

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

**LEVANTAMENTO DOS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A
CUPINS *Nasutitermites* sp. E O SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

Bolsista: Josicléa Fernandes Aparício, CNPq

Orientadora: Dra. Adriana Dantas Gonzaga

COARI - AMAZONAS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0001/2013

**LEVANTAMENTO DOS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A
CUPINS *Nasutitermites* sp. E O SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

Bolsista: Josicléa Fernandes Aparício, CNPq

Orientador: Dra. Adriana Dantas Gonzaga

COARI - AMAZONAS

2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao grupo de pesquisa “Microrganismos Associados a Insetos Sociais na Amazonia” e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, Grupo de Pesquisa “Microrganismos Associados a Insetos Sociais na Amazonia”.

Ficha Catalográfica

Aparício, Josicléa Fernandes

Levantamento dos microrganismos associados a cupins *Nasutitermites* sp. e o seu potencial biotecnológico

29 p.

Relatório Final apresentado à Universidade Federal do Amazonas. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Dra. Adriana Dantas gonzaga

RESUMO

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. A explicação para essa extraordinária abundância advém da existência da simbiose com microrganismos, além de uma organização social bastante desenvolvida (Costa-Leonardo, 2002). Embora os cupins sejam mais conhecidos como pragas e causarem prejuízos expressivos, principalmente nos centros urbanos, apresenta uma enorme importância ecológica. Geralmente os cupins são consumidores de madeira, material orgânico, em vários estágios de decomposição, líquens e até mesmo material orgânico presente no solo. Ultimamente sabe-se que esses simbiossantes agem bem sobre a celulose. Porém pouco ou praticamente nada se conhece sobre as enzimas que atuam sobre a molécula de lignina. Os experimentos foram realizados na UFAM, Campus do Instituto de Saúde e Biotecnologia ISB/Coari, AM. Os cupins *Nasutitermites* sp. foram coletados e conduzidos para o laboratório de Microbiologia do ISB, onde foi realizado o isolamento dos microrganismos. Os insetos foram divididos em cabeça, tórax e abdômen e também os insetos completos com todas as suas estruturas. Os isolados foram conservados por meio do método de Castelani e do glicerol a 15%, onde a solução de esporos foi armazenada e conservada no freezer. Não foi possível a identificação dos fungos através das análises macroscópicas e microscópicas, com isso houve necessidade de se fazer uma análise molecular realizando a extração de DNA e a amplificação dos fragmentos ITS do rDNA dos isolados, de forma a permitir uma posterior etapa de sequenciamento e possível identificação dos gêneros dos isolados obtidos neste trabalho. Teste de produção enzimática destes isolados foi realizado, acrescentando ao meio de cultura, Carboximetilcelulose (CMC) para testar a produção de enzima celulase pelos isolados. Os resultados não apresentaram efeitos positivos para a produção de celulase, pois isolados não exibiram halos suficiente para produção da enzima. Sendo assim a utilização de outras metodologias se faz necessária para que se possa obter resultados satisfatórios não só para celulase como também para a pectinase e protease que também são de grande interesse industrial.

Palavras-chaves: cupim, celulase, lignina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** primeiramente, pois “Tudo posso Naquele que me Fortalece” e que a cada dia me proporciona desfrutar o Dom da VIDA.

A Professora **Dra. Adriana Dantas Gonzaga**, pela oportunidade, confiança e orientação a mim concedida.

A minha família que amo muito e é o meu alicerce. Nas pessoas de minha mãe **Maria do Socorro**, meu pai **João Aparício (In memória)**, pelo esforço que fazem para me manterem aqui, a minha irmã **Jhuly** pela força concedida, aos meus irmãos **Pedro e Jakson** que me apóiam e incentivam a minha sobrinha **Letícia** que é o amor da minha vida e que me ensina muito.

A **Diana Nepomuceno** e a equipe na pessoa de: **Alline Rufino e Thais Toscano** e pelo auxílio nas atividades do projeto.

Aos grandes amigos de graduação: **José Deney, Denivaldo Cordeiro, Fabricie Karoline, Keith Santana, Maria Ducirene (In memória), Marcos Zurra, Mayana Pardo, Maria Cristhiane, Wiliam lirae Diana Silva**, pela amizade verdadeira e por estarem comigo nos momentos mais difíceis.

E a todos que me ajudam para execução deste projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Fragmentos do inseto em Meio BDA-----	18
Figura 02	Fungos produzido pelos fragmento do inseto e pelo inseto inteiro-----	19
Figura 03	Conservados no Glicerol a 15%-----	19
Figua 04	Conservados no método de Castellani-----	19
Figura 05	Revelação do gel de agarose – TAE 1% da quantificação das amostras de DNA-----	20
Figura 06	Bandas não amplificadas das regioes ITS do rDNA dos isolados fungicos associados a cupins Nasutitermes-----	21

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO -----	11
1. REFERENCIAL TEORICO -----	12
1.1 CELULASE-----	13
2. JUSTIFICATIVA -----	14
3. OBJETIVOS -----	15
3.1 OBJETIVO GERAL -----	15
3.2 Objetivos específicos -----	15
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	15
4.1 COLETA DOS INSETOS -----	15
4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS -----	15
4.3 OBTENÇÃO DE COLÔNIAS MONOSPÓRICAS -----	16
4.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS -----	16
4.5 MÉTODO DE CASTELLANI (1939) -----	16
4.6 MÉTODO DO GLICEROL A 15%-----	17
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS -----	17
4.8 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS-----	17
4.9 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS REGIOES DO RDNA-----	18
4.10 PRODUÇÃO DE ENZIMAS: MEIO PARA O CRESCIMENTO FÚNGICO E INDUÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA -----	19
4.11 CONDIÇÕES DE CULTIVO -----	19
4.12 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA-----	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	20
5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS -----	20
5.2 ARMAZENAMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS -----	21
5.3 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS ISOLADOS-----	22
5.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO RDNA -----	22

5.5 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA-----	23
CONCLUSÃO-----	25
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA-----	26
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES-----	29

INTRODUÇÃO

Os insetos são os organismos de maior sucesso sobre a Terra, em parte, por causa da capacidade de se alimentar de uma ampla variedade de dietas (MIYAZAWA et al., 2003). Muitas dessas dietas apresentam deficiências nutricionais que, em parte, podem ser supridas por microrganismos (TAMAS et al., 2002). Assim, os microrganismos durante milhões de anos de evolução influenciaram o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos, quer servindo de alimento, quer fornecendo vias metabólicas novas; os insetos, por sua vez, permitiram a disseminação desses microrganismos (BERNBAUM, 1988; WERNEGREN, 2004; SCHULTZ et al., 2005).

O termo simbiose foi utilizado pela primeira vez por ANTON BARY, em 1879, para definir uma associação íntima entre organismos de diferentes espécies, normalmente entre um hospedeiro e um microrganismo. Apesar de a simbiose representar todas as relações do parasitismo até o mutualismo, o termo é normalmente utilizado para relações onde há benefício mútuo. Muitos microrganismos estão envolvidos no processamento alimentar dos insetos. Por exemplo, insetos que se alimentam de dietas de difícil digestão por causa da presença de moléculas complexas (BREZNAK e BRUNE, 1994; CAZEMIER et al., 2003), dietas com deficiências nutricionais, como o floema, deficiente em lipídios e aminoácidos essenciais, e sangue, pobre em várias vitaminas do complexo B (RAINEY et al., 1995; BYRNE et al., 2003).

Outros microrganismos são necessários para desintoxicação do material vegetal e mesmo na defesa do inseto contra invasões de patógenos e ataque de parasitoides. Os microrganismos podem estar presentes tanto interna como externamente ou manter ou não uma relação complexa com o hospedeiro, mas a maioria das relações ecológicas entre microrganismos e insetos é construtiva (CAZEMIER et al., 2003).

As relações simbióticas nutricionais em várias ordens de insetos desenvolveram-se independentemente com diferentes tipos de microrganismos. Alguns grupos de insetos desenvolveram sistemas de cultivo onde o simbionte fúngico é mantido externamente servindo de alimento para o inseto (ectossimbiose). Outros grupos mantêm relação

mais intimas carregando os simbiossomas internamente (endossimbiose); esses simbiossomas podem ainda estar presentes no lúmen do intestino na forma livre, os extracelulares, ou dentro de células especializadas, os intracelulares (WERNEGREN, 2004).

1. REFERENCIAL TEÓRICO

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 poucos seres vivos são capazes de metabolizar (HIGASHI e ABE 1997).

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. *Nasutitermes* é o gênero de cupins com maior número de espécies do mundo, apresentando maior diversidade em região neotropical (CONSTANTINO, 1999), além de representar o táxon com maior número de espécies construtoras de ninhos conspicuos. São essencialmente xilófagos e forrageia sob o solo à procura de madeira morta, preferencialmente seca e em decomposição (MARTINUS, 1994).

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. O estudo dessas interações tem despertado interesse de diversos pesquisadores (COOK; SCOTT, 1993; HUNGATE, 1940; SANDS, 1969). 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 ingerido é então depositado como fezes nos favos de fungos (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).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas; apenas alguns, são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural.

1.1 CELULASE

A celulose maior carboidrato sintetizado pelos vegetais, é um polissacarídeo formado por resíduos de β -D-glicose unidos entre si por ligações β -1,4 e que mantem uma estrutura linear e plana sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D-glicopiranosil-D-glucopiranosose, a unidade repetitiva do polímero (BAYER e LAMED, 1992). É um polímero muito rígido, em cuja estrutura podem ser encontrada cerca de 4.000-8.000 moléculas de glicose conectadas (ARISTIDOU e PENTTILÄ, 2000).

A hidrólise da celulose por celulasas resulta na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (THIEMANN et al. 1980).

Os cupins, no entanto, não produzem a celulase. Em vez disso, dependem de microrganismos que vivem em uma parte de seu sistema digestivo chamada de intestino posterior. Esses organismos incluem as bactérias e os protozoários. Eles mantêm uma relação simbiótica com os cupins, já que nem os cupins nem os microrganismos conseguiriam viver um sem o outro. Os tipos de organismos encontrados no intestino posterior ajudam a dividir os cupins em duas categorias. Os cupins superiores possuem somente bactérias, sem a presença de protozoários, ao passo que os cupins inferiores possuem tanto bactérias quanto protozoários. Também é possível classificar os cupins usando suas habitações. Os subterrâneos constroem grandes ninhos no subsolo, ao passo que vários cupins primitivos formam colônias na própria madeira que consomem. (MEDEIROS.M.B;2004). Alguns estudos descrevem dois tipos de celulasas detectadas na digestão dos térmitas, uma secretada pela glândula salivar e a outra sintetizada pelo protozoário intestinal. Estabeleceu-se, significativamente uma relação entre a diferenciação

ultra estrutural e a função de absorção de nutrientes no epitélio do proctodeum, à ingestão seletiva de partículas de celulose por protozoários, a contribuição da fauna de protozoário intestinal e uma infecção oportuna deles. Um outro fator é a presença de bactérias que provêm condições boas para intestinais (TONADA e KAYA, 1994). As celulasas são enzimas também encontradas em certas bactérias e outros agentes presentes na decomposição da madeira.

Segundo SCHULTZ et.al 1986 os cupins superiores parecem possuir o conjunto completo de enzimas necessárias para digestão de celulose nativa, embora o envolvimento de bactérias simbiotes na digestão de celulose não possa ser desconsiderado.

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 simbiotes agem bem sobre a celulose, porem pouco praticamente nada se conhece sobre as enzimas que atuam sobre a molecula de lignina, cuja digestao feita atraves de bacterias e apoiada pela ação de micelios de basidiomicetos e ascomicetos e, certamente, tambem por protozoarios flagelados que se alimentam de ligninana.

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.

3.1.1 Objetivos Específicos

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

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

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DOS INSETOS

Os cupins *Nasutitermites* sp. foram coletados com o auxílio de pinças e placas de Petri, nos meses de maio e junho de 2013, 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.

4.2 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 os referido meio de cultura BDA.

4.3 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 serve 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 feita uma raspagem de leve nos isolados e postos nos microtubos, foi homogeneizado em agitador vortex (Phoenix). Para determinar a concentração de células da suspensão preparada, utilizou-se Câmara de Neubauer, na qual de forma microscópica torna possível a contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. Foi feito 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.

4.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

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

4.5 MÉTODO DE CASTELLANI (1939)

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

4.6 MÉTODO DO GLICEROL A 15%

Nesta metodologia, solução de esporos é 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 500µl da mesma em microtubos e 1200µl 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.

4.7 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 são posicionadas com a mesma distância entre si, sobre meio BDA em placa de Petri. A seguir, uma lamínula autoclavada é depositada e pressionada sobre cada um dos pequenos inóculos.

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).

4.8 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Os isolados foram cultivados em tubos tipo Falcon, contendo 20mL de meio Batata-Dextrose (BD) autoclavado (2% dextrose (p/v); q.s.p. 1000 mL de caldo de cozimento de batata inglesa) durante 3 dias, mantida em estufa B.O.D. a 28 °C. Após esse período, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo e lavado por três vezes com água destilada autoclavada. O micélio foi armazenado a -20 °C até o momento da extração de ácidos nucleicos. A massa micelial foi triturada em cadinho de porcelana

com 1mL de tampão de extração (8mL de Tris HCl 1M; 2mL de EDTA 0,5M ; 4mL SDS 10%; 2mL NaCl 5M; 24mL de água destilada autoclavada); A massa pastosa proveniente da trituração foi transferida para microtubos de 2mL, incubou-se em banho seco a 60 °C por 1h e 15min, e após foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios, adicionando-se em seguida, 500µL de fenol equilibrado. Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofane (fenol:clorofórmio, 1:1). Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação. Coletou-se novamente o sobrenadante, transferindo-o para novos microtubos, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1). Agitou-se suavemente, centrifugou-se, coletou-se o sobrenadante, transferindo-o novamente para um novo microtubo, ao qual adicionou-se 50µL de NaCl 3M e 700µL de álcool etílico absoluto a -20°C. Inverteu-se o tubo várias vezes, até a observação da precipitação dos ácidos nucléicos. Centrifugou-se o tubo mais uma vez, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Ao pellet, adicionou-se 500µL de álcool etílico a 70%, descartando-o em seguida. Adicionou-se álcool etílico absoluto (-20°C), descartando-o em seguida. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente, durante aproximadamente 1h. Ao pellet, foram adicionados 200µL de tampão TE (10mM Tris HCl; 1mM EDTA). Os tubos foram agitados para solubilização dos ácidos nucléicos e em seguida, transferidos para a geladeira (4°C), onde foram mantidos até a quantificação do DNA. O DNA foi quantificado em gel de agarose-TAE (1%) corado com brometo de etídeo juntamente com o marcador de 50pb (LGC), o qual apresenta bandas expressando quantidades específicas de DNA. O gel foi submetido a uma corrente 12 de 100V e após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador UV, sendo o gel fotodocumentado. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 50ng/µL e 100ng/µL utilizadas nas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação dos fragmentos de ITS do rDNA.

4.9 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS REGIOES DO rDNA

A amplificação do ITS1-5.8S-ITS2 rDNA foi realizada por meio da técnica de PCR (FUNGARO, 1998), onde foram utilizados os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As reações apresentaram um volume final de 50µL (40ng de DNA molde; 0,4M de cada

primer; 0,2mM de cada dNTP; 7,4mM de MgCl₂; 2U da enzima Taq DNA polimerase e 1X tampão da enzima). O volume foi completado com água ultrapura autoclavada e em todas as reações, foi utilizado um controle negativo com água, em substituição ao DNA molde. Os microtubos (volume total de 0,2mL) foram submetidos ao termociclador (Applied Biosystems), em uma sequência composta pelas seguintes etapas: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos), seguida de 25 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94°C durante 30 segundos), uma etapa de anelamento (55°C durante 30 segundos) e uma etapa de extensão (72°C durante 30 segundos), seguida de uma etapa final de 72°C durante 7 minutos e por fim, 4°C overnight. Após a reação de PCR, 5µL da reação foram aplicados em gel de agarose-TAE (1,2%) corado com brometo de etídeo, tendo como marcador, o *ladder* 1Kb (LGC). Após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado. Os fragmentos de ITS obtidos na amplificação foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR Purification (Qiagen).

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

Para o crescimento fúngico e indução da atividade enzimática, será utilizada a meio de cultura contendo Carboximetilcelulose (CMC). O meio de cultura mínimo sólido CMC foi preparado com a seguinte composição: KCO₂ – 3,75 g; NaNO₂- 4,5 g; CMC-7,5g; MgSO₄.7H₂O – 0,375 g; -Ágar – 11,25 g; ZnSO₄- 0,0075g; Água destilada - 750 mL; KH₂PO₄ – 1,125g; FeSO₄.

Para o preparo do meio, os reagentes foram diluídos em água destilada e para indução da enzima de interesse do estudo, foi adicionado o substrato carboximetilcelulose – CMC. O pH para detecção de celulase foi de 5,0. Após a solução foi levada para autoclave por 15min a 120°C. Decorrido o tempo determinado verteu o meio em placas de Petri e estas foram acondicionadas na geladeira.

4.11 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados de acordo com a técnica descrita por Hankin and Anagnostakis (1975), na qual se retira três discos de BDA com micélio, de cerca de 10mm, e transfere para uma placa com meio de cultura contendo CMC de forma que cada disco fique equidistante. O diâmetro do halo de degradação enzimático e do crescimento micelial são medidos e comparados.

4.12 DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA QUALITATIVA

Decorrido o período de incubação, a superfície do ágar foi borrifada com solução reveladora, para a determinação da atividade enzimática. A solução reveladora utilizada foi a solução de vermelho Congo a 0,1 % (celulases). Após 15 minutos, a solução reveladora foi descartada, e uma solução de NaCl foi adicionada sobre a superfície do ágar, para descoloração e assim visualização de formação de halos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS

Os 11 isolados de fungos associados a cupins *Nasutitermes* sp., são fungos considerados morfológicamente diferentes. Foram retirados de diferentes partes dos cupins (cabeça, tórax e abdomen) e do inseto inteiro, para esta visualização foi realizada a purificação das colônias, através de um único conídio (colônia monospórica). Este tratamento apresentou eficiência para o isolamento dos fungos. As condições empregadas para o isolamento tais como: meio de cultura, temperatura, pH, entre outros, foram favoráveis igualmente para todos os microrganismos. Os isolados foram conservados, conforme mostra a Figura 01.

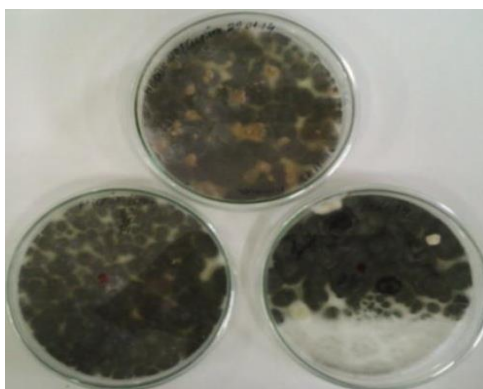
Figura. 01- Fragmento dos Insetos



FONTE: NEPOMUCENO, D.R 2014

Contudo, considera-se que, embora a eficiência de isolamento dos fungos tiver sido elevada, o mesmo não se aplica à diversidade, que foi considerada baixa ao analisar as culturas de forma macroscópica (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso).

Figura. 02- Fungos oriundos dos fragmentos do Inseto e pelo inseto inteiro



FONTE: NEPOMUCENO, D.R 2014

5.2 ARMAZENAMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS

Os isolados obtidos foram armazenados pelo método glicerol a 15% e de Castellani (CASTELLANI, 1939), conforme mencionado na parte metodológica.

Figura.03- Glicerol a 15%



FONTE: NEPOMUCENO, D.R 2014

Figura .04- Método de Catellani



FONTE: NEPOMUCENO, D.R 2014

5.3 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, à forma das bordas, à presença de pigmento difuso, à textura e à coloração da colônia. O aspecto micromorfológico das estruturas vegetativas e reprodutivas foi examinada sob microscopia de luz, em aumento total de 400X.

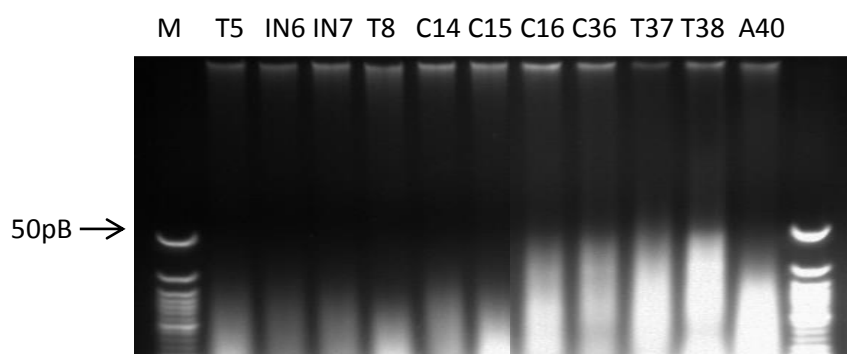
Observou-se fungos com coloração esverdeadas, amareladas, marrom e branca. Alguns com texturas liguenta e alguns esporulentos.

5.4 Extração de Ácidos Nucléicos e Amplificação da Região ITS do rDNA

A extração dos ácidos nucleicos dos fungos isolados do cupim permitiu a obtenção de quantidades variáveis de DNA total das amostras com bandas visíveis em gel de agarose-TAE 1%. As amostras apresentaram bandas visíveis, a quantidade de DNA variou entre 50 a 100 ng/μL.

Todos os isolados apresentaram DNA quantificável nas condições empregadas, tendo sido utilizados nas reações de amplificação, diretamente, sem procedimentos de diluição para ajuste de concentração, a qual foi utilizada para que todas as amostras atinjam a concentração de 20ng/μL de DNA total.

Figura.05- Revelação do Gel de Agarose-TAE 1% da quantificação das Amostras de DNA

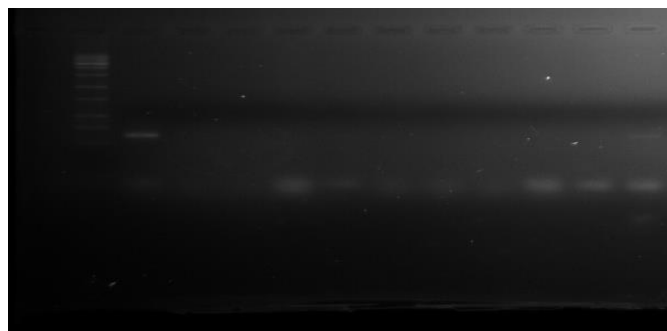


FONTE: NEPOMUCENO, D.R 2014

IN-Inseto; T-Torax; C-Cabeça; A-Abdomem

Após a quantificação, as amostras foram submetidas à PCR. Em seguida as reações, das amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose-TAE 1,2% (Figura 06) corado com brometo de etídeo. Os isolados não foram amplificados, ou seja, as bandas das amostras de DNA observáveis no gel de quantificação não amplificaram.

Figura.06-Bandas não amplificadas das regiões ITS do rDNA dos isolados fúngicos associados a cupins



FONTE: NEPOMUCENO, D.R 2014

5.5 Determinação enzimática

Os resultados positivos são identificados pela formação de halos translúcidos em volta de cada disco. Sendo assim os Os resultados das reações enzimáticas não foram positivos para os isolados dos cupins *Nasutitermes* sp., pois os mesmos não formaram halo translúcido, em volta dos discos, para produção da enzima celulase, conforme visualizado na Tabela 01. Houve apenas crescimento de micélio.

Tabela 01 - Diâmetro do crescimento micelial e do halo (mm), dos fungos isolados, cultivado em meio de cultura Carboximetilcelulase (CMC).

ISOLADO	DIÂMETRO DA COLÔNIA	MÉDIA	DIÂMETRO DO HALO	MÉDIA
J5	11x14/17x14/12x11			
	12.5+15.5+11.5=39.5÷3	13.16 mm	-----	-----
J6	14x24/13x17/18x9			
	19+15+13.5=47.5÷3	15.8 mm	-----	-----
J7	24x26/22x23/27x25			

	$25+22.5+26=73.5\div3$	24.5 mm	-----	-----
J8	19x13/22x23/28x25			
	$16+22.5+26.5=65\div3$	21.66 mm	-----	-----
J14	24x23/25x24/20x27			
	$23.5+24.5+23.5=71.5\div3$	23.83 mm	-----	-----
J15	27x21/27x36/35x21			
	$24+31.5+28=83.5\div3$	27.83 mm	-----	-----
J16	22x18/30x15/18x19			
	$15+22.5+18.5=56\div3$	18.66 mm	-----	-----
J36	22x27/24x22/29x27			
	$24.5+23+28=75.5\div3$	25.16 mm	-----	-----
J37	20x20/23x22/25x22			
	$20+22.5+23.5=66\div3$	22 mm	-----	-----
J38	23x30/27x25/22x32			
	$26.5+26+27=79.5\div3$	26.5 mm	-----	-----
J40	10x15/16x13/16x17			
	$25+29+33=87\div3$	29 mm	-----	-----

CONCLUSÃO

Com presente trabalho foi possível realizar o isolamento, a purificação, dos fungos associados aos cupins nasutitermes, entretanto não houve resultados satisfatório quanto a identificação e a realização dos testes enzimáticos para celulase. Sendo assim a utilização de outras metodologias se faz necessária para que se possa obter resultados satisfatórios não só para celulase como também para a pectinase e protease que também são de grande interesse industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BIRNBAUM, R. **How colleges work: The cybernetics of academic organizations and leadership**. San Francisco: Jossey-Bass. (1988).

BREZNAK J.A., BRUNE A.. **Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termite**. *Annu. Rev. Entomol* 39, 453–487. 1994

BYRNE, S., TROWER, P., BIRCHWOOD, M., et al. . **Command hallucinations: cognitive theory, therapy and research**. *Journal of Cognitive Psychotherapy: An International Quarterly*, 17, 67– 84. 2003

CASTELANI, A.. **Viability of mold culture of fungi in distilled water**. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42: 225. 1939

CAZEMIER, A. E., VERDOES, J. C., REUBSAET, F. A. G., HACKSTEIN, J. H. P., VAN DER DRIFT, C. & OP DEN CAMP, H. J. M.. **Promicromonospora pachnodae sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata***. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 135–148. 2003

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)

DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L.. **The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides**. *J. Suci. Food Agric.*, 4: 149-155 p. 1953

ENGEL, M. S., GRIMALDI, D. A., KRISHNA, K.. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American museum novitates*, 3650: 1-27. 2009

HIGASHI, M., ABE, T.. **Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality.** P 3-112 in *Biodiversity An Ecological perspectives* (Abe, T., Levin, S.A., Higashi, M. eds). Springer-Verlag New. 1997

I., KLASSON, L., CANBACK, K., NASLUND, A. K., ERIKSSON, A., WERNEGREN, J. SANDSTROM, J., MORAN, N., ANDERSSON, S. G.. **50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria.** *Science*, vol. 296 no. 5577 2376-2379 pp. 2002

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 MARTIN, J.S.. **The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite *Macrotermes natalensis*.** *Physiol. Zool.* 52(1):11-21. 1979

MIYAZAWA, M., C. YAMAFUJI, J. TABATA AND Y. ISHIKAWA. **Oviposition-stimulatory activity against *Ostrinia zealis* by essential oil of root part from *Cirsium japonicum* DC.** 2003

MIYAZAWA, M., J. ANZAI, J. FUJIOKA AND Y. ISHIKAWA **Insecticidal compounds against *Drosophila melanogaster* from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.** *Nat. Prod. Res.* 17: 337-339. 2003

ORBERG, P.K.. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*.** Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon 1981.

RAINEY, F. A., WARD-RAINEY, N., KROPPESTEDT, R. M., STACKEBRANDT, E.. **The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov,** *Int J Syst Bacteriol* 46, 1088±1092. 1996

ROBSON, L.M. e CHAMBLISS, G.H.. **Cellulases of bacterial origin.** *Enzyme and Microbial Technology* 11:626-644 1989

SCHULTZ, R.T., WIN, L., JACKOWSKI, A., KLIN, A., STAIB, L., PAPADEMETRIS, X., BABITZ, T., CARTER, E., KLAIMAN, C., FEILER, A., VOLKMAR, F.. **Brain**

morphology in autism spectrum disorders: an MRI study. Paper presented at annual International Meeting for Autism Research, Boston, MA, May. 2005

SOUZA, D.J.; DELLA LUCIA, T. M. C.; ERRARD, C.; RICHARD, F-J.; LIMA, E. R.. **Behavioural and chemical studies of discrimination processes in the leaf-cutting ant *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* (Forel, 1908).** *Braz. j. boil.*, 66(3): 863-871. 2006

THIEMANN, J.E., XAVIER, M.S.S.P., COLEN, G. e GUIA, M.M.. **Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos.** In **Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo** (J.S. Furtado, coord.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185. 1980

WERNEGREN J.J., AND D.J. FUNK.. **Mutation exposed: A neutral explanation for extreme base composition of an endosymbiont genome.** *Journal of Molecular Evolution* 59(6):849-858. 2004

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J, **Amplificação e seqüenciamento de genes de fungos ribossomal RNA para filogenética.** In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322. Academic Press, San Diego. 1990.

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

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2012	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2013	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	Coleta dos cupinzeiros	R	R	R									
3	Isolamento, identificação dos microrganismos presentes nos cupins		R	R	R								
4	Reativação, crescimento e conservação dos isolados				R	R	R						
5	Extração de DNA e Reação de PCR					R	R	R					
6	Sequenciamento do DNA dos microrganismos presentes nos cupins						R	R	R				
7	Ensaio enzimáticos celulase e pectinase							R	R	R	R	R	
8	Publicação dos resultados											R	
9	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												R

R= Realizado

