linins. Occurrence in wood tissue, isolations reactions and structure. In: LEWIS M, GOLDSTEIN I. S. (Ed.). **Wood structure and composition**. New York: Marcel Dekker, p. 183-261, 1991.

CHO MJ, KIM YH, SHIN K, KIM YK, KIM YS, KIM TJ. Symbiotic adaptation of bacteria in the gut of *Reticulitermes speratus*: low endo-beta-1,4-glucanase activity. **Biochem Biophys Res Commun** 395:432–435, 2010.

CORREIA. M. E. F. **Distribuição, Preferência Alimentar e Transformação de Serapilheira por Diplópodes em Sistemas Florestais**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2003.

CORREIA. M. E. F; **Ecologia da Interação entre Fauna do Solo e Microrganismo no Processo de Decomposição de Resíduos Vegetais**. Palestra (Congresso Brasileiro de Ciências do Solo) Fortaleza – CE, 2009

COWAN D, MEYERQ, STAFFORDW, MUYANGAS, CAMERONR, WITTWERP. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends Biotechnol**, 23:321–9, 2005.

CRAWFORD, C. S. The community ecology of macroarthropod detritivores. In *The Ecology of Desert Communities* (ed. G. A. Polis), pp. 89–112. **The University of Arizona Press**, Tucson, (1991).

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungusgrowing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.

DAVID,J.F. & GILLON, D. Annual feeding rate of the millipede *Glomeris marginata* on holm oak (*Quercus ilex*) leaf litter under Mediterranean conditions. **Pedobiologia** 46, 42–52, 2002.

- DAVID, J-F. & HANDA, I.T. The ecology of saprophagous macroarthropods (millipedes, woodlice) in the context of global change. **Biological Reviews**, 85, pp. 881–895, 2010.
- DAVISON A, BLAXTERM. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. **Mol Biol Evol** 22:1273–1284, 2005.
- DELATORRE, A. B.; ANDRADE, M. V. V.; LADEIRA, S. A.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Por Fermentação Submersa Usando O Termofílico *Bacillus* sp Smia-2. **Ciências e Cultura**. Vol. 04, n. 1, p. 41-48, 2009.
- DEMURA T, FUKUDA H. Transcriptional regulation in wood formation. **Trends Plant Sci**. 12:64–70, 2007.
- DILLON RJ, DILLON VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annu Rev Entomol** 49:71–92, 2004.
- DILLON, R. J.; WEBSTER, G.; WEIGHTMAN, A. J.; DILLON, V. M. Composition of acridid gut bacterial communities as revealed by 16S rRNA gene analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 265-272, 2008.
- EMONS, A.M.C.; SCHEL, J.H.N.; MULDER, M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, New York, v. 4, p. 22-26, 2002.
- ENGLEHARDT, J. **Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose**. **Carbohydrates Europea**, Amsterdam, v. 12, p. 5-14, 1995.
- EGERT, M.; WAGNER, B.; LEMKE, T.; BRUNE, A.; FRIEDRICH, M.W. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humusfeeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera:Scarabaeidae). **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6659-6668, 2003.
- EGERT, M.; STINGL, U.; BRUUN, L. D.; POMMERENKE, B.; BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. W. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera:Scarabaeidae). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 4556-4566, 2005.
- FACELLI, J.M.; PICKETT, S.T.A. Plant litter: its dynamic and effects on plant community structure. **Botanical Reviews**, v. 57, 1-32, 1991.
- FAGBOLA, O.; ABANG, M. M. *Colletotrichum circinans* and *Colletotrichum coccodes* can be distinguished by DGGE analysis of PCR-amplified 18S rDNA. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 3, p. 195-198, 2004.
- FARINAS, C. S.; LEMO, V.; ZÚÑIGA, U. F. R.; NETO, V. B.; COURI, S. Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2009.

FAVARIN, E. C. **Streptomyces associados a formigas da Tribo Attini e seus efeitos sobre os fungos *Escovopsis weberi* e outros microrganismos.** Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.

FEINSTEIN, L. M.; SUL, W. J.; BLACKWOOD, C. B. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5428-5433, 2009.

FENGEL, D., WEGENER, G. Wood chemistry ultrastructure reaction. Berlín: **Walter de Gruyter**, p. 610 1989.

FISCHER, K., HAHN, D., AMANN, R.I., DANIEL, O., ZEYER, J. In situ analysis of the bacterial community in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. by whole-cell hybridization. *J. Can. Microbiol.* 41, 666–673. 1994.

FLORES, M. E.; PÉREZ, R.; HUITRÓN, C. Beta-Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**, v.24., p.410-416, 1997.

FRANCO, M.N. Produção de celulases por actinomicetos em resíduos agro-industriais, visando a obtenção de bioetanol.. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia). UFRJ. Rio de Janeiro, 84p 2009.

FURIGO, A. J.; PEREIRA, E. B. Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: [HTTP://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/lista\\_exerc/cenetica\\_enzimatica.pdf](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cenetica_enzimatica.pdf). Acesso em Abril de 2013.

GARCIA, C. E. **Isolamento e identificação de actinobactérias em solos de terra preta antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e sequenciamento do gene 16S rRNA.** Tese de Doutorado. Unicamp, 2006.

GEBHARDT K, SCHIMANA J, KRASTEL P, DETTNER K, RHEINHEIMER J, ZEECK A & FIEDLER H-P. Endophenazines A–D, new phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **J Antibiot** 55: 794–800, 2002.

GEORGE, S.P.; AHMAD A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethylcellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, Amsterdam, Netherlands, v 77, p. 171 – 5, 2001.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v.59., p.257-268, 1987.

GOLOVATCH, S.I. & KIME, R. D. Millipede (Diplopoda) distributions: a review. **Soil Organisms** 81, 565–597. 159–193, 2009.



GRUNO M, VALJAMAE P, PETTERSSON G, Johansson G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering** 86: 503–511, 2004.

HOPKIN S.P., READ H.J.: The Biology of Millipedes. **Oxford University Press**, New York 1992.

GRANDCOLAS, P. LES BLATTES. Copenhagen, **World Health Organization**. 24 pp 1998a.

GRANDCOLAS, P. Domestic and non-domestic cockroaches: facts versus received ideas. **Revue Française Allergologie**, 38(10):833- 838, 1998b.

GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIZ-JIMENEZ, C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 36, n.1/2, p. 115-122, 1999.

GUPTA; N & GAUTAM. Optimization of  $\alpha$ -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, 1 1-8 2010.

GULDER TAM & MOORE BS. Chasing the treasures of the sea – bacterial marine natural products. **Curr Opin Microbiol** 12: 252–260, 2009.

HÄGERDAL, B.G.R.; FERCHAK,J.D.; PYE, E. K. Cellulolytic enzyme system of *Thermoactinomyces* sp. Sp. Grown on microcrystalline cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, p. 606 – 12, 1978.

HALOI, D. J.; BORKOTOKI, A.; MAHANTA, R. Comparative study of cellulose activity in *Periplaneta Americana*, *Odontotermes obesus* and *Philosamia ricini*. **World J Life Sci. and Medical Research**, France, Paris, p. 4-6, 2011.

HASSAL, M.; RUSHTON, S. P. The role of coprophagy in the feeding strategies of terrestrial isopods. **Oecologia**, Berlin, v. 53, p. 374-381, 1982.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S Rrna and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.8, p.3233-3241, Aug. 1997.

HOFFMAN,R.L. & PAYNE, J. A. Diplopods as carnivores. **Ecology** 50, 1096–1098, 1969.

HONGO, Y.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **FEMS Microbial Ecology**, v. 44, p. 231-242, 2003.

HONGO, 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**, v. 15, p. 505-516, 2006.

- HUGENHOLTZ, P., GOEBEL B. M., & PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J. Bacteriol.** v. 180, p. 4765–4774, 1998.
- JAN HD, CHEN KS. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World J Microbiol Biotechnol** 19:263–8, 2003.
- JAYASINGHE BATD & PARKINSON D. Earthworms as the vectors of actinomycetes antagonistic to litter decomposer fungi. **Appl Soil Ecol** 43: 1–10, 2009.
- JECU L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Ind Crops Prod**;11:1–5, 2000.
- JIANG, S; SUN, W; CHEN, M; DAI, S; ZHANG, L; LIU, Y; LEE, K J and LI, X. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. **Antonie van Leeuwenhoek.** 92:405–416: 2007.
- JORGENSEN H.; OLSSON L., Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, 38 381– 390. 2006.
- KALTENPOTH M. Actinobacteria as mutualists: general, healthcare for insects? **Trends Microbiol** 17: 529–535, 2009.
- KARUNANANDAA, K.; VARGA, G.A.; AKIN, D.E.; RIGSBY, L.L.; ROYSE, D.J. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. **Anim. Feed Sci. Technol.**, 55:179-19, 1995.
- KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma v. iride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control**, v.21, p.211-215, 2007.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 65-76, 1999.
- KERSTERS K., DE VOS P., GILLIS M., SWINGS J., VANDAMME P., STACKEBRANDT E.: Introduction to the Proteobacteria, pp. 3–37 in M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds): *The Prokaryotes* 5, 3rd ed. **Springer**, New York 2006.
- KHAMNA, S. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. **International Journal of Integrative Biology**. Vol. 6, n. 3, p. 146-147: 2004.
- KHUAD, R.C.; SINGH., A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, Palo Alto, v.13, p. 151-172, 1993.
- KIM, C.; KI., D. Purification and specificity of a specific endo- $\beta$ -1,4- D-glucanase (Avicelase II) resembling exo-cellobiohydrolase from *Bacillus circuland*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 248 – 254, 1995.

KIM, B.; LEE, B.; LEE, Y.; JIN, I.; CHUNG, C.; LEE, J. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 411, 2009.

KIM JK, LEE SC, CHO YY, OH HJ, KO YH. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. **ISRN Microbiol**, 2012.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. Environmentally **Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, p. 273-308.1998.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte chemie international, Weinheim**, v.44, p.3358-3393, 2005.

KNAPP, B. A.; PODMIRSEG, S. M.; SEEBER, J.; MEYER, E.; INSAM, H Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 2299-2307, 2009(a).

KNAPP, B. A.; SEEBER, J.; PODMIRSEG, S. M.; RIEF, A.; MEYER, E.; INSAM, H. Molecular fingerprinting analysis of the gut microflora of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda). **Pedobiologia**, v. 52, p. 325–336, 2009 (b).

KNAPP, B. A.; SEEBER, J.; RIEF, A.; MEYER, E.; INSAM, H. Bacterial Community Composition of the Gut Microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda) as Revealed by Molecular Fingerprinting and Cloning. **Folia Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 489-496, 2010.

KNIETCH, A., T. WASCHKOWITZ, S. BOWIEN, A. HENNE, AND R. DANIEL. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 5:46–56, 2003.

KÖCHLING, T. Biodiversidad microbiana de sedimentos marinos y su papel em La degradacion anaerobia de los sulfonatos de alquilbenceno leneales. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Molecular da Universidad Autônoma de Madrid.Madrid, 2007.

KÖHLER, H. R.; ALBERTI, G.; STORCH, V. The influence of mandibles of Diplopoda on the food – a dependence of fine structure and assimilation efficiency. **Pedobiologia**, v. 35, p. 108-116, 1991.

KÖNIG H, FRÖHLICH J, HERTEL H. Diversity and lignocellulolytic activities of cultured microorganisms. In: König H, Varma A (eds) Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. **Springer, Heidelberg**, pp 271–301, 2006.

KÖNIG H, FRÖHLICH J, LI L, WENZEL M, DRÖGE S, BREUNIG A, PFEIFFER P, RADEK R, BRUGEROLLE G The flagellates of the Australian termite *Mastotermes darwiniensis*: identification of their symbiotic bacteria and cellulases. **Symbiosis** 44:51–65, 2007.

- KÖNIG, H; FRÖHLICH, J; LI, L. The cellulolytic system of the termite gut. **Appl Microbiol Biotechnol** 97:7943–7962, 2013.
- KRASTEL P, ZEECK A, GEBHARDT K, FIEDLER H-P & RHEINHEIMER J . Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the athropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus* II. Structure elucidation. **J Antibiot** 55: 801–806, 2002.
- KREBS, B.; HÖDING, B.; KÜBART, S.; ALEMAYEHU-WORKIE, M.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; GROSCH, R.; BOCHOW, H.; HEVESI, M. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agente. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. **Journal of Plant Disease and Protection**, 105, 18 – 87, 1998.
- KUBICEK, C.P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.L.; KUBICEK-PRANZ, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 90-99, 1993.
- KUHNIGK T, BORST EM, BREUNIG A, KÖNIG H, COLLINS MP, HUTSON RA, KÄMPFER P. *Bacillus oleronius* sp. nov., a member of the hindgut flora of the termite *Reticulitermes santonensis*. **Can J Microbiol** 41:699–706, 1995.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **Fems microbiology reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.
- KUNKEL J. G. A minimal model of metamorphosis: fat body competence to respond to juvenile hormone. En: Ghovindan B, Friedman S, Rodríguez JG, eds. Current topics in insect endocrinology and nutrition. New York: **Plenum**, p. 107-29, 1981.
- KRIŠTÜFEK, V., FISCHER, J., BUHRMANN, J., ZELTINS, A., SCHREMPF, H. In situ monitoring of chitin degradation by *Streptomyces lividans* pCHIO12 within *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta) feeding on *Aspergillus proliferans*. **FEMS Microbiol. Ecology** 28, 41–48, 1999.
- LADD, J.N., Origin and range of enzymes in soil. In: Burns, R.G. (Ed.), **Soil Enzymes**. Academic Press, London, pp: 51–96, 1978.
- LAEMMLI, U. K. **Nature** (London), 227, 680–685, 1970.
- LAI, Y.Z., SARKANEN, K.V. Isolation and structural studies. In: SARKAMEN, K.V., LUDWIG, C.H. **Lignins: occurrence, formation, structure and reaction**. New York : Wiley, 1971. p.165-230.
- LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D., J RALPH. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society for Agronomy, 1993. p.133-163.
- LAUER, A. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. **The ISME Journal** 2: 145-157: 2008.

LAVELLE, P.; LATTAUD, C.; TRIGO, D.; BAROIS, I. Mutualism and biodiversity in soils. **Plant and Soil**, Hague, v. 170, p.23-33, 1995.

LAVELLE, P., BIGNELL, D., LEPAGE, M., WOLTERS, V., ROGER, P., INESON, P., HEAL, O.W. & DHILLION, S. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology** 33, 159–193, 1997.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes presents in wood and chemical pulps. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v.6.3467-3473, 2005.

LEE, R.L.; PAUL, J.W.; WILLEM, H.; VAN ZYL; ISAK, S.P. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66., p.506-577, 2002.

LEE A. H.; HUSSENER, C.; HOOPER-BUI L. Culture-independent identification of gut bacteria in fourth-instar red imported fire ant, *Solenopsis invicta* BUREN, larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 20-33, 2008.

LEE CS, JUNG Y-T, PARK S, OH T-K, YOON J-H. *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan degrading bacterium isolated from forest humus. **Int Journ Syst Evol Microb** 60: 281-286, 2010.

LEFEBVRE, T.; MIAMBI, E.; PANDO, A.; DIOUF, M.; ROULAND-LEFEVRE, C. Gutspecific actinobacterial community structure and diversity associated with the wood-feeding termite species, *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) described by nested PCR-DGGE analysis. **Insectes Sociaux**, v. 56, p. 269-276, 2009.

LI, X., LIN, W.; GAO, P.; CHEN, F. Endoglucanase S, a novel endocellulase exhibiting exoglucanase activity from a newly isolated *Streptomyces* sp LX. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, United Kingdom, v. 85, p. 347-58, 1998.

LI L, FRÖHLICH J, KÖNIG H. Cellulose digestion in the termite gut. In: König H, Varma A (eds) Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. **Springer, Heidelberg**, pp 221–24, 2006.

LI, W.; ZHANG, W.; YANG, M.; CHEN, Y. Cloning of the thermostable cellulose gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 40, p. 195 – 201, 2008.

LILBURN, T.G.; KIM, K. S.; OSTROM, N.E.; BYZEK, K.R., LEADBETTER, J.R.; BREZNAK, J.A. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. **Science**, v.29, p. 2495-2498, 2001.

LIMA, A.L.G.; NASCIMENTO, R.P.; BOM, E.P.S.; COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37., p.272-277, 2005.

LORANGER-MERCIRIS, G., IMBERT, D., BERNHARD-REVERSAT, F., LAVELLE, P. & PONGE, J. F. Litter N-content influences soil millipede abundance, species richness and

feeding preferences in a semi-evergreen dry forest of Guadeloupe (Lesser Antilles). **Biology and Fertility of Soils** 45, 93–98, 2008.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; Pretorius, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews. **American Society for Microbiology**, n.3, v.66., p.506-577, 2002.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 77, p. 467-475. fev. 2002.

MACCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental – a review. **Gene**, Viena, v. 115, p. 189-192, 1992.

MANGENOT F, TOUTAIN F Les Litières. In: Pesson P (ed) **Actualités d'écologie forestière**. Gauthier-Villars, Paris, pp 3–59, 1981.

MARTIN, A. & MARINISSEN, J. C. Y. Biological and physico-chemical processes in excrements of soil animals. **Geoderma**, Amsterdam, v. 56, p. 331-347, 1993.

MAWADZA, C; HATTI-KAUL R.; ZVAUYA, R.; and MATTIASSON, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus strains*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, Netherlands, v. 83, p. 177-87, 2000.

MALEK, M. A. Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme of Microbial Tecnology**, New York, v. 10, p. 750-3, 1988.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v.31, n.3, p.426-429, 1959.

MOHAN,D.;PITTMAN,C.U; STEELE, P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energy and Fuels*, Washington, v.20, p. 848-889, 2006.

MOLNAR, L., POLLAK, E. and FISCHER, E. The distribution of serotonergic neurons in the central nervous system of *Porcellio scaber* Latr (Isopoda, Porcellionidae). **Israel J Zool** 44, 451–452, 1998.

MOORE, B. P. Biochemical studies in termites. In: **Biology of Termites** (eds. K. Krishna & F.M. Weesner) pp. 407-432. Academic Press, New York, 598 p., 1969.

MOREIRA, F. M. S.& SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, 2006.

MÜHLING, M.; WOOLVEN-ALLEN, J.; MURRELL, J. C.; JOINT, I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. **ISME Journal**, v. 2, p. 379-392, 2008.

MUSSATTO, I.S. Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palia de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii*. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2002.

- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analyses of polymerase chain reaction-amplified genes for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.
- MUYZER, G., SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek** 73, 127–141, 1998.
- NAKAJIMA, H.; HONGO, Y.; NODA, S.; YOSHIDA, Y.; USAMI, R.; KUDO, T.; OHKUMA, M. Phylogenetic and morphological diversity of *Bacteroidales* members associated with the gut wall of termites. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 70, p. 211-218, 2006.
- O'BRIEN, R. W. & SLAYTOR, M. Role of microorganisms in the metabolism of termites. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 35, p.239–262,1982.
- OHKUMA, M. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 345-352, 2008.
- OHKUMA, M.; SATOKO, N.; KUDO, T. Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, No. 11, p. 4926-4934, 1999.
- OKORO, Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek** 95: 121-133: 2009.
- PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J.L. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa, p.327-347, 1998.
- PASSOS, S.R. Diversidade de Microrganismos no Trato Intestinal e Resíduos Digestivos de *Trigoniulus corallinus* (Gervais) (Diplopoda, Spirobolida, Pachybolidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, 2010.
- PASTI MB, BELLI ML. Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. **FEMS Microbiol Lett** 26:107–112, 1985.
- PAVANA JYOTSNA KP, VIJAYALAKSHMI K, PRASANNA ND, SHAHEEN SK. Isolation and characterization of cellulose producing *Lysinibacillus sphaericus* MTCC No 9468 from gut of *Eisenia Foetida*. **The Bioscan** 6: 325-327, 2010.
- PELLENS, R.; GRANDCOLAS, P. Catalogue of Blattaria (Insecta) from Brazil. **Zootaxa**, 1709: 1-109, 2008a.
- PELLENS, R.; GRANDCOLAS, P. Are successful colonizers necessarily invasive species? The case of the so-called invading parthenogenetic cockroach, *Pycnoscelus surinamensis*, in the Brazilian Atlantic forest. **Revue d'Ecologie (Terre Vie)**, v. 57, p. 253–261, 2002b.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v.2, 1a edition, 2008.

PÉREZ JA, MUÑOZ-DELGADO J, DE LA RUBIAT, MARTINEZ J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Inter Microbiol**, 5: 53-63, 2002.

PERITO, B; HANHART, E; IRDANI, T; IQBAL, M; MCCARTHY, AJ; MASTROMEI, G. Characterization and sequence analysis of a *Streptomyces rochei* A2 endoglucanase-encoding gene. *Gene*, Amsterdam, Netherlands, v. 148, p. 119-24, 1994.

PIEL J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Nat Prod Rep** 26: 338–362, 2009.

PITCHER, D. G., SAUNDERS, N. A. OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, 8: 151-156. 1989.

POBOZSNY, M. Nahrungsansprüche einiger Diplopoden- und Isopoden-Arten in mesophilen Laubwäldern Ungarns. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae** 24, 397–406, 1978.

POLLIERER, M. M., LANGEL, R., SCHEU, S. & MARAUN, M. Compartmentalization of the soil animal food web as indicated by dual analysis of stable isotope ratios ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). **Soil Biology and Biochemistry** 41, 1221–1226, 2009.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, Hague, v. 244, p. 9-17, 2002.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D.L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.54, n.12, p. 3057-3063, 1998.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extractio of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**. v. 39, p. 183-190, 2003.

ROESCH, L. F.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal** v. 1, p. 283-290, 2007.

RUEGGER, M.J.S; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.205-211, 2004.

RYAN F. SEIPKE, MARTIN KALTENPOTH & MATTHEW I. Hutchings. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS Microbiol Rev** 36 862–876, 2012.

SALEH-RASTIN, N.; PETERSEN, M.; COLEMAN, S.; HUBBELL, D. Rapid plate assay for hydrolytic enzymes of *Rhizobium*. In: KEISTER, D.; CREGON, P.B. (eds). *The*



Rhizosphere and Plant Growth, Dordrecht, The Netherlands: **Kluwer Academic Publishers**, p 188, 1991.

SALIBA, E.O.S; RODRIGUEZ, N. M; MORAIS, S.A.L; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p917-928, 2001.

SAMUEL, S. MUTHUKKARUPPAN, S.M.; GAYATHRI, S.; SENTHIL, K. P. K. Cellulase production by *Bacillus* spp. And *Aspergillus niger* using coir waste and sa dust and partial purification. **International Journal of Current Research**, v.x, p.31-34, 2010.

SASKA, P. Granivory in terrestrial isopods. **Ecological Entomology** 33, 742–747., 2008.

SARKO, A. *Cellulose*- How much do we know about its structure? In: Wood and Cellulosics: Industrial Utilization. **Biotechnology, Structure and Properties**. Jonh Wiley & Sons, New York, 1997.

SCHAEFER, M. Secondary production and decomposition. In Ecosystems of the World (7). Temperate Deciduous Forests (eds. E. Röhrling & B. Ulrich), pp. 175–218. **Elsevier**, Amsterdam, 1991.

SHELLEY, R. M.; LEHTINEN, P. T. Diagnoses, synonymies and occurrences of the pantropical millipeds *Leptogoniulus sorornus* (Butler) and *Trigoniulus corallinus* (Gervais) (Spirobolida: Pachybolidae: Trigoniulinae). **Journal of Natural History**, London, v. 33, p. 1379-1401, 1999.

SCHEU, S. & SCHAEFER, M. Bottom-up control of the soil macrofauna community in a beechwood on limestone: manipulation of food resources. **Ecology** 79, 1573–1585, 1998.

SCHMITT-WAGNER, D.; FRIEDRICH, M. W.; WAGNER, B.; BRUNE, A. Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 6007-6017, 2003.

SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. INTRODUCING DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 1501–1506, 2005.

SCHOEMAKER, H.E.; MINK, D. WOBOLTS, M.G. Dispelling the Myths- Biocatalysis in Industrial Synthesis. **Science**, v. 299, p. 1694-1698, 2003.

SCHOWALTER, T. *Insect Ecology: an Ecosystem Approach*. Second edition. Academic Press, **Elsevier**, Amsterdam, 2006.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**. São Paulo, vol.24, n. 2, 2001.

SCHROTT, M.; KNAPP, B. A.; WAGNER, A. O.; SEEBER, J.; MEYER, E.; INSAM, H. Molecular and cultivation-dependent analyses of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus*

and *Cylindroiulus fulviceps*, in K. Tajovský (Ed.): **Proc. 10th Central European Workshop Soil Zoology**, České Budějovice (Czechia), 2009.

SILVA, D.; FELIX, E.; FISCHER, G.; TAVARES, L.B.B. Biodegradação de resíduos por *Lentinus edodes* para produção de uma enzima xilanolítica. In: Melo, I.S.; Scramin, S.; Silva, C.M.M.S.; Spessoto, A. Workshop sobre Biodegradação, Campinas : Embrapa, 2001.

SINGH, J. S.; GUPTA, S. R. Plant decomposition and soil respiration in terrestrial ecosystems. **Botanical Review**, New York, v. 43, n. 4, p. 449-528. 1977.

SINGH, S.; MADLALA, A.M.; PRIOR, B.A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 3-16, 2003.

SOARES FL JR, MELO IS, DIAS AC, ANDREOTE FD. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World J Microbiol Biotechnol**; 28: 2195-203, 2012.

SOUZA, J. V. B.; MORIYA, R. Y.; ÉRICA S. SOUZA, E. S. Bioprospecção De Substâncias Anti-Fúngicas Produzidas Por Actinomycetes Isolados Da Região Amazônica. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol. VI (3), 94 - 102, 2009.

SPIRIDONOV, N.A.; WILSON, D.B. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. **Journal of Bacteriology**, Washington, p. 3529 -32, 1998.

SPIRIDONOV, N.A.; WILSON, D.B. Characterization and cloning of CelR, a transcriptional regulatory of celulases genes from *Themonospora fusca*. **The Jornal of Biological Chemistry**, Bethesda, United States, v. 274, n. 19, p. 13127-32, 1999.

SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. Decomposition in Terrestrial Ecosystems. **Studies in Ecology, Vol.5., Oxford: Blackwell Scientific Publications**, 372 p, 1979.

SUN, Y.,CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, New York, n.83, p.1-11, 2002.

SZABO´ , I.M., JA´ GER, K., CONTRERAS, E., MA´ RIALIGETI, K., DZINGOV, A., BARABA´ S, GY., POBOZSNY, M. Composition and properties of the external microflora of millipedes (Diplopoda). In: Lebrun, P.H., Andre, H.M., De Medts, A., Gregoire- Wibo, C., Wanthy, C., Dieu-Brichart, (Eds.), **New Trends in Soil Biology**. Ottignies- Louvain-Ja neuve, pp. 183–201, 1983.

SZLAVECZ, K. The effect of microhabitats on the leaf litter decomposition and on the distribution of soil animals. **Holarctic Ecology** 8, 33–38, 1985.

TAHIR M, SALEH F, OHTSUKA A, HAYASHI K. Synergistic effect of cellulase and hemicellulase on nutrient utilization and performance in broilers fed a corn-soybean meal diet. **Anim. Sci. J.** 76:559–65, 2005.

TABATABAI, M.A., *Enzymes*. In: Weaver, R.W., Augle, S, Bottomly, P.J., Berdicek, Q., Smith, S., Tabatabai, A., Wollum, A. (Eds.), **Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological**, 1994.

TAECHAPOEMPOL K, SREETHAWONG T, RANGSUNVIGIT P, NAMPROHM W, THAMPRAJAMCHIT B, RENGPIPAT S, CHAVADEJ S. Cellulaseproducing bacteria from Thai higher termites, *Microcerotermes* sp.: enzymatic activities and ionic liquid tolerance. **Appl Biochem**, 2011.

TANAKA H, AOYAGI H, SHIINA S, DOUDOU Y, YOSHIMURA T, NAKAMURA R, UCHIYAMA H. Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Appl Microbiol Biotechnol** 71:907–917, 2006.

TAYLOR, E.C.; CRAWFORD, C.S. Microbial gut symbionts and desert detritivores. **Sci Rev. Arid Zone Res.**, v.1, p. 37-52, 1982.

TAKAHASHI Y, MATSUMOTO A, SEINO A, IWAI Y, OMURA S. Rare actinomycetes isolated from desert soils. **Actinomycetologica**.10:91–97: 1996.

TEATHER, R. M., & P. J. WOOD. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** 43: 777, 780, 1982.

THOMAS, L.; CRAWFORD, D.L. Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocelluloses catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris*. **Journal of clinical microbiology**. Washington, v.44, p.364-372, 1998.

TOKUDA, G.; WATANABE, H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. **Biology Letters**, v. 3, p. 336-339. 2007.

VASANTHAKUMAR, A; HANDELSMAN, J; SCHLOSS, P. D; BAUER, L.S; RAFFA, K.F. Gut Microbiota of an Invasive Subcortical Beetle, *Agrius planipennis* Fairmaire, Across Various Life Stages. **Environmental Entomology**, 37(5):1344-1353. 2008.

VON WINTZINGERODE F., GOBEL U.B. and STACKEBRANDT E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiol. Rev.** 21: 213–219, 1997.

WACHINGER, G. Identification of mycelium-associated cellulose from *Streptomyces reticuli*. *Applied and environmental microbiology*, Washington, v.55, n.10, p.2653-265, 1989.

WALKER, A.J., GLEN, D.M., SHEWRY, P.R. Bacteria associated with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein digestion. **Soil Biology and Biochemistry** 31, 1387–1394, 1999.

WARBURG, M. R. Isopods and their terrestrial environment. **Advances in Ecological Research** 17, 187–242, 1987.

WARD D.M., WELLER R., BATESON M.M.: 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature** 345, 63–65, 1990.

WARDLE, D. A. Communities and Ecosystems: Linking the Aboveground and Belowground Components. **Princeton University Press**, Princeton, 2002.

WARNECKE, F.; LUGINBÜHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T. H.; STEGE, J. T.; CAYOUE, 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**, v. 450, p. 560–569, 2007.

WARREN MW, ZOU X. Soil macrofauna and litter nutrients in three tropical tree plantations on a disturbed site in Puerto Rico. **Forest Ecol Manage** 170:161–171, 2002.

WATANABE H, TOKUDA G. Animal cellulases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1167–78, 2001.

WATANABE Y, SHINZATO N, FUKATSU T. Isolation of actinomycetes from termites' guts. **Biosci Biotechnol Biochem** 67:1797–1801,2003.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual Review Entomology**, v. 55, p. 609-632, 2010.

WENZEL, M; SCHÖNIG, I; BERCHTOLD, M; KÄMPFER, P, and KÖNIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **J Appl Microbiol.**;92(1):32-40. 2002.

WITMANN, S; SHARECK, F; KLUEPFEL, D; and MOROSOLI, R. Purification e characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividians* 66 and DNA sequences of the encoding gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 701 – 1, 1994.

WOLTERS, V. Invertebrate control of soil organic matter stability. **Biology and Fertility of Soils** 31, 1–19, 2000.

VANDEL, A. La répartition géographique des Oniscoidea (Crustacés isópodes terrestres). **Bulletin Biologique de la France et de la Belgique** 74, 221–272, 1945.

VASCONCELLOS, R. L. F. Actinobactérias da rizosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial biotecnológico. (Dissertação – Mestre em Agronomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

YANG, H.; SCHMITT-WAGNER, D.; STINGL, U.; BRUNE, A. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). **Environmental Microbiol**, v.7, p. 916-932, 2005.

- ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORTHEAD, D. L.; WILDMAN, H. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n° 9, p. 1101-1108, 1994.
- ZHANG, P.; LYND, R. L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 88, n. 7, p. 797-824. 2004a.
- ZHANG, P.; LYND, R. L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 88, n. 7, p. 797-824. 2004b.
- ZHANG H, ZHANG W, JIN Y, JIN M, YU X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. **Antonie van Leeuwenhoek**.**93**:241–248: 2008.
- ZHOU J, SHI P, ZHANG R, HUANG H, MENG K, YANG P & YAO B. Symbiotic *Streptomyces* spp. TN119 GH 11 xylanase: a new pH-stable, protease- and SDS-resistant xylanase. **J IndMicrobiol Biotechnol** 38: 523–530, 2011.
- ZILLI, J. E.; SANTOS, E. L.; HAGLER, L. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Desenvolvimento de meio de cultivo para microrganismos do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 22, 2003, Florianópolis. *Resumos*. Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.
- ZIMMER,M.& TOPP, W. The role of coprophagy in nutrient release from feces of phytophagous insects. **Soil Biology and Biochemistry** 34, 1093–1099, 2002.