

**INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA-ISB
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

JOSICLÉA FERNANDES APARICIO

**OS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS
CUPINS *Nasutitermites* sp. E SUA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA**

Professora: Dra. Adriana Dantas Gonzaga.

**COARI
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA-ISB
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

JOSICLÉA FERNANDES APARICIO

**OS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS
CUPINS *Nasutitermites* sp. E SUA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA**

**Projeto apresentado na
realização de um PIBIC ao
curso Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade
Federal do Amazonas, com a
colaboração da professora
Doutora Adriana Dantas
Gonzaga.**

**COARI
2015**

INTRODUÇÃO

A ordem Isoptera engloba os indivíduos conhecidos como cupins ou térmitas, os quais possuem um aparelho bucal do tipo mastigador (GRASSÉ 1949).

Os cupins são insetos sociais que formam colônias de indivíduos interdependentes entre si, onde há sobreposição de gerações e cuidados com a prole. Sua estrutura social é composta por indivíduos que se desenvolvem por paurometabolia e compreende machos e fêmeas que se distribuem em categorias ou castas (GRASSÉ, 1982; OLIVEIRA et al., 1986). Os cupins são os invertebrados dominantes em ambientes terrestres tropicais e estão espalhados desde as florestas úmidas até as savanas, sendo encontrados até mesmo em regiões áridas (LEE e WOOD 1971, LA FAGE e NUTTING 1978, WOOD e SANDS 1978, WOOD et al. 1982, EGGLETON et al. 1996). A explicação para essa extraordinária abundância advém da existência da simbiose com microrganismos, além de uma organização social bastante desenvolvida (COSTA-LEONARDO 2002).

Os térmitas desempenham um papel importante na dinâmica dos ecossistemas em que encontram-se presentes. O comportamento social juntamente com seus hábitos alimentares e de nidificação, propiciam o desenvolvimento de colônias com grande número de indivíduos e grande longevidade. Deste modo os térmitas podem causar impactos ambientais maiores que as atividades de muitos organismos mais conspícuos, incluindo modificações nas propriedades físicas e químicas do solo, no processo de decomposição, na distribuição de plantas e animais termitófilos e na ciclagem de nutrientes (LEE & WOOD, 1971 E WOOD & SANDS, 1978).

Os organismos biodeterioradores, como os cupins, por apresentarem características morfológicas, fisiológicas e comportamentais especiais, são capazes de utilizar a madeira como substrato, abrigo e alimento. Neste contexto, destaque especial é dado aos térmitas, que devido a capacidade de digerir celulose proporcionada por fauna microbiológica simbiote presente em seu intestino, são atraídos por todo o material de origem celulósica, como a madeira em seu estado bruto, papel, tecidos e outros (GRASSÉ, 1982; OLIVEIRA et al., 1986).

Os térmitas possuem alimentação bastante variada entre as espécies e nem todos possuem hábitos xilófagos. Muitas espécies se alimentam de matéria orgânica em decomposição, madeiras deterioradas por fungos e outras são forrageiras ou cultivam fungos (EDWARDS & MILL, 1986 E OLIVEIRA et al., 1986).

A grande abundância dos cupins nos ecossistemas, associada à existência de diferentes simbioses intestinais, confere a estes insetos a possibilidade de desempenhar importantes papéis como super decompositores e auxílio no balanço Carbono-Nitrogênio (HIGASHI; ABE,1997). Algumas espécies possuem simbioses intestinais capazes de fixar nitrogênio atmosférico (BREZNAK et al.,1994; TAYASU et al., 1994).

De acordo com BLACK e OKWAKOL (1997), os cupins podem ser responsáveis por liberar até 2% do dióxido de carbono global e 15% do metano, interferindo assim em padrões climáticos locais, sendo considerados fundamentais em vários processos ecológicos, representando um grupo de organismos essenciais para manutenção da biodiversidade.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 OS CUPINS

A ordem isoptera é composta inteiramente por insetos eussociais e reúne mais de 2900 espécies descritas no mundo (ENGEL *et al.*, 2009). Embora os cupins sejam mais conhecidos como pragas e causarem prejuízos expressivos, principalmente nos centros urbanos (CONSTANTINO, 2002), apresentam uma enorme importância ecológica, pois são um dos principais organismos capazes de degradar a celulose, substância que compõem a maior parte da biomassa no planeta, mas que muito pouco seres vivos são capazes de metabolizar (HIGASHI e ABE 1997).

Os cupins ou térmitas são mais conhecidos por sua importância econômica como pragas de madeira e de outros materiais celulósicos, entretanto podem ser considerados insetos benéficos, pois atuam na decomposição da matéria orgânica e colaboram na ciclagem dos nutrientes e na aeração do solo.

Na região Neotropical são conhecidas mais de 540 espécies (CONSTANTINO, 2010), que embora representem mais de um quinto de todas as espécies descritas, certamente trata-se de um número subestimado e tende a crescer bastante com o avanço dos trabalhos de taxonomia.

Termitidae é a maior família de cupins e consiste de $\frac{3}{4}$ de todas as espécies conhecidas, agrupadas em 4 subfamílias: *Amitermitinae*, *Macrotermitinae*, *Nasutitermitinae*. É formada pelas espécies de cupins que fazem ninhos em formas de montículos, embora

haja as que constroem ninhos subterrâneos, e por outras que tem ninhos arborícolas ou semi-arborícolas (BERTI FILHO, 1993).

Nasutitermes é o gênero de cupins com maior número de espécies do mundo, apresentando maior diversidade em região neotropical (CONSTATINO, 1999), além de representar o táxon com maior número de evolução e especialização. Poucas são as espécies deste gênero que modificam somente no solo. Algumas espécies de *Nasutitermes* têm a tendência de construir ninhos vulgarmente denominados *cabeça de nego* em galhos de árvores, indicando ser este o principal local de formação da colônia, ainda que o casal real inicialmente nidifique no solo; mais tarde a colônia acaba transferindo-se para locais acima do nível do mesmo (FONTES, 1987). As espécies que ocorrem na América do Sul nidificam em qualquer tipo de formação vegetal, matas, florestas, caatingas, parques, etc. (PIZANO *et al.* 1990). Muitas espécies constroem ninhos arbóreos, que estão sempre em comunicação com o solo, por meio de túneis que descem pelo tronco da árvore onde seu ninho foi construído (MELO FILHO, 1996). Os mesmos são essencialmente xilófagos e forrageia sob o solo à procura de madeira morta, preferencialmente seca e em decomposição (MARTITUS, 1994).

Existem diferentes tipos de alimentação entre os cupins. Os jovens, os soldados e todos os reprodutores são incapazes de se alimentar sozinhos e recebem dos operários alimentação estomodeal ou proctodeal. A alimentação estomodeal pode ser saliva, que é o único nutriente dos reprodutores funcionais (rei e rainha), ou alimento regurgitado. Os soldados são, em grande parte, nutridos com alimento regurgitado, mas em certos *Termitidae* eles têm uma dieta exclusivamente líquida (saliva). A alimentação proctodeal foi descrita para os cupins inferiores, os quais apresentam uma fauna intestinal composta por protozoários flagelados. O alimento proctodeal consiste de excreções líquidas, ricas em simbiontes, provenientes do intestino posterior e que são eliminadas em resposta a estímulos táteis de outros cupins (GRASSÉ, 1949).

A coleta de alimento pelos operários, tanto para uso próprio quanto para prover as castas dependentes, é o recurso energético básico da colônia. Ela consiste de materiais celulósicos provenientes de plantas vivas ou mortas, parcialmente ou quase que inteiramente decompostas. O recurso alimentar e sua subsequente decomposição têm muitas implicações de longo alcance nas relações entre cupins e solos, tanto por suas atividades alimentares quanto pela transformação do alimento por meio da digestão. Portanto, os cupins afetam o ciclo da matéria orgânica e dos nutrientes. Adicionalmente, a concentração de alimento e a perda de produtos a partir da digestão

influenciam a disposição de matéria orgânica e de nutrientes no ecossistema (LEE e WOOD, 1971).

Os cupins possuem um aparelho bucal do tipo mastigador (GRASSÉ, 1949) e embora geralmente assumam-se que todos sejam consumidores de madeira, estes insetos exploram uma grande diversidade de material em vários estágios de decomposição. Muitos se alimentam de madeira (viva ou morta), outros consomem gramíneas, plantas herbáceas, serrapilheira, fungos, ninhos construídos por outras espécies de cupins, excrementos e carcaças de animais, líquens e até mesmo material orgânico presente no solo (húmus) (LEE e WOOD, 1971; WOOD, 1978; EDWARDS e WILL, 1986; LIMA e COSTA-LEONARDO, 2007).

Segundo (MOORE, 1996), muitas fontes alimentares dos cupins são ricas em lignina e em carboidratos, especialmente celulose, mas pobres em vitaminas, proteínas e outras formas de nitrogênio orgânico. A lignina, que fornece carboidratos extras para os cupins não é completamente degradada durante a passagem pelo canal alimentar dos cupins (BREZNAK e BRUNE, 1994) e a nutrição desses insetos depende do auxílio de microrganismos simbióticos.

Tais relações simbióticas tiveram um papel essencial na evolução dos térmitas, já que eles proporcionaram novas vias metabólicas de processamento de carbono e fixação de nitrogênio a partir da quebra dos componentes lignocelulósicos sob ação dos microrganismos simbiotes (LIMA e COSTA-LEONARDO, 2007).

1.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE CUPINS E FUNGOS

A associação entre cupins e fungos alcançou seu mais alto nível de especialização na subfamília *Macrotermitinae* (família *Termitidae*), que ocorre na África tropical, em partes da Índia e da Arábia, e no sudeste asiático, e geralmente são os cupins dominantes das savanas e de florestas tropicais desses lugares. Os *Macrotermitinae* consomem madeira, folhas e grama morta, fezes de herbívoros, e podem também se alimentar de raízes. Algumas espécies armazenam alimento na forma de minúsculos fragmentos de madeira umedecidos com saliva. Depois de ser estocado por uma semana, o alimento é ingerido e então depositado como fezes nos favos de fungos (WOOD e THOMAS 1989, DARLINGTON 1994). A presença desses organismos juntos aos térmitas, muitas vezes tem sido relatadas como benéfica para os cupins, sendo muitos térmitas nutricionalmente dependentes desses microrganismos

(SANDS, 1969). Contudo, as associações entre fungos e cupins são de diferentes tipos: comensais, parasíticas, predatórias, mutualísticas, de nutrição, saprofitismo e de transporte de fungos pelos cupins (SANDS, 1969; BRIAN 1983; DEJEAN; BOLTON, 1995; DEJAN et al., 1997; LEPONCE et al., 1999).

No Brasil segundo BARBOSA-SILVA et al (in preparação) são escassos os estudos que apontem aspectos biotecnológicos dessa interação. Os autores registraram em ambiente natural da caatinga, 12 espécies fungicas em ninhos ativos e sete em ninhos abandonados de *Constrictotermes Cyphergaster* (SILVESTRI, 1991). Registraram-se ainda, duas espécies fungicas associadas ao conteúdo alimentar desses térmitas. Contudo, várias lacunas ainda norteiam o conhecimento ecológico dessa associação.

A Subfamília *Macrotermitenae* cultiva fungos basidiomiceto *Termitomyces* pertencente à família *Amanitaceae*, em um substrato de fezes produzido a partir da ingestão de alimento, que passa rapidamente pelo trato digestivo do cupim, sem sofrer digestão, e é expelido sob a forma de esferas (fezes primárias). Tais fungos apresentam um alto valor nutricional e suas enzimas provavelmente contribuem para digestão da celulose, em graus variáveis nas diferentes espécies de cupins. Os favos de fungos são estruturas bastante dinâmicas, e conforme as fezes são depositadas e o fungo cresce, a parte mais antiga é consumida pelos cupins, resultando numa “reciclagem” total num período de cinco a oito semanas (WOOD e THOMAS, 1989; DARLINGTON, 1994).

Os fungos são ricos em nitrogênio e outros nutrientes, além de processarem enzimas (celulases, amilase, sucrase, maltase, melibiase, celobiase, lactase, xilanase, galactanase, proteinase, polipeptidase e lipase) para o catabolismo de celulose e lignina. Os favos de fungos também podem desintoxicar aleloquímicos (MARTIN e MARTIN, 1979). O cultivo de jardins de fungos otimiza a assimilação do alimento, e seus cultivadores apresentam taxas de consumo muito mais altas do que outros consumidores (COLLINS, 1980). A existência desse mutualismo entre cupins e fungos proporcionou aos térmitas um aproveitamento mais eficiente de nitrogênio e energia, sem serem limitados pela quantidade de simbioses que seu intestino pode comportar.

1.3 POTENCIAL DOS MICRORGANISMOS

Podemos encontrar os microrganismos em qualquer ecossistema existente no planeta terra, pois tem a capacidade de colonizar cada nicho ecológico. A sua existência e principalmente seu trabalho realizado é importante para atividade e equilíbrio de um sistema que inclui os seres vivos e o ambiente, além disso, ainda dispõem de uma importante fonte de recursos genéticos num âmbito biotecnológico e para um desenvolvimento econômico e sustentável (RODRIGUES, 2008).

Os fungos são organismos eucariotos que diferem das bactérias em tamanho, genoma e em muitas das suas funções celulares que são típicas de organismos complexos ao invés de simples células bacterianas. Apresentam crescimento celular vegetativo na forma de micélio seguido pela mudança da forma e estrutura (morfogênese) com a formação de esporos assexuados e sexuados. Para a maioria dos propósitos biotecnológicos fungos são crescimentos vegetativos associados com a divisão nuclear mitótica (CASTRO e SILVA *et al.*, 2002). Estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais. São os mais efetivos biodegradadores de materiais lignocelulósicos na natureza, mais especificamente os fungos causadores de decomposição (podridão) branca, pois degradam todos os componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) (CASTRO, *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1986). Entre os fungos decompositores de madeira, existem aqueles que são únicos entre os eucariontes por desenvolverem métodos não específicos para a degradação da “lignina” (fungos de podridão-branca) encontrada na parede celular e em outras estruturas das células xilemáticas (KIRK *et al.*, 1976). A degradação da lignina é essencialmente um processo metabólico secundário que não é necessário para o principal processo de crescimento (os fungos de podridão-branca não usam a lignina como fonte de carbono para o seu crescimento).

1.4 ENZIMAS

O mercado mundial das enzimas divide-se em três segmentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos; enzimas técnicas e, enzimas empregadas na produção de ração animal. Destes três grupos, destacam-se as enzimas destinadas aos setores de alimentos, que são empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes, e as enzimas técnicas, que são utilizadas na

formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos. Este é o principal mercado consumidor de enzimas, detendo aproximadamente 50% do total das enzimas comercializadas.

No setor industrial as mais utilizadas são as proteases, que ocupam 40% do mercado de enzimas, seguidas das carboidrases (amilases e celulasas) e lipases.

No entanto, o crescimento acima da média de algumas enzimas como as polimerases e as nucleases, juntamente com outras enzimas como fitases e celulasas, poderá levar esse grupo de enzimas a ultrapassar o grupo das mais empregadas industrialmente nos dias de hoje, formado pelas lipases, carboidrases e proteases.

A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar, e reconhecido pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável. Além do campo industrial, o rápido desenvolvimento da engenharia genética, *high-throughput screening* entre outros, abriu novos campos de aplicação. Esse desenvolvimento tem estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia de enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde, de energia e do meio ambiente.

Além do potencial biotecnológico de promoção de crescimento vegetal e inibição de fitopatógenos, os microrganismos ganham destaque na indústria quando capazes de produzir enzimas com diferentes aplicabilidades nesse setor. Enzimas produzidas por microrganismos são preferidas, do ponto de vista científico e comercial, por apresentarem rápido crescimento, espaço limitado de cultivo e fácil manipulação genética. Amilases, pectinases, celulasas e proteases são algumas das enzimas produzidas por microrganismos do solo e associados a plantas que têm sido muito utilizadas na indústria.

A celulose constitui uma importante fonte renovável de carbono, o que reforça a importância do uso de processos de fermentações celulolíticas e aumenta o interesse em aprimorar a digestibilidade de materiais ligno-celulósicos e em estudos envolvendo a hidrólise da celulose. O interesse no uso industrial de celulasas tem crescido muito. Sua aplicação na conversão de biomassa celulolíticas em açúcares para a fermentação de etanol e outros produtos pode prover grandes benefícios ambientais e econômicos. O desafio chave é transformar essa conversão num processo mais rápido e menos custoso (HIMMEL *et al.*, 1999).

1.4.1 CELULASE

A Celulase é um complexo de enzima que tem capacidade de fazer hidrólise de celulose, até moléculas de glicose, e está até pequenos oligossacarídeos, é oriunda de fungos, bactérias e outros seres vivos.

Celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais. Enzimas são moléculas capazes de “acelerar” reações químicas e estão presentes em todas as células.

A celulose é um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose unidas entre si através de ligações químicas. As celulases realizam a quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a celulose.

No caso das celulases, três enzimas fazem parte desse grupo, elas recebem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases.

As endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos (açúcares pequenos). As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose, que são compostos menores, formados por duas unidades de glicose. As beta-glicosidases quebram a ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose (livres).

A celulose é um homo-polissacarídeo de forma linear tendo em sua composição glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo o elemento fundamental da parede celular de vegetais. Exibe mais de 10.000 resíduos de β -glicose anidra. Cadeias de celulose geram as fibrilas essenciais, composta por duas regiões diferentes, a cristalina e a amorfa, na qual esta última é bem suscetível à hidrólise (MORETTI, 2010).

Esse complexo enzimático geralmente está localizado em secreções de microrganismos e só são liberados apenas quando se faz necessário seu crescimento em celulose, assim como as outras enzimas extracelulares de hidrólise, mas podem também ser encontradas no sistema digestivo de certas espécies de gastrópodes. Uma boa parte da produção de celulase em escala industrial é feito por fungos filamentosos (KUBICEK et al., 1993). Celulases comerciais são obtidas principalmente de fungos como: *Trichoderma spp*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*.

2. JUSTIFICATIVA

Os cupins são insetos que aparecem mais em ambientes tropicais, embora possam viver quase em qualquer lugar desde que o solo não congele no inverno. Embora várias pessoas achem os cupins parecidos com formigas, eles estão mais próximos filogeneticamente das baratas. Todas as espécies de cupins vivem em sociedade, e as colônias se dividem em grupos ou castas.

O principal alimento dos cupins vem da celulose. A celulose é um polímero, formado por várias moléculas idênticas. A celulose é um composto duro e resistente encontrado nas plantas, sendo ela que dá às árvores e arbustos sua estrutura. As moléculas que compõem a celulose são de glicose, chegando a até 3 mil.

Hoje em dia sabe-se que esses simbiossios agem bem sobre a celulose, porém pouco praticamente nada se conhece sobre as enzimas que atuam sobre a molécula de lignina, cuja digestão feita através de bactérias e fungos são apoiadas pela ação de micélios de basidiomicetos e ascomicetos e, certamente, também por protozoários flagelados que se alimentam de lignina.

As celulasas são utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil, essas enzimas são usadas para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos, macios e com melhor caimento. Também são utilizadas na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. Exercem papel importante na nutrição animal. Na fabricação de detergentes, proporcionam maior limpeza e menor degradação dos tecidos e na indústria de polpa e papel, tornam o papel mais branco e liso. Entretanto, o interesse por essas enzimas tem aumentado muito devido a sua utilização no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais (CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N.).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial dos fungos associados aos cupins *Nasutitermites* sp., bem como o seu potencial biotecnológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar, purificar, identificar e conservar os fungos associados ao cupim *Nasutitermites* sp.;

Investigar a produção de enzimas extracelulares de no mínimo seis linhagens diferentes de microrganismos associados ao cupim *Nasutitermes* sp., tais como, celulases.

4. MATERIA E METODOS

4.1 COLETA DOS INSETOS

Os cupins *Nasutitermes* sp. foram coletados com o auxílio de pinças e placas de Petri, nos meses de maio e junho de 2014, no Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB), localizado no município de Coari, AM e transportados para o Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Amazonas, ISB-UFAM.

Figura. 01- Coleta do cupins *Nasutitermes* sp., A – Visualização do cupinzeiro; B- Cupins nas placas de Petri.



Fonte: Aparício, J.F.

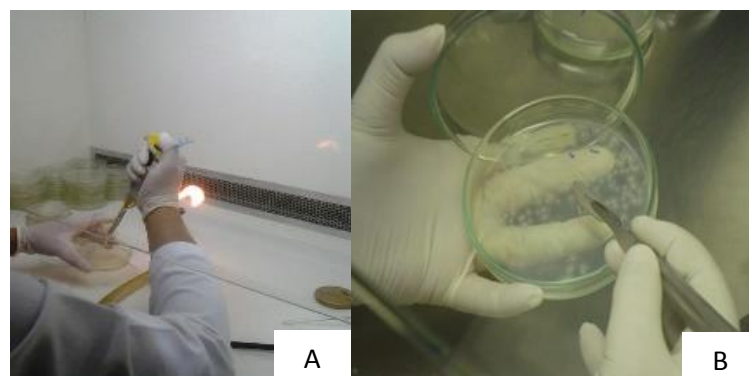
4.1.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Os recipientes contendo os cupins foram conduzidos para o Laboratório de Microbiologia do ISB, onde foi realizado o isolamento dos microrganismos presentes nos cupins. Para o isolamento, os insetos foram divididos em cabeça, tórax e abdômen, além de termos os insetos completos (com todas as estruturas) transferindo pequenos fragmentos dos insetos para placa de Petri com o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). As culturas foram transferidas para estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C. Após 7 dias, foi realizado o isolamento, transferindo-se fragmentos de ágar contendo hifas, para novas placas contendo o referido meio de cultura BDA.

4.1.2 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS

Com a finalidade de se obter colônias de fungo puras (separadas), ou seja, colônia de um único conídio realizou-se a purificação dos isolados e posteriormente a diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de AZEVEDO e COSTA (1973). Preparou-se a solução de Tween 80 (20ml de Tween 80 + 50mL de água destilada autoclavada), na qual serviu para separar os conídios, e pipetou-se 1mL desta solução em microtubos (Eppendorf de 1,5 mL) e com auxílio de alça com agulha de platina foi realizada uma raspagem de leve nos isolados e postos nos microtubos, e foi homogeneizado em agitador vortex (Phoenix). Para determinar a concentração de células da suspensão preparada, utilizou-se Câmara de Neubauer, na qual torna possível a contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. Foi realizado cálculos estimativos do número de conídios e posteriormente realizaram-se as diluições seriadas em solução salina. Após as diluições, uma alíquota de 10 μ L das suspensões 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram inoculados no centro da placa de Petri com meio de cultura BDA e espalhados com ajuda da alça de Drigalski. As suspensões foram plaqueadas em duplicata e armazenadas a 28 °C em estufa B.O.D. Depois de três dias, selecionou-se uma colônia oriunda de um único conídio (cultura pura) e transferiu-se para placas com o mesmo meio de cultura, armazenadas no mesmo tipo de estufa a 28 °C até seu crescimento e esporulação da colônia para posterior conservação.

Figura 02: Pipetagem de uma alíquota de 10 μ L das suspensões realizadas (A) e escolha da colônia monospórica gerada (B).



Fonte: Aparício, J.F

4.1.3 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos foram armazenados em triplicatas, utilizando duas metodologias diferentes: método de CASTELLANI (1939) e do método do glicerol a 15%, descritas a seguir

4.1.4 MÉTODO DE CASTELLANI (1939)

Neste método, 10 a 15 fragmentos de BDA ($\pm 5\text{mm}$ de diâmetro) contendo micélio foram submersos em frascos de vidro, contendo 20mL de água destilada autoclavada. Os frascos foram vedados e mantidos à temperatura ambiente.

4.1.5 MÉTODO DO GLICEROL A 15%

Nesta metodologia, a solução de esporos foi armazenada e conservada em freezer. A solução foi preparada utilizando 20 mL de glicerina diluída em 80 mL de água destilada. A solução foi posta em um recipiente de vidro, vedada e encaminhada para autoclave por 15 min. Após o resfriamento da solução, pipetou-se 500 μl da mesma em microtubos e 1200 μl de água destilada. Em seguida, foi realizado em triplicata a conservação dos fungos isolados, retirando 30 pequenos pedaços de BDA com micélio, sendo 10 fragmentos em cada microtubo. Os microtubos foram vedados e acondicionados em geladeira.

Figura 03: Preparo da solução de glicerol para a conservação dos isolados.



Fonte: Aparício, J.F

4.1.6 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a identificação dos isolados, realizaram-se observações macroscópicas da colônia (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso) e observações microscópicas das estruturas vegetativas (hifas) por meio de microcultivos. Para este método, retiram-se três pequenas porções de micélio, as quais foram posicionadas com a mesma distância entre si, sobre meio BDA em placa de Petri. A seguir, uma lamínula autoclavada foi depositada e pressionada sobre cada um dos pequenos inoculo. As placas foram vedadas com filmito e submetidas à incubação em estufa B.O.D. a 28 °C, até o início do crescimento e da esporulação do fungo sobre a lamínula. Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente do meio de cultura (com o auxílio de uma pinça autoclavada) e posicionadas sobre uma lâmina de microscopia contendo uma gota de corante lactofenol azul algodão (Sigma). A visualização de microestruturas (vegetativas e reprodutivas) foi realizada utilizando-se a objetiva de 40X (aumento total de 400X).

5.0 PRODUÇÃO DE ENZIMAS: MEIO PARA O CRESCIMENTO FÚNGICO E INDUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o crescimento fúngico e indução da atividade enzimática, foram preparadas duas soluções de Manachinni sólido (meio de cultura), uma contendo o indutor enzimático e outra sem o indutor com a seguinte composição: KH_2PO_4 – 2g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g; Na_2HPO_4 - 0,98 g; Extrato de Levedura-1g; Ágar – 7,5g; Água destilada - 1000 mL; Os reagentes foram diluídos em água destilada e para indução da enzima de interesse do estudo, foi adicionado o substrato carboximetilcelulose – CMC (0,5%). O pH para detecção de celulase foi de 5,0. Após a solução foi levada para autoclave por 15min a 120°C. Percorrido o tempo determinado verteu-se o meio em placas de Petri e estas foram acondicionadas na estufa B.D.O. por 10 dias.

5.1 CRESCIMENTO EM MEIO LIQUIDO

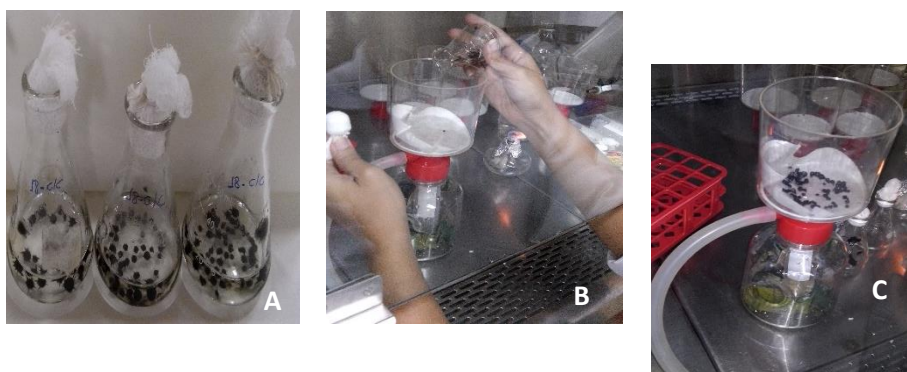
Para produção da celulase os fungos foram cultivados em meio sólido por 10 dias. Após esse período foi feita a suspensão esporica dos mesmos em glicerina e água destilada. Em seguida uma suspensão de 10µl foi adicionada em Herlamayer de 50 ml contendo 20ml do meio liquido: KH_2PO_4 – 2g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g; Na_2HPO_4 - 0,98 g; Extrato de Levedura-1g; Água destilada - 1000 mL; pH 5,0.

Posteriormente foram para Incubadora Shaker SL 222 que foi conduzida a 28°C sob agitação de 140 rpm por 5 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

5.1.1 FILTRAÇÃO A VÁCUO

Depois do período de incubação em meio líquido as amostras foram filtradas em sistemas de filtração a vácuo com membrana milipórica para separação da massa micelial. Obtendo assim 15 ml de extrato enzimático na qual foram consideradas as atividades enzimáticas.

Figura 04: Processo de filtração a vácuo. A – Fungos com o meio de cultura com o indutor enzimático; B e C - Processo de filtração fúngica.



Fonte: Aparício, J.F

6.0 DETERMINAÇÃO DAS ANALISES QUANTITATIVAS

6.1 DETERMINAÇÃO DE FPASE

Para quantificação da atividade da celulase total (FPase), utilizou-se a metodologia descrita por GHOSE (1987), tendo como substrato papel filtro Whatman n°1 de 0,7cm de diâmetro. Foram incubados em termociclador (banho-maria) utilizando placa de PCR, a 50°C por 60 min:

- 20µl de extrato enzimático;
- 1 círculo de papel de filtro Whatman n°1 de 0,7 cm de diâmetro;
- 40µl de tampão citrato de sódio pH 4,8.

Para cada amostra foi preparado um controle de enzima, um controle substrato e um branco conforme descrito a seguir.

Controle de enzima: foi adicionado na placa de PCR:

- 20µl de extrato enzimático;
- 40 µl de tampão citrato de sódio pH 4,8;

Controle de substrato: foi adicionado na placa de PCR:

- 60µl de tampão citrato de sódio pH 4,8;
- 1 círculo de papel de filtro Whatman nº1 de 0,7cm.

Branco: foi adicionado na placa de PCR:

- 60µl de tampão citrato de sódio pH 4,8;

Após o tempo reacional de 50°C por 60 mim. Adicionou-se:

- 120µl de reagente de DNS para todas as amostras e controles.

Logo em seguida foram colocados no termociclador a 50°C por 15 mim, Passado o tempo reacional em microtubulos contendo 720µl de água Milli-Q adicionou-se 80µl das amostras. A leitura dessa solução foi feita em absorbância de 540nm.

6.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE β -GLICOSIDASE

Para quantificação da atividade β -glicosidase utilizou-se o kit glucose Liquicolor em tubos de ensaios. Para as amostras adicionou-se 25µl de celubiose a 1% em tampão de Citrato de sódio com pH 5,0 e 25µl de extrato enzimático.

- **Controle enzimático:** 10µl de água d Milli-Q e 10µl de extrato enzimático
- **Controle Substrato:** 10µl de água d Milli-Q e 10µl de celubiose.

Para o controle padrão adicionou-se 10µl de padrão glicose (STD) em tubos de ensaio para reagir com 1ml de reagente do Kit (RGT). O tempo reacional foi de 30 min em banho maria a 37°C. Percorrido o tempo de 30 min retirou-se 10µl da amostra para cada replica e 10µl dos controles e em seguida adicionou-se em 1mL do reagente

(RGT) e foi colocado em banho maria a 37°C por 5 min. As absorbâncias foram verificadas em espectrofotômetro a 500nm.

6.3 ANÁLISES QUANTITATIVAS CMCase (endoglucanase)

Para determinar a atividade CMCase (endoglucanase) utilizou-se tubo de ensaio onde foram adicionados 450µl de CMC em tampão acetato de sódio a 1% 50 mM, pH 5,0. E 50µl das amostras. Após equilíbrio térmico em banho-maria por 10 min a 50°C, adicionou-se 500µl de DNS e mais 50µl das amostras nos controles totalizando 1mL os mesmos foram levados para o banho fervente por 5 min. Após o tempo reacional foram retirados e colocados em banho gelado nesse processo foi acrescentado 4mL de água destilada. As absorbâncias foram verificadas em espectrofotômetro a 540nm.

7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Isolamento e Purificação de Fungos

Foram encontrados vários tipos de isolados fungicos no total de 450 e 300 isolados de bactérias encontrados nos cupins, *Nasutitermites* sp., tanto nos insetos completos como os fragmentos (cabeça, tórax e abdômen), isto demonstra que o meio de cultura utilizado mostrou-se eficiente em garantir uma grande diversidade de microrganismos, além das condições empregadas para o isolamento como temperatura, pH, entre outros foram favoráveis.

Figura. 05-Fragmentos dos Insetos em meio BDA



Fonte: Aparício, J.F

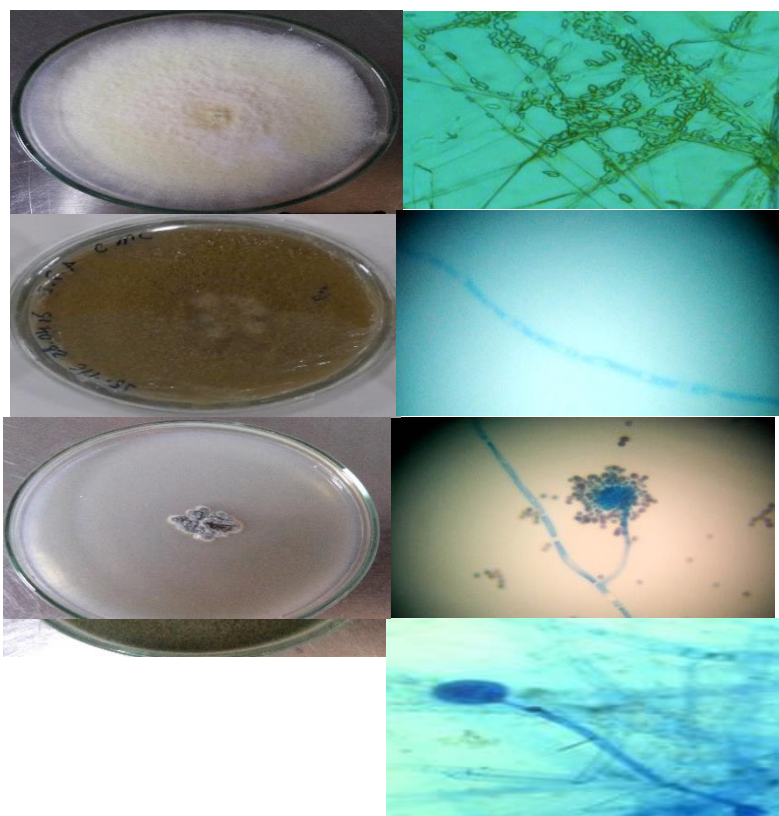
A observação da diversidade fungica foi possível quando analisamos as estruturas macroscópica (crescimento, coloração e textura). Os gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Tricoderma* sp., *Fusarium* sp. e *Xylaria* sp. foram encontrados.

Segundo (VISSER et al., 2009). Ninhos abandonados de *Macrotermitinae* geralmente apresentam os jardins de fungos cobertos por espécie fungicas do gênero *Xylaria* sp. No entanto, no presente trabalho encontramos este microrganismo em um ninho ativo de cupins, e no inseto principalmente se localizando na cabeça do mesmo. Talvez este contribua como um dos fungos simbiotes que facilitará a alimentação do cupim.

7.2 Caracterização Macro e Microscópica dos fungos Isolados

Os fungos foram analisados por meio das características macroscópicas e microscópicas. O aspecto macromorfológico das colônias dos isolados foi examinado a olho nu, com atenção especial ao crescimento micelial, a forma das bordas a presença de pigmento difuso, a textura e a coloração de colônia. O aspecto micromorfológico das estruturas vegetativas e reprodutivas foi examinada sob microscopia de luz, em aumento total de 400X. Observou-se fungos com coloração esverdeadas, amareladas marrom e branca. Alguns com texturas liguenta e alguns esporulentos. Foi notada presença de hifas, de conidióforo sem os conídios, e conídios de forma dispersa (Figura 06).

Figura 06: Aspecto macromorfológico e aspecto micromorfológico dos fungos isolados.



Fonte: Aparício, J.F

7.3 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA

Os isolados estudados dos cupins *Nasutitermites* sp. apresentaram fungos do gênero *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. A presença desses fungos associados aos cupins corrobora estudos anteriores (HENDEE, 1933; ZOBERI, 1993; GRACE 1990; BARBOSA-SILVA et al (in preparação). Esses fungos são capazes de produzir celulases. Em geral, esses fungos celulolíticos produzem um grande número de celulases e muitos as usam para degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal.

A análise qualitativa da atividade da celulase total (FPase) mostrou eficiência nas amostras estudadas como visto (Figura...) os isolados que apresentaram maior atividade foram 40-T/C seguido de 33-INS(S.A).

Em estudos anteriores KHAN et al (2007) utilizaram *Trichoderma* sp. Obtiveram atividade celulósica total de 0,10 UI mL⁻¹ de extrato enzimático.

Os microrganismos estudados obtiveram uma boa produção enzimática quando utilizado o indutor de FPase, no entanto o fungo... não apresentou nenhuma atividade enzimática, mas fato este não diminui a sua produção celulolítica, pois o fungo obteve uma ótima produção com os indutores de CMCase e na B-glucosidase.

Falar sobre o trichoderma....

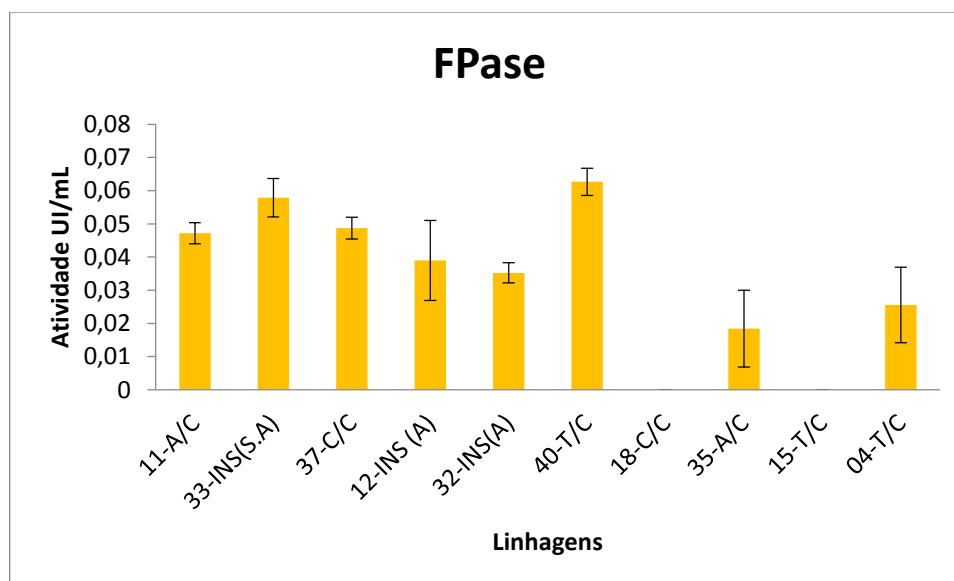


Figura 07 – Produção de FPase dos fungos oriundos dos fragmentos e inseto inteiro dos cupins *Nasutitermites* sp.

Para a produção de β -glicosidase (Figura ..) nem todos os isolados obtiveram uma produção significativa. O isolado 37-C/C, foi o que teve uma maior produção de β -glicosidase, seguido do isolado 40-T/C.

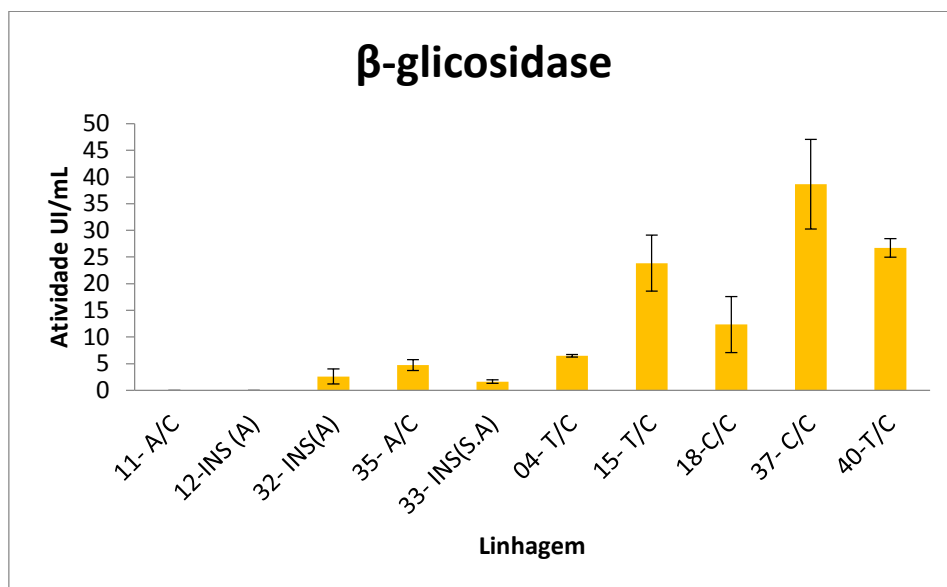


Figura 08 - Produção de β -glucosidade pelos Isolados dos cupins *Nasutitermites* sp.

Para atividade enzimáticas da CMCase os respectivos isolados 12-INS(A) e 11-A/C apresentaram maior atividade enzimática em relação aos demais. A atividade específica da CMCase em relação β -glucosidase mostrou maior produção nos isolados citados que os mesmos não obtiveram resultados significantes quando comparados com a produção enzimática da β -glucosidase.

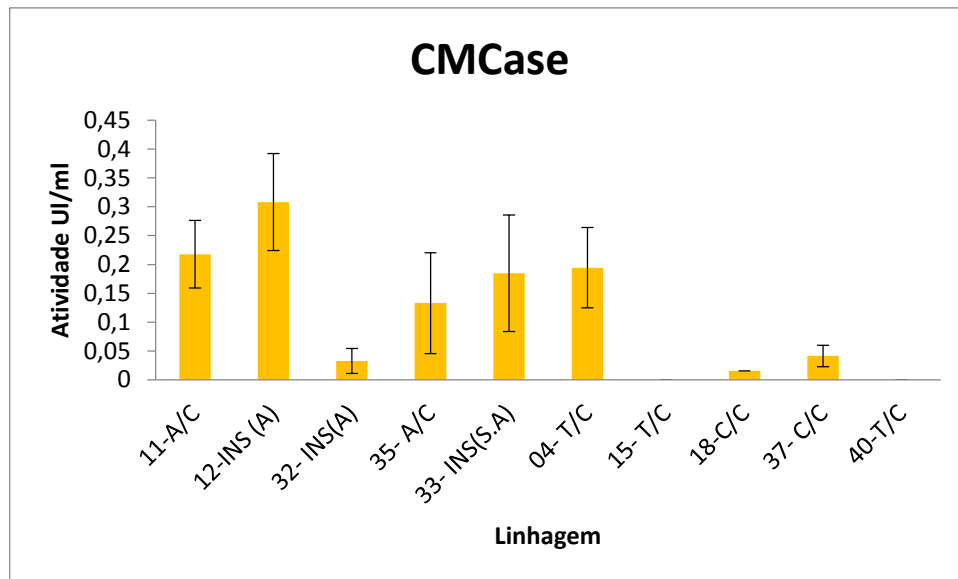


Figura 09 – Produção de CMCase pelos isolados de cupins *Nasutitermites* ssp

Colocar algumas citações de trabalhos com produção de celulasas em microrganismos, pois estes são os seus melhores dados... Seus fungos produziram muito bem, dá para publicar estes dados, mas vc precisa engrandece-los... coloque no final que os fungos encontrados podem ser usados na área da biotecnologia como farmacêutica, de cosméticos e que futuros estudos devem ser realizados para corroborar com as pesquisas nestas áreas. O livro de enzimas em biotecnologia pode te ajudar...

CONCLUSÃO – mudar a conclusão

Com o presente trabalho foi possível perceber a riqueza fúngica associada aos cupins os quais produziram fungos do gênero: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Xylaria* sp., além de outros ainda não identificados. Os mesmos tem sido utilizados como grandes produtores de diferentes substancias de interesse econômico. Enzimas celulíticas desses fungos tem sido estudadas devido seu potencial biotecnológico onde se inclui o uso em alimentos, bebidas, detergentes, na indústria têxtil polpa e papel. Com isso o presente trabalho mostrou eficiência quanto a purificação, o isolamento e identificação dos fungos associados aos cupins *Nasutitermites*. Os resultados enzimáticos foram constatados que os mesmo são capazes de degradar/produzir celulose. É importante destacar que estudos posteriores são indispensáveis para uma compreensão ainda maior das interações estabelecidas entre os cupins e seus fungos associados.

permitindo assim a seleção de linhagens com grande potencial de utilização biotecnológica.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. **Exercícios práticos de Genética**. São Paulo. Editora nacional. 1973.

BERTI FILHO, EVÔNEO, coord. Cupins ou Termitas /coord. Por Evôneo Berti Filho – IPEF/SIF 1993. 56 p.:il

BRIAN, M.V. **Social Insects: ecology and behavioral biology**. Chapman and hall, Lodon, 1983. 362p.

BLACK, H.I.J.; OKWAKOL, M.J.N. agricultura intensificatio, soil biodiversity and agroecosystem function the tropics: the role of térmites. **Applied Soil Ecology**, v. 6, n.1, p.37-53.1997.

BREZNAK, J. A.;BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by térmites. **Anual Review of Entomology**, v, 39, n.1, p.453-487,1994.

CASTELANI, A.. **Viability of mold culture off ungi in destiled water**. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42: 225.1939

CASTRO e SILVA, A. e AGUIAR, I. J. A. 2001. Micromorfologia da Degradação da Madeira da Espécie Amazônica *Hura crepitans* L. Por Fungos Lignolíticos Pertencentes à Classe Hymenomycetes . **Acta Amaz**, 31 (3) : 397 – 418. 66

CASTRO E SILVA, A. **Madeiras da Amazônia: características gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Edição SEBRAE. 2002.

COLLINS, N. M., 1981. The role of termites in the composition of wood and leaf litter in the Southern Guinea Savana of Nigeria. **Oecologia**, **51**: 389-99

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

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins(Insecta:Isoptra) que ocorrem no brasil. **Papaeis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v40, n.25, 387-448, 1999.

CONSTANTINO, R.. **Notes on the type-species and synonymy of the genus *Nasutitermites*** (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology* 40(2): 533-538.2002.

CONSTANTINO, R.2010.
[HTTP; //www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.html](http://www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.html)

EDWARDS, R; A. E. MILL. Termites in buildings : their biology and control. **Rentokil Limited**: England, 1986. 261p.

ENGEL, M.S., GRIMALDI. A., KRISHNA, K..Termites (Isoptera): Their Phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American museum novitates*, 3650:1-27

FONTES, L.R.; BERTI-FILHO, E. (Eds.) **Cupins – O desafio do conhecimento**. Piracicaba: FEALQ, 1998.

GRASSÉ, P.P.. Ordre des Isoptères ou termites. In: GRASSÉ, P.P. **Traité de Zoologie**. Masson, Paris, v.9 p.408-544,1949.

HENDEE, E. C. The association of the termite *Kaloterms minor*, *Reticulitermes hesperus* and *Zootermopsis angusticollis* with fungi. **University of California Publications in Zoology**, v. 39, p. 111-134. 1933.

HIGASHI, M; ABE, T. Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: ABE, T.; LEVIN S.A; HIGASHI, M. (eds). **Biodeversity-an ecological perspective**. Springer- verlag 1997. 1997p. 83-112.

HIMMEL. M. E.; RUTH, M. F. E WYMANS, S. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass.1999.

KIRK, T. K. ; FARREL, R, L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. **Ann. Rev. Microb**, 41: 465-505.

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.

LEE, K E.; WOOD, T.G. **Termites and Soils.** London (Academic Press). 1997. 251 p.

LEPONCE, M.; ROISIN, Y.; PASTEELS , J. M. Community interactions between ants and arboreal- nesting termites in New Guinea coconut plantations. **Insects Sociales**, v.46,n2, p.126-130.1999.

LIMA, J.T.; COSTA-LEONARDO, A.M. 2007. Recursos Alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotr.**, 7(3): 4-11.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G., PARINI, C.. **Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus Stolonifer*.** *Biotechnol. Lett.*, 9(3): 249-224 p. 1987.

MARTIN, M.M e MARTIM, J.S.. **The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite *Macrotermes natalensis*.** *Physiol. Zool.* 52(1): 11-21.1979

MELO FILHO, R. DE M. 1996. Controle químico do cupim *Nasutitermes* (Dudley, 1890) (Isoptera: Termitidae), em cana-de-açúcar, nos Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte. Tese de mestrado, UFRPE, Recife, 100 p.

MOORE, B.P. Biochemical studies in termites., in: KRISHNA, K; WEESNER, F.M. (eds). **Biology of termites.** Academic Press, New York, 1969.

MORETTI, M.M.S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferulil esterase para bioconservação de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis.** Rio Claro: 2010.

SANDS, W. A. The association of termites and fungi. In: KRISHNA, K; WEESNER, F.M. (eds). **Biology of termites.** Academic Press, New York, 1969.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T.; LEPAGE, E. S. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. (Coord.). **Manual de preservação de madeiras.** São Paulo: IPT, I: 99-278, 1976.

PIZANO, M.A., N. MACEDO, P.S.M. BOTELHO. 1990. Racionalização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. *Alcool & Açúcar* 53: 26-27.

RODRIGUEZ-DIAZ, M.; RODELES-GONZALES, B.; POZO-CLEMENTE, C.; MARTINEZ- TOLEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J.. A review on the taxonomy

and possible screening of traits of plant growth promoting rhizobacteria, p. 55– 80. In I. Ahmad, J. Pichtel, and S. Hayat (ed.), Plant bacteria interactions, strategies and techniques to promote plant growth. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2008.

TAYASU, I. et al. The xylophagous termite depending on atmospheric nitrogen **Naturwissenschaften**, v.81,n.5,p. 229-231. 1994.

VISSER A.A. et al. Levels of specificity of *Xylaria* species associated with fungus-growing termites: a phylogenetic approach. **Molecular Ecology**, v.18, p553-567. 2009.

WOOD, T.G. Food and feeding habits of termites. In: BRIAN, M.V. **Production Ecology Of Ants And Termites Cambridge University Press. 1978. p. 55-80.**

WOOD, T.G. e THOMAS, R.J.. **The mutualistic association between Macrotermitinae and Termitomyces. In Insect-fungus interactions** (N. Wilding, n.m. Collins, P.M. Hammond e J.F. Webber, eds.). Academic PRESS, London, p. 69-92. 1989)

ZOBERI, M,H; GRACE, J. K. Fungi associated with the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* in Ontario. **Mycology**, v82, n.3, p. 289-294. 1990.