

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

ENZIMAS E BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DO TRATO DIGESTIVO DE  
LARVAS DE *Stenochironomus* (Diptera:Chironomidae)

Ricardo Koroiva

São Carlos, 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**ENZIMAS E BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DO TRATO**  
**DIGESTIVO DE LARVAS DE *Stenochironomus* (Diptera:Chironomidae)**

Ricardo Koroiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alaide Aparecida Fonseca Gessner

Co-orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Agência financiadora: CAPES

São Carlos  
Fevereiro, 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

K84eb

Koroiva, Ricardo.

Enzimas e bactérias lignocelulolíticas do trato digestivo de larvas de *Stenochironomus* (Diptera:Chironomidae) / Ricardo Koroiva. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
54 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Inseto aquático. 2. Larvas saproxílicas. 3. Bactérias cultiváveis. 4. Enzimas digestivas. I. Título.

CDD: 595.7092 (20ª)

**Ricardo Koroiva**

**ENZIMAS E BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DO TRATO DIGESTIVO  
DE LARVAS DE *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**Aprovada em 28 de fevereiro de 2011**

**BANCA EXAMINADORA**

Presidente



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Alaíde Ap. Fonseca Gessner  
(Orientadora)

1º Examinador



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
PPGBiotec/UFSCar

2º Examinador



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UNIFAL/Alfenas-MG

Dedico esta dissertação a todas as larvas  
de *Stenochironomus* e aos demais insetos  
aquáticos que tiveram suas vidas  
interrompidas para que fosse possível a  
realização dos meus trabalhos

*“Fracassos? Não sei do que falas, em cada experiência descubro um dos motivos pelo qual a lâmpada não funciona. Agora sei mais de mil maneiras de como não fazer a lâmpada.”*

Thomas Alva Edison (1847-1931)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora doutora Alaíde Aparecida Fonseca Gessner, por esses 6 anos de companheirismo, respeito e orientação, além de acreditar e confiar em mim e no meu trabalho em todo esse tempo, fidedignamente. O meu muito obrigado por tudo professora!

Ao professor doutor Clovis Wesley Oliveira de Souza, pela co-orientação, pela amizade e pelo apoio na realização deste trabalho. Creio que estes dois anos de trabalho seja apenas o começo....

Aos profissionais do Laboratório de Entomologia Aquática da UFSCar: Profa. Dra. Susana Trivinho Strixino, Prof. Dr. Marcel Okamoto Tanaka, Dra. Márcia Suriano, Ms. Márcia Cristina, Ms. Fábio Laurindo, Dr. Juliano Corbi, Dr. Mateus Pepinelli, Carol, Barbara e Fabio Villaverde pelos conhecimentos compartilhados, auxílios e pelas risadas nesses anos. Aos integrantes da “salinha” dos pós graduandos do laboratório: Chicão “não-mordo”, Daniel “ahn?²”, Roger “Zica”, Toshiro “Japonês safado” e Sra. Cintia, Huguinho “Prazer tremendo”, Gustavo “Pai” “Goiano”, Cris e Melissa Segura, pelas conversas científicas, cafês, auxílio em campo e, principalmente, por tornar o mestrado divertido e o ambiente de trabalho um local cativante.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (DMP-UFSCar): Lygia, Luiz, Patrícia, Danilo, Mariana, Danielle, Thaila, os técnicos Ivete, Zélia e Beto, pela paciência e o auxílio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Dr. Irineu Bianchini Júnior e Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino pelo auxílio nas análises bioquímicas e pela permissão da utilização dos equipamentos do Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática (DHb-UFSCar).

Ao Professor Dr. Italo Delalibera Jr. (ESALQ-USP) e a Janaina Lamezon pelo auxílio na avaliação de degradação dos substratos pelas bactérias.

Ao professor Dr. Flavio Henrique Silva, Fernando Fonseca, Wesley Generoso e Danyelle Toyama do Laboratório de Biologia Molecular (DGE-UFSCar), pelo auxílio

nas identificações moleculares, além dos comentários pertinentes para a realização deste trabalho.

A minha família da Republica Auto Posto com Lingüiça: Marcelo Yudi, Daniel Espinosa, Mauricio Lili, e, em especial, à Darlan Gonçalves Nakayama (e família), Eduardo Pini Greco (“Foca”), Danilo Evangelista (“Tripa”) e Prof. Dr. Mauro Caetano de Souza (FACE-UFG) por esses anos diversão, bebedeiras, auxílio científico e, principalmente, pela amizade em todos os momentos.

Aos companheiros de república Wagner Chiba e Rafael “Fabio Costa” Xavier pela ajuda nos mais diversos assuntos, pelo companheirismo e convivência nesse ultimo ano (seja onde for hehe).

Aos amigos da UFSCar/Futebol: Adelcio, Leite, Profa. Dalva, Mariana, Karen, Danilo “Jesus”, Danilo, Prof. Marco, Haroldo “Mineiro” e tantas outras pessoas que sempre contribuíram seja pelas risadas, pelo futebol ou pela amizade (ou os 3 juntos).

Aos amigos de Piracicaba, em especial ao pessoal do I.U.R.E. (Caio, Raoni, Lucas, Ribas, Gyorgy, Renan, Antena, Meia e Roberto), ao Douglas, ao Branta, ao Pulga, ao Bruno Silva e ao Felipe Bernardi, apesar de pouco nos vermos a amizade prevalece. Ao pessoal da ESALQ-USP: Mari G-ada, De Assis, Fórmula, Nê, Tita, Corajoso e todos da Rep. Nois Q-Sabe.

A Thais Censi, vulgo “Gri”, pelo companheirismo, amizade e carinho nesses anos.

A minha família, entre eles, Du, Regis, Munique, Taty, Tia Teka, Batchan, Vó Zelia (*In memoriam*) e, em especial, a Osamu Koroiva e Sonia Guedes de Carvalho Koroiva, meus pais, pela infinita contribuição e auxílio em todos os momentos da minha vida.....

Por fim a Deus e a todos que me deram força e apoio no mestrado....

A todos, meu muitíssimo obrigado!



## RESUMO

A presença de complexo enzimático lignocelulolítico e/ou de microrganismos no trato digestivo de invertebrados é um indicativo da capacidade desses organismos utilizarem a madeira como fonte de energia. Apesar da participação microbiana em processos digestivos celulósicos em algumas espécies de insetos aquáticos, pouco se sabe sobre a importância dos microrganismos na capacidade digestiva de larvas de quironomídeos. Assim, este estudo teve como objetivo analisar as atividades enzimáticas digestivas de celulose e de hemicelulose e de avaliar a comunidade bacteriana cultivável capaz de hidrolisar compostos de madeira do trato digestivo de larvas de *Stenochironomus* Kieffer (Diptera, Chironomidae). Este é um gênero cosmopolita caracterizado por larvas minadoras de galhos submersos em decomposição. Foram estudados dois morfotipos larvais. Os resultados da análise enzimática, realizado através da quantificação de açúcares redutores, demonstraram limitada capacidade na degradação de celulose, porém indicaram capacidade de hidrólise de xilana. Na caracterização da comunidade bacteriana foram isolados trinta e um tipos de colônias nos dois morfotipos estudados. Dezenove responderam positivamente à capacidade de hidrólise de pelo menos um dos quatro substratos utilizados como principal fonte de carbono nos meios de cultura. A capacidade de degradação foi avaliada através de testes colorimétricos. As bactérias foram identificadas pela análise do gene 16S rRNA. Nenhuma das bactérias isoladas foi capaz de degradar lignina. *Pseudomonas* foi o gênero com maior riqueza, *Bacillus* teve a maior capacidade de degradar diferentes substratos e *Sphingobium* foi encontrado em ambos os morfotipos. Os resultados deste trabalho evidenciam a participação de microrganismos na degradação da madeira consumida pelas larvas de *Stenochironomus*. Ressalta-se que este é o primeiro registro de bactérias e enzimas lignocelulolíticas no trato digestivo de quironomídeos minadores.

**Palavras chave:** Bactérias cultiváveis; Enzimas digestivas; Celulose; Xilana; larvas saproxílicas

## ABSTRACT

The presence of a lignocellulolytic enzyme complex and/or symbiotic microorganisms in the invertebrate guts is an indicative of its ability of using wood as energy source. Despite the microbial involvement in the cellulose digestive processes of some species of aquatic insects, there is a lack of information regarding the importance of microorganisms in the digestive capacity of chironomid larvae. This research focuses on the analysis of the activity of enzymes responsible for cellulose and hemicelluloses digestion and the cultivable bacterial community capable of hydrolyzing wood compounds in the digestive tract of *Stenochironomus* larvae Kieffer (Diptera, Chironomidae). This is a cosmopolitan genus characterized by mining larvae of submerged decaying branches. Two larval morphotypes were studied. The results of enzymatic analysis in the larval digestive tract, performed by quantification of reducing sugars, showed limited ability of both morphotypes in the degradation of cellulose, but indicated capacity to hydrolyze xylan. There were isolated thirty-one types of colonies during the characterization of bacterial communities, of which nineteen strain responded positively into the ability to hydrolyze at least one of the four substrates used as the main carbon source in the culture media. Degradation capability was assessed using colorimetric tests. The bacteria were classified using 16S rRNA gene analysis. No bacteria capable of degrading lignin were isolated. *Pseudomonas* was highly richness, *Bacillus* showed the greatest capacity for degrading different substrates and *Sphingobium* was present in both *Stenochironomus* morphotypes. The results obtained in this research emphasize the participation of microorganisms in the degradation of the wood consumed by the *Stenochironomus* larvae. This is the first report of lignocellulolytic bacteria and lignocellulolytic enzymes in the gut of wood-mining chironomid.

**Keywords:** Cultivable bacteria; Digestive enzymes; Cellulose; Xylan; Saproxylic larvae.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	XIII
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 ECOLOGIA DE INSETOS SAPROXÍLICOS .....	1
1.2 OS CONSTITUINTES DA MADEIRA E A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SEUS COMPONENTES.....	4
1.3 FAMÍLIA CHIRONOMIDAE E SEUS REPRESENTANTES SAPROXÍLICOS .....	7
1.4 O GÊNERO <i>STENOCHIRONOMUS</i> (DIPTERA:CHIRONOMINAE) .....	10
1.5. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	11
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>13</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 OBJETIVO GERAL: .....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	14
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>15</b>
4.1 ORIGEM DAS LARVAS.....	15
4.2 ENSAIO ENZIMÁTICO.....	18
4.2.1 <i>Extração enzimática</i> .....	18
4.2.2 <i>Atividade enzimática e quantificação de proteínas</i> .....	19
4.3 AVALIAÇÃO BACTERIANA.....	22
4.3.1 <i>Isolamento e quantificação de bactérias</i> .....	22
4.3.2 <i>Ensaio de degradação dos substratos</i> .....	23
4.3.3 <i>Identificação das bactérias</i> .....	25
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1. ENSAIO ENZIMÁTICO .....	28
5.2. AVALIAÇÃO BACTERIANA.....	29
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>8 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....</b>	<b>41</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>.....</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>.....</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>.....</b>

## ÍNDICE DE TABELAS




Tabela 5.2.1. Número de morfotipos isolados com capacidade de degradação do substrato o qual foi isolado ..... 29

Tabela 5.2.2. Afiliação taxonômica e a capacidade de degradação das bactérias encontradas no trato digestivo nos dois morfotipos larvais de *Stenochironomus* ..... 30

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.2.1. Esquema do mecanismo de ação do complexo celulásico na quebra da cadeia polimérica (modificado de WATANABE & TOKUDA, 2010) .....06
- Figura 4.1.1. a, Trecho do córrego do Fazzari (São Carlos,SP); b, larva de *Stenochironomus* 1 (coloração escura se deve a manutenção deste exemplar em geladeira); c, Cápsula cefálica do morfotipo .....17
- Figura 4.1.2. a, Trecho do córrego da Galharada (Campos do Jordão,SP); b, larva de *Stenochironomus* 2 (coloração escura se deve a manutenção deste exemplar em geladeira); c, Cápsula cefálica do morfotipo .....18
- Figura 4.2.1. Esquema do método de quantificação de açúcares redutores em um ensaio modificado de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) .....22
- Figura 4.3.2.1. Representação das medições para o Índice enzimático.  $\varnothing C$  representa a linha do diâmetro da colônia;  $\varnothing h$  representa a linha de diâmetro do halo de degradação (Imagem retirada de BRAGA *et al.*, 2009) .....25
- Figura 5.1.1. Resultados das atividades celulásica e hemicelulásica específicas (unidades por mg de proteína) dos fluidos digestivos intestinais dos dois morfotipos de *Stenochironomus*. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definido como 1  $\mu$ M de açúcar reduzido liberado por minuto na temperatura especificada e a pH 6,0. Diferentes letras indicam diferença significativa no teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). .....28
- Figura 5.2.1. Valores das densidades média de bactérias capazes de degradar os diferentes substratos nos dois morfotipos de larvas de *Stenochironomus* analisados. ....31
- Figura 5.2.2. Árvore filogenética não-enraizada baseada nas sequências do gene 16S rRNA-V3 obtidas neste estudo. Nomes científicos indicam as sequências obtidas do GenBank. A árvore foi construída pelo método de “neighbor-joining” e as distâncias foram calculadas pelo método de Kimura-2. Os números dos nós internos são os valores

de *bootstrap* (%) para 1.000 réplicas. A escala indica 2% de divergência das sequências.....32

Figura 5.2.3. Resultado das análises da atividade enzimática das bactérias isoladas do trato digestivo dos dois morfotipos de *Stenochironomus*; , refere às bactérias isoladas das larvas de *Stenochironomus* 1; , refere as bactérias isoladas das larvas de *Stenochironomus* 2; , refere ao desvio padrão do Índice enzimático; Valores acima de 1,0 são um indicativo de excreção de enzimas .....34

## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

% - Percentagem

°C – grau Celsius

**16S rRNA** – Subunidade 16S do RNA ribossômico

**a.n.m.** – Acima do nível do mar

**ANOVA** – Análise de variância

**cm** – centímetro

**EC** – classificação numérica para enzimas do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC- IUBMB)

**EUA** – Estados Unidos da América

**g** – aceleração gravitacional

**g** – grama

**kb** – kilobase, 1000 pares de base

**L** – litro

**M** – molaridade, mol.L<sup>-1</sup>

**mA** – miliamperes

**mg** - miligrama

**mL** – mililitro

**mS** – milisimens

**nm** – nanômetro

**NTU** – “*Nephelometric Turbidity Unit*”, unidade nefelométrica de turbidez

**PCR** - "*Polymerase chain reaction*", reação em cadeia da polimerase

**pH** - potencial hidrogeniônico

**UFC** – Unidade formadora de colônia

**β** - beta

**λ** – lambda

**μ** - micron

# **1 INTRODUÇÃO**

---

## **1.1 Ecologia de insetos saproxílicos**

Segundo o Conceito do contínuo fluvial (VANNOTE *et al.*, 1980), a comunidade de macroinvertebrados aquáticos de córregos de cabeceira, de primeira a terceira ordem (STRAHLER, 1957), são dependentes da entrada de material alóctone provenientes da vegetação ripária, para obtenção de carbono e energia, uma vez que o dossel das matas ocasionam uma menor penetração da luz direta, restringindo a produção primária autóctone. Deste modo, a matéria orgânica alóctone (detritos, folhas, frutos e galhos) além de ser a principal fonte de alimento para a cadeia trófica também contribuem como substrato adicional para a proliferação de microrganismos, bem como local para ovoposição e refúgio para os macroinvertebrados aquáticos (DUDLEY & ANDERSON, 1982).

Apesar das folhas serem consideradas como um importante recurso energético em córregos (PETERSEN & CUMMINS, 1974), os troncos possuem maior estabilidade (GULIS *et al.*, 2004) e menor sazonalidade (PETERSEN *et al.*, 1989), sendo um dos principais recursos para comunidades de invertebrados em córregos de baixa ordem.

Entre os insetos aquáticos, diversas ordens como Trichoptera, Ephemeroptera, Coleoptera e Diptera (DUDLEY & ANDERSON, 1982; HOFFMAN & HENRING, 2000) possuem espécies com hábito de uso e consumo dos troncos submersos. Essas espécies são denominadas na literatura de diferentes maneiras tais como:

- ***saproxilófagos*** ( “Sapro” do grego “Sapros”, putrefado, morto; “Xiló” do grego “Xyl”, madeira e, “fagos” do grego “phagein”, comer),



- *saproxílicos* ( “Sapro” do grego “Sapros”, putrefado, morto; “Xili” do grego “Xyl”, madeira e, “icos” do grego “ikos”, sufixo grego formador de adjetivos)
- *xilófagos de madeira morta* (“Xiló” do grego “Xyl”, madeira e, “fagos” do grego “phagein”, comer).

Independente da terminologia acima, todas indicam que as espécies dependem diretamente da queda de galhos oriundos da vegetação ripícola, as quais, em pelo menos uma fase da vida, utilizam os troncos como fonte de alimento, proteção e/ou habitat (MCKIE & CRANSTON, 2001). Nesta dissertação optou-se por “Saproxílicos”, cunhada na França na década de 60 por Roger Dajoz, considerado o “pai” da entomologia saproxílica, cujo termo com tradução para o inglês se difundiu amplamente entre a comunidade científica após as publicações de Rose & Harding em 1986 e de Speight em 1989 (GROVE, 2002) .

Constituindo uma importante comunidade em córregos, participando diretamente no fluxo de energia e ciclagem dos nutrientes (ANDERSON *et al.*, 1984), os insetos saproxílicos podem estar associados à madeira de três maneiras diferentes, baseado na presença e no grau de consumo (adaptação de HOFFMAN & HERING, 2000):

- Espécies não-saproxílicas, que utilizam os troncos e galhos como habitat por um período da vida, consumindo biofilme e ocasionalmente fragmentos de madeira;
- Espécies saproxílicas facultativas, consideradas espécies raspadoras, podem consumir não apenas madeira, mas também folhas, tendo o primeiro como recurso importante para o crescimento e até mesmo para a sobrevivência em algum período do seu ciclo de vida;

- Espécies saproxílicas obrigatórias, espécies restritas ao consumo de madeira, grupo este classificado como minador, além de raspador e tubícolas de superfície, cujo ciclo de vida está intrinsecamente relacionado ao recurso alóctone.

Em geral, o grau de decomposição e o tamanho dos troncos são características importantes para a colonização por insetos saproxílicos (DUDLEY & ANDERSON, 1982), contudo, considerando a comunidade como um todo, não existe apenas uma característica física do tronco (e.g. estrutura de superfícies, estágio de consistência, presença de casca) relacionado a colonização por esses insetos, necessitando a observação individual de cada espécie (WARMKE & HERING, 2000; KOROIVA *et al.*, 2009). Como exemplo, para alguns quironomídeos (Diptera:Chironomidae) minadores como *Stenochironomus* (str. sensu) e *Xylotopus par* foi constatado a preferência por troncos em estágio avançado de decomposição e macios (KAUFMAN & KING, 1987; MAGOULICK, 1998), enquanto larvas de tipulídeos (Diptera:Tipulidae) minadores, como algumas espécies dos gêneros *Lipsothrix* e *Tipula*, e também do quironomídeo *Symposiocladius lignicola* estão relacionados a troncos de consistência rígida (WARMKE & HERING, 2000).

Apesar de diversos estudos discutirem as relações e as especificidades entre insetos saproxílicos e troncos (MAGOULICK, 1998; TRIVINHO-STRIXINO & STRIXINO, 1998; WARMKE & HERING, 2000; MATHOOKO & OTIENO, 2002; HOFER & RICHARDSON, 2007; VALENTE-NETO *et al.*, 2008; KOROIVA *et al.*, 2009), informações ou estudos dos processos digestivos desses insetos ainda são escassos (HOFFMANN & HERING, 2000)

A presença de um complexo enzimático lignocelulolítico é um indicador da capacidade do fluido ou de microrganismos associados presentes no trato digestivo de invertebrados utilizarem a madeira como fonte de carbono (MARTIN, 1983). Segundo MARTIN (1983, 1991), mais de uma centena de espécies de insetos pertencentes a nove ordens desempenham atividades celulolíticas em seu trato digestivo. Apesar da aparente diversidade, a difícil degradação e a baixa qualidade nutricional do substrato remetem a uma dependência, da maioria dos insetos xilófagos e fitófagos, de relações associativas com microrganismos na utilização desse recurso, especialmente aqueles que utilizam a madeira com principal fonte de alimento (BRUNE, 2006).

A digestão de materiais lignocelulósicos é evidenciada em diversos insetos terrestres tais como baratas (e.g., CRUDEN & MARKOVETZ, 1979), cupins (e.g., WENZEL *et al.*, 2002), besouros (e.g., DELALIBERA-JR *et al.*, 2005) e gafanhotos (e.g., WILIS *et al.*, 2010). Entre os insetos aquáticos, algumas espécies de plecópteros (Insecta:Plecoptera) e tricópteros (Insecta:Trichoptera) têm participação de enzimas de fungos nos processos digestivos de materiais celulósicos (SINSABAUGH *et al.*, 1985) enquanto que as larvas de *Tipula abdominalis* (Diptera:Tipulidae), organismo fitófago, beneficiam-se nutricionalmente da digestão microbiana da celulose em seu intestino posterior (COOK *et al.*, 2007; ROGERS & DORAN-PETERSON, 2010).

## **1.2 Os constituintes da madeira e a degradação enzimática de seus componentes**

A capacidade de utilização de troncos como recurso energético depende diretamente da habilidade do animal na digestão dos principais constituintes da madeira: celulose, lignina e hemicelulose.

A celulose, principal componente da parede celular das plantas e o composto orgânico mais abundante da Terra, é constituída por um complexo linear polimérico de

carboidrato, composto de resíduos de glicose com ligações  $\beta$  1-4 (SAXENA & BROWN-JR, 2005). A degradação dessa estrutura, para fins energéticos, requer um conjunto de enzimas de ação sinérgica, o sistema celulásico, que consiste de três classes de enzimas hidrolíticas: endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou endoglucanase (E.C. 3.2.1.4), 1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolases, exoglucanase ou celobiohidrolases (E.C.3.2.1.91) e 1,4- $\beta$ -D-glucosidase,  $\beta$ -glucosidase ou celobiase (E.C. 3.2.1.21) (WATANABE & TOKUDA, 2010).

A degradação da celulose se inicia quando endoglucanases atuam promovendo ações em regiões amórficas isoladas da matriz cristalina, facilitando quebras na cadeia linear de celulose. As celobiohidrolases reagem com os fragmentos dessas quebras, tanto na extremidade redutora quanto não redutora, liberando celobiose e expondo novos sítios para a ação das endoglucanases, geralmente rompendo a rígida estrutura do polímero. A continuação combinada das ações da endoglucanase e da exoglucanase resulta na eventual degradação completa da celulose original com a produção de celobiose e de uma mistura de oligossacarídeos lineares de cadeias de diferentes comprimentos (celodextrina). A celobiose, que é um inibidor dos outros dois tipos de celulase, é hidrolisada em glicose pelas celobiasas, e os demais oligossacarídeos pela ação conjunta das três classes de enzimas hidrolíticas (Figura 1.2.1.) (ZANDONA-FILHO, 2001, WATANABE & TOKUDA, 2010). Deste modo, a utilização da celulose é dependente de um conjunto de ações sinérgicas dos três tipos de enzimas, sendo que, a inibição ou ausência de uma das três, a degradação da celulose é parcial.

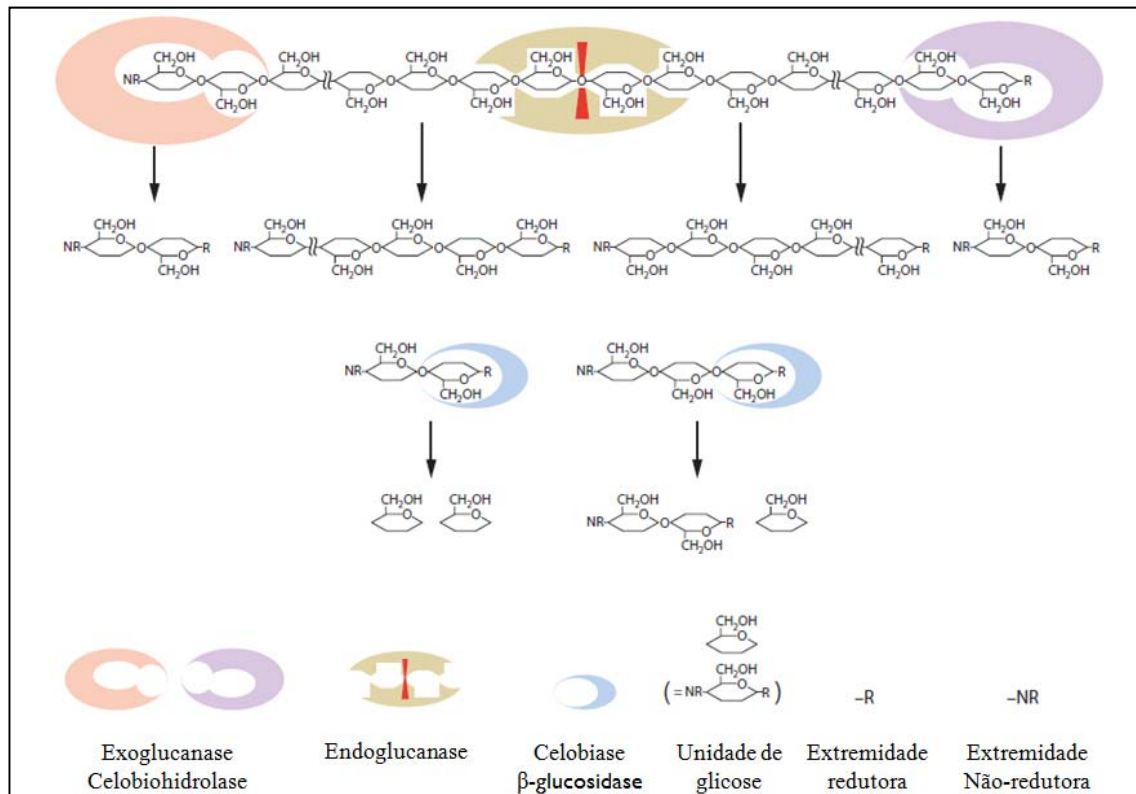


Figura 1.2.1. Esquema do mecanismo de ação do complexo celulásico na quebra da cadeia polimérica (modificado de WATANABE & TOKUDA, 2010)

A xilana é o principal componente hemicelulósico da madeira e pode representar até 30% -35% do peso seco total em plantas terrestres. Este heteropolímero é constituído principalmente por resíduos de D-xilose como item monomérico e traços de L-arabinose. Coerente com sua estrutura química e substituições dos grupos laterais, as xilanas parecem ser intercalada e covalentemente ligada a vários pontos com a lignina enquanto produz um revestimento em torno dos eixos de celulose via pontes de hidrogênio (BEG *et al.*, 2001). A camada de xilana com ligação covalente com a lignina e interações não-covalentes com a celulose deve ser importante na manutenção na integridade da celulose *in situ* e na ajuda da proteção das fibras contra a degradação das celulasas (UFFEN, 1997). A hidrólise completa deste composto requer a ação sinérgica de diversas enzimas como: β-1,4-endoxilanase, β-xilosidase, acetil xilana

esterase entre outras (BEG *et al.*, 2001). Como principais degradadores de xilana estão as bactérias e fungos, contudo há também a produção de enzimas por protozoários, algas marinhas, crustáceos, insetos e caramujos. (RÜHL *et al.*, 2007)

A lignina, juntamente com a celulose, constitui componente responsável pela estrutura e rigidez de troncos e galhos, e possui grande resistência a choques físicos e ataque por microrganismos. Este componente, a forma mais abundante de carbono aromático da Terra, é formado via polimerização oxidativa de grupos de fenil propano, constituindo de 20 a 30% da madeira, havendo diferenças de teor e da sua estrutura físicas entre as coníferas e as plantas folhosas (VAN AKEN & AGATHOS, 2001). Dois grupos de enzimas oxidativas atuam na modificação estrutural das ligninas: as peroxidases lignolíticas, como lignina-peroxidase (LiP), mangês-peroxidase (MnP) e peroxidase versátil (VP), e as fenoloxidasas, como as do tipo lacases (MARTINEZ, 2007). Os fungos são os principais degradadores de lignina, mas também há bactérias e actinomicetos dotados de um sistema lignolítico (BONONI, 1997).

### **1.3 Família Chironomidae e seus representantes saproxílicos**

Chironomidae (Diptera:Nematocera) é uma família de inseto cujas larvas são aquáticas, com ampla distribuição espacial, elevada abundância e ocupam quase todos os ambientes dulcícolas (CRANSTON, 1995). Cosmopolita, existem cerca de 5.000 espécies de quironomídeos descritas (CRANSTON & MARTIN, 2007), dividida em 11 subfamílias das quais cinco ocorrem no Brasil: Tanypodinae, Orthocladiinae, Chironominae, Podonominae e Telmatogetoninae, com cerca de 335 gêneros válidos (MENDES & PINHO, 2006). As fases imaturas dos quironomídeos, larva e pupa, são predominantemente dulcícolas, havendo também algumas espécies marinhas e terrestres. A fase larval é a principal responsável pelo estoque energético dos demais

estádios, uma vez que é a única fase que se alimenta. A fase de pupa é curta e no final do seu período emerge o imago (macho ou fêmea). A fase adulta é terrestre e alada, em geral não se alimenta, restringindo-se praticamente a funções reprodutivas.

Tão amplo quanto sua distribuição, há uma significativa variedade de modos de alimentação das larvas de quironomídeos. Baseando-se no modo de alimentação larval, os quironomídeos podem ser agrupados em cinco categoriais funcionais (BERG, 1995): coletores-catadores, coletores-filtradores, raspadores, fragmentadores e predadores. Apesar desta classificação, as espécies comumente não se restringem a apenas uma categoria de alimentação, um táxon pode desempenhar diferentes estratégias de alimentação, portanto a ocupar diferentes categorias, visto a plasticidade da dieta das larvas devido às condições e aos recursos disponíveis no ambiente.

Entre as categorias alimentares citadas, o grupo dos fragmentadores compreende as espécies de quironomídeos que adquirem alimento por meio de mastigação de folhas ou algas, tecidos vegetais vivos ou escavando e/ou minando galhos e troncos submersos caídos (BERG, 1995). Deste grupo, apenas três subfamílias, Orthoclaadiinae, Chironominae e Diamesinae, possuem algumas espécies com larvas minadoras associadas essencialmente a troncos submersos. Como citado por CRANSTON & MCKIE (2006), a ecologia dos quironomídeos saproxílicos é pouco conhecida, com exceção *Xylotopus par*, para a qual há estudos autecológicos detalhados, com informações sobre o ciclo de vida e sugestões quanto à capacidade digestiva e a associação com microrganismos.

Apesar da participação microbiana em processos digestivos em outros insetos aquáticos (e.g. SINSABAUGH *et al.*, 1985), estudos que discutem a presença de bactérias no trato digestivo dessas larvas são praticamente restritos a sua controversa

colaboração energética (e.g. BAKER & BRANDNAM, 1976; PINDER, 1986; JOHNSON *et al.*, 1989; HALL-JR & MEYER, 1998).

Algumas larvas de quironomídeo são capazes de completar o desenvolvimento em uma dieta restrita de bactérias (PINDER, 1986). Entretanto, mesmo em ambientes que as bactérias são suficientemente abundantes para suprir as necessidades dietéticas, as larvas de quironomídeos são seletivas ao consumo, utilizando outros recursos como fonte energética como os detritos (JOHNSON *et al.*, 1989). Além disto, a taxa de assimilação de compostos bacterianos pode ser insuficiente para a manutenção das larvas, evidenciando a necessidade de outras fontes energéticas, como averiguado em *Chironomus riparius* (BAKER & BRANDNAM, 1976).

Mesmo as larvas não obtendo carbono e nitrogênio exclusivamente a partir de microrganismos, a biomassa bacteriana parece ser importante no fornecimento de substâncias específicas ou na modificação química de detritos (PINDER, 1986), havendo evidências de possíveis contribuições bacterianas nos processos digestivos. ROUF & RIGNEY (1993) avaliaram a microbiota bacteriana em larvas de *Chironomus plumosus*, um quironomídeo detritívoro, durante um período de dois anos e observaram diferenças na comunidade e na densidade das bactérias, ressaltando o acúmulo de bactérias em regiões específicas intestinais. Contudo, os autores não atribuíram nenhum tipo de função ou interação entre a comunidade bacteriana e o trato digestivo das larvas. KAUFMAN *et al.* (1986) analisando larvas de vários ínstares de *X. par* constataram bactérias em uma faixa contínua no lado do lúmen do epitélio. Os autores levantaram a hipótese de uma possível contribuição destas bactérias na degradação da madeira, mas o relato, baseando-se em dados não publicados, sobre a insuficiência da degradação de celulose no intestino médio coloca em dúvida essa possibilidade.



#### 1.4 O gênero *Stenochironomus* (Diptera:Chironominae)

*Stenochironomus* KIEFFER, 1919, é um gênero cosmopolita que ocorre em todas as regiões biogeográficas exceto na Antártida. São reconhecidas mais de 100 espécies no gênero, há 24 espécies no Brasil, e todas com habito minador (DANTAS, 2010). As espécies cujas larvas minam troncos submersos são incluídas no sub-gênero *Stenochironomus* (*sensu stricto*), enquanto que aquelas que minam folhas submersas são classificadas no sub-gênero *Petalopholeus* (BORKENT, 1984). Apenas uma espécie, *S. nelumbus*, é conhecida como minadora de tecido vegetal vivo, especificadamente da flor-de-Lotus (*Nelumbo lucífera*) (MATHEW & HABEEBURRAHMAN, 2008).

Algumas adaptações para o modo de vida minador são observados nas larvas de *Stenochironomus*. A coloração vermelho vivo, indica alta concentração de hemoglobina, o que possibilita à penetração das larvas em áreas mais profundas dos substratos onde a concentração de oxigênio pode ser escassa (BERG, 1995). O mento em forma de arado adaptado para fragmentação e o achatamento dorso-ventral do corpo também são adaptações morfológicas que permitem a capacidade de minação dos substratos (CRANSTON & MCKIE, 2006).

As larvas de *Stenochironomus* (*stricto sensu*) são encontradas tanto em ambientes lóticos quanto lênticos, vivem em troncos firmemente ancorados, com a superfície relativamente limpa e geralmente em troncos de plantas da divisão Magnoliophyta (Angiosperma) (BORKENT, 1984). Coletadas somente no interior de troncos (CRANSTON & MCKIE, 2006), as larvas deste sub-gênero minam e formam câmaras de pequena profundidade (~1 mm) e longo comprimento (podendo alcançar de 2 a 3 vezes o comprimento da larva), onde habitam até a emersão como adulto (BORKENT, 1984). Estudos (MAGOULICK, 1998; MATHOOKO & OTIENO, 2002;

KOROIVA *et al.*, 2009) indicam a preferência dos imaturos de *Stenochironomus* por troncos em processo de degradação e macios. É sugerido que estas características estejam relacionadas ao alto valor nutritivo, visto a concentração microbiana em troncos em decomposição (MAGOULICK, 1998).

### **1.5. Identificação dos microrganismos**

No passado as identificações dos microrganismos associados seguiam os métodos tradicionais de microbiologia, derivados da microbiologia médica, utilizando da caracterização fenotípica de colônias isoladas. Atualmente, métodos de análises da sequência dos ácidos nucleicos são preferencialmente utilizados para a identificação dos microrganismos, em particular, o uso do gene 16S rRNA da comunidade microbiana (CLARRIDGE III, 2004; DILLON & DILLON, 2004).

O gene 16S rRNA é considerado um excelente marcador molecular, uma vez que está presente em todos organismos e seu produto possui funcionalidade constante e é parte integrante do ribossomo, organela não-membranosa requerida para síntese protéicas. Este gene é considerado suficientemente longo (~1,5 kb) (RÖLING & HEAD, 2005) e limitado a transferências horizontais (HARAYAMA & KASAI, 2006), indicado como uma importante ferramenta para a avaliação da história evolutiva dos procariotos. O 16s rRNA possui sequências que evoluíram em taxas diferentes, havendo domínios, os quais têm permanecido quase universalmente conservados, intercalados por regiões mais variáveis (regiões denominadas de V1 a V9), capazes de especificar diferentes categorias taxonômicas, ou seja, desde filo até subespécies. Isto permite um inequívoco alinhamento da posição das sequências homologas possibilitando a identificação de regiões conservadas e de sequências específicas dos táxons (RÖLING & HEAD, 2005). No presente, a amplificação das regiões V3 e/ou V6 tem sido utilizada

para identificações bacterianas uma vez que podem prover informações filogenéticas suficientes para a caracterização em nível genérico (HUSE *et al.*, 2008).

A descrição dos membros da comunidade microbiana do intestino de um inseto é considerado o primeiro passo para a compreensão das relações de estrutura e função dos microrganismos comensais presentes (SCHLOSS *et al.*, 2006). Espécies de bactérias celulolíticas associadas são bem estabelecidas em insetos terrestres (DELALIBERA-JUNIOR *et al.*, 2005; WENZEL *et al.*, 2002; DRÖGE *et al.*, 2006, RAMIN *et al.*, 2009) , mexilhões (SAKAMOTO *et al.*, 2007), caranguejos (GULMANN, 2004) e caramujos (CHARRIER *et al.*, 1998), contudo só recentemente identificou-se com uso de métodos moleculares bactérias relacionadas à insetos aquáticos, particularmente em larvas do gênero *Tipulida* (Diptera:Tipulidae) (COOK *et al.*, 2007, COOK *et al.*, 2008).

Apesar de técnicas de identificação independente da utilização de cultura possibilitar uma melhor caracterização da comunidade microbiana (GUAZZARONI *et al.*, 2009), a utilização de técnicas de isolamento por cultivo com substratos presentes na dieta natural é uma valiosa e recorrente ferramenta utilizada para o reconhecimento de microrganismos que auxiliam nos processos digestivos dos insetos (PARK *et al.*, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

Os insetos saproxílicos constituem uma importante comunidade no processamento da matéria orgânica e disponibilizando nutrientes para a cadeia trófica em córregos. Conforme sugerido por GROVE & STORK (1999) são necessários estudos que forneçam informações destas espécies, como a autecologia destes animais, especialmente na região Neotropical

Na literatura, há um único relato com base em dados não publicados (não confirmados) de que larvas de quironomídeos minadores são incapazes de degradar materiais lignocelulósicos (KAUFMAN *et al.*, 1986), além de evidências que bactérias podem se estabelecer e auxiliar nos processos digestivos das larvas de quironomídeos. Assim, estudos sobre a digestão da madeira e seu uso como fonte energética, podem auxiliar no entendimento da ecologia dos quironomídeos minadores, especialmente aqueles que possuem íntima relação com troncos submersos, tal como as larvas do gênero *Stenochironomus*.

## **3 OBJETIVOS**

---

### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar a capacidade das larvas de *Stenochironomus* de degradar compostos celulósicos e hemicelulósicos e identificar possíveis bactérias associadas que auxiliem nos processos da degradação de madeira.

### **3.2 Objetivos específicos:**

- 1) Quantificar a atividade enzimática específica de celulasas e hemicelulasas do trato digestivo de larvas de *Stenochironomus*.
- 2) Quantificar e isolar bactérias cultiváveis associadas ao trato digestivo das larvas de *Stenochironomus*;
- 3) Avaliar a capacidade das bactérias isoladas de degradarem diferentes compostos presentes na madeira,
- 4) Identificar as bactérias com capacidade de degradação, através do sequenciamento da região 16S rRNA, e comparar a microbiota do trato digestivo das larvas de *Stenochironomus* com a de outros insetos minadores.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

---

### 4.1 Origem das larvas

Troncos submersos foram coletados próximos a cabeceira de dois córregos para obtenção das larvas de *Stenochironomus*. O primeiro córrego, denominado Córrego do Fazzari (21° 58' 09"S, 47° 53' 04"W), está localizado em uma reserva legal de Cerrado, no “*campus*” da Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos, São Paulo, à altitude em torno de 910 metros a.n.m. O trecho do córrego percorrido (Figura 4.1.1.a) na coleta caracteriza-se por ter canal protegido pela vegetação ripícola, e leito com elevado aporte de matéria orgânica, depósito de folhas, galhos e troncos, águas límpidas, baixa profundidade (<50 cm) e baixa velocidade de corrente (0,3 m.s<sup>-1</sup>); alta concentração de oxigênio dissolvido (7,9 mg. L<sup>-1</sup>), baixa condutividade (13 mS.cm<sup>-1</sup>) e temperatura entre 15 a 23°C (PEPINELLI, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

O segundo córrego, denominado Córrego da Galharada (22° 41' 40" S, 45° 27'36" W ), localiza-se em uma área montanhosa de Floresta Ombrófila Mista Altomontana no Parque Estadual de Campos do Jordão, em Campos do Jordão, São Paulo, à altitude em torno de 1550 metros a.n.m. O trecho do córrego percorrido na coleta (Figura 4.1.2.a) caracteriza pelo canal protegido pela vegetação ripícola, e o leito duro constituído por matacões e seixos; com água límpida, baixa profundidade (<50 cm) e alta velocidade de corrente (0,6 m.s<sup>-1</sup>); alta concentração de oxigênio dissolvido (9,1 mg.L<sup>-1</sup>), baixa condutividade (10 μS.cm<sup>-1</sup>), temperatura em torno de 16°C. (PEPINELLI, 2003; SURIANO & FONSECA-GESSNER, 2004).

Os córregos foram percorridos em sentido montante e troncos e galhos com características de preferenciais das larvas foram coletados manualmente e transportados em baldes plásticos com água do local para o laboratório. Os troncos coletados foram

retalhados em bandeja branca de polietileno sobre uma fonte luminosa e apenas as larvas de *Stenochironomus* encontradas dentro da madeira foram separadas conforme o seu tamanho. As larvas selecionadas foram mantidas em refrigeração entre 0 a 4 °C por no máximo seis horas até a realização das dissecções. Após as dissecções, a cápsula cefálica e o exoesqueleto foram montados em lâminas e identificados antes da utilização dos tratos intestinais nos experimentos. O material está depositado na coleção do Laboratório de Entomologia Aquática do Departamento de Hidrobiologia da Universidade Federal de São Carlos.

A identificação específica de quironomídeos se faz com base em espécimes adultos machos, o reconhecimento larval em espécie é difícil. Neste estudo foram separados dois morfotipos de larvas conforme as suas características morfológicas e o local de origem. Dois morfotipos larvais de *Stenochironomus* foram determinados: *Stenochironomus* 1, coletados no córrego do Fazzari em São Carlos, e *Stenochironomus* 2, coletados no córrego do Galharada em Campos do Jordão. Aspectos como o formato dos túbulos anais e da cápsula cefálica foram considerados para diferenciação morfológica (Figura 4.1.1.b,c; Figura 4.1.2.b,c).



a



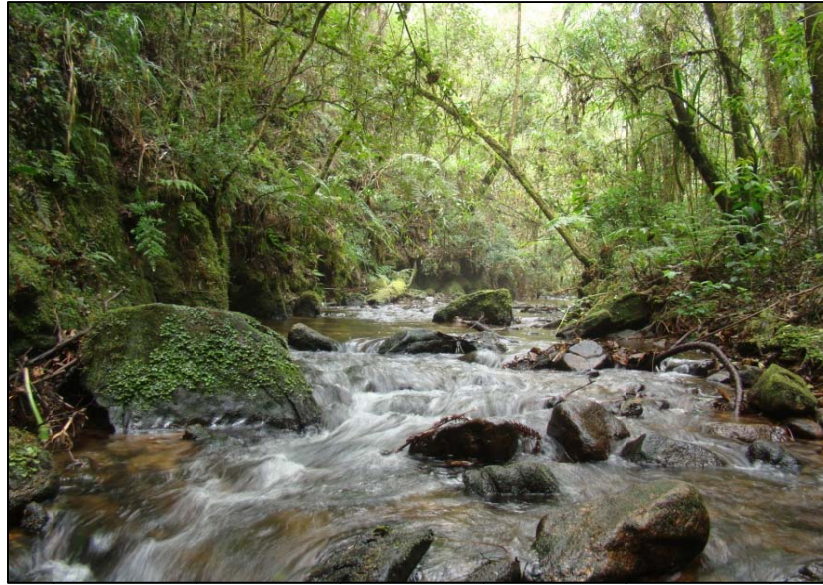
b



c

Figura 4.1.1. a, Trecho do córrego do Fazzari (São Carlos,SP); b, larva de *Stenochironomus 1* (coloração escura se deve a manutenção deste exemplar em geladeira); c, Cápsula cefálica do morfotipo.





a



b



c

Figura 4.1.2. a, Trecho do córrego do Galharada (Campos do Jordão,SP); b, larva de *Stenochironomus 2* (coloração escura se deve a manutenção deste exemplar em geladeira); c, Cápsula cefálica do morfotipo.

## 4.2 Ensaio enzimático

### 4.2.1 Extração enzimática

Para cada quantificação enzimática foram utilizados os conteúdos de oito tratos digestivos para garantir a disponibilidade de material suficiente para as análises. A extração das enzimas seguiu a metodologia adaptada de OPPERT *et al.* (2010). Após a retirada das larvas dos troncos, estas foram mantidas em refrigerador a temperatura em

torno de 4 °C por até 8 horas antes da dissecação. Individualmente, oito larvas foram dissecadas em solução tampão TAE 10x (Tris-acetato-EDTA; Tris base 400 mM, ácido acético 190 mM, EDTA 10 mM, pH 7,8), e os conteúdos dos tratos digestivos foram colocados em um tubo “safe-lock” esterilizado contendo 1 ml de citrato tampão, pH 6,0 (Apêndice 1). O “pool” dos conteúdos dos tratos digestivos foi então macerado com bastão de vidro autoclavado, homogeneizado e centrifugado a 16.100g por 3 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos “safe-lock” autoclavados e estocados a temperatura de -22°C, sendo este considerado o extrato enzimático. Esse procedimento foi realizado em quintuplicata para cada morfotipo de larva.

#### **4.2.2 Atividade enzimática e quantificação de proteínas**

As atividades celulolíticas e hemicelulolíticas foram avaliadas através da quantificação de açúcares redutores em um ensaio modificado de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) . Este método parte do princípio de que o ácido 3,5-dinitrosalicílico é reduzido em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, enquanto o grupo aldeído é oxidado em grupo carboxila (HOSTETTLER *et al.*, 1951 *apud* MILLER, 1959). Segundo RODRIGUES (2003) o aquecimento da amostra de açúcar redutor à 100°C por 5 minutos altera a coloração amarelada inicial do DNS, para uma escala cromática que vai do amarelo ao marrom, dependendo da concentração de açúcar redutor na amostra. Para a determinação das concentrações de açúcares redutores nas amostras, os valores obtidos foram comparados a uma curva padrão de calibração para soluções com concentrações conhecidas (faixa de 0,5 a 2,0 g.L<sup>-1</sup>).

Dois substratos com propriedades distintas foram usados no ensaio de quantificação de açúcar redutores liberados na degradação de celulose: Carboximetil celulose (CMC) e celulose microcristalina (MCC). Carboximetil celulose é composto por polímeros de celulose modificado com um grupo extra carboximetil que promove sua solubilidade em água, avaliando a atividade de endo- $\beta$ -1-4-glucanase (EC. 3.2.1.4) presente na amostra. A celulose microcristalina (MCC) contém o polímero semelhante ao encontrado no ambiente, insolúvel em água, e sua utilização avalia a capacidade celulásica total da amostra (endo- $\beta$ -1-4-glucanase [EC. 3.2.1.4]; exo- $\beta$ -1-4-glucanase [E.C.3.2.1.91] e  $\beta$ -D-glucosidase [E.C.3.2.1.21]) (OPPERT *et al.*, 2010). Para observar a atividade hemicelulásica foi avaliada a capacidade de degradação de xilana ( $\beta$ -xilana [EC 3.2.1.8]). Neste teste utilizou-se como substrato a xilana obtido de madeira de faia (“*xylan from beechwood*”). A estrutura deste composto é formada por ligações  $\beta$ -1,4 de xilose, contendo mais que 90% de resíduos de xilose, e, como preferidos pelas larvas de *Stenochironomus*, são de origem da madeira de uma planta da divisão Magnoliophyta (Angiosperma) (BORKENT, 1984).

O extrato enzimático dos insetos (0,5 ml) foi então adicionado em 0,5 ml de 2% CMC (C5678 Sigma); 2% MCC (11363, Avicel, Fluka); 1% de xilana obtido de madeira de faia (X4252 Sigma); suspensos em 50mM tampão citrado, pH 6,0, valor de pH próximo ao encontrado no trato digestivo de larvas de quironomídeos (FROUZ *et al.*, 2007). Essas amostras foram incubadas por 1 hora, nos substratos CMC e xilana, e por 2 horas, em MCC, a temperatura de 50°C e 18°C, adaptação à metodologia de SHI *et al.* (2010). A realização do ensaio a 50°C segue conforme descrito em diversos trabalhos de análise enzimática (OPPERT *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2010; WILLIS *et al.*, 2010) e a 18°C por ser este valor próximo à temperatura média da água dos córregos de

procedência dos insetos (SURIANO & FONSECA-GESSNER, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

Após a incubação adicionou-se a cada tubo 3 mL de solução de DNS (Apêndice 2), e os tubos foram levados ao banho-maria (100°C) por 5 minutos. Imediatamente após este período os tubos foram colocados em banho de gelo. Resfriados adicionaram-se 20 mL de água destilada em cada tubo. Antes da realização da leitura dos tubos contendo MCC, estes foram centrifugados a 4400g por 2 minutos para precipitação de substratos remanescentes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro, Suécia) no comprimento de onda 540 nm ( $\lambda=540$  nm) (Figura 4.2.1.)

Os valores dos ensaios foram corrigidos subtraindo-se os valores finais pelos iniciais dos açúcares redutores. Os testes foram realizados em quintuplicata (n=5). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definido como 1  $\mu$ M de açúcar reduzido liberado por minuto. Esta quantificação foi calculada utilizando-se uma curva padrão dos respectivos açúcares. A atividade específica foi definida como a atividade enzimática por mg de proteína no trato digestivo ( $U \times mg^{-1}$  de proteína de trato digestivo). A concentração protéica nas amostras foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) usando o kit Coomassie® Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) com albumina soro bovino como padrão, conforme instrução do fabricante.

Os resultados de temperaturas e substratos são apresentados como média e desvio padrão correspondente e foram comparados através da análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey ( $p<0.05$ ).

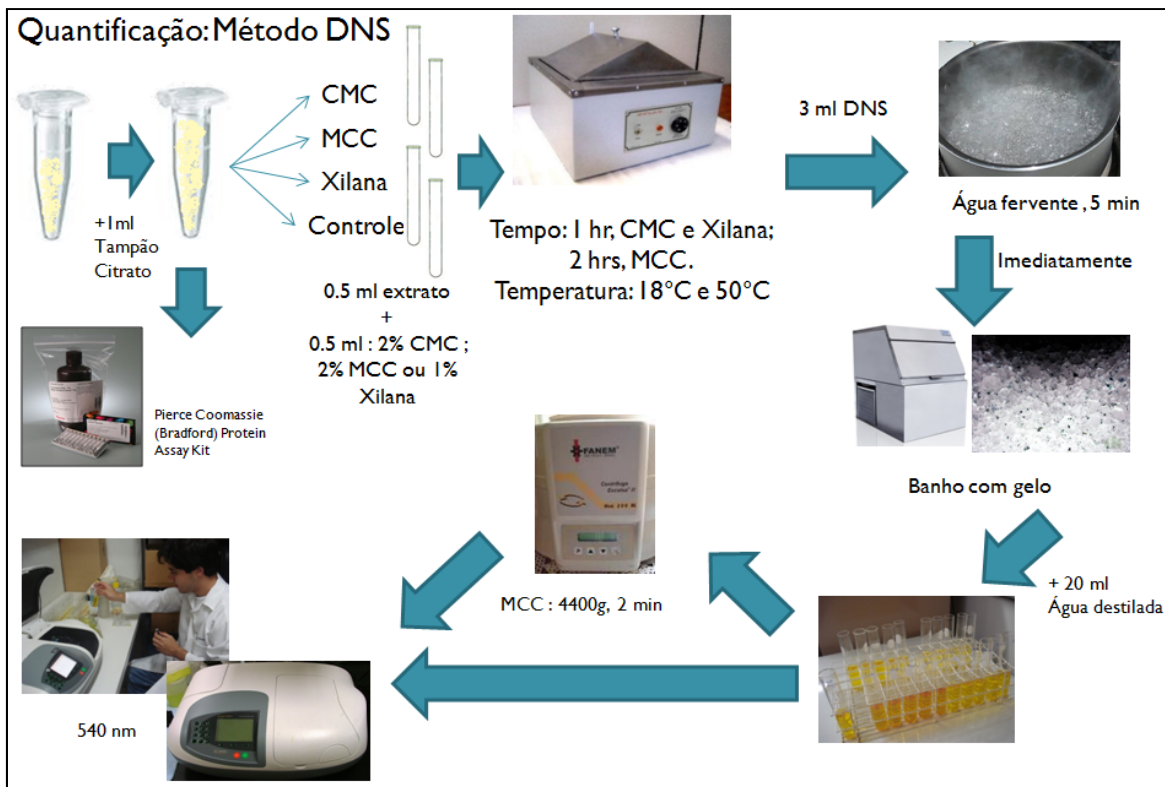


Figura 4.2.1. Esquema do método de quantificação de açúcares redutores em um ensaio modificado de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS)

## 4.3 Avaliação bacteriana

### 4.3.1 Isolamento e quantificação de bactérias

A extração do trato digestivo das larvas foi realizado pela adaptação da metodologia de VASANTHAKUMAR *et al.* (2006) (Apêndice 3). Para o isolamento e a quantificação bacteriana foram utilizados dez indivíduos de cada tipo de larva, adaptando metodologia de GEIB *et al.* (2009). Todas as extrações de trato intestinal foram realizadas em capela de fluxo laminar e em menos de duas horas após a extração dos insetos dos troncos.

Diluições decimais foram realizadas até  $10^{-3}$ , destas 100  $\mu\text{L}$  (homogêinizado) foram semeadas em meio base [0.2 g  $\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura (Sigma Y1625), 15 g  $\text{L}^{-1}$

de Agar bacteriológico nº1 (Oxoid)] com quatro diferentes substratos como principal fonte de carbono (5 g.L<sup>-1</sup>): (1) carboximetil celulose (CMC; Sigma C5678), (2) xilana obtida de madeira de faia (Sigma X4252), (3) D -(+)- celbiose (Sigma C7252) ou (4) lignina alcalina (Aldrich 370 959). Os procedimentos foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas a 28°C por uma semana.

As colônias foram categorizadas com base no seu tamanho, elevação, margem e pigmentação, contadas e os tipos celulares identificadas com o uso de método de Gram (CAPPUCCINO & SHERMAN, 2001). A quantidade média de colônias isoladas e o peso de cada trato digestivo foram utilizados para a determinação da quantidade de bactérias por peso de trato digestivo (UFC.mg<sup>-1</sup>). Para obtenção de culturas puras foi realizado o isolamento de uma única colônia, sendo estas estocadas em meio Trypticase Soy Broth (TSB, Difco) com 20% glicerol a -20°C até o uso.

#### **4.3.2 Ensaio de degradação dos substratos**

A partir das culturas em estoque foram realizados testes colorimétricos para a visualização de halos de atividade; estes foram efetuados em triplicata e em placas individuais com o meio de cultura contendo o meio base e um dos quatros substratos utilizados no isolamento como fonte de carbono. Como controles positivos foram utilizados para CMC a levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, e para xilana, celbiose e lignina o fungo *Pleurotus sajor-caju*.

A constatação da degradação em CMC foi realizada através do método de Vermelho Congo (0,1%) (THEATHER & WOOD, 1984). As placas com colônias isoladas foram cobertas pelo corante por 15 minutos e depois da drenagem foram lavadas três vezes com cloreto de sódio 1M.

Para xilana e celobiose foi utilizado solução de iodo a 2% por 10 minutos (WILLIAMS, 1983). No substrato não-degradado observa-se uma coloração escura enquanto nos halos degradados uma coloração mais clara.

Para os testes de degradação de lignina foi utilizado uma solução a 1 % Perclorato de Ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) e a 1% Ferricianeto de Potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) na proporção 1:1 (SUNDMAN & NASE, 1971). As placas permaneceram no escuro por 15 minutos para visualização da degradação, sendo identificada a lignina não degradada de coloração azul-verde e no caso da desfenilização do produto foi observada uma região verde-amarelada ao redor e sob a colônia.

Apenas as colônias que degradaram o substrato seguiram para testes de atividade enzimática e identificação genética.

A determinação da atividade enzimática das bactérias na degradação dos substratos lignocelulósicos foi avaliada de acordo com a zona de hidrólise do meio. O método da difusão radial em meio sólido indica a atividade enzimática de modo qualitativo, sendo analisado pela razão entre o diâmetro da zona de degradação e o diâmetro da colônia bacteriana, índice este denominado Índice Enzimático (Figura 4.3.2.1.) (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). O Índice Enzimático é uma ferramenta prática e rápida para a seleção e comparação da produção enzimática de diferentes isolados microbianos. Valores acima de 1,0 são um indicativo de excreção de enzimas (FUNGARO & MACCHERONI, 2002; CARRIM *et al.*, 2006).

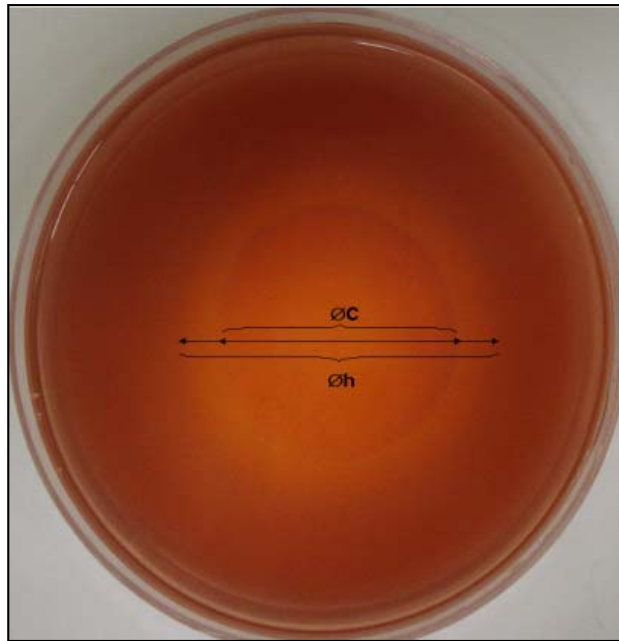


Figura 4.3.2.1. Representação das medições para o Índice enzimático.  $\text{ØC}$  representa a linha do diametro da colônia;  $\text{Øh}$  representa a linha de diamentro do halo de degradação (Imagem retirada de BRAGA *et al.*, 2009).

A habilidade das colônias para degradar os demais substratos foi investigada. Quando positivo, o Índice enzimático foi usado para determinar a quantidade de bactérias que potencialmente pode auxiliar os processos degradativos.

### 4.3.3 Identificação das bactérias

Para a identificação das bactérias associadas capazes de degradar os diferentes tipos de substratos foi realizado o sequenciamento da região conservada 16S rRNA. O gene 16s rRNA foi amplificado através do método de PCR de colônia, sendo utilizados os *primers* 27F - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' (GIOVANNONI, 1991) e 1500R - 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3' (LANE, 1991), amplificando uma região de aproximadamente 1,5 kb. Este procedimento foi realizado no termociclador MJ



Research PTC 100 Thermal Cycler seguindo o seguinte programa: 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos (94 °C, 1 minuto; 50 °C, 1 minuto; 72 °C, 2 minutos) seguidos de um ciclo de extensão final de 72 °C por 20 minutos.

O produto de amplificação foi então submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo (0,02 µg.µl<sup>-1</sup>). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TAQ com KCl 1x (10 mM Tris-HCl e 50mM KCl) a 90V. O gel foi posteriormente visualizado em luz UV para comprovar a amplificação dos fragmentos.

As bandas do produto amplificado com o tamanho esperado (1,5 kb) foram cortadas do gel com o auxílio de um bisturi e colocadas em tubos de 1,5 ml. O produto de PCR de colônia amplificado foi purificado utilizando o kit Wizard® SV Geland PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e depois quantificado em leitura no espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000* (Thermo Scientific, CA, EUA). O produto purificado de PCR foi seqüenciado em um MegaBACE 1000 Flexible kit usando o kit *DYEnamic ET Dye terminator* (GE Healthcare) segundo as instruções do fabricante. As reações de PCR para o sequenciamento foram realizadas utilizando o oligonucleotídeo iniciador 338F (5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') (LANE, 1991), que corresponde a região hipervariável V3 do 16S rRNA.

A análise das seqüências foi realizada pelo software *Base Caller Cimarron 3.12*. Regiões de baixa qualidade foram retiradas usando o programa DCAS (GUO *et al.*, 2009) (Phred-Prap <15). Bactérias com seqüências similares foram comparadas contra o banco de dados através das ferramentas *nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e o *Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology* (MG-RAST) (MEYER *et al.*, 2008), visando a identificação dos

gêneros bacterianos. As sequências geradas neste estudo foram depositados no GenBank.

Para a análise filogenética pelo método de distância (NJ- *neighbor-joining*) (SAITOU & NEI, 1987), as sequências de 16S rRNA obtidas e outras sequências escolhidas retiradas do NCBI foram alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW contido no programa MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011). O ajuste das extremidades das sequências a fim de estas estivessem todas alinhadas e com o mesmo número de bases foi realizado com o uso do programa MEGA versão 5.0 . O calculo da significância estatística da similaridade entre as sequências foi realizada a análise de reamostragem ou *bootstrap* para 1.000 replicações. A árvore filogenética foi gerada usando as distâncias calculadas pelo método de Kimura-2, sendo também desenvolvido no programa MEGA versão 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Ensaio enzimático

Os resultados da avaliação enzimática dos fluidos proteicos extraídos do trato digestivo das larvas indicaram a incapacidade de degradação de MCC e uma baixa capacidade de degradação de CMC, 1,24 U.mg<sup>-1</sup> de proteína do trato digestivo em *Stenochironomus 1* a 50°C e 1,52 U.mg<sup>-1</sup> de proteína do trato digestivo em *Stenochironomus 2* a 18°C (Figura 5.1.1.).

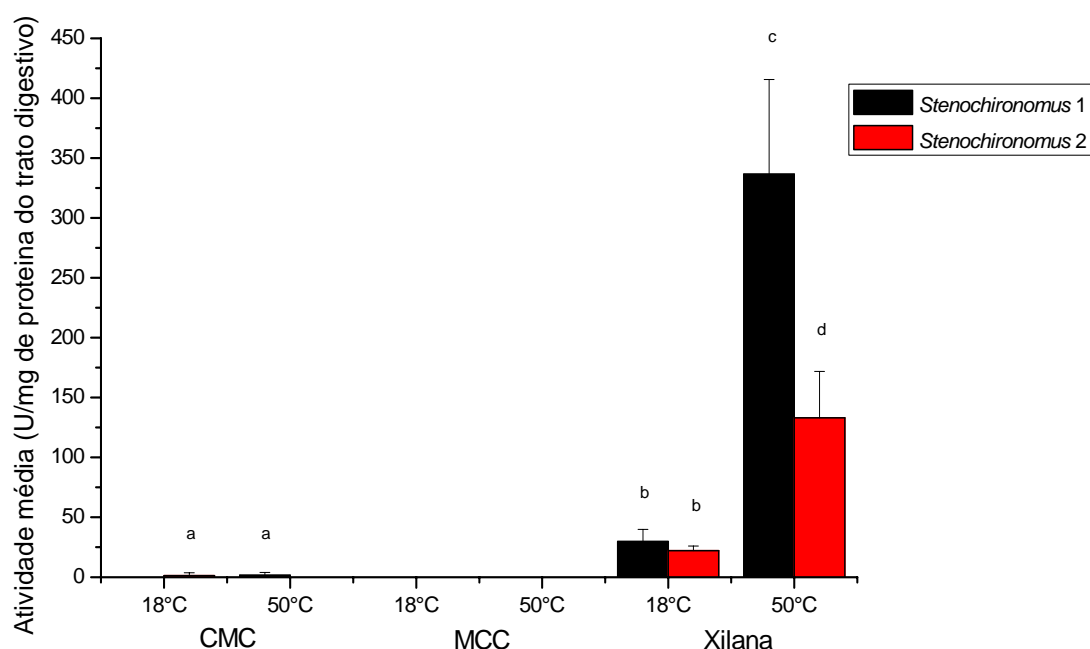


Figura 5.1.1. Resultados das atividades celulásica e hemicelulásica específicas (unidades por mg de proteína) dos fluidos digestivos intestinais dos dois morfotipos de *Stenochironomus*. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definido como 1  $\mu$ M de açúcar reduzido liberado por minuto na temperatura especificada e a pH 6,0. Diferentes letras indicam diferença significativa no teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Em contra partida, os resultados da avaliação da capacidade de degradação de xilana demonstraram atividade catalítica no trato digestivo de ambos os morfotipos larvais. Em *Stenochironomus 1* a capacidade de degradação foi em média 29 U.mg<sup>-1</sup> proteína do trato digestivo e 336 U.mg<sup>-1</sup> proteína do trato digestivo a 18°C e 50°C, respectivamente, sendo que em *Stenochironomus 2*, a média de 22 e 133 U.mg<sup>-1</sup> proteína do trato digestivo a 18°C e a 50°C, respectivamente (Figura 5.1.1.). Apesar das médias estatisticamente não apresentarem diferenças significativa a 18°C (p>0.05), as médias foram diferentes entre os morfotipos e a 50°C (p<0.05).

## 5.2. Avaliação bacteriana

Trinta e um morfotipos de colônias de bactérias foram isoladas nos tratos digestivos dos dois tipos de larvas, sendo oito morfotipos em *Stenochironomus 1* e vinte e três morfotipos em *Stenochironomus 2* (Tabela 5.2.1.). Através da visualização dos halos em placa, os resultados indicaram que dezenove morfotipos possuem capacidade de degradar o substrato e foram subsequentemente submetidas à identificação molecular. Nenhuma bactéria capaz de degradar lignina foi observada (Tabela 5.2.2.).

Tabela 5.2.1. Número de morfotipos isolados com capacidade de degradação do substrato o qual foi isolado.

Inseto \ Substrato	CMC		Xilana		Celobiose		Lignina		Total	
	Nº de morf. isolados	Nº de morf. degradadores	Nº de morf. isolados	Nº de morf. degradadores	Nº de morf. isolados	Nº de morf. degradadores	Nº de morf. isolados	Nº de morf. degradadores	Nº de morf. isolados	Nº de morf. degradadores
<i>Stenochironomus 1</i>	3	2	3	3	2	2	0	0	8	7
<i>Stenochironomus 2</i>	4	2	8	4	8	6	3	0	23	12
Total	7	4	11	7	10	8	3	0	31	19

Nº - Número; morf. - morfotipo

Tabela 5.2.2. Afiliação taxonômica e a capacidade de degradação das bactérias encontradas no trato digestivo nos dois morfotipos larvais de *Stenochironomus*.

Inseto	N° acesso do GenBank	Gênero	Identificação (%)	Atividade enzimática			
				CMC	Xilana	Celobiose	Lignina
Chironomidae							
<i>Stenochironomus 1</i>	HM484307	<i>Sphingobium</i>	99.00	+	+	+	-
	HM484320	<i>Pseudomonas</i>	98.00	-	+	+	-
	HM484312	<i>Pseudomonas</i>	99.00	-	+	-	-
	HM484313	<i>Pseudomonas</i>	98.00	+	+	+	-
	HM484310	<i>Pseudomonas</i>	99.00	-	+	-	-
	HM484323	<i>Rhodococcus</i>	98.00	+	+	+	-
	HM484324	<i>Pseudomonas</i>	98.00	+	+	+	-
<i>Stenochironomus 2</i>	HM484318	<i>Variovorax</i>	98.00	+	-	+	-
	HM484316	<i>Rhodococcus</i>	99.00	+	+	+	-
	HM484315	<i>Bacillus</i>	100.00	-	-	+	-
	HM484319	<i>Acinetobacter</i>	99.00	+	-	+	-
	HM484317	unclassified Betaproteobacteria	98.00	+	-	+	-
	HM484306	<i>Bacillus</i>	99.00	-	-	+	-
	HM484309	<i>Sphingobium</i>	100.00	+	+	+	-
	HM484311	<i>Sphingobium</i>	98.00	+	+	+	-
	HM484308	<i>Bacillus</i>	98.00	+	+	-	-
	HM484322	<i>Variovorax</i>	97.00	+	-	+	-
	HM484325	<i>Rhodococcus</i>	99.00	+	+	+	-
HM484314	<i>Acinetobacter</i>	99.00	+	-	-	-	

+, capacidade de degradação do substrato; -, incapacidade de degradação do substrato

Os resultados indicaram que as larvas de *Stenochironomus* 1 possuem maior densidade de bactérias capazes de degradar xilana ( $1,75 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ ) e celobiose ( $5,09 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ ) e a menor densidade de bactérias capazes de degradar CMC ( $1,63 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ ) em comparação com *Stenochironomus* 2 com valores em média  $1,39 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  para xilana,  $1,60 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  para celobiose e  $2,04 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  para CMC (Figura 5.2.1.).

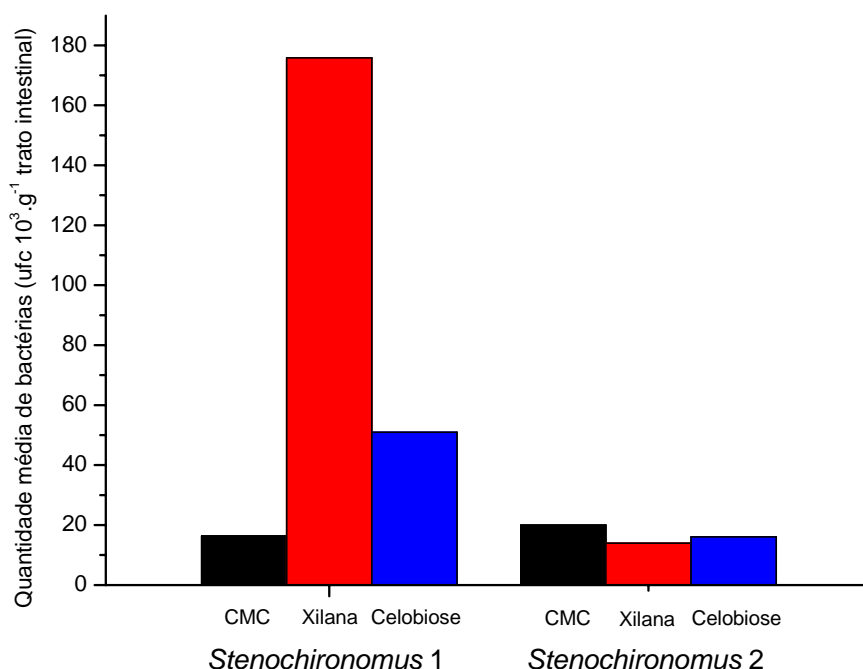


Figura 5.2.1. Valores das densidades média de bactérias capazes de degradar os diferentes substratos nos dois morfotipos de larvas de *Stenochironomus* analisados.

A análise das sequências do gene 16S rRNA dos isolados construída pelo método de “neighbor-joining” indicou cinco agrupamentos filogenéticos (Figura 5.2.2.). Entre os isolados, sete pertencem a  $\gamma$ -proteobacteria, enquanto Actinobacteria, Firmicutes,  $\alpha$ -proteobacteria e  $\beta$ -proteobacteria formaram três isolados cada.

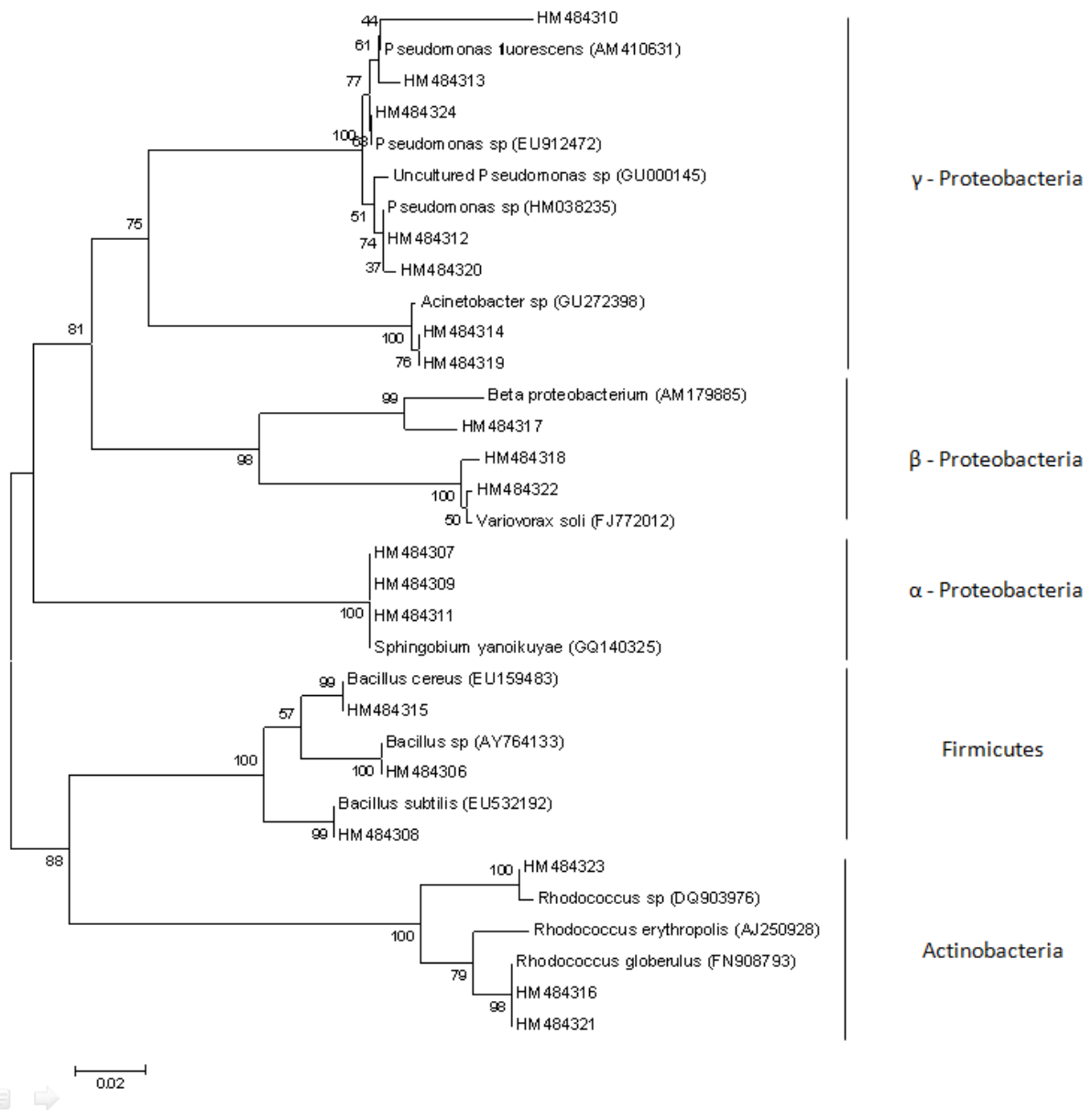


Figura 5.2.2. Árvore filogenética não-enraizada baseada nas sequências do gene 16S rRNA-V3 obtidas neste estudo. Nomes científicos indicam as sequências obtidas do GenBank. A árvore foi construída pelo método de “neighbor-joining” e as distâncias foram calculadas pelo método de Kimura-2. Os números dos nós internos são os valores de *bootstrap* (%) para 1.000 réplicas. A escala indica 2% de divergência das sequências.

As larvas de *Stenochironomus 2* possuem maior riqueza de bactérias e os maiores valores do Índice Enzimático para todos os substratos que ocorreram degradação. Entre as bactérias com maior atividade enzimática, as do gênero *Sphingobium* foram encontradas em ambos morfotipos de larvas. Os resultados indicaram que o gênero *Variovorax* é capaz de degradar CMC e celobiose e o gênero *Bacillus* tem alta capacidade de degradação nos diferentes substratos (Figura 5.2.3).



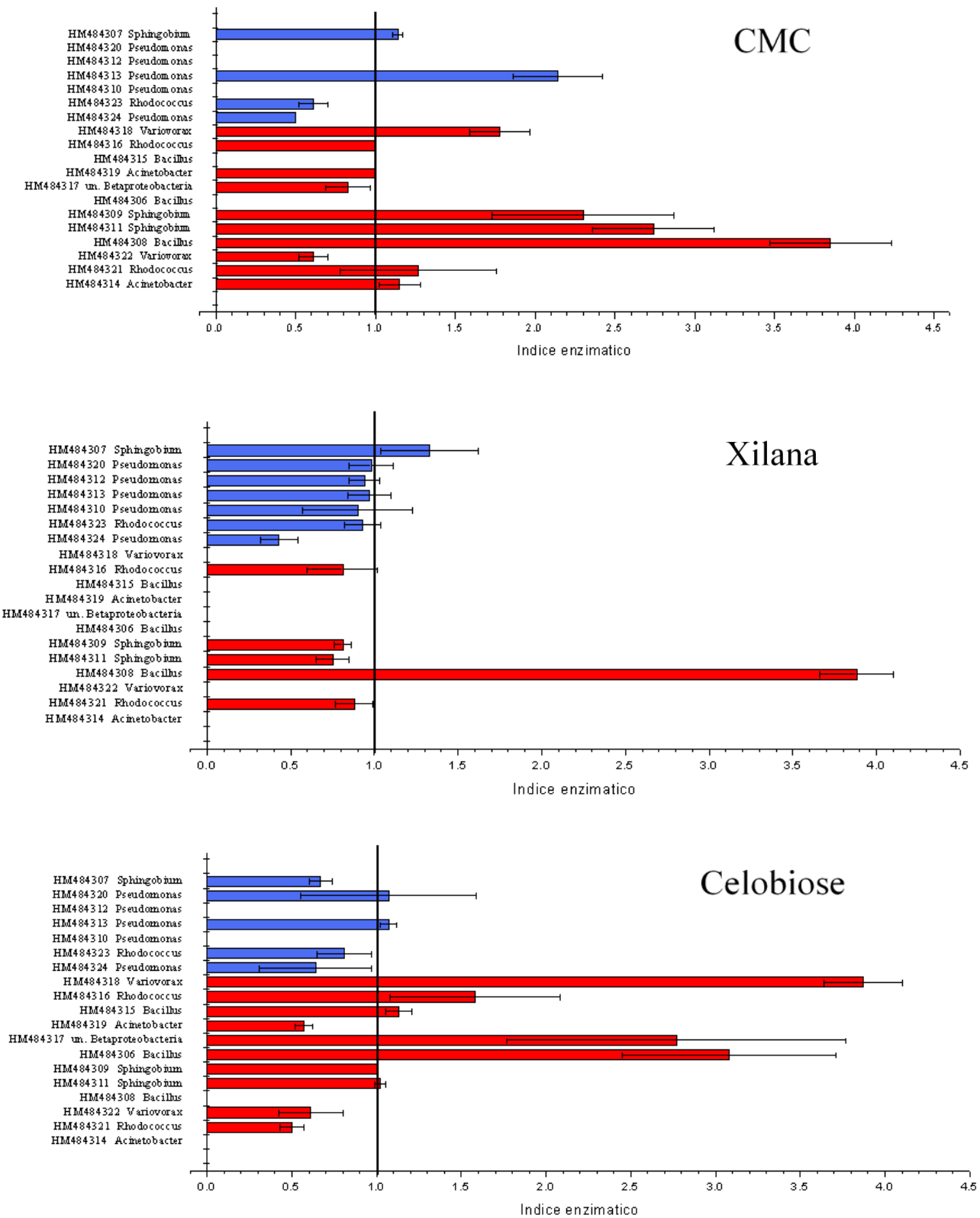


Figura 5.2.3. Resultado das análises da atividade enzimática das bactérias isoladas do trato digestivo dos dois morfotipos de *Stenochironomus*; █, refere às bactérias isoladas das larvas de *Stenochironomus* 1; █, refere as bactérias isoladas das larvas de *Stenochironomus* 2; , refere ao desvio padrão do Índice enzimático; Valores acima de 1,0 são um indicativo de excreção de enzimas .

## 6 DISCUSSÃO

---

Nos ambientes de água doce, seja lântico ou lótico, em região temperada ou tropical (SIMONIS *et al.*, 2008), a atividade de degradação de troncos submersos por microrganismos é caracterizada pela perda de massa e crescimento restrito a regiões superficiais úmidas da madeira (ZARE-MAIVAN & SHEARE, 1988). Este processo é realizado por bactérias e fungos, principalmente por organismos da divisão Ascomycota, cujo tipo de degradação, denominado “*soft rot*” (degradação branda), ocorre pela ação de exoenzimas na parede celular secundária dos troncos, amaciando as camadas exteriores da madeira pela quebra de complexos compostos de carbono, como a celulose, e lignina. Esta degradação promove a exposição dos componentes da estrutura fibrilar e fornece compostos de carbono simples que podem se desprender ou ficarem disponíveis para o consumo de outros organismos, como os invertebrados (SAVORY, 1954; SIMONIS *et al.*, 2008).

Os resultados desta pesquisa indicaram que as larvas de *Stenochironomus* possuem limitada capacidade de degradação de celulose, mas com habilidade para degradação de xilana. Estes resultados, juntamente com evidências ecológicas e fisiológicas, possibilitam inferir que a preferência por este tipo de substrato pode estar relacionada com o tipo de degradação microbiana e a disponibilização de compostos promovida por microrganismos.

A grande concentração de microrganismos e fungos nas camadas mais externas e úmidas dos troncos foi sugerido por MAGOULICK (1998) como provável motivo das larvas de *Stenochironomus* ocorrer em troncos com consistência macia. Apesar da discutível digestão e assimilação do carbono de origem microbiana nas larvas de quironomídeos (PINDER, 1986) a atividade de fungos e bactérias é importante na

ciclagem de carbono nos ecossistemas dulcícolas, visto sua produção de enzimas degradativas de materiais lignocelulósicos (SIMONIS *et al.*, 2008).

A presença de um pH intestinal próximo a neutralidade no trato digestivo das larvas de quironomídeos (FROUZ *et al.*, 2007) possibilita uma condição favorável ao crescimento e a atividade enzimática microbiana, visto que o pH neutro permite o crescimento da maioria das bactérias e fungos, inclusive de espécies celulolíticas (LANDAUD *et al.*, 1995).

Deste modo, o fornecimento direto de compostos de carbono simples presentes na madeira, a exposição de compostos fibrilares digeridos pelo inseto tal como a xilana e condições fisiológicas do trato digestivo que permitem a multiplicação e a atividade enzimática microbiana, são fatores que devem contribuir no fornecimento de compostos energéticos para as larvas de *Stenochironomus*.

Apesar de ser comum a capacidade da degradação de celulose por insetos minadores terrestres (WATANABE & TOKUDA, 2010), ZVERLOV *et al.* (2003) reportaram que larvas de *Rhagium inquisitor* (Coleoptera:Cerambycidae), besouro conhecido como minador de troncos da Euroásia, são incapazes de degradar celulose; as larvas desta espécie possuem no trato digestivo uma diversidade enzimática capaz de degradar outros polissacarídeos e oligossacarídeos, onde discute-se a possibilidade de ser esta sua fonte de carboidratos. Apesar de avaliarmos o uso de celulose e xilana, a hipótese da utilização de outros carboidratos também deve ser considerada para as larvas de *Stenochironomus*.

Existem diversos trabalhos que discutem a capacidade de hidrólise de celulose e hemicelulose em insetos minadores (e.g. MARTIN *et al.*, 1981; OPPERT *et al.*, 2010), contudo as diferentes metodologias utilizadas dificultam a comparação dos resultados com os dados desta dissertação. Outro fato que impede a comparação com os resultados

de outros trabalhos é o valor da temperatura estabelecido nas análises para a determinação da atividade enzimática, sendo geralmente maior a degradação quando as temperaturas são superiores aquelas onde vivem os insetos, como demonstrado nesta dissertação (Figura 5.1.1.) (MARTIN *et al.*, 1981; SAMI *et al.*, 2010). Em comparação com o trabalho de SHI *et al.* (2010), cuja metodologia para a quantificação dos açúcares redutores foi semelhante ao utilizada neste trabalho, os valores encontrados para larvas de *Stenochironomus* foram inferiores em relação àqueles observados em larvas de besouros terrestres (284  $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para carboximetil celulose e 4.800  $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para xilana; pH 7,0 a 50°C), porém próximos aos encontrados em larvas fitófagas de bicho-de-seda (74  $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para carboximetil celulose e 600  $\mu\text{M}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para xilana; pH 7,0 a 50°C).

A quantificação bacteriana, apesar de não ter sido realizada individualmente como em outros trabalhos que visam caracterizar possíveis espécies resilientes no trato digestivo (DELALIBERA-JR *et al.*, 2005; DELALIBERA-JR *et al.*, 2007), permitiu a comparação dos valores registrados em outros insetos. Em relação aos valores encontrados em larvas de baratas (CRUDEN & MARKOVETZ, 1979) e de cupins (WENZEL *et al.*, 2002) estes apresentaram de cem a mil vezes inferiores a quantidade estipulada para estes insetos; contudo o resultado deste trabalho apresentou ser próximos aos encontrados em larvas de besouros. GEIB *et al.*, (2009; 2010), por exemplo, avaliando a comunidade bacteriana cultura-dependente de *Anoplophora glabripennis*, inseto que se acreditam ter a colaboração de exoenzimas microbiana, observaram-se em média  $2,6 \cdot 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> no intestino desse inseto em meio seletivo de carboximetil celulose, quantidade próxima a encontradas neste estudo para larvas de *Stenochironomus*.

Os resultados das análises das espécies bacterianas isoladas do trato digestivo das larvas de *Stenochironomus* foram semelhantes aos encontrados para outros insetos capazes de degradar constituintes de madeira. Os cinco agrupamentos filogenéticos obtidos neste estudo também foi observado no trato digestivo de outros insetos xilófagos e fitófago (BRODERICK *et al.*, 2003; VASANTHAKUMAR *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2007). Como exemplo, a maior proporção de isolados cultiváveis de  $\gamma$ -Proteobacteria, também foi observado em diferentes espécies de besouros (PARK *et al.*, 2007) e em largatas de mariposa-cigana (BRODERICK *et al.*, 2003). Ao nível genérico, *Bacillus* e *Pseudomonas* são reconhecidas por suas consideráveis habilidades em degradar biopolímeros (GILBERT & HAZLEWOOD, 1993) e são comuns no trato digestivo de diversos insetos saproxílicos como tipulídeos, cupins e besouros cerambicídeos (MOORE, 1972; WENZEL *et al.*, 2002; COOK *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2007).

Além dessas bactérias, neste estudo evidenciou-se a presença da bactéria *Sphingobium* em ambos os tipos de larvas analisadas. A alta versatilidade no catabolismo de compostos (KIM *et al.*, 1997) inclusive de celulose (DELALIBERA-JR *et al.*, 2005), e a presença no trato digestivo de larvas de *Saperda vestita* (Coleoptera:Cerambycidae) observadas em períodos e procedências distintas, embasou a hipótese de DELALIBERA-JR *et al.*(2005) de uma possível colaboração dessa bactéria na degradação de madeira ingerida pelo besouro acima citado.

Durante o desenvolvimento desta dissertação diversas tentativas de depuração e de criação isolada das larvas de *Stenochironomus* foram realizadas, utilizando-se metodologias descritas para outras espécies da família Chironomidae (RISTOLA, 1995; MOORE *et al.*, 2003), contudo não se obteve êxito. Este fato limitou a possibilidade de

gerar maiores informações sobre a capacidade enzimática endógena, da resiliência de microrganismos e da importância bacteriana no trato digestivo das larvas estudadas.

Ressalta-se que este trabalho é o primeiro registro de bactérias e enzimas hidrolíticas de compostos lignocelulósicos no trato digestivo de quironomídeos minadores.

## 7 CONCLUSÕES

---

Neste estudo observou-se uma baixa capacidade de degradação de celulose frente à de xilana no trato digestivo de larvas de *Stenochironomus*. Acredita-se que a degradação da madeira realizada por microrganismos auxiliem na utilização desse recurso, seja fornecendo compostos de carbono degradados ou expondo as fibras à degradação.

Foi possível também detectar bactérias degradadoras de compostos celulósicos no trato intestinal de larvas de *Stenochironomus*. Os gêneros e a quantidade média das bactérias foram semelhantes aos outros insetos que se beneficiam da produção de exoenzimas. Tais indícios evidenciam a existência de contribuição microbiana na digestão de madeira também dentro do trato digestivo.

## **8 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

---

A partir dos resultados deste trabalho diversas questões quanto à importância dos troncos submersos, a função e a interação de microrganismos com as larvas de *Stenochironomus* devem ser investigados, tais como

- (1) a eficiência de assimilação de açúcares oriundo dos materiais lignocelulósicos;
- (2) a representatividade das enzimas fúngicas e bacterianas na capacidade digestiva da madeira presente no trato digestivo do inseto;
- (3) a resiliência de fungos e bactérias no trato digestivo em diferentes estádios e diferentes estágios;
- (4) as diferenças da comunidade microbiana entre indivíduos e entre populações.
- (5) avaliação da microbiota não cultivável e microrganismos anaeróbios.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anderson, N.H., 1982. A survey of aquatic insects associated with wood debris in New Zealand streams. *Mauri Ora* 10, 21-33
- Anderson, N.H., Steedman, R.J., Dudley, T., 1984. Patterns of exploitation by stream invertebrates of wood debris (xylophagy). *Verh. Int. Verein. Limnol.* 22, 1847-1852.
- Baker, J.H., Brandnam, L.A., 1976. The role of bacteria in the nutrition of aquatic detritivores. *Oecologia* 24, 95-104.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biot.* 56, 326-338.
- Berg, M.B., 1995. Larval food and feeding behaviour. *In: Armitage, P.D., Cranston, P.S., Pinder, L.C.V. (eds.) The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges, Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, pp. 136-168.*
- Bononi, V.L.R., 1997. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos. *In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) Microbiologia Ambiental, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, Brasil, pp. 243-268.*
- Borkent, A., 1984. The systematics and phylogeny of the *Stenochironomus* complex (*Xestochironomus*, *Harrisius*, and *Stenochironomus*) (Diptera: Chironomidae). *Mem. Entomol. Soc. Can.* 128, 1-269.
- Braga, R.M., Faheina-Jr, G.S., Lopes, V.R.O., Martins, S.C., Martins, C.M., Pinto, G.A.S., 2009. Avaliação da produção de Celulase por Cepas de *Fusarium*. *In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal, RN. Disponível em <*

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPAT-2010/11483/1/AT09042.pdf>>

. Acessado em 20 de janeiro de 2011.

- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Goodman, R.M., Handelsman, J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* , 70, 293-300.
- Brune, A., 2006. Symbiotic associations between termites and prokaryotes. *In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. The Prokaryotes: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology –Volume 1, Springer, Nova Iorque, EUA.*
- Cappuccino, J.G., Sherman, N., 2001. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 6ª edição, Benjamin Cummings, Menlo Park, EUA.
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E.. C., Vieira, J.D.G., 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49, 353-359.
- Charrier, M., Combet-Blanc, Y.; Ollivier, R. B., 1998. Bacterial flora in the gut of *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata): evidence for a permanent population with a dominant homolactic intestinal bacterium, *Enterococcus casseliflavus*. *Can. J. Microbio.* 44, 20-27.
- Cook, D.M., Henriksen, E.D., Upchirc, R., Peterson, J.B.D., 2007. Isolation of Polymer-Degrading Bacteria and Characterization of the Hindgut Bacterial Community from the Detritus-Feeding Larvae of *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). *Appl. Environ. Microb.* 73 (17), 5683-5686.

- Cook, D.M., Henriksen, E. D., Rogers, T.E., Peterson, J.D., 2008. *Klugiella xanthotipulae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Microbacteriaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 2779–2782.
- Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev., 17, 840–862.
- Cranston P.S., 1995. Introduction In: Armitage, P.D., Cranston, P.S., Pinder, L.C.V. (eds.) The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges, Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, pp.1-7.
- Cranston, P.S., Martin, J., 2007. Family Chironomidae. In: Evenhuis, N.L. (ed.), Catalog of the Diptera of the Australasian and Oceanian Regions. (online version). Disponível em <http://hbs.bishopmuseum.org/aocat/chiro.html>. Acessado em 18 de janeiro de 2011.
- Cranston, P.S, McKie, B., 2006. Aquatic wood – an insect perspective. In: Grove, S.J., Hanula, J.L. (Eds). Insect Biodiversity and Dead Wood: Proceedings of a Symposium for the 22nd International Congress of Entomology. General Technical Report SRS-93, US Department of Agriculture Service, Southern Research Station. Asheville, NC, EUA, pp. 9-14.
- Cruden, D. L., Markovetz, A.J., 1979. Carboxymethyl cellulose decomposition by intestinal bacteria of cockroaches. Appl. Environ. Microb. 38, 369-372.
- Dantas, G.P.S., 2010. Taxonomia de *Stenochironomus* Kieffer, 1919 (Chironomidae:Diptera) na Amazônia Central, Brasil. 106 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazonia, Manaus, AM.
- Delalibera-Jr., I., Handelsman Jr., J., Raffa, K.F., 2005. Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera:

- Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 34, 541-547.
- Delalibera-Jr, I. Vasanthakumar, A., Burwitz, B.J., Schloss, P.D., Klepzig, K.D., Handelsman, J., Raffa, K.F., 2007. Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera) colonizing red pine. *Symbiosis* 43, 97-104.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 71–92.
- Dröge, S.; Frolich, J.; Radek, R.; König, H., 2006. *Spirochaeta coccooides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1), 392–397.
- Dudley, T.; Anderson, N. H., 1982. A survey of invertebrates associated with wood debris in aquatic habitats. *Melandria* 39, 1-21.
- Frouz J, Lobinske RJ, Yaqub A, Ali A., 2007. Larval gut pH profile in *pestiferous Chironomus crassicaudatus* and *Glyptotendipes paripes* (Chironomidae: Diptera) in reference to the toxicity of *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 23, 355-358
- Fungaro, M. H. P., Maccheroni Jr., W., 2002. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos. In: Melo, I. S., Valadares-Inglis, M. C., Nass, L. L., Valois, A.C.C. (Eds.). *Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo*. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, Brasil, pp. 426-453.
- Geib, S.M., Jimenez-Gasco, M.D.M., Carlson, J.E., Tien, M., Hoover, K., 2009 Effect of Host Tree Species on Cellulase Activity and Bacterial Community Composition in the Gut of Larval Asian Longhorned Beetle. *Environ. Entomol.* 38, 686-699.
- Geib, S.M., Tien, M., Hoover, K., 2010. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based

- peptide analysis of gut proteins from larval Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. *Insect Sci.* 17, 253–264.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139, 187-194.
- Giovannoni, S.J., 1991. The Polymerase chain reaction. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA, pp.177-203.
- Grove, S.J., 2002. Saproxylic insect ecology and the sustainable management of forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 1-23.
- Grove, S. J., Stork, N. E., 1999. The conservation of saproxylic insects in tropical forests: a research agenda. *J. Insect Conserv.* 3, 67-74.
- Guazzaroni M.E., Beloqui A., Golyshin P.N., Ferrer M., 2009. Metagenomics as a new technological tool to gain scientific knowledge *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 945-954.
- Gulis, V. Rosemond, A.D., Suberkropp, K., Weyers, H.S., Benstead, J.P., 2004. Effects of nutrient enrichment on the decomposition of wood and associated microbial activity in streams. *Freshw. Biol.* 49, 1437-1447.
- Gulmann, L. K., 2004. Gut-associated microbial symbionts of the marsh fiddler crab, *Uca pugnax*. Tese (Doutorado em Oceanografia biológica). 2004. 160 f. Massachusetts Institute of Technology/Woods Hole Oceanographic, Woods Hole, MA, EUA.
- Guo, Y., Ribiero, J.M., Anderson, J.M., Bour, S., 2009. dCAS: a desktop application for cDNA Sequence annotation. *Bioinformatics* 25, 1195-1196.
- Hall-Jr., R. O., Meyer, J. R., 1998. The tropic significance of bacteria in a detritus-based stream food web. *Ecology* 79, 1995-2012.

- Hankin, L., Anagnostakis, S. L., 1975. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi, *Mycologia* 67, 597-607.
- Harayama, S., Kasai, H., 2006. Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. In: Stackebrandt, E. (Ed.), *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Springer, Nova Iorque, EUA, pp. 105-140.
- Hofer, N., Richardson, J. S., 2007. Comparisons of the colonisation by invertebrates of three species of wood, alder leaves, and plastic "leaves" in a temperate stream. *Int. Rev. Hydrobiol.* 6, 647-655.
- Hoffman, A., Hering, D., 2000. Wood-associated macroinvertebrate Fauna in Central European Streams. *Int. Rev. Hydrobiol.* 85, 25-48.
- Hostettler, F., Borel, E., Deuel, H., 1951. Über die Reduction der 3,5-Dinitrosalicylsäure durch Zucker (Reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid by sugars). *Helv. Chim. Acta* 34, 2132-2139.
- Johnson, R. K., Bostrom, M. B., Van de Bund, W., 1989. Interactions between *Chironomus plumosus* (L.) and the microbial community in surficial sediments of a shallow eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 34, 992-1003.
- Kaufman, M. G., King, R.H., 1987. Colonization of wood substrates by the aquatic xylophage *Xylotopus par* (Diptera: Chironomidae) and a description of its life history. *Can. J. Zool.* 65, 2280–2286.
- Kaufman, M.G., Pankratz, H.S., Klug, M.J., 1986. Bacteria associated with the ectoperitrophic space in the midgut of the larva of the midge *Xylotopus par* (Diptera: Chironomidae). *Appl. Environ. Microb.* 51, 657-660.
- Kim, E., Zylstra, G. J., Freeman, J.P., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., 1997. Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 479-484.

- Koroiva, R., Fonseca-Gessner, A.A., Valente-Neto, F., Roque, F.O., 2009. Relação entre características morfológicas de troncos submersos e ocorrência de larvas de dípteros saproxilófilos em um córrego em mata Atlântica semidecídua no sudeste do Brasil. In: IX Congresso de Ecologia do Brasil. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, MG. Disponível em <[www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos\\_ixceb/91.pdf](http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_ixceb/91.pdf)>. Acessado em 20 de Janeiro de 2011.
- Landaud, S., Piquerel, P., Pourquié, J., 1995. Screening for bacilli producing cellulolytic enzymes active in the neutral pH range. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 319–321.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing In: Stackebrandt, E, Goodfellow, M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA, pp.115-175.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Magoulick, D.D., 1998. Effect of wood hardness, condition, texture and substrate type on community structure of stream invertebrates. *Am. Midl. Nat.* 139, 187-200.
- Martin, M.M., 1983. Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Phys. A* 75, 313-324.
- Martin, M.M., 1991. The Evolution of Cellulose Digestion in Insects. *Philos. T. Roy. Soc. B* 333, 281-288.
- Martin M. M., Kukor J. J., Martin J. S., Lawson D. L., Merritt R. W., 1981. Digestive enzymes of larvae of three species of caddisflies (Trichoptera). *Insect Biochem.* 11, 501-505.
- Martinez, A.T., 2007. High redox potential peroxidases. In: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Ed.) *Industrial Enzymes: structure, function and applications*. Springer; Nova Iorque, EUA, 477-488.

- Mathew, D., Habeeburrahman, P. V., 2008. Invasion and severe outbreak of the lotus lily Midge *Stenochironomus nelumbus* Tok et Kur (Diptera: Chironomidae) in Indian freshwater ecosystems. *Curr. Sci.* 94, 1569-1570.
- Mathooko, J. M., Otieno, C. O., 2002. Does surface textural complexity of woody debris in lotic ecosystems influence their colonization by aquatic invertebrates?. *Hydrobiologia* 489, 11-20.
- McKie, B., Cranston, P. S., 2001. Colonisation of experimentally immersed wood in south-eastern Australian: responses of feeding groups to changes in riparian vegetation. *Hydrobiologia*, 452, 1-14.
- Mendes, H. F., Pinho, L. C., 2006. Diptera: Chironomidae. In: Levantamento e biologia de Insecta e Oligochaeta aquáticos de sistemas lóticos do Estado de São Paulo. Disponível em <<http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/chironomidae/chiroindex.htm>> Acessado em 20 de janeiro 2011.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R.A., 2008. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9, 386.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Moore, G.E., 1972. Microflora from the alimentary tract of healthy southern pine beetles, *Dendroctonus frontalis* (Scolytidae), and their possible relationship to pathogenicity. *J. Invertebr. Pathol.* 19, 72-75.
- Moore, B.C., Martinez, E., Gay, J.M., Rice, D.H., 2003. Survival of *Salmonella entericain* freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). *Appl. Environ. Microb.* 69, 4556-4560.



- Oppert, C., Klingeman, W.E., Willis, J.D., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J.L., 2010. Prospecting for cellulolytic activity in insect digestive fluids. *Comp. Biochem. Phys. B* 155, 145–154.
- Park, D.S., Oh, H.W., Jeong, W.J., Kim, H., Park, H.Y., Bae, K.S., 2007. A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *J. Microbiol.* 45, 394-401.
- Pepinelli, M., 2003. Diversidade de simuliidae (Diptera, Nematocera) em córregos do estado de São Paulo, Brasil. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Petersen, R.C., Cummins, K.W., 1974. Leaf processing in a woodland stream. *Freshw. Biol.* 4, 343-368.
- Petersen, R. C., Cummins, K.W., Ward, G.M., 1989. Microbial and animal processing of detritus in a woodland stream. *Ecol. Monog.* 59, 21–39.
- Pinder, L.C.V., 1986. Biology of freshwater Chironomidae. *Ann. Rev. Entomol.* 31, 1-23.
- Ramin, M., Alimon, A.R., Abdullah, N., 2009. Identification of cellulolytic bacteria isolated from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren). *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.* 17 (1), 103-116.
- Ristola T., 1995. Effects of feeding regime on the results of sed-iment bioassays and toxicity tests with chironomids. *Ann. Zool. Fenn.* 32, 257–264.
- Rodrigues, S., 2003. Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor. 250 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.
- Rogers, T. E., Doran-Peterson, J., 2010. Analysis of cellulolytic and hemicellulolytic enzyme activity within the *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae) larval gut and

- characterization of *Crocebacterium ilecola* gen. nov., sp. nov., isolated from the *Tipula abdominalis* larval hindgut. *Insect Sci.* 17, 291–302.
- Roling, W. F. M., Head, I. M., 2005. Prokaryotic systematics: PCR and sequence analysis of amplified 16S rRNA genes. In: Osborn, M.A., Smith, C.J. (Eds.) *Molecular Microbial Ecology*, Taylor & Francis Group, Londres, Reino Unido, pp. 25-57.
- Rouf, M.A., Rigney, M.M., 1993. Bacterial Florae in Larvae of the Lake Fly *Chironomus plumosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1236-1241.
- Ruhl, M., Kilaru, S., Navarro-González, M., Hoegger, P. J., Kharazipour, A.; Kues, U., 2007. Production of laccase and other enzymes for wood industry. In: Kues, U. (Ed.), *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*. Universitätsverlag Göttingen, Göttingen, Alemanha, pp.469-508.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sakamoto, K., Touhata, K., Yamashita, M., Kasai, A., Toyohara, H., 2007. Cellulose digestion by common Japanese freshwater clam *Corbicula japonica*. *Fisheries Sci.* 73(3), 675-683.
- Sami, A.J., Tabassum, F., Shakoori, A.R., 2010. Biodegradation of cellulose and xylan by a paddy pest, *Oxya chinensis*, *Ann. Biol. Res.* 1, 1-12.
- Savory, J.G., 1954. Breakdown of timber by ascomycetes and fungi imperfect. *Ann. Appl. Biol.* 41, 336-347.
- Saxena, I.M., Brown- Jr, R.M., 2005. Cellulose Biosynthesis: Current views and evolving concepts. *Ann. Bot.* 96, 9-21.
- Schloss, P.D., Delalibera-Jr, I., Handelsman, J., Raffa, K.F., 2006. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 35, 625-629.

- Shi, W.B., Ding, S.Y., Yuan, J.S., 2010. Comparison of insect gut cellulase and xylanase activity across different insect species with distinct food sources. *Bioenergy Research* 4, 1-10.
- Simonis, J. L., Raja, H.A., Shearer, C.A., 2008. Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in fresh water? *Fung. Diver.* 31, 135-146.
- Sinsabaugh, R. L., Linkins, A.E., Benfield, E.F., 1985. Cellulose digestion and assimilation by three leaf-shredding aquatic insects. *Ecology* 66, 1464-1471.
- Siqueira, T., Roque, F.O., Trivinho-Strixino, S., 2008. Phenological patterns of neotropical lotic chironomids: Is emergence constrained by environmental factors? *Austral Ecol.* 33, 902-910.
- Strahler, A. N., 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Trans. Am. Geophys. Union* 38, 913-920.
- Sundman, V., Nase, L., 1971. A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Pap. Tim.* 53, 65-71.
- Suriano, M. T., Fonseca-Gessner, A.A., 2004. Chironomidae (Diptera) Larvae in streams of Parque Estadual de Campos do Jordão, São Paulo state, Brazil. *Acta Limn. Bras.* 16, 129-136.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, (submitted)
- Teather, R. M., Wood, P. J., 1984. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microb.* 43, 777-780.
- Trivinho-Strixino, S., Strixino, G., 1998 Chironomidae (Diptera) associados a troncos de árvores submersos. *Rev. Bras. Entomol.* 41, 173-178.

- Valente-Neto, F., Fonseca-Gessner, A.A., Roque, F.O., Koroiva, R., 2008. Macroinvertebrados Aquáticos Associados a Troncos Submersos em Córregos no Sudeste Brasileiro. In: II Simpósio de Ecologia do PPGERN da UFSCar, 2008, São Carlos. Anais do II Simpósio de Ecologia do PPGERN da UFSCar, São Carlos, SP.
- Van Aken, B., Agathos, S.N., 2001. Biodegradation of nitro-substituted explosives by ligninolytic white-rot fungi: A mechanistic approach. *Adv. Appl. Microbiol.* 48, 1-77.
- Vannote, R.L., Minshall, K.W., Cummins, J., Sedell, J.R., Cushing, C., 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 130-137.
- Vasanthakumar, A., Delalibera-Jr, I., Handelsman, J., Klepzig, K.D., Schloss, P., Raffa, K.F., 2006. Characterization of gut-associated microorganisms in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmerman. *Environ. Entomol.* 6, 1710-1717.
- Warmke, S., Hering, D., 2000. Composition, Microdistribution and Food of the Macroinvertebrate Fauna Inhabiting Wood in Low - Order Mountain Streams in Central Europe. *Int. Rev. Hydro.* 85(1), 67 - 78.
- Watanabe, H., Tokuda, G., 2010. Cellulolytic system in insects, *Annu. Rev. Entomol.* 55, 609–632.
- Wenzel, M., Schonig, I., Berchtold, M., Kampfer, M., König, H., 2002. Aerobic and facultatively anaerobic from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 32-40.
- Williams, A.G., 1983. Staining reactions for the detection of hemicellulose-degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 253-258.
- Willis, J.D., Klingeman, W.E., Oppert, C., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J.L., 2010. Characterization of cellulolytic activity from digestive fluids of *Dissosteira carolina* (Orthoptera: Acrididae). *Comp. Biochem. Phys. B* 157, 267-272.

- Zandona-Filho, A. 2001. Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. 193 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
- Zare-Maivan, H, Shearer, C.A., 1988. Extracellular enzyme production and cell wall degradation by freshwater lignicolous fungi. *Mycologia* 80, 365–375.
- Zverlov V.V., Höll W., Schwarz W.H., 2003. Enzymes for digestion of cellulose and other polysaccharides in the gut of longhorn beetle larvae, *Rhagium inquisitor* L. (Col., Cerambycidae). *Int. Biodet. Biodegr.* 51, 175-179.

## **APÊNDICE 1**

---

### Tampão Sodio-Citrato (0,05M pH 6,0)

Tampão: 11.5 ml de A – 88.5 ml de B

Avaliar pH no pHmetro.

- ✓ Solução A - Solução de Ácido cítrico 0,05M

Dissolver 1,05g de ácido cítrico em 100 ml de água destilada

- ✓ Solução B - Solução de citrato de sódio 0,05M

Dissolver 1,47g de citrato de sódio em 100 ml de água destilada

## APÊNDICE 2

---

### Reagente DNS ( Miller, 1959 modificado\*)

- ✓ Dissolver em um béquer 600 ml de água destilada:  
10g de Hidróxido de sódio (NaOH) [**CAUIDADO!!!** ALTAMENTE EXOTÉRMICO, ADICIONE LENTAMENTE]
- ✓ 192g de Potássio e sódio tartarato (Sal Rochelle)
- ✓ 10g de ácido dinitrosalicílico (Adicionar lentamente, agitando)

Obs 1: Demora cerca de 3 horas para dissolver o DNS em agitador magnético;

Favor cobrir o béquer no agitador;

Obs 2: Estocar o produto em temperatura ambiente e em local escuro

\*- Modificado, pois não se adiciona Fenol nem Bissulfito de sódio, componentes cancerígenos.

### APÊNDICE 3

---

#### Protocolo de isolamento das bactérias do trato digestivo de *Stenochironomus* sp

##### Dissecação

1. Retirar o inseto inteiro e não danificado do seu local de origem;
2. Manter o inseto em um tubo “safe-lock” com água e em temperatura entre 0 a 4°C em banho Maria de gelo;
3. Em uma capela de fluxo laminar, com todos os instrumentos autoclavados ou deixados ao rubro através de flambador, coloque o inseto, individualmente por 1 minuto em álcool 70°GL;
4. Retire o inseto e lave-o abundantemente com água destilada estéril ou PBS estéril;
5. Em uma lupa, coloque o inseto imerso em PBS estéril em placa de petri, retire a cabeça e realize a dissecação da larva;
6. Retire o trato digestivo e coloque em tubo “safe-lock” autoclavados juntamente com 0,1 ml de PBS estéril; Neste momento deve-se ser realizada a pesagem do trato digestivo. Mantenha os refrigerados;
7. A parte da cabeça e o exoesqueleto deve ser mantido em álcool 70°GL para a posterior confirmação do gênero.