

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM LARVAS
DO CAMPO E LABORATÓRIO DO BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR,
SPHENOPHORUS LEVIS (COLEOPTERA, CUCURLIONIDAE).

RAQUEL RINKE

São Carlos

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL EM LARVAS
DO CAMPO E LABORATÓRIO DO BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR,
SPHENOPHORUS LEVIS (COLEOPTERA, CUCURLIONIDAE).

RAQUEL RINKE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos, como parte
integrante dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva
Prof. Dr. Mauro Biajiz

São Carlos

2009

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

R582cd

Rinke, Raquel.

Comparação da diversidade microbiana intestinal em larvas do campo e laboratório do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Cucurlionidae) / Raquel Rinke. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Diversidade biológica. 2. Pragas da cana-de-açúcar. 3. *Sphenophorus levis*. 4. DNAr 16S. 5. Celulose. 6. Celulase.
I. Título.

CDD: 574 (20^a)

Raquel Rinke

Dissertação de Mestrado submetida a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 28/04/2009

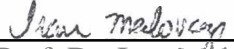
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Flavio Henrique Silva (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar



Prof. Dr. Ariel Domingo Arencibia Rodríguez
Instituto Nacional de investigaciones de la caña de Azúcar - Cuba



Prof. Dr. Iran Malavazi
Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar

Orientadores:

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva
Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Mauro Biajiz
Departamento de Computação da Universidade Federal de São Carlos

Agradecimentos

O grande dia chegou!

Depois de dois anos de muito esforço e superando diversos obstáculos, longe de casa, em uma nova cidade, em um novo laboratório, com novos colegas e amigos... Estou extremamente feliz por ter conseguido superar todos os desafios até aqui. Tenho certeza que todo o esforço valeu a pena!!!

Gostaria de agradecer primeiramente a meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho, pela orientação, pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial científico.

Ao Prof. Dr. Mauro Biajiz, também meu orientador, mesmo não tão presente.

A Luiz Carlos de Almeida do Centro de Tecnologia Canavieira por ter cedido as larvas do *S. levis*, as quais são as “atrizes” deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior pelas ajudas e dicas no início e na finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza por ter disponibilizado a realização de testes de Gram em seu laboratório.

Aos atuais colegas da Pós-Graduação do Laboratório de Biologia Molecular: Fernando (por ter iniciado e me ajudado durante a realização deste trabalho), Kesser, Wilson e Darlan.

Aos colegas que já se foram: Andréia Gianotti, César, Kelly, Simone.

Às minhas amigas fiéis e companheiras Andrea Costa, Marcia e Rosseli. Obrigada pela companhia dentro e fora do laboratório, almoços, discussões científicas, conselhos...

A Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar.

Ao Prof. Fernando Araújo Moreira, coordenador da Pós-Graduação em Biotecnologia, pelas ajudas burocráticas.

A CAPES, pela bolsa de Mestrado durante 12 meses.

A FAPESP - (CBME, CEPID Proc. 98/14138-2).

Aos meus pais por terem me dado todo suporte e apoio mesmo à distância. Sem eles eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por tudo! Desde sempre!!! Ao meu irmão, Marcel, que com certeza, morre de orgulho da sua irmãzinha!

Ao meu namorado Thiago, que está sempre disposto a me ajudar em todos os momentos, principalmente naqueles que eu tive vontade de “fugir”. Muito obrigada por tudo! Teu apoio me dá mais forças para seguir cada vez mais adiante e conquistar novos territórios!

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes culturas no Brasil. No entanto, muitas pragas atacam esta cultura causando prejuízos econômicos. O gorgulho da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, é uma importante praga na cultura canavieira no Estado de São Paulo. Para completar o seu ciclo de vida, *S. levis* parece depender de microorganismos que habitam o seu trato intestinal e desempenham um importante função na fisiologia e nutrição do inseto. Neste estudo, nós realizamos a caracterização da microbiota intestinal de população de larvas de inseto campo e de laboratório. As análises das seqüências de 16S rDNA revelaram um total de catorze gêneros, um grupo da categoria *Candidatus* e dois grupos não-cultiváveis representados pelos filos Alfa-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes tanto em larvas do campo quanto nas do laboratório. Os microorganismos isolados através dos métodos dependentes de cultura foram agrupados de acordo com parâmetros morfológicos e através do marcador moléculas 16S rDNA. Além das bactérias também foram isolados quatro fungos filamentosos. Observou-se uma diversidade bacteriana levemente superior no campo do que no laboratório de acordo com o índice de Shannon (Campo $H' = 3,36$; Laboratório $H' = 3,26$). É também nosso objetivo neste trabalho encontrar microorganismos capazes de degradar celulose, um importante evento no ataque do inseto. Dos microorganismos cultiváveis, cinco gêneros de bactérias e dois fungos filamentosos apresentaram atividade celulolítica. Este é o primeiro estudo sobre a microbiota do *S. levis* que pode contribuir para a compreensão da interação planta-patógeno e também ser útil para o futuro desenvolvimento de novas estratégias de controle de *S. levis* no cultivo da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Pragas da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, 16S rDNA, microbiota intestinal, degradação de celulose, atividade celulolítica

Abstract

The sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*, is an important pest in sugarcane culture in São Paulo state, Brazil. To complete its life cycle, *S. levis* may depend on microorganisms that inhabit its intestinal tract and play an important key in the insect physiology and nutrition. In this study we report the characterization of the intestinal microbiota from population of insect larvae from field and laboratory. Analysis of 16S rDNA sequences revealed a total of fourteen genera, one group from *Candidatus* category and two uncultivable groups represented by Alfa-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes phylum. Microorganisms isolated through culture-dependent methods were classified according morphological parameters and using 16S rDNA molecular marker. In addition to bacteria, four filamentous fungi were isolated. It was observed a slightly higher bacterial diversity in field than in laboratory according to Shannon index (Field $H' = 3,36$; Laboratory $H' = 3,26$). It is also our objective in this work to search for microorganisms capable to degrade cellulose, an important event in the insect attack. From the cultivable microorganisms, five genera of bacteria and two filamentous fungi presented cellulolytic activity. This is the first study about *S. levis* microbiota which may contribute to understand the interaction plant-pathogen and also be useful for future development of new strategies for control of *S. levis* in sugarcane cultivation.

Keywords: Sugarcane pests, *Sphenophorus levis*, 16S rRNA, intestinal microbiota, cellulose degradation, cellulase activity.

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Sphenophorus levis</i> , o gorgulho da cana-de-açúcar	7
Figura 2: Danos causados pelas larvas de <i>S. levis</i> nos colmos e rizomas da cana-de-açúcar ...	10
Figura 3: Esquema representativo da celulose.....	23
Figura 4: Frascos onde as larvas cultivadas em laboratório	28
Figura 5: Etapas durante a dissecação intestinal de <i>S. levis</i>	29
Figura 6: Produto de PCR amplificado.....	31
Figura 7: Mapa do vetor pTZ57 R/T utilizando para as clonagens.	32
Figura 8: Foto mostrando a diversidade de colônias encontradas nas placas contendo o conteúdo intestinal das larvas.	38
Figura 9: Histograma de frequências relativas baseado na distribuição de número de clones de cada biblioteca	46
Figura 10: Análise de rarefação das bibliotecas de 16S rRNA.....	47
Figura 11: Abundância relativa de diferentes filotipos bacterianos da microbiota intestinal de larvas de <i>S. levis</i>	49
Figura 12: Figura mostrando a coloração diferencial entre o conteúdo intestinal de larvas de <i>S. levis</i> do campo (esquerda) das do laboratório (direita).....	50
Figura 13: Ensaio para testar a atividade CMCásica..	58
Figura 14: Fungos filamentosos isolados da microbiota intestinal de <i>S. levis</i>	60
Figura 15: Microscopia confocal <i>Sphenophorus levis</i> Filamentous Fungi 1.....	61
Figura 16: Microscopia confocal <i>Sphenophorus levis</i> Filamentous Fungi 2.....	61
Figura 17: Microscopia confocal <i>Sphenophorus levis</i> Filamentous Fungi 3.....	62
Figura 18: Microscopia confocal <i>Sphenophorus levis</i> Filamentous Fungi 4.....	62
Figura 19: Ensaio de atividade celulolítica em ágar CMC corado com Vermelho de Congo ..	63
Figura 20: Teste realizado para verificar resistência bacteriana a antibióticos com diferentes mecanismos de ação.....	64
Figura 21: Atividade celulolítica calculadapela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Antibióticos utilizados durante o teste de resistência a antibióticos e seus mecanismos de ação sobre os microrganismos.....	41
Tabela 2: Composição da microbiota intestinal bacteriana <i>Sphenophorus levis</i> das comunidades de larvas coletadas em campo e no laboratório.	45
Tabela 3: Classificação mais detalhada dos grupos de microrganismos encontrados na microbiota intestinal de <i>S. levis</i>	52
Tabela 4: Grupos de bactérias e leveduras encontrados nas populações intestinais das larvas do campo e do laboratório de <i>S. levis</i>	53
Tabela 5: Grupos de bactérias e leveduras que apresentaram resistência a antibióticos nos meios que foram previamente isolados.....	55
Tabela 6: Efeito da dieta alimentar artificial sob o crescimento de microrganismos isolados da população de <i>S. levis</i> do campo..	56
Tabela 7: Grupos de bactérias e leveduras que foram capazes de degradar Carboximetilcelulose.	57
Tabela 8: OTU's referentes às bactérias isoladas pelos métodos tradicionais de cultivo.....	67

Anexos

Anexo A: Composição do meio da dieta artificial das larvas.....	96
Anexo B: Extração de DNA utilizando protocolo CTAB.....	97
Anexo C: Características dos meios utilizados para isolamento e cultivo de microrganismos.....	98

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. A cana-de-açúcar.....	3
2.2. A importância econômica da cana-de-açúcar.....	4
2.3. <i>Sphenophorus levis</i> : uma praga da cana-de-açúcar.....	7
2.4. Controle do <i>S. levis</i>	11
2.5. Diversidade da microbiota intestinal de insetos.....	13
2.6. Estudando a microbiota intestinal de <i>S. levis</i>	17
2.7. Medidas de diversidade.....	20
2.8. Microrganismos produtores de celulase.....	22
3. Justificativa do presente trabalho.....	26
4. Objetivos.....	27
5. Materiais e métodos.....	28
5.1. Coleta das amostras.....	28
5.2. Dissecção intestinal.....	29
5.3. Extração de DNA.....	30
5.4. Amplificação do gene 16S rRNA.....	30
5.5. Quantificação e purificação dos produtos de PCR.....	31
5.6. Clonagem do gene 16S rDNA.....	32
5.7. Transformação em <i>E. coli</i>	32
5.8. Seleção dos clones recombinantes.....	33
5.9. Extração e quantificação do DNA plasmidial.....	34
5.10. PCR para seqüenciamento.....	34
5.11. Análise das seqüências obtidas.....	35
5.12. Medidas de diversidade.....	36
5.13. Cultivos Bacterianos.....	37
5.14. Seqüenciamento do gene 16S rDNA das bactérias isoladas pelo método tradicional de cultivo.....	38
5.15. Ensaio de atividade celulolítica.....	39
5.16. Microscopia confocal.....	40
5.17. Ensaio de Resistência a Antibióticos.....	40
5.18. Efeito da dieta alimentar artificial na biodiversidade intestinal.....	41
5.19. Seqüenciamento do gene 16S rDNA de bactérias que apresentaram atividade celulolítica.....	42
6. Resultados.....	43
6.1. Análise das seqüências do gene 16S rRNA.....	43
6.2. Bactérias intestinais cultiváveis.....	50
7. Discussão.....	69
8. Conclusões.....	78
9. Referências Bibliográficas.....	79

1. Introdução

Os besouros da família Curculionidae são conhecidos como gorgulhos ou bicudos, representando a família com a maior diversidade de espécies entre os seres vivos totalizando cerca de 60.000 espécies descritas no mundo (MARVALDI & LANTERI, 2005). A grande maioria das espécies é pequena (0,5 a 50 mm) e vivem exclusivamente associadas a plantas (ANDERSON, 1993), por isso, são importantes na polinização (FRANZ & VALENTE, 2005; HENDERSON *et al.*, 2000), como pragas (ANDERSON, 2002) e no controle biológico de ervas invasoras (ANDERSON, 1993).

O intestino dos besouros e dos insetos em geral é um reservatório para uma imensa variedade de microrganismos; muitos ainda não conhecidos e não caracterizados, principalmente devido à dificuldade de cultivo desses microrganismos em laboratório. Porém, com os avanços da biologia molecular tornou-se mais fácil estudar esses microrganismos e acessar essa diversidade, principalmente daqueles microrganismos não-cultiváveis.

A microbiota intestinal pode desempenhar papéis importantes em vários processos do ciclo de vida de seus hospedeiros. Assim, caracterizá-la é importante para entender a biologia dos insetos.

O bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, é um Curculionidae causador de grandes perdas econômicas no Brasil. Por esta razão, é importante caracterizar a população microbiana no intestino de suas larvas, para entender melhor a interação entre esses microrganismos e seu hospedeiro, o que pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias para controlar esta praga no campo. Por outro lado, se algum composto for descoberto para controlar esta praga é necessário que os testes sejam realizados tanto nas larvas do laboratório quanto das larvas do campo, visto que o resultado dos testes somente em larvas do laboratório (mais fáceis de serem conseguidas) pode fornecer informações

equivocadas e não compatíveis com as esperadas no campo. Por esta razão, torna-se de grande valia comparar os endosimbiontes tanto nas larvas do laboratório quanto nas do campo.

Neste trabalho foram comparados a microbiota intestinal de larvas de *S. levis* do campo e do laboratório através do marcador molecular 16S rDNA. A microbiota intestinal dessas duas populações foi também cultivada através dos métodos tradicionais de isolamento. As cepas que tiveram capacidade de crescer nos meios YPD pH 5,0 e TSA pH 7,0 foram submetidas a diferentes testes como: resistência a antibióticos, capacidade de crescer em meio utilizado na dieta artificial das larvas em laboratório e capacidade de degradar celulose. Além disso, foram isolados microrganismos capazes de degradar celulose, os quais foram identificados pelo marcador molecular 16S rDNA.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta da família das Gramíneas (Poaceae) originária da Ásia Meridional e bastante cultivada em países tropicais e subtropicais; sendo os maiores produtores o Brasil, Índia, Cuba, México, China, Filipinas, Austrália, África do Sul, Estados Unidos da América, República Dominicana e Formosa (ROS, 2004). Desde a época da colonização, a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. Ela foi trazida ao país ainda na primeira metade do século XVI pelos colonizadores, quando se iniciou o ciclo do açúcar. Desde então, a lavoura contribuiu para o surgimento dos primeiros engenhos que proporcionou um aumento significativo na produção de cana-de-açúcar com o passar dos anos. Com o surgimento dos engenhos centrais, iniciou-se uma nova etapa na indústria açucareira brasileira, dando origem às primeiras usinas de açúcar (ROS, 2004).

Em 1975, o Governo Federal do Brasil criou o Programa Nacional do Álcool, Pró-Álcool, na tentativa de diminuir o uso de derivados do petróleo (combustíveis fósseis), visando a redução da importação deste e substituindo-o pelo etanol, álcool etílico combustível derivado de cana-de-açúcar (Decreto nº 76.593 de 14 de novembro de 1975). A partir daí, a área de cultivo de cana-de-açúcar expandiu consideravelmente, principalmente na região Centro-Sul, e se iniciaram os primeiros investimentos para a produção de álcool nas unidades açucareiras e destilarias autônomas. Além disso, foram concedidos os primeiros financiamentos para o desenvolvimento de motores apropriados para a utilização desta nova tecnologia às indústrias automobilísticas (CENTRO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM BIOMASSA).

Devido ao atual cenário mundial, tanto econômico quanto ambiental, vários países estão em busca de novas tecnologias para produção eficiente de energia através de fontes renováveis que apresentem um preço mais competitivo com relação ao petróleo e, além disso, cause menores impactos ao meio ambiente. Atualmente, o Brasil apresenta uma grande vantagem com relação aos outros países já que domina a tecnologia de produção de etanol combustível a partir de cana-de-açúcar, sendo o primeiro no ranking mundial, e, além disso, é o maior consumidor de álcool combustível no mundo sendo pioneiro no uso deste em larga escala.

2.2. A importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar está entre as mais importantes espécies cultivadas no Brasil, sendo a principal fonte para a produção de sacarose e de subprodutos os quais podem ser obtidos tanto do caldo quanto do bagaço. Ela é a principal matéria prima utilizada para a produção de etanol, açúcar, melado e energia elétrica, a partir da queima do bagaço (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Na safra de 2007 foram plantados 6,7 milhões de hectares de cana-de-açúcar em todo território nacional. Na safra de 2008, esse número subiu para 7 milhões de hectares. A produtividade média da cana-de-açúcar no Brasil, de 47,78 toneladas por hectare em 1975, passou para 79,29 toneladas por hectare em 2005 (BOLETIM ELETRÔNICO DEDICADO A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2005). O Estado de São Paulo, responsável por 58,8 % da produção brasileira de cana-de-açúcar, apresentou um aumento de 6,5 % na área cultivada e de 5,6 % na colheita no ano de 2006. Além disso, sua produtividade média que há 30 anos era de 61,50 toneladas por hectare, no ano de 2008 foi de 89 toneladas por hectare, bem acima da média nacional que foi de 82 toneladas por hectare (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008).

Segundo o terceiro levantamento estimativo sobre a safra agrícola de cana-de-açúcar de 2008 realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento, a previsão da produção nacional de cana-de-açúcar que será processada nesta safra de 2008 é de 571,4 milhões de toneladas, 13,9 % a mais que a do ano passado. A produção total de açúcar está estimada em 32,1 milhões de toneladas representando um aumento de 2,6 % com relação à safra passada. As previsões referentes ao volume de produção de etanol estão em torno de 26,6 bilhões de litros para a safra de 2008, com um aumento expressivo na produção nacional de 15,7 % (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008). De acordo com o terceiro levantamento estimativo sobre a safra agrícola de cana-de-açúcar de 2008 realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento, o Estado de São Paulo será responsável por 59,6 % da produção total de cana-de-açúcar no Brasil. Desse total, 42,3 % será destinado à produção de açúcar e 57,7 % à produção de etanol.

Os números observados demonstram a tendência ao aumento na produção de etanol, muito acima do que observado para o açúcar, o que está de acordo com o mercado; visto que o consumo de açúcar tende a um padrão estável enquanto que o do álcool etílico ocupa espaços crescentes como um combustível oriundo de fonte limpa e renovável. Além disso, esse combustível vem se tornando de padrão universal, sendo utilizado tanto no mercado brasileiro quanto internacional.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, e em 2006 foi responsável por 42 % dessa produção, perdendo apenas para os Estados Unidos, que produz etanol a partir de milho, responsável por 46 % da produção mundial (WORLD DEVELOPMENT REPORT, 2008). Atualmente o Brasil exporta pouco etanol devido ao elevado consumo pelo mercado interno. Em 2008, o Brasil consolidou sua liderança na produção de etanol e bateu recorde de exportação do combustível num total de 6,16 bilhões de litros de etanol contra 5,5 bilhões de litros em 2007 (BOLETIM MENSAL DOS

COMBUSTÍVEIS RENOVÁVEIS, 2008). Estados Unidos, Japão e alguns países da União Européia, estão interessados em substituir parte do petróleo utilizado, pelo etanol brasileiro. Além disso, alguns desses países já estão aprovando leis onde será obrigatória a inclusão de uma determinada quantidade de etanol na gasolina consumida no país. Desta forma, são grandes as perspectivas do aumento do consumo de etanol para os próximos anos.

A cana-de-açúcar é a base para todo esse agronegócio, representado por 367 unidades produtoras de açúcar e álcool, sendo que 172 destas estão no Estado de São Paulo (DEPARTAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR E AGROENERGIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007), e gerador de mais de 1.000.000 de empregos diretos e indiretos (CENTRO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM BIOMASSA). Em 2004, gerou uma renda de US\$ 7,7 bilhões, perdendo apenas para os produtos de origem animal (INSTITUTO DE EXPANSÃO AGRÍCOLA, 2005).

Para o ano de 2010 projeta-se uma ampliação da lavoura canavieira aumentando a produção para aproximadamente 30 bilhões de litros de etanol/ano. Essa previsão é feita com base no aumento do consumo dos produtos derivados da cultura da cana-de-açúcar no mercado interno, tanto o açúcar quanto o etanol, e das exportações destes produtos para o mercado internacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007; TERMO DE REFERÊNCIA DO WORKSHOP DE MELHORAMENTO GENÉTICO E BIOTECNOLOGIA, 2007).

Para atender essa demanda, é necessário o aumento da produção de cana-de-açúcar. Isso poderá ser atingido com a ampliação de área plantada de cana-de-açúcar. Além disso, podem ser obtidas, através de melhoramento, variedades mais produtivas, mais resistentes a pragas e/ou doenças ou também mais tolerantes a ambientes desfavoráveis. Por outro lado, é necessário encontrar métodos eficazes e de custo acessível para combate às pragas dessa lavoura.

2.3. *Sphenophorus levis*: uma praga da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é atacada por cerca de 80 pragas, e entre elas está o *Sphenophorus levis* (GALLO *et al.*, 1978). O *Sphenophorus levis* - VAURIE, 1978 - (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido por gorgulho ou bicudo da cana-de-açúcar, é encontrado no norte da Argentina, Paraguai e Brasil. Atualmente é uma das principais pragas que vem atacando as plantações de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (GALLO *et al.*, 2002) (Figura 1).

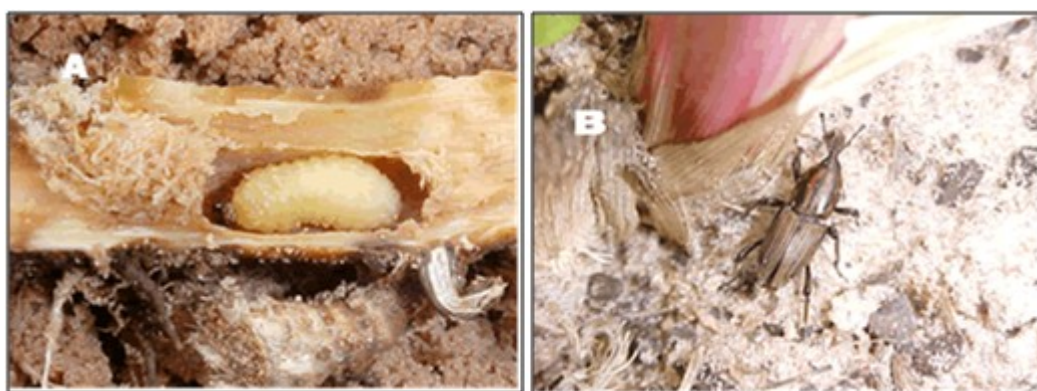


Figura 1: *Sphenophorus levis*, o gorgulho da cana-de-açúcar, em seu estágio larval (A) e inseto adulto (B), um dos principais causadores de dano na cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. (Figura extraída de Fonte: Revista Cultivar - Março 2005. http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=39#).

Essa espécie foi coletada pela primeira vez no Brasil atacando bromeliáceas e a sua ocorrência em cana-de-açúcar foi relatada em 1977 (DEGASPARI *et al.*, 1987). Em 1989 o inseto era detectado em 14 municípios ao redor de Piracicaba (PRECETTI & ARRIGONI, 1990). Segundo dados do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), atualmente, o *S. levis* encontra-se distribuído em uma região mais ampla atingindo os Estados de São Paulo e Minas Gerais, totalizando 53 municípios; sendo que no ano de 2006, 23 novos municípios entraram para esta lista; mostrando que o inseto está presente em praticamente todas as principais regiões de cultivo de cana-de-açúcar (WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE “PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR”, 2007). Estima-se que a área total atingida pelo bicudo no Estado de São Paulo seja de 200 mil hectares (ERENO, 2007). Embora inicialmente ele tivesse sido

considerado uma praga secundária, atualmente é a espécie de Curculionidae mais importante na cultura da cana-de-açúcar devido aos grandes danos que ele causa aos canaviais, gerando perdas significativas (WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE “PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR, CONTROLE BIOLÓGICO E CONTROLE QUÍMICO DE PRAGAS EM CANA-DE-AÇÚCAR, 2007).

O *S. levis* adulto tem hábitos noturnos, possui o comprimento ao redor de 8 a 14 mm, apresenta pouca agilidade e simula-se de morto quando atacado (VAURIE, 1978). As fêmeas, após o acasalamento, perfuram os tecidos sadios do rizoma com as mandíbulas, localizadas no ápice do rostro, inserindo seus ovos na base da brotação. De sete a doze dias após, as larvas eclodem (ALMEIDA, 2005). O período larval médio é de 50 dias (PRECETTI & TERAN, 1983). A larva recém eclodida apresenta coloração branco-leitosa e com o desenvolvimento adquire coloração amarelada. A cabeça é de cor castanho-avermelhada e as mandíbulas são bem desenvolvidas. Além disso, a larva apresenta hábitos subterrâneos (DEGASPARI *et al.* 1987). Por ter sido primeiramente descrita atacando bromeliáceas, sugere-se que a larva desse inseto seja polífoga, porém, atualmente, acredita-se que ela apresente hábito alimentar especializado, pelo menos no Brasil, atacando preferencialmente plantações da cana-de-açúcar (Luiz Carlos de Almeida do Centro de Tecnologia Canavieira – Comunicação pessoal). Geralmente as larvas e adultos de uma mesma espécie apresentam hábitos alimentares bastante diferentes, sendo que as larvas apresentam hábitos alimentares mais restritos que os adultos (VANIN, 1999).

O inseto adulto apresenta uma capacidade de vôo restrita, o que caracteriza sua baixa capacidade de dispersão (DEGASPARI *et al.*, 1987). Sugere-se então que a dispersão do besouro *Sphenophorus levis* é dada através do transporte sem os devidos cuidados de mudas infectadas através da malha rodoviária, o que causa a disseminação descontrolada deste inseto para as regiões sucroalcooleiras (DINARDO–MIRANDA, 2005; LEITE *et al.*,

2005). Além disso, o produtor deve ficar alerta para o plantio de mudas oriundas de áreas infectadas (Centro de Tecnologia Canavieira, 2009).

As perdas geradas pelo *S. levis* causam enormes prejuízos econômicos devido a importância que essa cultura canavieira representa para o Brasil. Ele é capaz de destruir até 30 toneladas de cana-de-açúcar por hectare, chegando a colocar em risco até 40 % da produtividade. Além disso, pode ocorrer morte em 50 a 60 % dos perfilhos entre 5 e 7 meses (PRECETTI & ARRIGONI, 1990).

As larvas desse inseto são as responsáveis pelos danos à planta (Figura 2), principalmente na época seca do ano, abrindo galerias circulares e longitudinais nos rizomas abaixo do solo, local onde a larva se alimenta e abriga, atacando também os colmos da cana-de-açúcar destruindo-os e lesando os tecidos da planta (ALMEIDA, 2005). Verifica-se no solo a presença de serragem fina, característico do ataque da praga. Os sintomas mais frequentes são o amarelamento e seca de folhas e perfilhos jovens, causando diminuição do número, tamanho e diâmetro dos colmos para a colheita (WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE “PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR”, 2007). Também pode ocorrer morte da planta e falhas na brotação das soqueiras. Conseqüentemente, ocorre uma redução da produtividade com a redução da qualidade da matéria prima e da longevidade do canavial (ALMEIDA, 2005).



Figura 2: Danos causados pelas larvas de *S. levis* nos colmos e rizomas da cana-de-açúcar geram perdas em torno de até 30 toneladas por hectare ao ano (Fonte: Revista Cultivar - Março 2005. http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=39#).

Segundo Newton Macedo, diretor do Araújo & Macedo - Consultoria e Controle de Pragas, o aumento dessa praga pode estar relacionado com o aumento do corte mecanizado da cana-de-açúcar no campo, já que a palha que fica no local mantém a umidade do solo tornando este um ambiente favorável para a proliferação desse inseto. A destruição das soqueiras é uma prática satisfatória, porém somente no primeiro corte já que posteriormente as larvas conseguem manter-se no solo alimentando-se da matéria orgânica disponível no campo (Apud in ALMEIDA, 2005).

O Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) vem realizando levantamentos sobre o monitoramento de pragas recorrentes em canaviais levando em conta a presença e a ausência de palha no solo provinda da colheita anterior. Esse monitoramento considera o Manejo Integrado de Pragas (MIP) que inclui um plano de medidas voltadas para a

diminuição do uso de agrotóxicos no campo a fim de aperfeiçoar a utilização desses produtos nos cultivares como por exemplo o controle biológico, a rotação de cultura e o monitoramento das pragas. O monitoramento é feito com a finalidade de estimar as populações de pragas determinando assim qual o melhor método de controle que se deve utilizar para uma determinada situação, além de quando e onde essas medidas serão aplicadas, sempre levando em conta a eficiência das mesmas. Esse método deve ser preferencialmente prático, de alta precisão e de baixo custo.

2.4. Controle do *S. levis*

Poucos estudos estão sendo realizados para controlar a proliferação e a incidência do *Sphenophorus levis* nos canaviais. Para o controle da forma adulta do besouro *S. levis* os métodos mais utilizados são microbianos, químicos e armadilhas (iscas tóxicas) (LEITE, MACHADO & BATISTA FILHO, 2005; WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE “PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR”, 2007). A ocorrência das formas imaturas (ovos, larvas e pupas) no interior das touceiras dificulta a ação de produtos tóxicos, como inseticidas químicos convencionais, para o combate desse inseto já que o contato com o inseticida se torna difícil (CERDA *et al.*, 1999). Além disso, o uso de inseticidas químicos eleva muito o custo da cultura, sendo economicamente inviável, além de contribuir para uma série de impactos negativos ao meio ambiente como a contaminação de solo, água e seres vivos.

No aspecto ecológico e agrícola, a utilização de microrganismos, principalmente fungos, no controle biológico de insetos-praga reforça a importância das relações entre microrganismos e insetos na natureza (BOTELHO *et al.*, 2002). Atualmente são buscados métodos alternativos que sejam ambientalmente corretos e economicamente viáveis, como por exemplo, a utilização de fungos entomopatogênicos como o *Metarhizium*

anisopliae e *Beauveria bassian*, e algumas espécies de nematóides entomopatogênicos (BADILLA & ALVES, 1989) que atuam no controle biológico dessa.

De acordo com testes realizados no Laboratório de Controle Biológico no Centro Experimental do Instituto Biológico de Campinas, os nematóides do gênero *Steinernema* são os mais indicados para o controle do bicudo da cana-de-açúcar. Esses nematóides têm receptores químicos na região cefálica que permitem a localização do bicudo pela detecção de produtos de excreção liberados no ambiente e pela percepção de variações de temperatura e de níveis de gás carbônico, um comportamento natural de busca aos hospedeiros. Ao encontrar o bicudo os vermes penetram pelas aberturas naturais do inseto e liberam uma bactéria que carregam no intestino, responsável por provocar septicemia e a morte do inseto em 48 horas (ERENO, 2007).

Como na cultura da cana-de-açúcar a renovação da planta não ocorre anualmente, isso acaba favorecendo o estabelecimento e proliferação de diversas pragas no canavial o que se torna um grande problema. Sugere-se que seja feita uma prévia eliminação de soqueiras mediante aração logo após o corte da cana-de-açúcar a fim de diminuir a proliferação de insetos (PRECETTI & ARRIGONI, 1990). É também necessário que ocorra um manejo fitossanitário mais rigoroso e eficaz sob os cultivares de cana-de-açúcar a fim de se obter um maior controle sob as infestações causadas por pragas na lavoura visando reduzir as perdas e aumentar a sustentabilidade ao sistema de produção.

Devido às dificuldades e a falta de métodos de controle eficazes contra o *S. levis* é importante a realização de estudos que visem entender o comportamento desse inseto em suas diferentes fases do ciclo de vida, já que muito pouco se sabe sobre esse Coleoptera. Além disso, é interessante estudar a microbiota intestinal desse inseto e tentar compreender como esta se relaciona com o seu hospedeiro. Essas informações contribuirão para estudos que visem alternativas eficazes para combater essa praga.

2.5. Diversidade da microbiota intestinal de insetos

A interação de microrganismos que habitam o trato intestinal de insetos com seus hospedeiros é conhecida desde 1929 (WIGGLESWORTH, 1929). Insetos que são submetidos a dietas pobres em nutrientes, como madeira e húmus, necessitam de bactérias simbiotes para auxiliarem na síntese de aminoácidos e fixação de nitrogênio atmosférico (TERRA, 1990). Dependendo do tipo de dieta que uma espécie de inseto é submetida, enzimas diferenciadas, ou seja, aquelas que não são habitualmente produzidas pelo inseto, são necessárias para o sucesso do processo digestivo (KAUFMAN & KLUG, 1991; SANTO-DOMINGO *et al.*, 1998).

Os microrganismos endosimbiontes relacionam-se ecologicamente com seu hospedeiro de maneiras essenciais, como as mutualísticas, e não benéficas como as patogênicas. Muitos deles apresentam-se como microrganismos obrigatórios da flora intestinal não possuindo a capacidade de sobreviver fora do hospedeiro (DILLON & DILLON, 2004).

Nos insetos em geral, é comum a presença de uma microbiota no aparelho digestivo, que pode auxiliar no processo digestivo além de desempenhar muitas outras funções (DILLON & DILLON, 2004). DOUGLAS, 1998 observou a produção de nutrientes por bactérias do gênero *Buchnera* no intestino de formigas operárias de *Camponotus* spp., e que a origem das mesmas seriam os afídeos (pulgões) com os quais elas se associam. Entre as formigas cortadeiras, a ocorrência de simbiotes associados com o aparelho digestivo dos adultos já foi relatada (CAETANO, 1994), no entanto, nada se sabe sobre suas origens e funções. MORAES *et al.*, 2004 estudaram a presença de fungos na flora intestinal de vetores do *Trypanossoma cruzi* Chagas, 1909, e constataram a presença de 34 espécies de fungos. Segundo PHAFF & STARMER, 1987, a associação de leveduras no intestino de insetos é de

grande importância ecológica, pois os insetos utilizam produtos derivados do metabolismo das leveduras, como os carboidratos. Várias espécies de fungos leveduriformes têm sido associadas a outras famílias de Coleópteros, como Bostrichidae, Cerambycidae, Buprestidae (PHAFF & STARMER 1987) e Curculionidae (BARRETO *et al.*, 1998). É conhecido, também, que coleópteros das famílias Scolytidae, Lymexylidae e Platypodidae possuem associações mutualísticas com leveduras (KINUURA, 1995).

A relação entre inseto e microrganismos é importante quando consideramos a capacidade desses microrganismos decomporem e modificarem compostos químicos presentes nas plantas ingeridas pelos insetos em sua dieta diminuindo, assim, o efeito tóxico dessas substâncias para o hospedeiro (CAMPBELL, 1990; DOUGLAS, 1992; DILLON & DILLON, 2004; GENTA *et al.*; 2006; TERRA & FERREIRA, 2005). Os endossimbiontes, colonizadores do trato intestinal, muitas vezes auxiliam no aspecto nutricional oferecendo condições vitais ao hospedeiro auxiliando na quebra de compostos complexos e aumentando a absorção dos metabólitos. Também são responsáveis por oferecer nitrogênio, fonte de carbono e energia (BREZNAK, 2000).

A aquisição dos primeiros colonizadores intestinais das larvas do *S. levis* possivelmente se dá após a eclosão do ovo por meio da ingestão da camada externa do mesmo, que contém microrganismos. Essa camada é secretada quando a fêmea oviposita, caracterizando uma passagem de microbiota de geração para geração (DILLON & DILLON, 2004). Ela também pode ser adquirida no meio ambiente ou a partir da dieta alimentar. Após o período de colonização, outras espécies bacterianas tornam-se menos susceptíveis a fazerem parte da microbiota (DILLON & DILLON, 2004). Com a mudança das fases do ciclo de vida dos insetos também se observa uma mudança na composição da microbiota. Na maioria dos casos, o hospedeiro não pode sobreviver sem os endossimbiontes, já que a eliminação destes poderá acarretar um efeito deletério. Embora a vantagem para o hospedeiro seja

aparentemente clara, para o endossimbionte nem sempre é (DOUGLAS & SMITH, 1989; MAYNARD SMITH & SZATHMÁRY, 1995).

Em 1987, Martin sugeriu que a presença de celulases no trato intestinal de cupins derivada da microbiota intestinal aumentava a eficiência da digestão e isso estaria relacionada com a presença de fungos e/ou bactérias capazes de degradar celulose. Apesar de seqüências que codificam celulases terem sido encontradas no genoma de cupins (TOKUDA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 1998;) sugeriu-se então que as celulases de microrganismos simbiossiontes do intestino desses insetos também estariam contribuindo para a degradação da celulose (SLAYTOR, 1992) sendo que, algumas dessas enzimas atuantes seriam exclusivas de microrganismos e estariam desempenhando papel fundamental na degradação de alguns compostos atuando sinergicamente (TERRA & FERREIRA, 2005; WARNECKE *et al.*, 2007).

As interações simbióticas entre a microbiota intestinal e alguns insetos como cupins e afídeos têm sido bastante estudadas. Microrganismos associados à microbiota de cupins podem ser essenciais para a sobrevivência desse inseto por serem responsáveis pela secreção de enzimas que degradam celulose e lignina fornecendo glicose e ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia pelo hospedeiro. Além disso, os próprios microrganismos podem atuar como intermediários na decomposição de compostos que servirão de fonte de carbono para seus hospedeiros (BREZNAK & BRUNE, 1994). Porém, não há evidências sobre a produção de celulases por essas bactérias. Sendo assim, é possível que tais bactérias tenham outras funções no ecossistema intestinal de cupins (BRUNE & FRIEDRICH, 2000). Devido a limitações técnicas, muitos dos microrganismos ainda não detectados podem ser membros de associações importantes no trato intestinal de cupins (BRUNE & FRIEDRICH, 2000).

Além da celulose existem outras moléculas de estrutura complexa que também são encontradas em plantas como os compostos fenólicos, lignina, flavonóides, taninos, alcalóides que são decompostos no intestino de insetos. Sugere-se que as bactérias que fazem parte da flora intestinal seriam as responsáveis por sua hidrólise (DOUGLAS, 1992). A ocorrência desses processos ainda não está muito clara (WARNECKE *et al.* 2007).

Algumas plantas apresentam compostos secundários (terpenos, compostos fenólicos e os alcalóides) que podem apresentar propriedades antimicrobianas vindo a causar variações no pH intestinal e a modificar, assim, a composição da microbiota. Isso leva ao estabelecimento favorável de espécies microbianas que sejam responsáveis pela detoxificação desses compostos que muitas vezes atuam como xenobióticos (WALENCIAK *et al.*, 2002). A modificação de compostos tóxicos das plantas ingeridas pela microbiota gera compostos voláteis que são eliminados nas fezes e que podem influenciar no comportamento do inseto (CAMPBELL, 1990) atuando como sinalizadores ou indicadores para outros insetos ou para os da mesma colônia (OBENG-OFORI *et al.*, 1994).

Alterações na comunidade microbiana da flora intestinal desses insetos podem ocorrer nas diferentes fases larvais, sendo necessário estabelecer qual será o instar (idade) escolhido para as análises. Essa variação não ocorre somente entre indivíduos. Ela também pode ocorrer dependendo do tipo de dieta a qual o inseto é submetido, fase de desenvolvimento, ciclo de vida, pH intestinal. Apesar da maioria das enzimas digestivas funcionarem bem em pH em torno de 6 e 7, muitas delas podem atuar em pH extremos: ácidos (por volta de 3) ou alcalinos (por volta de 10). Porém, a adaptação de insetos a mudanças ambientais é muito mais rápida. Isso pode ser observado em insetos que são submetidos a diferentes tipos de dietas (KAUFMAN & KLUG, 1991; SANTO-DOMINGO *et al.*, 1998).

Muitas vezes as comunidades microbianas intestinais podem ser tão diversas que excedem o número de células do próprio inseto, como ocorre frequentemente em mamíferos (SAVAGE, 1977). Devido à complexidade e a diversidade encontrada nos organismos endossimbiontes, não é possível cultivar a maioria deles através dos métodos tradicionais (microrganismos não-cultiváveis) sendo necessária a aplicação de técnicas de biologia molecular para realização de identificação filogenética (BRAUMAN *et al.*, 2001).

Os primeiros estudos para identificação da microbiota intestinal eram baseados nos métodos tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos (LYSENKO, 1985), porém, como é relativamente difícil simular em laboratório as condições nas quais esses microrganismos estão adaptados em suas condições vitais, esse processo torna-se inviável e ineficaz para o estudo de diversidade; visto que, busca-se isolar todos os microrganismos daquele ambiente. Além disso, é bastante laborioso manter todas essas espécies em laboratório visto que as condições de cultivo são diferentes entre as diversas espécies isoladas.

Nos últimos anos deram início os estudos associando microrganismos intestinais com uma variedade de insetos hospedeiros. Entretanto, pouco se conhece sobre a essa associação na família Curculionidae, onde estão inseridas várias pragas de importância agrícola, responsáveis por grandes perdas na agricultura em todo o mundo. Considerando a importância dessa relação e a ausência de informação sobre a microbiota intestinal de *S. levis* é importante caracterizar e tentar entender essa relação na busca de novas estratégias para o controle dessa praga no campo.

2.6. Estudando a microbiota intestinal de *S. levis*

As técnicas de cultivo tradicional proporcionam a caracterização individual de microrganismos principalmente relacionados com nutrição e bioquímica desses organismos.

Porém, o cultivo limita avaliações taxonômicas e filogenéticas quando queremos estimar a diversidade bacteriana devido às falhas encontradas nos métodos de cultivos tradicionais que limitam o crescimento de microrganismos (PACE, 1997). Estas análises são realizadas utilizando microrganismos isolados em culturas axênicas as quais são mais fáceis de trabalhar. A grande dificuldade em trabalhar com culturas puras é conseguir isolar aqueles organismos que apresentam fundamental importância no ambiente estudado, visto que, simular as necessidades nutricionais de todos eles torna-se inviável.

Métodos tradicionais para o isolamento e crescimento de microrganismos em condições laboratoriais se apresentam muitas vezes ineficientes, porém, eles são informativos em outros aspectos como a biologia e recursos bioquímicos. Dessa forma muitos micróbios da natureza ainda não foram estudados (DOJKA *et al.*, 1998; HUGENHOLTZ *et al.*, 1998; RONDON *et al.*, 2000). Estima-se que aproximadamente 1 a 10 % dos microrganismos podem ser isolados pelos métodos tradicionais de cultura em meio líquido ou sólido (BORNEMAN *et al.*, 1996, KUSKE *et al.*, 1997) sendo que o número de novos microrganismos que têm sido isolados, cultivados e caracterizados atualmente é relativamente pequeno (SEBAT *et al.*, 2003). É importante ressaltar que 99 % das bactérias encontradas na maioria dos ambientes apresentam-se como microrganismos não-cultiváveis (AMANN *et al.*, 1995; BORNEMAN *et al.*, 1996; KUSKE *et al.*, 1997).

As tecnologias de análises moleculares tornaram-se um instrumento fundamental para os estudos de ecologia microbiana. Hoje em dia é possível estudar amostras ambientais complexas direto da biomassa total de uma comunidade em particular. A partir daí muitos trabalhos estão voltados à análise de regiões gênicas conservadas em microrganismos de ambientes ainda não conhecidos, principalmente para estudos filogenéticos e de diversidade. As primeiras técnicas moleculares foram utilizadas para estudar um único gene de interesse, porém em vários microrganismos ao mesmo tempo. Um exemplo disso é a

análise da região que codifica o RNA ribossomal 16S constituinte da subunidade menor do ribossomo em procariotos (16S rDNA), que é bastante utilizada para estudos taxonômicos e de identificação de espécies bacterianas (CHOI *et al.*, 1996; SCHMALENBERGER *et al.*, 2001; CLARRIDGE, 2004; MUNSON *et al.*, 2004; PETTI *et al.*, 2005). Esta região é bastante conservada entre as bactérias, no entanto, apresenta regiões variáveis que permitem identificar diferentes tipos bacterianos.

Os primeiros trabalhos utilizando a molécula de 16S rDNA foram realizados por Carl Woese. Segundo WOESE, 1987, a molécula é um excelente marcador molecular, pois está presente em todos os procariotos, é relativamente longa (~ 1,5 kb) sendo suficiente para estudar biodiversidade. Além disso, apresenta algumas regiões altamente conservadas e pequenas regiões hipervariáveis através das quais é possível diferenciar organismos muito próximos filogeneticamente (ATLAS, 1997). A região codificante do 16S rRNA é muito conservada tanto inter-espécies quanto intra-espécies. Nessa seqüência existem regiões que são chamadas de hipervariáveis – em número de nove (V1 a V9) e que são diversificadas entre os diferentes gêneros bacterianos (NEEFS *et al.*, 1990). Atualmente a região hipervariável V3 é bastante utilizada em estudos de diversidade já que através dela já é possível diferenciar as bactérias da amostra de interesse em gênero e espécie comparando as seqüências obtidas por seqüenciamento com aquelas presentes nos bancos de dados (LAMBAIS *et al.*, 2006).

Existem diversas técnicas que são utilizadas para analisar diversidade microbiana. As técnicas baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são rápidas, relativamente baratas e uma das mais utilizadas. Porém quando aplicadas sob amostras ambientais podem apresentar problemas que venham a dificultar os estudos. Essas dificuldades estão basicamente relacionadas com o método de extração de DNA utilizado (KENT & TRIPLET, 2002) e a pouca quantidade de certos microrganismos encontrados em

amostras de certos ambientes (omissão de alguns e prevalência de outros microrganismos na origem amostral). Além disso, muitas amostras podem estar contaminadas por compostos secundários, particularmente fenólicos (encontrado em plantas), ácidos húmicos e fúlvicos (presentes em amostras de solo e/ou água), que inibem a ação da enzima *Taq* DNA polimerase impedindo a amplificação de DNA (HUMMEL & HERRMANN, 1994).

Em estudos de filogenia e diversidade bacteriana a região 16S rDNA tem sido bastante utilizada. Esta região é amplificada utilizando iniciadores universais, posteriormente o material amplificado é clonado em vetores plasmidiais possibilitando, assim, a construção de bibliotecas de DNA 16S. Esses plasmídeos recombinantes são seqüenciados e as seqüências comparadas com um banco de dados sendo possível identificar o gênero (= 95 % de similaridade) e/ou a espécie (= 97 % de similaridade) dos microrganismos na amostra de interesse baseado nas diferenças encontradas entre as regiões hipervariáveis das seqüências amplificadas (BAKER *et al.*, 2003; ; LU *et al.*, 2000; MCCABE *et al.*, 1999; MUNSON *et al.*, 2004). Inúmeros estudos de identificação de microrganismos pelo estudo de regiões hipervariáveis do 16S rDNA foram realizados com sucesso (BECKER *et al.*, 2004; BERTILSSON *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 1996; CLARRIDGE, 2004; KATAOKA *et al.*, 1997; LAMBAIS *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2000; MARCHESI *et al.*, 1998; MAYNARD *et al.*, 2005; ROTHMAN *et al.*, 2002).

2.7. Medidas de diversidade

Muitas vezes é impossível saber o número de espécie em uma determinada área, e o que temos é apenas a estimativa da diversidade. Existem várias maneiras para medirmos a diversidade das espécies, também conhecida como diversidade biológica (COLLIN, 2004). A forma mais simples de calcular essa diversidade é dada pela riqueza de

espécies que representa o número de espécie existente em uma determinada amostra biológica (WILSEY *et al.* 2005). Porém, para comparar a riqueza de espécies entre diferentes comunidades devemos levar em conta que o esforço amostral das coletas deve ser padronizado para uma melhor interpretação das análises.

Quando se quer comparar a diversidade de espécies de áreas ou habitats diferentes devemos levar em conta que cada espécie possui um papel funcional diferente em uma determinada comunidade e, portanto, a sua proporção varia em relação à abundância total. Assim, nem sempre o número de espécies em uma comunidade é adequado para descrever diversidade e, portanto, as espécies não contribuem de maneira igual na estimativa de diversidade total. A diversidade é maior aonde a equitabilidade é maior, ou seja, onde populações são similares uma as outras em abundância do que quando algumas são muito comuns e outras muito raras.

Para medir ou estimar a diversidade de um dado ambiente, podemos utilizar os índices de diversidade os quais combinam dois atributos de uma comunidade: riqueza de espécies, que se refere ao número de espécies presentes em uma determinada área, e equitabilidade que se refere ao quão similar as espécies está representadas na comunidade (HURLBERT, 1971; PEET, 1974). Ao contrário dos índices de riqueza, os índices de diversidade são pouco dependentes do esforço amostral (SMITH & GRASSLE, 1977). Ou seja, com amostras relativamente pequenas podemos obter um valor de diversidade que mudará pouco conforme aumentamos o esforço amostral (MAGURRAN, 2003; PIELOU, 1975). Como consequência, poderemos comparar diretamente comunidades com diferentes esforços amostrais.

Os índices mais comuns para medida de biodiversidade são o de Shannon (LUDWIG & REYNOLDS, 1988) e o de Simpson (MENDES *et al.*, 2008; WOLDA, 1983). O índice de Simpson é um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos

escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Varia de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade (URAMOTO *et al.*, 2005). O índice de Shannon mede o grau de diversidade em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com “S” espécies e “N” indivíduos. Esse índice assume valores que podem variar de 0 a 5, sendo que o seu declínio é o resultado de uma maior dominância de grupos em detrimento de outros (BEGON *et al.*, 1996). Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. Neste caso, a diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice (URAMOTO *et al.*, 2005). Porém, o índice de Shannon é considerado um índice para cálculo de diversidade ideal quando se têm amostras tomadas ao acaso, em uma grande comunidade, pois considera a incerteza dos dados (MATOS *et al.*, 1999). Por outro lado, ele considera o número de espécies, levando em conta a proporção de cada espécie em relação ao todo, normalizando os dados e diminuindo a probabilidade de erro dos cálculos. Outra vantagem deste índice é que ele leva em consideração o número total das espécies, tanto das espécies raras quanto das mais abundantes, ou seja, a equitabilidade das espécies (MAGURRAN, 2003).

2.8. Microrganismos produtores de celulase

A celulose é o principal componente da biomassa das plantas e é o biopolímero mais abundante na natureza, por isso, tornou-se uma atrativa fonte geradora de combustível sustentável (MANSFIELD & MEDER, 2003). A quantidade de resíduos resultante dos vários processos agrícolas e agro-industriais, como daqueles derivados da indústria de papel e celulose, usinas de álcool e açúcar e da produção agrícola é muito elevada e esta biomassa apresenta um enorme potencial para a geração de energia. Em 1994, a indústria brasileira do açúcar e do álcool produziu aproximadamente 9 milhões de toneladas de açúcar e 13 bilhões

de litros de etanol a partir de 260 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, gerando entre 47 a 73 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar (ASSIS, 1994).

A celulose é formada por monômeros de glicose formando um homopolissacarídeo. A estrutura da celulose se forma pela união de moléculas de β -glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas gerando cadeias longas e lineares (Figura 3).

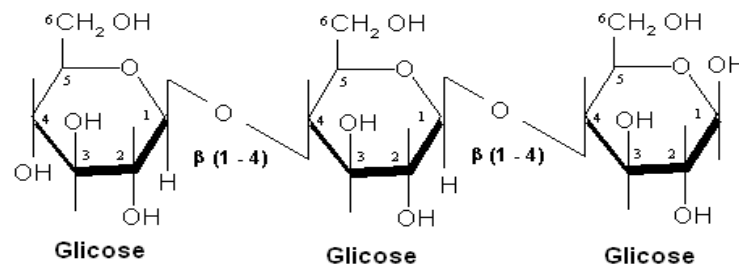


Figura 3: Esquema representativo da celulose. Este polímero é formado pela união “n” moléculas de glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas.

(Fonte: <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9071/celulose.gif>).

A celulose é um polímero biodegradável decomposto naturalmente no solo pela ação de bactérias e fungos através de processos complexos. Esses microrganismos são importantes no ciclo do carbono e são fontes potenciais enzimáticas tanto para a indústria quanto para a biotecnologia (LYND *et al.*, 2002).

As enzimas que hidrolisam celulose, as celulases, são divididas em 3 grupos principais: endoglucanases, celobiohidrolases (exoglucanases) e β -glucosidases. Estas três enzimas são necessárias para a hidrólise completa da celulose. As endoglucanases e as exoglucanases são conhecidas por atuarem sinergicamente na hidrólise da celulose (COUGHLAN, 1985; WOOD & MCCRAE, 1978) enquanto que as β -glucosidases são necessária para a hidrólise da celobiose à glicose. A celobiose é resultante da hidrólise parcial da celulose e esta que inibe fortemente as endo e as exoglucanases (NADALINI, 1997; WOODWARD & WISEMAN, 1982).

A celulose não pode ser utilizada como fonte de energia pela maioria dos animais vertebrados visto que estes não possuem enzimas capazes de hidrolizá-la. Os herbívoros alimentam-se de vegetais e conseguem hidrolizar a celulose porque possuem em seu trato digestivo microrganismos simbiotes como protistas, bactérias e fungos (SALVIO & D'AGOSTO, 2001) que produzem celulasas que são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 da celulose (COFFEY *et al.*, 1995). Com isso há um maior aproveitamento dos carboidratos proveniente da dieta. A microbiologia do rúmen é complexa devido ao grande número de organismos presentes, suas diferentes naturezas e mudanças de população, que resultam da mudança da dieta do ruminante (TEIXEIRA, 1992).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (ROBSON & CHAMBLISS, 1989). A capacidade de degradar celulose é amplamente distribuída entre vários gêneros no domínio das Eubacteria e fungos, dentro do domínio Eucaria. Membros com capacidade celulolítica pertencentes ao domínio Archae ainda não foram identificados. Enzimas celulolíticas são produzidas por fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias. Esses microrganismos que apresentam a capacidade de hidrolisar celulose são bastante procurados visto que podem ser utilizados em diversos procesos industriais assim como para o tratamento de efluentes de indústrias têxteis, de papel e celulose entre outras.

Fungos são agentes biológicos conhecidos pela sua capacidade em decompor matéria orgânica em geral, em particular substratos celulósicos (MONTEGUT, 1991; CARLILE & WATKINSON, 1997). Os fungos são responsáveis por secretarem uma variedade de enzimas, dentre elas as celulasas, as quais dominam, atualmente, as aplicações

industriais para a quebra da celulose. *Trichoderma reesei* é um dos fungos melhores caracterizados e o mais utilizado industrialmente para a produção de celulases (BEGUIN & AUBERT, 1994; SRISODSUK, 1994).

Hoje em dia, o grande desafio é desenvolver processos capazes de quebrar a biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), principalmente do bagaço de cana-de-açúcar, para produzir etanol de segunda geração, rompendo a fração celulósica liberando glicose para o processo fermentativo. Considerando o aproveitamento da palha juntamente com o bagaço para a produção de etanol 2/3 restantes da energia da biomassa poderia ser aproveitada (MARQUES, 2008) visto que o caldo de cana-de-açúcar é rico em sacarose é responsável por 1/3 do potencial energético da planta.

As celulases devem ser necessárias o desenvolvimento das larvas do *S. levis* durante seu ataque à planta. Por isso pretendemos através desse trabalho estudar a microbiota intestinal buscando isolar microorganismos capazes de degradar celulose, que está presente na alimentação dessas larvas, tanto nas do campo quanto nas do laboratório. O isolamento e a caracterização dessas enzimas serão de fundamental importância na tentativa de encontrar enzimas com potencial biotecnológico aplicado à quebra da celulose oriunda do bagaço da cana-de-açúcar excedente.

O domínio da tecnologia, por rotas termoquímicas ou hidrólise enzimática, que visa quebra da celulose do bagaço para produção de bioetanol, contribuirá para que o país aumente ainda mais a sua produção de etanol em larga escala visando atender a demanda mundial (IZIQUÉ, 2008). Além disso, com a implantação de novas políticas visando a redução do consumo de combustíveis fósseis e assim, a diminuição de liberação dióxido de carbono (CO₂), a utilização desse bagaço para obtenção de energia limpa e renovável é de fundamental importância.

3. Justificativa do presente trabalho

Tendo em vista os impactos agrícolas e econômicos causados pelas larvas desses besouros e visto que existem poucas informações disponíveis sobre o *Sphenophorus levis*, além da falta de mecanismos eficazes para o controle desse inseto no campo, é de fundamental importância o estudo dessa espécie, nos mais diferentes aspectos. Por este ser uma praga de grande impacto e relevância para a economia sucroalcooleira brasileira o estudo da microbiota do trato digestivo da larva de *S. levis* pode proporcionar o entendimento das relações que ocorrem entre a flora intestinal microbiana e seu hospedeiro.

Por apresenta a capacidade de se alimentar do rizoma e colmo da cana-de-açúcar, partes de composição bastante fibrosa e ricas em celulose, as larvas de *S. levis* possivelmente devem apresentar enzimas intestinais que são capazes de quebrar substâncias de estrutura complexa. Porém, essas enzimas podem estar sendo produzidas tanto pelas células intestinais da larva quanto pela microbiota presente no intestino do hospedeiro, sugerindo que a microbiota intestinal pode estar auxiliando nos processos de digestão e absorção do que está sendo ingerido pela larva (DILLON & DILLON, 2004).

Por ser o primeiro estudo em busca do conhecimento da microbiota intestinal do *S. levis*, que além de tudo pertence a uma família onde estão inseridas várias pragas de importância agrícola e responsáveis por grandes perdas na agricultura em todo o mundo, essa caracterização poderá contribuir para o estabelecimento de novos métodos para o controle para esta praga, já que, até o momento os métodos de controle que são utilizados apresentam-se de alto custo para os produtores e parcialmente ineficazes contra o inseto. Além disso, o isolamento e caracterização de microrganismos capazes de degradar celulose poderão ser utilizados em diversos processos agrícolas e industriais voltados para uma aplicabilidade biotecnológica.

4. Objetivos

Geral: Estudar a diversidade microbiana intestinal do *S. levis* visando uma primeira caracterização da microbiota intestinal de larvas tanto em indivíduos encontrados no campo quanto naqueles cultivados em laboratório.

Específicos:

- Analisar e comparar a biodiversidade bacteriana em intestino de *S. levis* oriundo do campo e também cultivado em laboratório por meio da abordagem do 16S rDNA;
- Isolar microrganismos cultiváveis por meios tradicionais de cultivo;
- Isolar microrganismos produtores de celulases e caracterizá-los.

5. Materiais e métodos

5.1. Coleta das amostras

Larvas de *Sphenophorus levis* foram coletadas na Fazenda Santo Antônio campo de experimentação do Centro de Tecnologia Canaveieira em Piracicaba, São Paulo, Brasil a predominância é de "Ambiente C", LVA1.1(LVE-3) - Latossol Vermelho AlicoTextura Argilosa. As larvas foram gentilmente coletadas (são originárias dos levantamentos populacionais que são realizados nos talhões) e cedidas pelo Laboratório de Entomologia do Centro de Tecnologia Canaveieira (CTC) também localizado na cidade de Piracicaba. As coletas das larvas do campo foram realizadas em Setembro de 2007. As larvas cultivadas em laboratório foram mantidas no CTC (Figura 4) sob as seguintes condições de manutenção laboratoriais: temperatura variando de 27 a 30 °C, com doze horas de luz (DEGASPARI *et al.* 1987). A dieta alimentar artificial utilizada foi modificada a partir de DEGASPARI *et al.* 1987 contendo os seguintes ingredientes (Anexo A).



Figura 4: Frascos onde as larvas cultivadas em laboratório no Centro de Tecnologia Canaveieira são mantidas com a dieta alimentar artificial.

5.2. Dissecação intestinal

Foram utilizadas 10 larvas de cada origem amostral – laboratório e campo. Para dar início ao processo de dissecação do intestino das larvas, essas foram mantidas em gelo por 10 minutos. Posteriormente as larvas foram submersas em etanol 70 % (v/v) por 3 minutos para desinfecção externa e em seguida foram imersas em solução de Tampão Fosfato Salino (PBS) 1x (PBS 1x: 137 mM NaCl, 10 mM Fosfato, 2,7 mM KCl, pH 7.4) (Figura 5). As larvas tiveram suas cabeças cortadas em uma placa de Petri contendo PBS 1x. O conteúdo interno (intestino, anexos e corpo gorduroso) foi separado da carcaça com o auxílio de pinças e agulhas. O intestino total de cada larva foi removido e armazenado individualmente em tubo de 1,5 ml contendo 600 µL de tampão Tris-EDTA 1x (TE 1x: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e levado ao vortex por 5 minutos a fim de auxiliar na remoção da microbiota da parede intestinal. As larvas utilizadas tinham idade de 15 a 18 dias, com tamanhos semelhantes e apresentam-se no mesmo estágio de desenvolvimento para a realização do experimento tanto para as larvas cultivadas em laboratório quanto para as coletadas no campo.

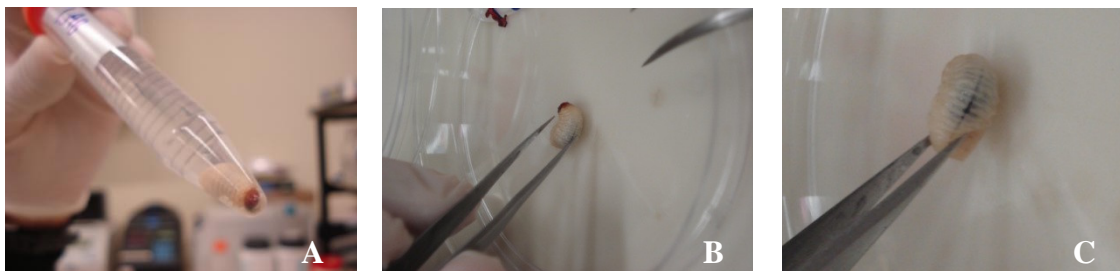


Figura 5: Etapas durante a dissecação intestinal de *S. levis*. Desinfecção externa da larva em etanol 70 % (A); preparação para iniciar a dissecação intestinal (B) e (C).

5.3. Extração de DNA

Foi feito um *pool* com o conteúdo intestinal total (10 larvas) de cada origem amostral com a finalidade de aumentar a quantidade de microrganismos, aumentando também a eficiência da extração de DNA. A extração de DNA foi feita a partir do *pool* dos extratos intestinais das larvas utilizando o protocolo CTAB modificado de AUSUBEL *et al.*, 2004; BRODERICK *et al.*, 2004 (Anexo B); seguido de tratamento com fenol clorofórmio e precipitação com isopropanol (DELALIBERA *et al.*, 2007). O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1 %, comparando com marcador molecular High Mass (Invitrogen), e também em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

5.4. Amplificação do gene 16S rRNA

Para o estudo da diversidade bacteriana utilizou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida do seqüenciamento. A amplificação foi realizada baseada na região 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeos universais degenerados com o intuito de identificar taxonomicamente as espécies. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: 27F - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' (GIOVANNONI, 1991) e 1500R - 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' (WEISBURG *et al.*, 1991), amplificando uma região de aproximadamente 1,5 kb.

Para a realização da PCR foram utilizadas as seguintes quantidades de reagente: aproximadamente 25 ng de DNA molde (*pool*); 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen); tampão

para PCR 1x (Invitrogen); 10 picomoles de cada oligonucleotídeos; e água mili-Q filtrada e estéril para o volume final de 25 μ L.

A amplificação foi feita 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. As amostras permaneceram a 4 °C no termociclador até serem retiradas e armazenadas no freezer a -20 °C.

5.5. Quantificação e purificação dos produtos de PCR

O produto de PCR amplificado foi visualizado em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo (0,02 μ g/ μ l). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE 1x: 0,04 M Tris-acetato e 1 mM de EDTA) a 90 V por 30 minutos aproximadamente. O gel foi posteriormente visualizado em luz UV para comprovar a amplificação dos fragmentos no tamanho esperado (Figura 6). 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. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente quantificado em gel de agarose 1 %.

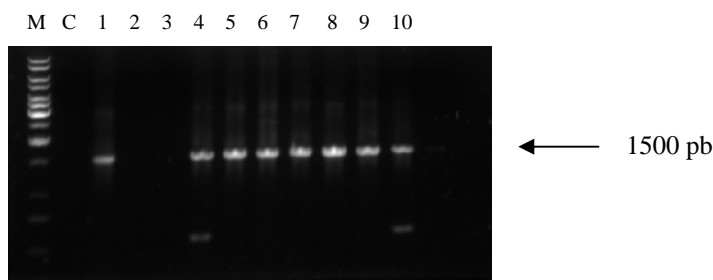


Figura 6: Produto de PCR amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 27F e 1500R. Gel de Agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular. C: controle negativo. Coluna 1,4,5,6,7,8,9,10: amostras que apresentaram a amplificação positiva.

5.6. Clonagem do gene 16S rDNA

Os produtos de PCR do gene 16S rDNA do conteúdo intestinal das larvas do campo e do laboratório purificados foram clonados em vetor pTZ57 R/T (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante. Esse vetor apresenta em ambas as extremidades 3' DDTimina que impede a circularização do vetor e facilita a ligação do inserto que apresenta DDAdenina nas suas extremidades 3'. A reação de ligação foi feita em uma proporção de extremidades livres de 3:1 (inserto: vetor) e mantida a 4 °C *overnight*.

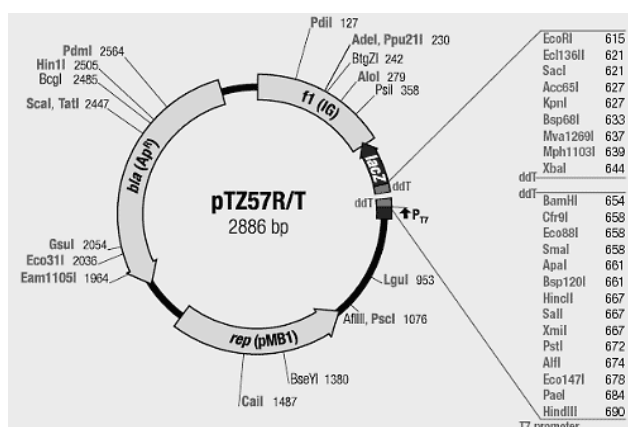


Figura 7: Mapa do vetor pTZ57 R/T utilizado para as clonagens.

5.7. Transformação em *E. coli*

Utilizou-se metade do volume da ligação para realizar a transformação por eletroporação em 40 µl de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B (Invitrogen). Após o choque (1,8 kv; 25 capacitance, low range: 200, high range: 600), adicionou-se 800 µl de LB Broth (10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l NaCl) e o tubo foi incubado por 1 hora à 37 °C. Posteriormente, 10 µl, 50 µl e 100 µl do conteúdo incubado contendo as células transformadas foram transferidos e espalhados com o auxílio da alça de Drigalski em placas

de Petri contendo LB Agar (10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar) suplementado com 100 µg/ml de ampicilina. Previamente, sob o meio de cultura espalhou-se IPTG e X-gal para que ficassem a uma concentração final de 2 mM e a 0,004 %, respectivamente. As placas foram incubadas *overnight* à 37 °C.

5.8. Seleção dos clones recombinantes

As colônias bacterianas recombinantes foram selecionadas com a adição de ampicilina visto que, o plasmídeo (pTZ57 R/T) possui o gene de resistência a este antibiótico. Deste modo, apenas bactérias recombinantes (aquelas que contêm o plasmídeo) foram capazes de crescer. A partir dessa primeira seleção, necessitamos saber se essas colônias possuem o plasmídeo recombinante com o inserto de interesse. A segunda seleção é realizada baseada no fenótipo das colônias, azuis ou brancas.

As colônias brancas são as possíveis recombinantes visto que, quando a ligação do inserto de interesse, neste caso o gene 16S rRNA, no plasmídeo é eficiente, o gene que codifica a β-galactosidase no plasmídeo estará interrompido e a bactéria não tem capacidade de quebrar o composto X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) em galactose e um produto azul insolúvel (4-chloro-3-brom-indigo), tornando a colônia de coloração branca. Se o gene de interesse não estiver ligado ao plasmídeo, o gene que codifica a β-galactosidase estará funcional sendo a bactéria capaz de degradar a X-gal, tornando o fenótipo da colônia azul (clone não recombinante).

As colônias brancas foram transferidas com o auxílio de palitos estéreis para placas de 96 poços contendo 200 µl de meio LB Broth com 100 µg/ml de ampicilina e glicerol a uma concentração final de 30 %. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por

18 horas para uma posterior estocagem desses clones em ultra freezer a - 80 °C. Desta forma, duas bibliotecas de DNA genômico foram construídas e nomeadas laboratório e campo.

5.9. Extração e quantificação do DNA plasmidial

Os clones da biblioteca foram cultivados em 1 ml de meio Circle Grow (BIO 101) acrescido de 100 µg/ml de ampicilina. Os clones foram mantidos em shaker a 37 °C a 200 rpm por 18 horas em placas Megatiter. Após o cultivo o DNA plasmidial dos clones foi isolado por mini preparação seguindo o protocolo descrito por VETTORE *et al.*, 2001.

O DNA plasmidial foi quantificado em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X a 90 V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi visualizado sob luz UV.

5.10. PCR para seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas em microplacas no seqüenciador *MegaBACE 500 Flex*, de 48 capilares (GE Healthcare).

As reações de PCR para seqüenciamento foram realizadas utilizando o oligonucleotídeo iniciador 338F 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' (LANE, 1991), que corresponde à região hipervariável V3. Para tanto, foi utilizado o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare) segundo as instruções do fabricante.

5.11. Análise das seqüências obtidas

Foram seqüenciadas 96 seqüências de cada biblioteca genômica, que geralmente é suficiente para as análises de biodiversidade. A análise das seqüências foi feita pelo *software Sequence Analyser, Base Caller Cimarron 3.12*. As regiões flangeadoras das seqüências que apresentaram baixo índice de qualidade em suas extremidades foram retiradas e elas foram comparados contra o banco de dados do *GenBank* acessado do *site* do NCBI (National Center for Biotechnology Information), através da ferramenta *nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e contra o banco de dados do *Ribosomal Database Project II* (RDP-II) (COLE *et al.*, 2007). Assim, foi possível verificar a homologia das seqüências da microbiota intestinal das duas populações com as seqüências já depositadas nestes bancos de dados comparando a diversidade microbiana entre as duas origens amostrais larvais.

Alguns clones tiveram seu gene 16S rDNA completo seqüenciado, pois só com o seqüenciamento da região hipervariável V3 não foi possível indentificar o gênero com um grau de confiabilidade (= 95 %), e suas seqüências montadas e ajustadas manualmente utilizando o programa *Clustal W* (THOMPSON, *et al.*, 1994) do *software BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). Posteriormente essas foram comparadas com o banco de dados do *GenBank* utilizando o BLASTN e RDP-II.

Para definir as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) construiu-se uma matriz de distância através do método Kimura 2-parâmetros no programa DNADIST dentro do programa PHYLIP (FELSENSTEIN, 1993) que foi utilizada para definir o número de OTUs e estimar a diversidade e a riqueza de espécies através do *software* DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005). As análises de rarefação foi realizada com os dados gerados no progama DOTUR e calculada com similaridade única, 97%, 95% e 90% entre as

seqüências de 16S rDNA de cada biblioteca para verificar se a quantidade de clones seqüenciados era suficiente para dar continuidade às análises. A curva de rarefação foi construída plotando o número de OTU's observadas *versus* o número total de seqüências seqüenciadas (Figura 10).

As seqüências dos clones da biblioteca foram depositadas no *GenBank* sob os acessos números FJ593042 – FJ593133 e FJ626247 – FJ626351.

5.12. Medidas de diversidade

Os cálculos de diversidade foram realizados baseados no índice de Shannon. Quanto maior for o valor de H' , maior será a diversidade da população em estudo.

Aplicamos a seguinte equação em nossas análises:

$$H' = -\sum_{i=1}^S [p_i \ln(p_i)], \text{ com } p_i = \frac{n_i}{N}$$

Onde:

N = número total de indivíduos amostrados;

n_i = número de indivíduos amostrados da i -ésima espécie;

S = número de espécies amostradas;

ln= logaritmo de base neperiana (e).

5.13. Cultivos Bacterianos

Para os cultivos bacterianos foram utilizados o intestino total de 3 larvas coletadas no campo e 1 larva cultivada em laboratório (coletadas em Janeiro de 2008) para o isolamento de microrganismos utilizando a metodologia tradicional de cultivo para estudar um pouco mais os microrganismos presentes no trato intestinal das larvas de *S. levis*. As larvas foram dissecadas, conforme descrito, anteriormente, no item 5.2 de Materiais e Métodos do presente trabalho.

Após a dissecação das larvas, os intestinos foram colocados separadamente em tubos de 1,5 ml contendo 1,0 ml de PBS 1x e as amostras foram vortexadas durante 5 minutos, fazendo com que as células bacterianas se desprendessem da parede intestinal. A partir daí realizou-se diluições seriadas de 10^0 a 10^{-6} de cada amostra com o seu conteúdo intestinal e essas foram plaqueadas em dois tipos de meios: ágar tripticaseína de soja (TSA, Difco Laboratories: 15 g/l caseína pancreática digestiva, 5 g/l papaína digestiva de soja, 5 g/l cloreto de sódio, 15 g/l ágar, pH 7,0) (DELALIBERA *et al.*, 2005) e ágar extrato de levedura dextrose peptona (YPD: 20 g/l peptona, 20 g/l dextrose, 10 g/l extrato de levedura e 20 g/l ágar, pH 5,0) (KUMURA *et al.*, 2004) ambos em condições aeróbicas. Um maior detalhamento dos meios está no Anexo C. As placas foram incubadas na estufa a 30 °C durante 10 dias.

As placas foram observadas diariamente (Figura 8). Após os 10 dias de cultivo, as colônias, tanto de bactérias quanto de fungos leveduriformes, foram repicadas para placas novas visando a separação em culturas puras que foram utilizadas em análises posteriores. Os fungos que cresciam no decorrer do tempo de incubação eram transferidos imediatamente para placas contendo o meio Potato Agar Dextrose (PDA - Difco: 4 g/l extrato de batata, 20g/l dextrose, 15 g/l ágar) e passaram a ser mantidos em estufa a 28 °C.

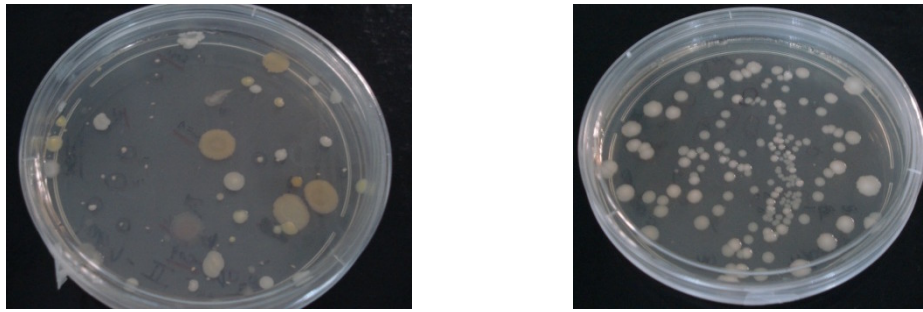


Figura 8: Foto mostrando a diversidade de colônias encontradas nas placas contendo o conteúdo intestinal das larvas com o passar dos dias.

As colônias (n =320) após repique individual foram classificadas utilizando o teste de Gram. Assim, foi possível separar os microrganismos em dois grupos: fungos leveduriformes e bactérias (Gram positivas e Gram negativas). Além disso, foi possível classificar as colônias em grupos de acordo com características morfológicas (forma, coloração, tamanho da colônia) levando em consideração o teste de Gram.

5.14. Sequenciamento do gene 16S rDNA das bactérias isoladas pelo método tradicional de cultivo

Visto que a caracterização microbiológica através dos métodos clássicos para a identificação bacteriana baseada em características morfológicas não apresenta uma alta eficácia e na maioria das vezes não é suficiente informativa e distintiva, optamos também por sequenciar a região hipervariável V3 do gene 16S rDNA de algumas bactérias que foram isoladas pelos métodos tradicionais de cultivo. De acordo com a separação dos grupos, colônias bacterianas foram escolhidas aleatoriamente dentro de cada grupo.

A partir do pré-inóculo, 30°C, *overnight*, de cada cepa realizado no meio de isolamento inicial da mesma: caldo tripticaseína de soja (TSB: Difco Laboratories: 15 g/l caseína pancreática digestiva, 5 g/l papaína digestiva de soja, 5 g/l cloreto de sódio, pH 7,0)

ou caldo extrato de levedura dextrose peptona (YPD Broth: 20 g/l peptona, 20 g/l dextrose, 10 g/l extrato de levedura, pH 5,0). A partir do pellet bacteriano obtido após centrifugação de 1,5 ml de cultura realizou-se a extração de DNA utilizando o protocolo CTAB modificado de AUSUBEL *et al.*, 2004; BRODERICK *et al.*, 2004 (Anexo B); a amplificação do gene 16S rRNA conforme descrito no item 5.4 do presente trabalho; a quantificação e purificação dos produtos de PCR conforme descrito no item 5.5 do presente trabalho; a preparação da amostra para ser seqüenciada segundo o item 5.10; e a análise das seqüências obtidas descrita no item 5.11.

5.15. Ensaio de atividade celulolítica

Os microrganismos isolados nas culturas puras (bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos) foram testados com o objetivo de verificar a habilidade desses degradarem carboximetilcelulose, um polímero derivado da celulose. Para isso utilizamos o meio ágar carboximetilcelulose (CMC: 15 g/l ágar, 5 g/l carboximetilcelulose e 0,2 g/l extrato de levedura). Os microrganismos foram repicados em placas de Petri contendo ágar CMC. As placas foram incubadas durante 4 dias a 28 °C e tratadas com o corante Vermelho de Congo para confirmar a presença ou ausência de atividade endoglucanásica de acordo com TEATHER & WOOD, 1982. A solução aquosa de Vermelho de Congo 0,2 % (p/v) foi adicionada às placas até que todas as colônias estivessem imersas. Após 30 minutos retirou-se a solução de Vermelho de Congo e adicionou-se a solução de NaCl 1 M até cobrir toda a placa. Após 15 minutos, essa solução foi retirada das placas. A formação de halos amarelos ao redor das colônias indica que houve a degradação da carboximetilcelulose. As medições do diâmetro do halo produzido e da colônia foram feitas com o auxílio de uma régua. A atividade

enzimática é calculada pela razão entre o diâmetro da zona de degradação amarelada incluindo a colônia pelo diâmetro da colônia (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). O controle positivo e o controle negativo utilizado para comparar as atividades celulíticas foram *Pichia pastoris* KM71H e *E. coli* DH5a, respectivamente.

5.16. Microscopia confocal

Utilizamos a microscopia confocal para tentar diferenciar melhor os fungos filamentosos isolados da microbiota intestinal de larvas de *S. levis* do campo e do laboratório. As fotos por microscopia confocal das hifas foram visualizadas em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510) (Figura 15, Figura 16, Figura 17, Figura 18). Esse serviço foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular no Hemocentro na UNICAMP.

5.17. Ensaio de Resistência a Antibióticos

Todas as bactérias isoladas foram testadas quanto à sensibilidade a diferentes classes de antibióticos disponíveis comercialmente, cada um com um mecanismo e espectro de ação diferente. Para esses testes foram utilizados os meios TSA pH 7,0 e YPD pH 5,0 (dependendo de onde os microrganismos foram isolados previamente) contendo diferentes antibióticos: ampicilina (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml) e kanamicina (25 µg/ml). As placas foram incubadas aerobicamente durante 36 h a 30 °C.

Os antibióticos utilizados apresentam diferentes mecanismos de ação e por isso eles foram escolhidos (Tabela 1).

Tabela 1: Antibióticos utilizados durante o teste de resistência a antibióticos e seus mecanismos de ação sobre os microrganismos.

Antibiótico		Forma de Ação	Mecanismo de ação
Ampicilina	Família dos β -lactâmicos	Bactericida	Atua impedindo o crescimento de bactérias Gram positivas inibindo alguns passos na síntese de peptídeoglicanos da parede celular bacteriana.
Tetraciclina		Bacteriostática de ação de amplo espectro	Atua inibindo a síntese protéica bloqueando a ligação do aminoacil tRNA ao sítio A do ribossomo.
Cloranfenicol		Bacteriostática de ação de amplo espectro	Atua inibindo a síntese protéica inibindo a enzima peptidil transferase impedindo o crescimento da cadeia de polipeptídeos durante a síntese protéica.
Kanamicina	Família dos aminoglicosídeos	Bactericida e/ou Bacteriostática de ação de amplo espectro	As moléculas se ligam ao ribossomo bacteriano interferindo na síntese protéica.

5.18. Efeito da dieta alimentar artificial na biodiversidade intestinal

Todas as bactérias e fungos leveduriformes isolados do intestino de larvas do campo foram plaqueados em placa de Petri contendo o meio da dieta alimentar artificial utilizado para a manutenção das larvas no laboratório no CTC. O objetivo desse estudo foi de verificar a interferência desse meio de cultura na diversidade microbiana encontrada no intestino das larvas do campo. O meio da dieta alimentar artificial foi preparado no CTC (Anexo A). As placas foram incubadas aerobicamente durante 36 h a 30 °C.

5.19. Seqüenciamento do gene 16S rDNA de bactérias que apresentaram atividade celulolítica

As cepas bacterianas que apresentaram atividade celulolítica em meio CMC foram crecidas em meio LB Broth por 30 °C, *overnight*. No outro dia, a cultura foi centrifugada e o DNA genômico do pellet bacteriano foi extraído utilizando o protocolo CTAB e amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 27F e 1500R seguindo as mesmas condições conforme descrito no item 5.4 em Materiais e Métodos do presente trabalho. A amplificação foi visualizada em gel de agarose 1 % para conferir o tamanho do fragmento esperado. A banda na altura de 1,5 kb foi recortada do gel e purificada utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) de acordo com as instruções do fabricante e depois quantificado em gel de agarose 1 %. O produto de PCR de cepas com atividades celulolíticas foi seqüenciado conforme descrito no item 5.10 em Materiais e Métodos do presente trabalho. As seqüências foram analisadas conforme o item 5.11 em Materiais e Métodos do presente trabalho.

6. Resultados

6.1. Análise das seqüências do gene 16S rRNA

Dos 96 clones de cada biblioteca, 94 do laboratório e 84 do campo apresentaram seqüências de boa qualidade e que permitir dar continuidade às análises. Todas as seqüências de 16S rDNA foram classificadas em OTU's utilizando o programa DOTUR. As OTUs quando definidas como um grupo de seqüências que apresentaram uma similaridade única, 97%, 95% e 90% entre elas a classificação é composta por 80, 48, 37 e 19 OTU's na população do campo e 84, 44, 33 e 19 OTU's na população do laboratório.

Utilizando o estimativo de riqueza não-paramétrico Chao1 (Chao, 1984), utilizando os dados gerados no programa DOTUR, verificamos que a biblioteca da população do campo prevê 52 OTUs contra 46 OTUs previstas para o laboratório quando se define OTU como um grupo de seqüência com uma diferença = 5% entre si.

Buscas utilizando o programa BLASTN no NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1990), mostrou que as seqüências são pertencentes a 5 classes taxonômicas: Gamma-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria, Alfa-Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (Tabela 2). Foi possível classificar a microbiota total em 14 gêneros, 1 grupo da categoria *Candidatus* e 2 grupos não-cultiváveis. Destes 8 gêneros, 1 grupo da categoria *Candidatus* e 2 grupos não-cultiváveis pertencem à população microbiana intestinal das larvas do laboratório enquanto que 8 gêneros, 1 grupo da categoria *Candidatus* e nenhum grupo não-cultivável à população microbiana intestinal das larvas do campo (Tabela 2).

Os gêneros *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Citrobacter*, *Diaphorobacter*, *Methylophilus* e *Streptococcus* foram somente encontrados nos clones da biblioteca genômica construída a partir da microbiota intestinal das larvas do laboratório e *Buchnera*, *Raoultella*,

Enterobacter, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Sphingobacterium* foram somente encontrados nas do campo; enquanto que, *Klebsiella* e *Acinetobacter* foram gêneros encontrados em ambas as bibliotecas (Tabela 2).

Dentre os clones de cada biblioteca, observamos que os grupos uncultivable *Enterobacter* e uncultivable *Flavobacteriaceae* foram somente encontrados na biblioteca do laboratório. Nenhum grupo de não-cultiváveis foi encontrado na biblioteca do campo; enquanto que, o grupo Gamma-Proteobacteria – *Candidatus* Nardonella – foi encontrado em ambas as bibliotecas (Tabela 2).

Tabela 2: Composição da microbiota intestinal bacteriana *Sphenophorus levis* das comunidades de larvas coletadas em campo e no laboratório.

Aplicação Filogenética das seqüências de 16S rRNA		Número de seqüências encontradas em cada grupo	
		Laboratório (n = 94)	Campo (n = 84)
Gamma-Proteobacteria			
	<i>Candidatus Nardonella</i>	77	20
	<i>Buchnera</i> sp.	0	1
	<i>Klebsiella</i> sp.	1	14
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp.	1	0
	<i>Raoultella</i> sp.	0	17
	<i>Enterobacter</i> sp.	0	26
	Unculture <i>Enterobacter</i>	1	0
	<i>Acinetobacter</i> sp.	2	1
Moraxellaceae			
Beta-Proteobacteria			
Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i> sp.	1	0
Comamonadaceae	<i>Diaphorobacter</i> sp.	2	0
Methylophilaceae	<i>Methylophilus</i> sp.	1	0
Alfa-Proteobacteria			
Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i> sp.	1	0
Firmicutes			
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> sp.	1	0
	<i>Lactococcus</i> sp.	0	3
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i> sp.	0	1
Bacteroidetes			
Flavobacteriaceae	Uncultivable <i>Flavobacteriaceae</i>	4	0
Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i> sp.	0	1

Como podemos observar na Figura 9, o gráfico das frequências relativa dos gêneros encontrados mostra com mais clareza a comparação entre a microbiota intestinal das populações do *S. levis* do campo e do laboratório. É possível detectar que a composição microbiana intestinal entre essas duas populações se apresenta bem distintas. Para verificar qual era a população de larvas que apresentava uma maior diversidade microbiana foi utilizado o índice de Shannon o qual demonstrou que a população do campo ($H' = 3,36$) apresenta-se levemente mais diversa com relação à do laboratório ($H' = 3,26$) (similarity index of sequences = 95 %). A curva de rarefação está disponível na Figura 10. Ela indica que OTU_{0.03} a população intestinal das larvas do laboratório e do campo foram amostradas adequadamente (considerando uma similaridade = 97 %).

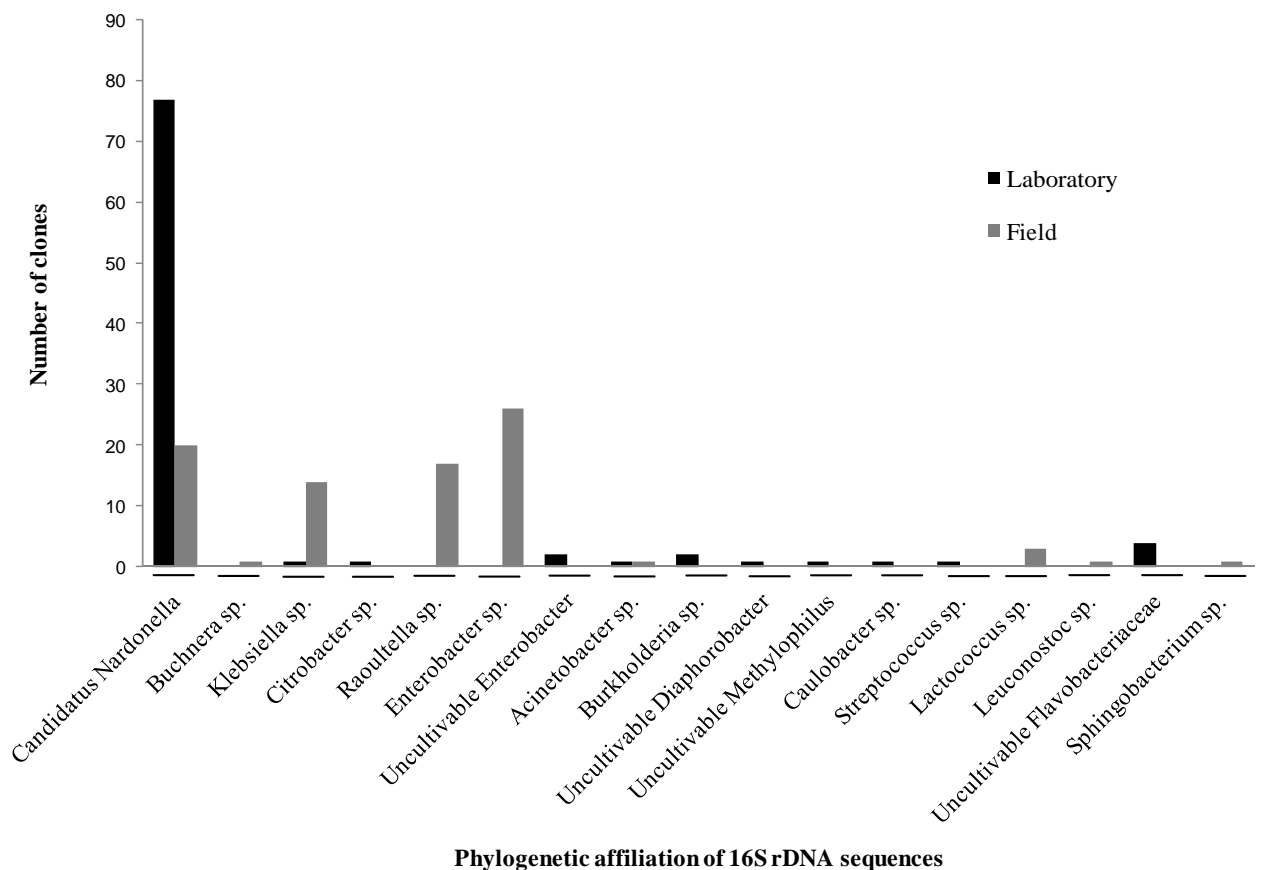
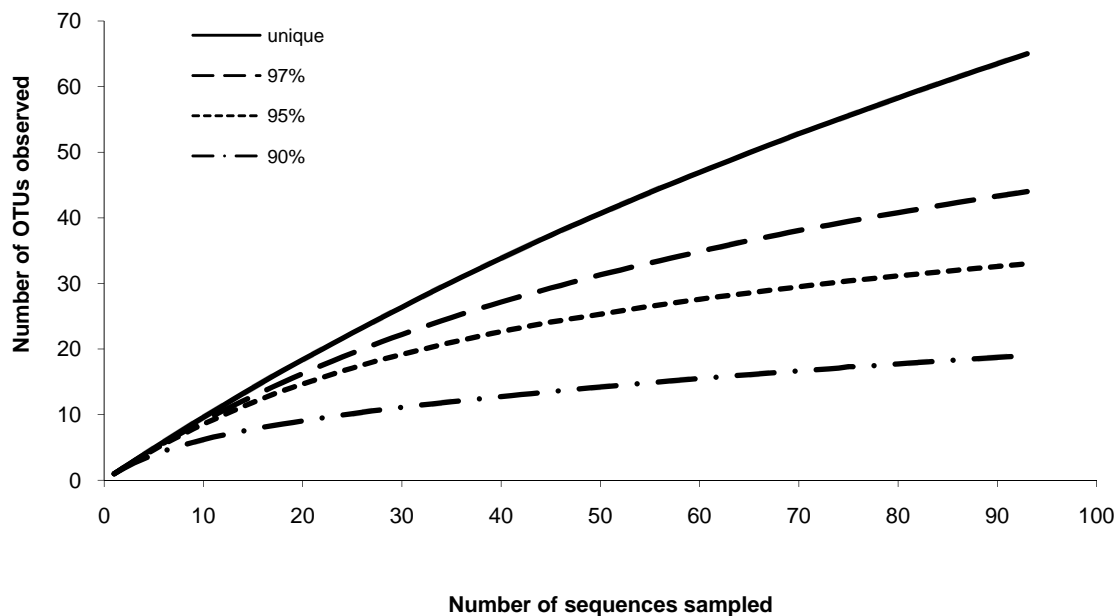


Figura 9: Histograma de frequências relativas baseado na distribuição de número de clones de cada biblioteca baseado nos dados da Tabela 3.

Rarefaction Curve - Laboratory Population



Rarefaction Curve - Field Population

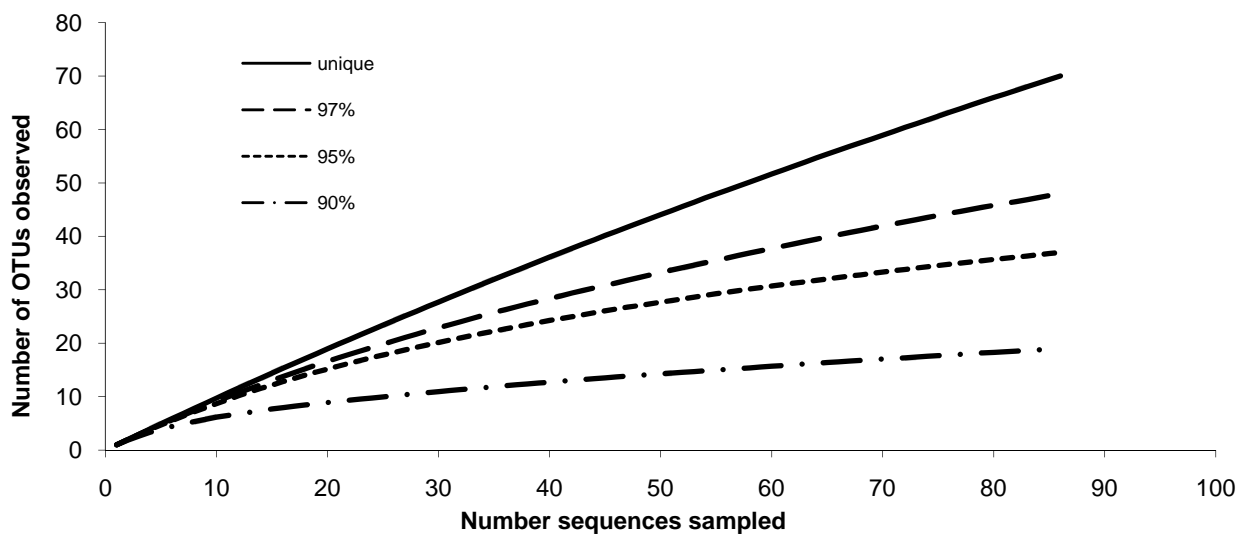


Figura 10: Análise de rarefação das bibliotecas de 16S rRNA construídas com intestinos de larvas do laboratório e do campo de *Sphenophorus levis*. As curvas de rarefação foram cosntruídas baseadas no programa DOTUR e estão baseadas em seqüências únicas, com 97 %, 95 % e 90 % de similaridade entre as OTUs.

Para estimar a abundância de diferentes filotipos bacterianos nas populações do campo e do laboratório, restringimos nossas considerações aos gêneros (índice de similaridade das seqüências = 95 %), aos grupos não-cultiváveis e a categoria *Candidatus* (Figura 11). Clones da categoria *Candidatus* Nardonella são predominantes na população das larvas cultivadas em laboratório (84 %) enquanto que na população de larvas do campo essa categoria está representada por apenas 24 % dos clones (Figura 11). Em seguida temos os gêneros *Enterobacter* (31%), *Raoultella* (20%) e *Klebsiella* (17%) como os mais abundantes nos clones da população das larvas do campo (Figura 11). Clones pertencentes à família Enterobacteriaceae são predominantes na biblioteca do campo (70 %), enquanto que na biblioteca do laboratório eles estão presentes, porém em uma proporção bem menor (5,5 %). Clones pertencentes à classe taxonômica Beta-Proteobacteria foram somente encontrados na biblioteca do laboratório (Tabela 2).

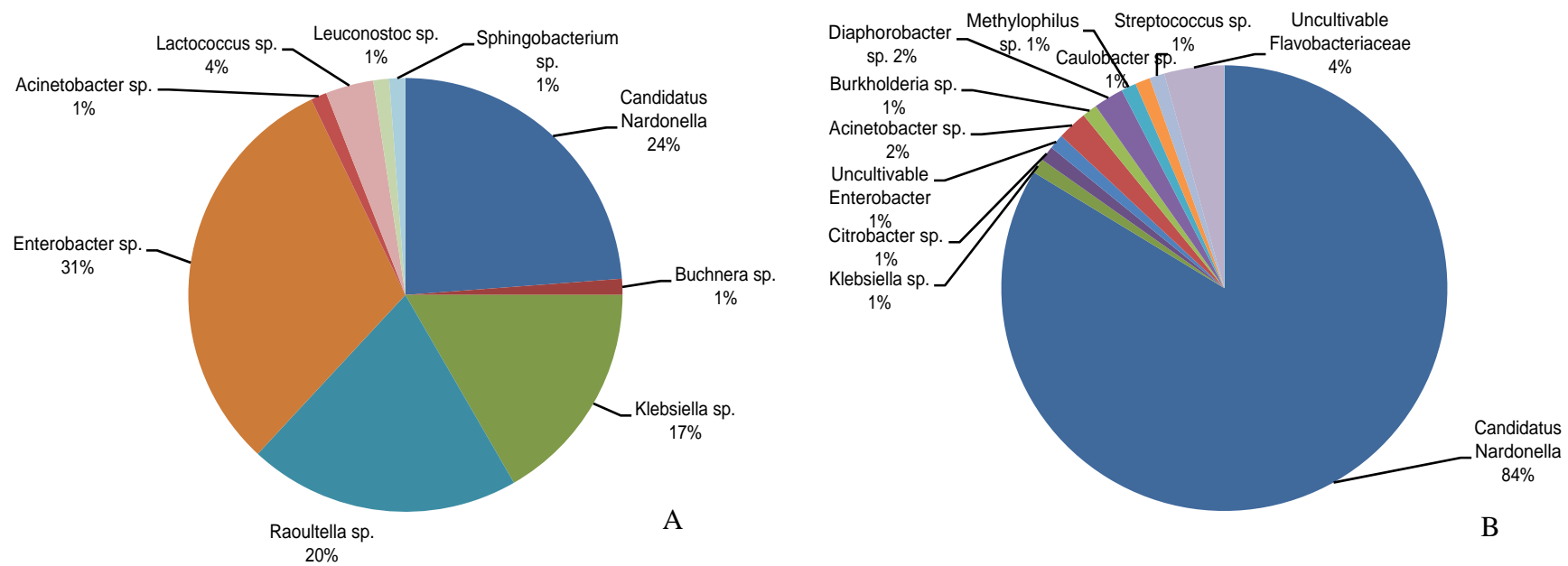


Figura 11: Abundância relativa de diferentes filotipos bacterianos da microbiota intestinal de larvas de *S. levis* cultivadas no campo (A) e coletadas no laboratório (B) baseada nas seqüências encontradas nas bibliotecas de 16S rDNA.

6.2. Bactérias intestinais cultiváveis

Foi observado durante os procedimentos de coleta do intestino do *S. levis*, uma diferença bastante evidente com relação a coloração do intestino nas espécie cultivadas em laboratório daquelas que são encontrada no campo. Todas as larvas que são cultivadas em laboratório apresentaram a coloração do conteúdo intestinal mais escura do que as larvas coletadas no campo (Figura 12).



Figura 12: Figura mostrando a coloração diferencial entre o conteúdo intestinal de larvas de *S. levis* do campo (esquerda) das do laboratório (direita).

Os microrganismos que tiveram a capacidade de crescer em meio YPD pH 5,0 foram somente isolados do intestino das larvas de *S. levis* do campo. Já em meio TSA pH 7,0 foi observado o crescimento de microrganismos tanto do intestino de larvas do campo quanto das do laboratório.

A caracterização morfológica dos microrganismos isolados pelos métodos tradicionais foi primeiramente baseada no teste de Gram realizado no laboratório do Professor Doutor Clovis Wesley Oliveira de Souza do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos. A partir desse teste foi possível diferenciar bactérias de fungos leveduriformes. Além disso, foi possível diferenciar bactérias Gram positivas das Gram negativas. Tanto bactérias quanto fungos leveduriformes foram caracterizados com base em parâmetros morfológicos como: coloração, forma, característica, tamanho e elevação da

colônia. Com isso foi possível agrupá-las em 9 grupos bacterianos (A, B, C, D, E, F, G, H e I) e 6 grupos de fungos leveduriformes (J, K, L, M, N e O) (Tabela 3).

Com base nesses parâmetros morfológicos observamos na microbiota intestinal das larvas coletadas no campo a presença de 8 grupos bacterianos (A, B, C, E, F, G, H e I) e 5 grupos de fungos leveduriformes (J, K, L, N e O) enquanto que na microbiota intestinal das larvas do laboratório a presença de 6 grupos bacterianos (B, C, D, E, F e H) e 5 grupos de fungos leveduriformes (J, K, M, N e O) (Tabela 4). Essas duas populações compartilham 5 grupos bacterianos (B, C, E, F e H) e 4 grupos de fungos leveduriformes (J, K, N e O) (Tabela 4).

Tabela 3: Classificação mais detalhada dos grupos de microrganismos (bactérias e leveduras) encontrados na microbiota intestinal de *S. levis* nas populações do campo e do laboratório. Também são mostrados dados morfológicos os quais foram utilizados como parâmetro de classificação aos grupos.

Grupos		Gram	Coloração da colônia	Forma da célula e/ou característica da colônia	Elevação da colônia
A	Bactéria	Gram Positiva	Branca, brilhosa, viscosa	Coco	Pulvinada
B	Bactéria	Gram Positiva	Branca, opaca	Coco	Achatada
C	Bactéria	Gram Positiva	Amarela	Cocobacilo	Elevada
D	Bactéria	Gram Negativa	Trasparente, viscosa	Bacilo	Umbiculada
E	Bactéria	Gram Positiva	Branca	Coco	Convexa
F	Bactéria	Gram Positiva	Alaranjadas	Bacilo	Convexa
G	Bactéria	Gram Negativa	Marron	Cocobacilo	Convexa
H	Bactéria	Gram Positiva	Transparente	Bacilo	Achatada
I	Bactéria	Gram Positiva	Transparente	Coco	Achatada
J	Levedura	-	Branca, translúcida	Colônias pequenas	Convexa
K	Levedura	-	Amarela clara, opaca	Colônias pequenas	Convexa
L	Levedura	-	Branca, brilhosa	Células em forma de garrafa	Elevada
M	Levedura	-	Branca	Células arredondadas	Convexa
N	Levedura	-	Amarela alaranjada	Colônias pequenas	Elevada
O	Levedura	-	Branca, opaca	Colônias com caráter fermentativo	Pulvinada

Tabela 4: Grupos de bactérias e leveduras encontrados nas populações intestinais das larvas do campo e do laboratório de *S. levis*. Em vermelho, os grupos de microrganismos compartilhados entre as duas populações.

Grupos		Campo	Laboratório
A	Bactéria	x	
B	Bactéria	x	x
C	Bactéria	x	x
D	Bactéria		x
E	Bactéria	x	x
F	Bactéria	x	x
G	Bactéria	x	
H	Bactéria	x	x
I	Bactéria	x	
J	Levedura	x	x
K	Levedura	x	x
L	Levedura	x	
M	Levedura		x
N	Levedura	x	x
O	Levedura	x	x

Todas as bactérias isoladas do intestino das larvas tanto do campo quanto do laboratório foram testadas com relação a sua resistência a antibióticos. Em meio YPD pH 5,0 foi observado o crescimento de 6 grupos bacterianos (A, C, E, F, H e I) e um grupo de fungo leveduriforme (L) (Tabela 5). Das larvas isoladas do campo com resistência a pelo menos um antibiótico, apresentando uma maior resistência à kanamicina (25 µg/ml) apesar de 3 grupos bacterianos isolados do campo (A, F e E) apresentarem representantes que possuem resistência a mais de um antibiótico ao mesmo tempo (Figura 20). Em meio TSA pH 7,0 foi observado o crescimento de 5 grupos bacterianos (A, B, C, E e H) isolados do campo e 4 grupos bacterianos isolados do laboratório (B, C, D e H) além de 3 grupos de fungos leveduriformes do laboratório (J, K e O) (Tabela 5); a maioria deles apresentou resistência a pelo menos um antibiótico, apresentando uma maior resistência à tetraciclina (25 µg/ml) (Figura 20). Além disso, foi observado que 5 grupos bacterianos do campo (A, B, C, E e H) e 4 grupos bacterianos do laboratório (B, C, D e H) além de 2 fungos leveduriformes do laboratório (J e O) apresentaram resistência a mais de um antibiótico ao mesmo tempo (Tabela 5).

Para testar o efeito da dieta alimentar artificial os testes foram realizados utilizando tanto bactérias quanto fungos leveduriformes do campo já previamente isolados em culturas puras. No total, observou-se que 3 grupos bacterianos (A, E e F) e 3 grupos de fungos leveduriformes (J, L e O) tiveram a capacidade de crescer no meio da dieta alimentar artificial (Tabela 6).

Todos os isolados de bactérias e fungos leveduriformes (n=320) foram testados quanto à capacidade de degradarem carboximetilcelulose (Figura 13). Foi observado que 6 grupos bacterianos (A, B, C, D, E e H) apresentaram atividade celulolítica enquanto que apenas um grupo de fungo leveduriforme (J) apresentou tal atividade (Tabela 7). Dentre as cepas celulolíticas: 5 grupos bacterianos (A, B, C, E e H) foram isolados do campo enquanto

Tabela 5: Grupos de bactérias e leveduras que apresentaram resistência a antibióticos nos meios que foram previamente isolados. Em vermelho, aqueles grupos que apresentaram resistência a mais de um antibiótico ao mesmo tempo.

Grupos	Resistência a Antibióticos		
	YPD (pH 5)	TSA (pH 7)	
	Campo	Campo	Lab
A	x	x	
B		x	x
C	x	x	x
D			x
E	x	x	
F	x		
G			
H	x	x	x
I	x		
J			x
K			x
L	x		
M			
N			
O			x

Tabela 6: Efeito da dieta alimentar artificial sob o crescimento de microrganismos isolados da população de *S. levis* do campo. Mostrado os grupos que conseguiram crescer no meio.

Grupos	Dieta Artificial
	Campo
A	x
B	
C	
D	
E	x
F	x
G	
H	
I	
J	x
K	
L	x
M	
N	
O	x

Tabela 7: Grupos de bactérias e leveduras que foram capazes de degradar Carboximetilcelulose.

Grupos	Atividade Celulolítica	
	Campo	Laboratório
A	x	
B	x	x
C	x	x
D		x
E	x	
F		
G		
H	x	x
I		
J		x
K		
L		
M		
N		
O		

que 4 grupos bacterianos (B, C, D e H) do laboratório (Tabela 7). O único grupo de fungos leveduriformes (J) com atividade celulolítica foi isolado da microbiota intestinal de larvas do laboratório (Tabela 7).

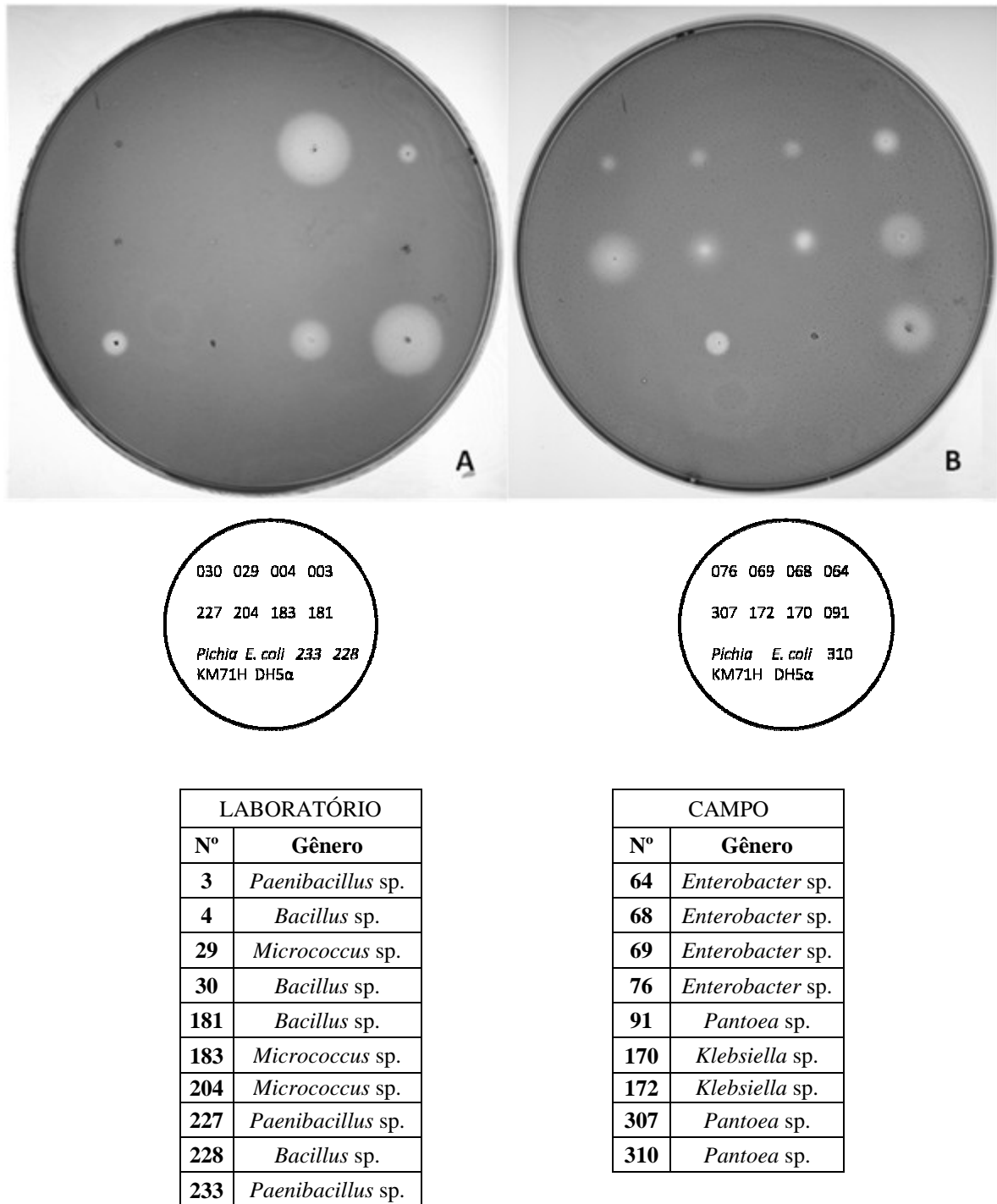


Figura 13: Ensaio para testar a atividade CMCásica. Halos representam capacidade de degradar CMC. Figura A: bactérias do Laboratório. Figura B: bactérias do campo. Halos ao redor das colônias representam atividade

celulolítica em ágar CMC corado com Vermelho de Congo. *Pichia* KM71H: controle positivo. *E. coli* DH5a: controle negativo.

Durante o cultivo dos microrganismos em ágar CMC e após a coloração com o corante Vermelho de Congo, foi observada a formação de halos azuis ao redor de algumas colônias (dado não mostrado).

Também foram isolados da microbiota intestinal de larvas coletadas no campo e no laboratório 4 fungos filamentosos nomeados *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 1 (SLFF1), *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 2 (SLFF2), *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 3 (SLFF3) e *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 4 (SLFF4) (Figura 14). Três fungos filamentosos foram isolados da microbiota intestinal de larvas de *S. levis* do campo (SLFF2, SLFF3 e SLFF4) enquanto apenas um foi isolado do intestino das larvas do laboratório (SLFF1). Os fungos SLFF1 e SLFF2 são macroscopicamente muito semelhantes entre si. Na tentativa de diferenciá-los utilizamos a microscopia confocal (Figura 15, Figura 16). Os fungos SLFF 3 e SLFF 4 também foram observados utilizando essa técnica. (Figura 17, Figura 18). A atividade CMCásica, capacidade de degradar CMC, também foi testada nestes quatro fungos filamentosos, porém, apenas dois apresentaram tal atividade: SFLL1 e SFLL2 (Figura 19).

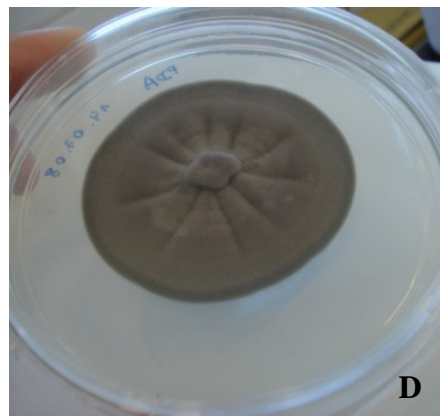
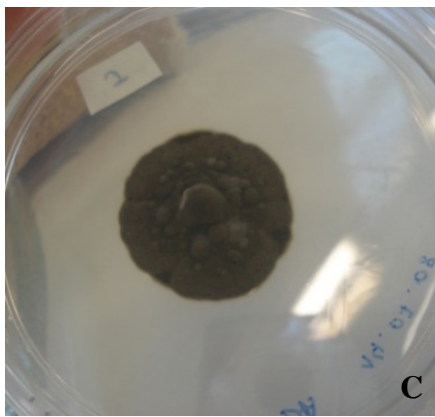
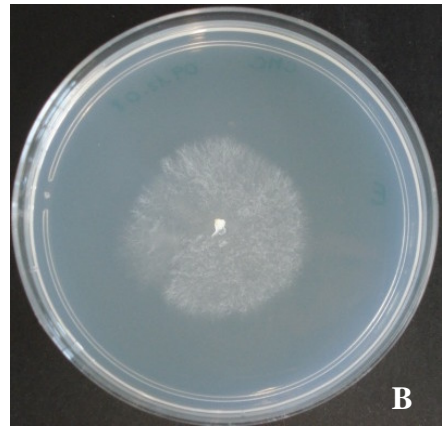
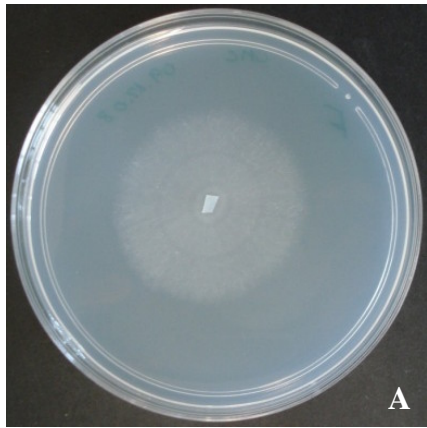


Figura 14: Fungos filamentosos isolados da microbiota intestinal de *S. levis*. SLFF1 (A), SLFF2 (B), SLFF3 (C) e SLFF4 (D).

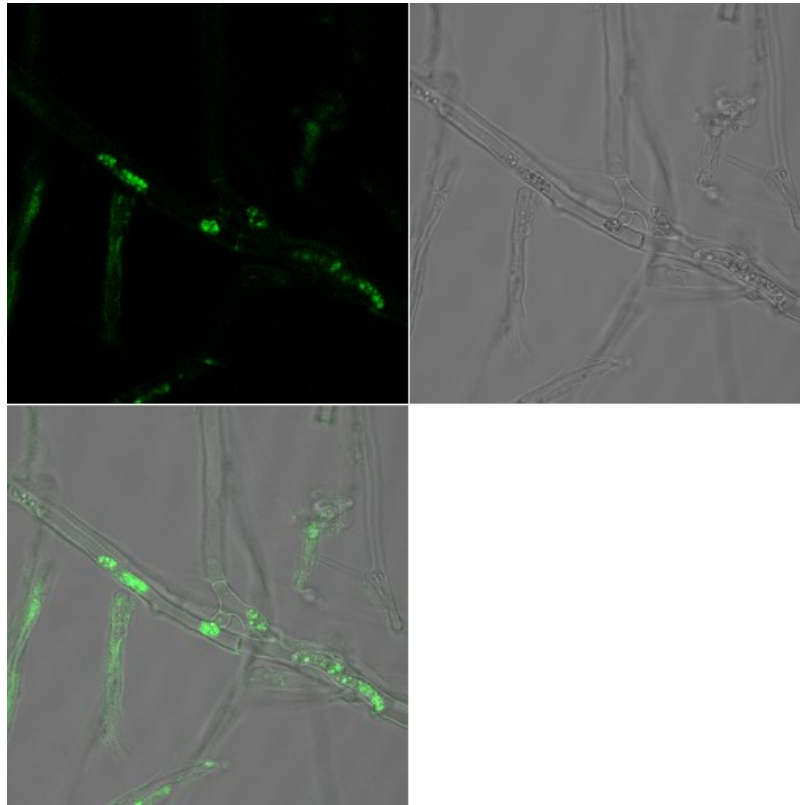


Figura 15: Microscopia confocal *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 1. Em verde autofluorescência.

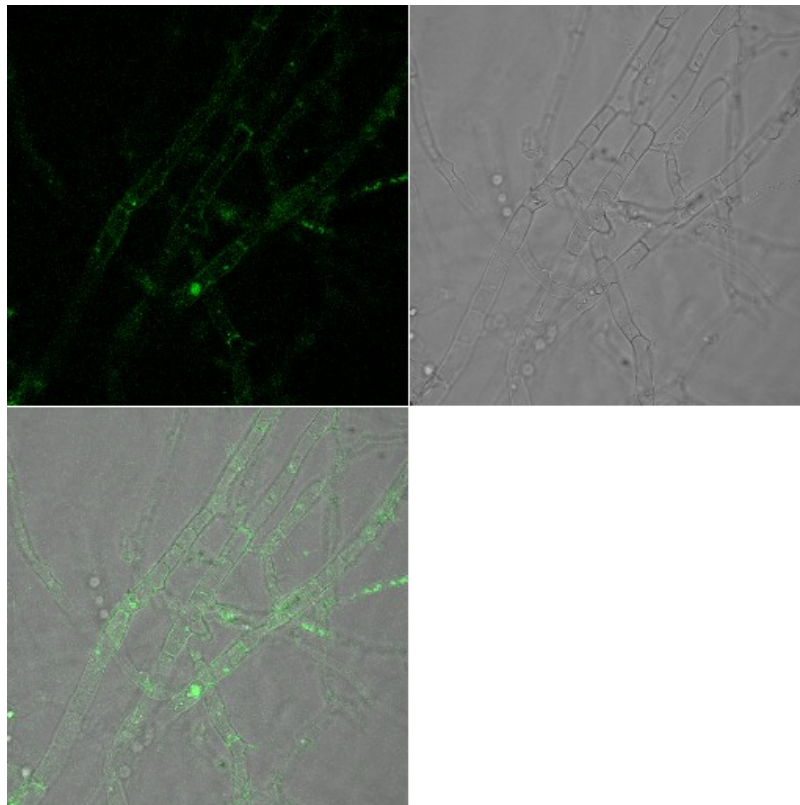


Figura 16: Microscopia confocal *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 2. Em verde autofluorescência.

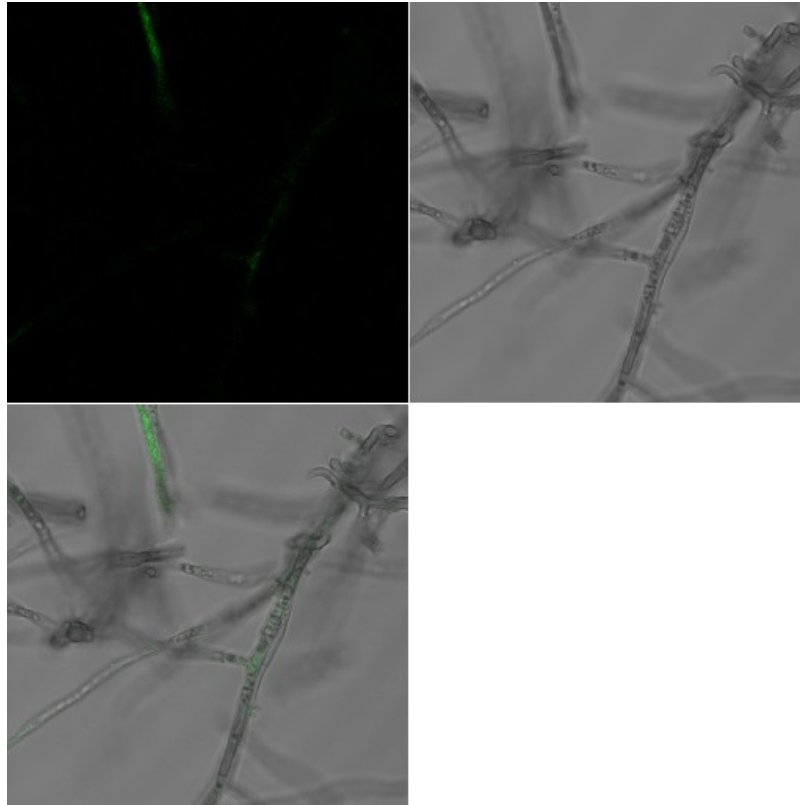


Figura 17: Microscopia confocal *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 3. Em verde autofluorescência.

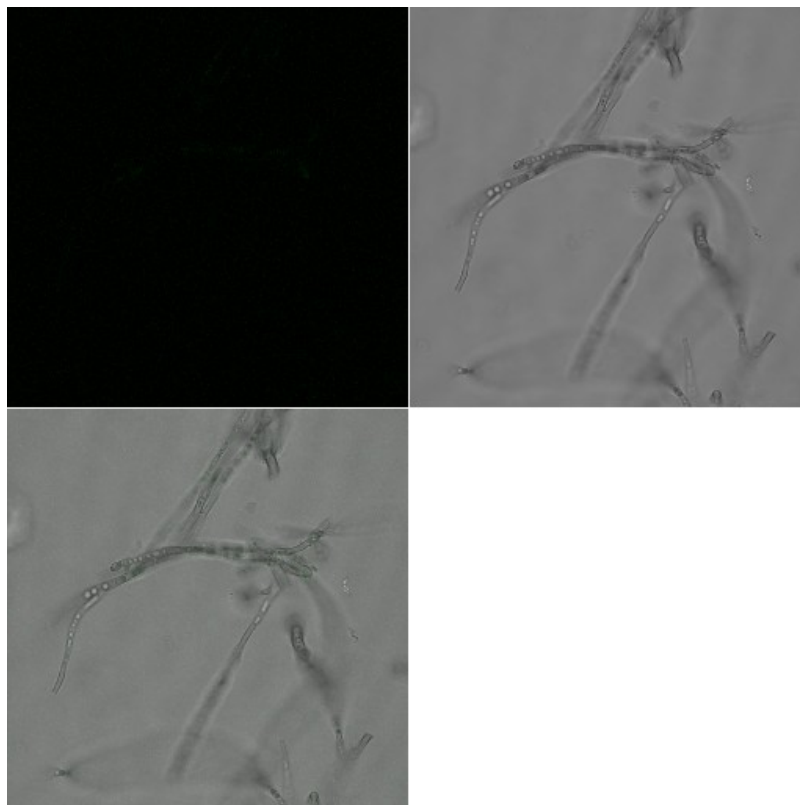


Figura 18: Microscopia confocal *Sphenophorus levis* Filamentous Fungi 4.

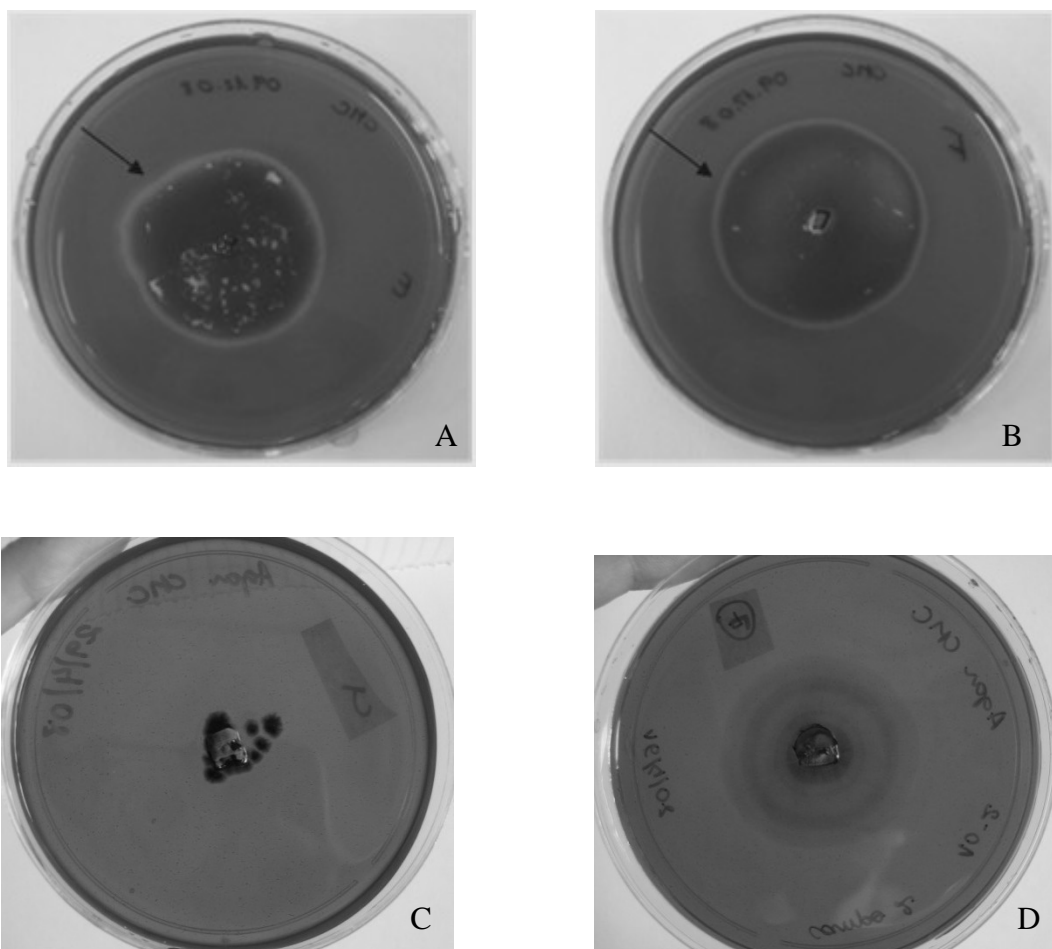


Figura 19: Ensaio de atividade celulolítica em ágar CMC corado com Vermelho de Congo aplicado nos fungos filamentosos SLFF1 (A) SFLL2 (B), SFLL3 (C), SFLL4 (D). A formação do halo de degradação de CMC encontra-se em amarelo: indicado pela seta.

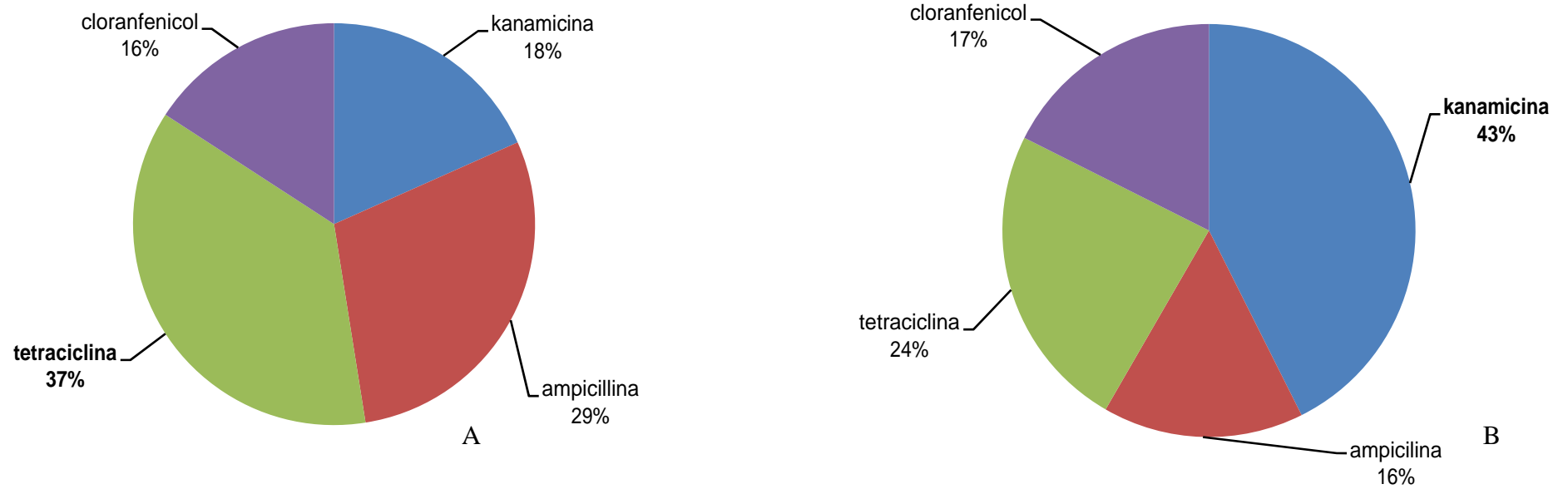


Figura 20: Teste realizado para verificar resistência bacteriana a antibióticos com diferentes mecanismos de ação. Foram testados individualmente nos meios onde os microrganismos foram isolados previamente: TSA pH 7,0 (A) e meio YPD pH 5,0 (B).

Devido à dificuldade de interpretação dos dados provenientes somente das análises dos parâmetros morfológicos bacterianas também utilizamos dados do seqüenciamento da região hipervariável V3 do gene 16 rDNA para dar continuidade as análises e tornar os resultados mais claros e concretos. As bactérias isoladas pelos métodos tradicionais de cultivo foram classificadas em OTU's de acordo com os resultados encontrados nos bancos de dados BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e RDP-II (COLE *et al.*, 2007). Assim, foi possível classificá-las nas seguintes classes taxonômicas: Alfa-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Firmicutes e Acidobacteria totalizando 12 gêneros e 1 grupo não-cultivável. Desses, foram encontrados no laboratório 6 gêneros [*Bacillus* (57.16 %), *Micrococcus* (7.14 %), *Microbacterium* (7.14 %), *Asaia* (7.14 %), *Acinetobacter* (7.14 %), *Leuconostoc* (7.14 %) e *Paenibacillus* (14.28 %)] e 8 gêneros no campo [*Bacillus* (4 %), *Lactococcus* (16 %), *Klebsiella* (12 %), *Weissella* (32 %), *Microbacterium* (4 %), *Asaia* (16 %), *Pantoea* (4 %), *Leuconostoc* (4 %) e *Curtobacterium* (4 %)] e um grupo não-cultivável (4 %). Os gêneros *Micrococcus*, *Acinetobacter* e *Paenibacillus* apresentaram-se exclusivos nos microrganismos isolados do laboratório enquanto que os gêneros *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Weissella*, *Asaia*, *Pantoea* e *Curtobacterium* foram encontrados somente no campo. Em comum temos os gêneros *Bacillus*, *Microbacterium* e *Leuconostoc* (Tabela 8). Para verificar qual população de larvas que apresenta uma maior diversidade microbiana baseada na caracterização daquelas bactérias que foram isolados pelos métodos tradicionais de cultivo e posteriormente tiveram o gene 16S rDNA seqüenciado também utilizamos o índice de Shannon o qual demonstrou que a população do campo ($H' = 2,97$) apresenta-se mais diversa com relação à do laboratório ($H' = 2,57$) (considerando uma similaridade = 97 %).

Comparando os dados do seqüenciamento dos clones das bibliotecas do campo e do laboratório com os das bactérias cultiváveis observa-se que 3 filogrupos são coincidentes Firmicutes, Alfa-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria enquanto que o filogrupo

Acidobacteria foi encontrado somente dentro dos cultiváveis e os Beta-Proteobacteria e Bacteroidetes somente nas bibliotecas (Tabela 8).

Os gêneros coincidentes entre os clones e os cultiváveis foram *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* e *Leuconostoc*. Onde *Lactococcus* encontra-se presente somente no campo em ambas as análises; *Klebsiella* foi encontrado nos clones tanto no campo quanto no laboratório, porém nos cultiváveis somente no campo; *Acinetobacter* encontrado nos clones tanto no campo quanto no laboratório, porém nos cultiváveis somente no laboratório; *Leuconostoc* encontrado nos clones somente no campo, porém nos cultiváveis somente no laboratório.

Com relação à resistência a antibióticos observou-se que as bactérias cultiváveis seqüenciadas no campo apresentaram maior resistência a kanamicina (25 µg/ml) e as do laboratório a tetraciclina (10 µg/ml) o que está de acordo com o que foi encontrado com relação aos morfotipos. Durante as buscas nos bancos de dados, algumas seqüências 16s rDNA das bactérias cultiváveis também apresentavam similaridade (= 95%) com seqüências referentes aos clones das bibliotecas do campo e do laboratório (Endosymbiont of *Sphenophorus levis*) depositadas pelo nosso grupo de pesquisa. Porém, isso só foi encontrado em 7 cepas (*Lactococcus* e *Klebsiella* spp.) das 41 seqüenciadas.

Tabela 8: OTU's referentes às bactérias isoladas pelos métodos tradicionais de cultivo.

Gênero (similaridade = 95%)	Laboratório n= 15	Campo n=25
Gamma-Proteobacteria		
<i>Klebsiella</i> sp.	0	3
<i>Pantoea</i> sp.	0	1
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0
Alfa-Proteobacteria		
<i>Asaia</i> sp.	0	4
Firmicutes		
<i>Bacillus</i> sp.	9	1
<i>Lactococcus</i> sp.	0	4
<i>Weissella</i> sp.	0	8
<i>Leuconostoc</i> sp.	1	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	0
Acidobacteria		
<i>Micrococcus</i> sp.	1	0
<i>Microbacterium</i> sp.	1	1
<i>Curtobacterium</i> sp.	0	1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	0	1

Dentre as bactérias cultiváveis seqüenciadas 24,4 % apresentaram atividade celulolítica e dentro dessas 70 % foram isoladas do laboratório e 30 % do campo. As bactérias que apresentaram atividade celulolítica foram seqüenciadas e pertencem aos gêneros *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea* foram encontradas tanto na microbiota intestinal de larvas do campo quanto do laboratório. Desses gêneros celulolíticos foram encontrados no campo *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea* e no laboratório foram encontrados os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus*. Comparações feitas com as cepas celulolíticas isoladas da microbiota intestinal de *S. levis* com as cepas controle: *Pichia*

pastoris KM71H (controle positivo) e *E. coli* (controle negativo) mostraram que as cepas com maior atividade celulolítica na população do laboratório foram n ° 4 (*Bacillus* sp.) e a n ° 228 (*Bacillus* sp.) enquanto que no campo a de n ° 170 (*Klebsiela* sp.), de acordo com teste t de Student ($p < 0,05$) (Figura 21).

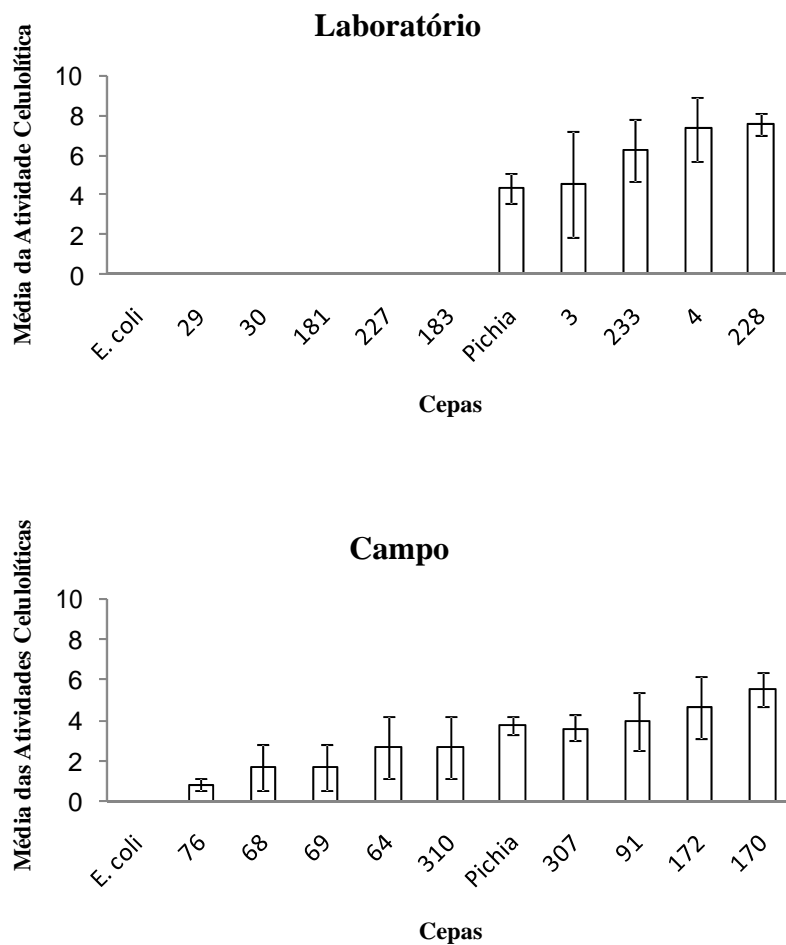


Figura 21: Atividade celulolítica calculada pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. A comparação utiliza o teste estatístico t de Student ($p < 0,05$) comparando o controle positivo (*Pichia pastoris* KM71H) e o controle negativo (*Escherichia coli* DH5 a) contra cada cepa celulolítica isolada de laboratório e de campo intestinal população. As cepas números estão representadas na Figura 13.

7. Discussão

A interação entre a microbiota intestinal e seu inseto hospedeiro parece desempenhar um papel importante já que, alguns microrganismos colonizadores do trato intestinal parecem ter habilidade e capacidade em decompor e/ou modificar compostos químicos presentes na dieta alimentar. Como exemplo, podemos citar a quebra da celulose proveniente da dieta em açúcares mais simples permitindo que esses sejam convertidos em energia, assim como, a diminuição do efeito de substâncias tóxicas ao hospedeiro (CAMPBELL, 1990; DILLON, & DILLON, 2004; DOUGLAS, 1992; GENTA, *et al.*, 2006; TERRA & FERREIRA, 2005). Alguns endosimbiontes têm a capacidade de disponibilizar nitrogênio, carbono e outras fontes de energia para seu hospedeiro (BREZNAK, 2000). As associações simbióticas na maioria dos insetos apresentam-se pouco exploradas, incluindo naqueles insetos que apresentam grande importância econômica, como é o caso do *Sphenophorus levis*.

Neste trabalho, verificou-se que a coloração do intestino das larvas cultivadas no laboratório é mais escura do que as larvas coletadas no campo, isso possivelmente pode estar ocorrendo devido ao tipo de dieta alimentar artificial que está sendo oferecido às larvas no cultivo no laboratório, ou então pela dieta diferente dos indivíduos do campo. Segundo dados informados pela Southern Association of Agricultural Experiment Station Directors, em 2001, foi observado que a coloração e a textura do conteúdo intestinal no bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) variam de acordo com o tipo de dieta ingerida por esses insetos.

Foi observado o crescimento de microrganismos isolados tanto do intestino das larvas do campo quanto das do laboratório em meio TSA pH 7,0 enquanto que, em meio YPD pH 5,0 somente microrganismos isolados do intestino das larvas do campo foram capazes de crescer. Talvez isso possa ser explicado baseado nas necessidades especiais de

cultivo que são necessárias para o isolamento de alguns microrganismos da microbiota intestinal dessas larvas. Por outro lado, como a microbiota intestinal das larvas do laboratório parece estar pré-selecionada devido à sua manutenção em laboratório utilizando a dieta alimentar artificial, isso pode estar alterando ou interferindo na composição da microflora intestinal desses insetos. Além disso, insetos que apresentam diferentes estágios alimentares, como por exemplo, aqueles sob constante alimentação versus aqueles que não têm alimento disponível por um período de tempo ou até mesmo aqueles que utilizam outro tipo de dieta como as que são ricas em compostos secundários, por exemplo, têm a capacidade de alterar o pH ou o potencial redutor intestinal contribuindo assim para uma modificação na composição da microbiota intestinal (DILLON, & DILLON, 2004). Finalmente, os componentes de cada meio de cultura (TSA ou YPD) acabam sendo seletivos com relação aos tipos de microrganismos que terão capacidade de crescer (ver Anexo C). O meio TSA apresenta-se altamente nutritivo mesmo não tendo carboidratos na sua composição, enquanto que o YPD tem a peptona como fonte de carbono e a dextrose é fonte de carboidrato, sendo mais indicado para o isolamento de levedura, porém também é utilizado para bactérias.

Análises utilizando diferentes antibióticos demonstraram que a quantidade de bactérias resistentes a antibióticos no meio TSA foi ligeiramente maior naqueles microrganismos isolados dos insetos do campo (A, B, C, E e H) do que naqueles do laboratório (B, C, D e H) apresentando 3 grupos em comuns entre eles (B, C e H) (Tabela 5 e Figura 20).

Os ensaios realizados com a dieta alimentar artificial servindo de meio de cultivo para os microrganismos isolados do intestino das larvas do campo mostraram que as bactérias e fungos leveduriformes tiveram uma diminuição na habilidade de crescer. Apenas três grupos bacterianos (A, E e F) e três grupos de fungos leveduriformes (J, L e O) foram capazes de crescer no meio da dieta alimentar artificial, mostrando assim, uma diminuição no

crescimento bacteriano. Microrganismos intestinais têm a habilidade para se adaptar a mudanças que são causadas por alterações na dieta pela indução de enzimas e mudanças na população da comunidade microbiana (KAUFMAN & KLUG, 1991; SANTO-DOMINGO *et al.*, 1998). Neste caso, a dieta alimentar artificial é produzida utilizando o bagaço da cana-de-açúcar além de outros compostos como proteínas, aminoácidos.

Desta forma a dieta alimentar artificial parece ter um impacto na diversidade da microbiota intestinal como mostrado no teste realizado para verificar o efeito dessa sob os microrganismos isolados da microbiota das larvas do campo (Tabela 6). Isso possivelmente pode estar acontecendo devido à presença do agente antimicrobiano (Nipagin) e o fungicida (Wintomylon) na dieta alimentar artificial, que servem para conservar o meio por mais tempo livre de contaminações por microrganismos (Hoffman *et al.*, 1966; Bell & Joachim, 1976) e podem estar contribuindo para uma diminuição na diversidade microbiana intestinal. Já foi mostrado em outros trabalhos que a dieta alterou significativamente a composição da microbiota intestinal da Lagarta do Sobreiro (*Lymantria dispar* – Linnaeus, 1759) (BRODERICK *et al.*, 2004), baratas (*Periplaneta americana* – Família Blattidae) (KANE & BREZNAK, 1991) e o grilo doméstico *Acheta domesticus* (LINNAEUS, 1758) (DOMINGO *et al.* 1988). Também devemos levar em conta que as larvas que são mantidas em condições laboratoriais no CTC por muitas gerações em um ambiente controlado e submetidas a uma dieta alimentar específica a qual contém compostos antimicrobianos e antifúngicos, que podem estar atuando diretamente sobre microrganismos que possam ser importantes para o processo de digestão do *S. levis*.

A curva de rarefação demonstrou que o número de clones de cada biblioteca era suficiente e apropriado para realização das análises comparativas entre os grupos, não sendo necessário aumentar o número amostral.

As análises moleculares mostraram que os filotipos encontrados no laboratório são pertencentes a 8 gêneros, 1 grupo da categoria *Candidatus* e 2 grupos não-cultiváveis enquanto que na população do campo foram observados 8 gêneros, 1 grupo da categoria *Candidatus* e nenhum grupo não-cultivável. Neste estudo foi encontrada uma diversidade levemente maior na população do campo ($H' = 3,36$) do que a do laboratório ($H' = 3,26$) baseada nos cálculos utilizando o índice de Shannon utilizando os dados encontrados a obtidos com a metodologia independente de cultivo. Já baseado na caracterização daquelas bactérias que foram isolados pelos métodos tradicionais de cultivo e posteriormente tiveram o gene 16S rDNA seqüenciado o índice de Shannon demonstrou que a população do campo ($H' = 2,97$) apresenta-se levemente mais diversa com relação à do laboratório ($H' = 2,57$).

A composição da comunidade bacteriana intestinal pode ser reflexo do tipo de alimento disponível aos insetos criados no laboratório, ou outros fatores ambientais que são diferentes entre as populações campo e de laboratório (MEAD *et al.*, 1988). No campo, as larvas se alimentam de cana-de-açúcar enquanto que no laboratório as larvas têm acesso ao bagaço da cana-de-açúcar, porém misturado com outros compostos como proteínas, sais minerais, vitaminas no meio desenvolvido para a dieta alimentar artificial além dos compostos que são utilizados para a conservação do meio (Nipagin: Methylparabeno; 35 mg/ml e Wintomylon: ácido Nalidíxico; 0.0625 mg/ml). Desta forma, a dieta do laboratório apresenta-se mais restritiva. Outros estudos mostraram que a microbiota intestinal em larvas de terceiro instar de *Automeris zucana* (Lepdoptera – Saturniidae) expostas a diferentes hábitos alimentares poderiam afetar a composição da comunidade microbiana intestinal, embora tenha sido observada a predominância dos micróbios que são oriundos de transmissão vertical materna por meio da cápsula que protege o ovo e que serve de alimento para as larvas recém eclodidas (SITTENFELD *et al.*, 2002).

O grupo *Candidatus* Nardonella pertencente ao filogruppo Gamma-Proteobacteria foi o grupo predominante encontrado nas larvas do laboratório; embora também tenha sido encontrado na população do campo, porém em menor proporção. A categoria *Candidatus* Nardonella é freqüentemente encontrada como endosimbionte de besouros como *Cosmopolites sordidus*, *Metamasius callizona*, *Metamasius hemipterus*, *Rhynchophorus palmarum*, *Scyphophorus yuccae*, *Sphenophorus abbreviate*, *Yuccaborus frontalis* (LEFÈVRE *et al.*, 2004). Todas as seqüências relatadas como *Candidatus* Nardonella apresentaram maior índice de similaridade com seqüências 16S rDNA do endosimbionte *Metamasius hemipterus* como descrita em LEFÈVRE *et al.*, 2004.

Metamasius hemipterus (L.) (NARDON *et al.*, 1984) é um Coleoptera da família Curculionidae que está associado principalmente com ataque a plantações de banana e banana-nanica (*Musa* spp.) além de culturas de cana-de-açúcar. As infestações causadas por *M. hemipterus* (L.) são também observadas em alguns palmeiras (GIBLIN-DAVIS *et al.*, 1994; PEÑA *et al.*, 2005; VAURIE, 1966). *M. hemipterus* é considerado uma praga nas plantações de cana-de-açúcar no Oeste da Índia, América Central e do Sul (VAURIE, 1966) e foi descrita pela primeira vez na Flórida em 1984 (WOODRUFF AND BARANOWSKI 1985). O ciclo de vida deste inseto é similar ao do *S. levis*, tanto em sua fase adulta quando na larval, além de apresentar hábitos alimentares muito parecidos. O controle deste inseto é feito utilizando iscas químicas. Alguns fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* também são utilizados para controlar essa praga. Porém o nematóide *Steinernema carpocapsae* apresenta grande maior eficácia contra as larvas de *M. hemipterus* não atuando contra os insetos adultos (GIBLIN-DAVIS *et al.*, 1996).

Geralmente a microbiota intestinal de insetos é considerada como um ecossistema complexo o qual contém centenas de espécies bacterianas incluindo microrganismos aeróbios, anaeróbios e/ou aeróbios facultativos (BRAUMAN, 2000;

VARMA *et al.*, 1994). A família das Enterobacteriaceae, que apresentam capacidade de fermentar açúcares (EWING, 1986), parece desempenhar um papel fundamental para a população de *S. levis* do campo já que 67.5 % dos clones dessa biblioteca pertencem a essa família enquanto contra 3% na população do campo. De acordo com DILLON *et al.*, 1996, essa família também aparece como predominante na microbiota intestinal de *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), o principal vetor de *Leishmania major*. O gafanhoto do deserto, *Schistocerca gregaria*, também apresenta na sua microbiota intestinal a predominância de microrganismos da família das Enterobacteriaceae (HUNT & CHARNLEY, 1981). O arroz caruncho *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Rhynchophoridae) apresenta uma associação endossimbiótica com *Sitophilus oryzae principal endosymbiont* (SOPE), uma bactéria gram-negativa pertencentes à família Enterobacteriaceae (LEFÈVRE *et al.*, 2004). Enterobacteriaceae e outros grupos como Gamma-Proteobacteria, Bacteroidetes, Lactobacillae são consistentemente associados e frequentemente observados em bibliotecas de microbiota intestinal de artrópodes em geral (BRODERICK *et al.*, 2004; EGERT *et al.*, 2003).

Parece ser necessária a presença de microrganismos celulolíticos no trato intestinal de *S. levis*, os quais têm a capacidade de degradar celulose e hemicelulose. Testes de atividade CMCásica mostraram que cinco grupos bacterianos do campo (A, B, C, E e H), quatro do laboratório (B, C, D e H) e um grupo de fungos leveduriformes (J) da população do laboratório apresentaram capacidade de degradar carboximetilcelulose (Tabela 7). As bactérias parecem ter uma maior capacidade em utilizar CMC como fonte de energia do que as leveduras no intestino de *S. levis*, entretanto, Suh e colaboradores (SUH *et al.*, 2003) encontraram leveduras no intestino de besouros *Odontotaenius disjunctus* e *Verres sternbergianus* (Coleoptera: Passalidae) que possivelmente estão envolvidas com a degradação de madeira. A maior atividade celulolítica foi observada em bactérias isoladas de

larvas do laboratório, calculado baseado no halo formado na degradação do Agar CMC (Figura 13; Figura 21).

O corante Vermelho de Congo é utilizado como indicador de pH: em soluções ácidas ele apresenta coloração azul e em soluções básicas coloração vermelha. Assim justificamos a formação de halos azuis ao redor de algumas colônias. Neste caso, esses microrganismos provavelmente devem ter secretado substâncias, na tentativa de conseguirem crescer no meio, tornando-o ácido.

A atividade CMCásica também foi testada nos quatro os fungos filamentosos isolados, porém apenas dois deles apresentaram tal atividade SLFF1 e SLFF2 (Figura 19). As fotos de Microscopia Confocal indicam que os fungos SLFF1 e SLFF2 não são os mesmos morfológicamente, ou seja, há uma diferença com relação às hifas onde no primeiro elas não têm septos enquanto que o segundo têm. Porém esses fungos ainda não foram identificados com relação a gênero e espécie. Estudos demonstram o potencial das linhagens de *Trichoderma* na produção de celulases (COCHET, 1991; GASHE, 1992) apesar de que espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também são citadas como boas produtoras destas enzimas (KURASAWA *et al.*, 1992, KUHAD & SINGH 1993, CASTILLO *et al.*, 1994, KIM *et al.*, 1997).

A análise molecular realizada nas cepas bacterianas degradadoras de carboximetilcelulose (Figura 13) mostrou que as de números 04, 201 e 30 são do gênero *Bacillus*; números 03, 227, 228, 233 são do gênero *Paenibacillus*; número 20 é do gênero *Micrococcus*; número 70 (que foi usada como controle negativo) do gênero *Klebsiella*; números 65, 66 e 69 ao gênero *Enterobacter*. Desta forma, observamos que o gênero *Paenibacillus* foi o mais encontrado além de ter sido isolado tanto da microbiota intestinal de larvas do campo quanto do laboratório, sendo o principal grupo que apresentou atividade

CMCásica. Além dos microrganismos dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Klebsiella* também terem apresentado tal atividade. Surpreendentemente, o gênero *Paenicabillus* não foi encontrado na biblioteca genômica de 16S rRNA. Já foi isolada do intestino de cupins uma cepa do gênero *Paenibacillus* a qual é capaz de degradar celulose e hemicelulose que possivelmente está contribuindo para a degradação de alimentos do solo (OHKUMA et al., 2003). Também já foi relatado que a cepa *Paenibacillus* sp. BP-23 (formalmente *Bacillus* sp. BP-23) (BLANCO & PASTOR, 1993) apresenta um sistema de glucanases complexo, incluindo diversas celulasas (BLANCO et al., 1998; PASTOR et al., 2001), xilanases (BLANCO et al., 1995; BLANCO et al., 1999) e pectinases (SORIANO et al., 2000). Segundo a Delalibera et al., 2005, as culturas de microrganismos celulolíticos da microbiota intestinal de *S. vestita* que apresentaram degradadores CMC foram capazes de digerir fracamente tiras de papel filtro. Isto indica que um conjunto de micróbios produz uma mistura de enzimas que é, provavelmente, necessária para a completa digestão da celulose que não poderia ser realizada por um único isolado.

Bibliotecas de 16S rDNA muitas vezes revelam uma maior diversidade microbiana do que as metodologias de cultivos tradicionais em ambientes como água do mar, água doce e solo (HANDELSMAN, 2004). A caracterização da comunidade bacteriana intestinal de larvas do campo e do laboratório de *S. levis* pela metodologia de 16S rDNA sem a necessidade de cultivo revelaram um número semelhante de OTU's comparado com o que foi observado pela metodologia dependente de cultura; apesar de alguns grupos serem compartilhados e outros exclusivos de acordo com cada metodologia aplicada. A ausência de microrganismos do filogruppo Acidobacteria nas bibliotecas de 16S rDNA pode estar relacionada com as metodologias aplicadas: extração de DNA, PCR, clonagem. Além disso, talvez os microrganismos desse filogruppo, por estarem menos presentes quando comparados com os outros, não foram identificados. Os filogruppos Beta-Proteobacteria e Bacteroidetes

devem apresentar microrganismos que dependem de condições especiais para isolamento e cultivo através das metodologias tradicionais (condição nutricional diferenciada, necessidade de cultivo anaeróbio), fazendo que estes não tenham sido isolados pelos métodos tradicionais por esse motivo. Isto é semelhante aos resultados a partir de *Dendroctonus frontalis* (VASANTHAKUMAR *et al.*, 2006) e *Lymantria dispar*, no qual 77% dos morfotipos foram cultiváveis (BRODERICK *et al.*, 2004).

8. Conclusões

- Há diferença entre a composição da microbiota intestinal entre as duas populações. A microbiota intestinal das larvas do campo apresentou-se mais diversa do que a do laboratório através das análises moleculares que foram calculadas pelo índice de diversidade de Shannon;
- Foi possível isolar microrganismos através das técnicas tradicionais de cultivos e também caracterizá-los molecularmente utilizando o marcador 16S rDNA;
- Foram encontrados microrganismos (bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos) capazes de degradar celulose tanto na microbiota intestinal das larvas do campo quanto das do laboratório e isto pode contribuir para estudos voltados a degradação da biomassa e resíduos de origem lignocelulolítica.
- O gênero *Paenibacillus* foi o grupo mais abundante que apresentou atividade CMCásica, porém não foi o que se apresentou com maior atividade celulolítica (*Bacillus* sp. e *Klebsiella* sp.).

9. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, L.C. Bicudo da Cana-de-Açúcar. **Boletim Técnico do Centro de Tecnologia Canavieira**, Piracicaba. 2005.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215:403-410. 1990.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**. 59(1):143-69. 1995.

ANDERSON, R. S. Weevil and plants: phylogenetic versus ecological mediation of evolution of host plant association in Curculionidae (Coleoptera: Curculionidae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**. 165:197-232. 1993.

ANDERSON, R. S. The Dryophthorinae of Costa Rica and Panama: Checklist with keys, new synonymy and descriptions of the new species of Cactophagus, Mesocordylus and Rhodobaenus (Coleoptera, Curculionoidea). **Zootaxa**. 80:1-94. 2002.

ASSIS, P. E. P. **Revista Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**. 13, 10-12. 1994.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SMITH, J. A.; SEIDMAN, J. G.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York. Greene Publishing Associates and Wiley-Inter-science, 1992. Volume 2.

ATLAS R.M.; BARTHA R. Microbial Evolution and Biodiversity - The origins of life. In: ATLAS R.M.; BARTHA R. (Ed.) **Microbial Ecology: fundamentals and applications**. 4ª Edição. Menlo Park, Califórnia: Book News. 1997. p.37-39.

BADILLA, F. F. **Controle microbiano do gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (col.: Curculionidae) com *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN, 1883**. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 1989.

BAKER, G.C.; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, 55(3):541-55, 2003..

BARRETO, M.R; BARRETO, E. S.; ANJOS, N. Leveduras Associadas a *Spermologus rufus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 27(2): 295-297, 1998.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(11):4988-95, 2004.

BEGON, M.; HAPER, J. L.; TOWNSED, C. R. **Ecology: individuals, populations and communities**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1996.

BEGUIN, P. & AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology**. 13:25-58, 1994.

BELL R.A. & JOACHIM F.G. Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco horn worm and pink bollworms. **American Entomology Society**. 69:365-373, 1976.

BERTILSSON, S.; CAVANAUGH, C.M.; POLZ, M.F. Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable. **Applied and Environmental Microbiology**. 68(12):6077-6086, 2002.

BLANCO, A. & F. I. J. PASTOR. Characterization of Cellulase-Free Xylanases from the Newly Isolated *Bacillus* Sp Strain Bp-23. **Canadian Journal of Microbiology**. 39:1162-1166, 1993.

BLANCO, A.; P. DIAZ; J. MARTINEZ; T. VIDAL; A. L. TORRES; F. I. J. PASTOR. Cloning of a new endoglucanase gene from *Bacillus* sp. BP-23 and characterisation of the enzyme. Performance in paper manufacture from cereal straw. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 50:48-54, 1998.

BLANCO, A.; P. DIAZ; J. ZUECO; P. PARASCANDOLA; F. I. J. PASTOR. A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. **Microbiology-Uk**. 145:2163-2170, 1999.

BLANCO, A.; T. VIDAL; J. F. COLOM; F. I. J. PASTOR. Purification and Properties of Xylanase-a from Alkali-Tolerant *Bacillus* Sp Strain Bp-23. **Applied and Environmental Microbiology**. 61:4468-4470, 1995.

BOLETIM ELETRÔNICO DEDICADO A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - **Inovação UNICAMP** - Edição Especial P&D em Cana e Etanol - 5 de Dezembro de 2005. Edição virtual disponível: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/news-ctc1.php>>.

BOLETIM MENSAL DOS COMBUSTÍVEIS RENOVÁVEIS. Ministério de **Minas e Energia; Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis**. Departamento de Combustíveis Renováveis. Edição nº 12 – Dez/2008.

BORNEMAN, J.; P. W. SKROCH; K. M. O'SULLIVAN; J. A. PALUS; N. G. RUMJANEK; J. L. JANSEN; J. NIENHUIS; E. W. TRIPLETT. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**. 62:1935-1943, 1996.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; CORRÊA FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. **S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. 1ª Edição. São Paulo: Editora Manole, 2002. 609 p.

BRAUMAN, A.; DORE, J.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D.; BREZNAK, J.A.; KANE, M.D. Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. **FEMS Microbiology Ecology**. 35:27-36, 2001.

BRAUMAN, A. Effect of gut transit and mound deposit on soil organic matter transformations in the soil feeding termite: A review. **European Journal of Soil Biology**. 36:117-125, 2002.

BREZNAK, J.A. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litter-feeding termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.E. & HIGASHI, M. **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 2000. p. 209–231.

BREZNAK J. & BRUNE A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Microbiology**. 39:453-487, 1994.

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

BRUNE A. & FRIEDRICH M. Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. **Current Opinion in Microbiology**. 3(3):263-269, 2000.

CAETANO, F. H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**. 35:257-305, 1994.

CAMPBELL, B.C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. (Ed.). **Insect Plant Interactions**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 1-45.

CARLILE, M. J. & WATKINSON, S. C. **The fungi**. 1ª Edição. London: Academic Press, 1997. 482p.

CASTILLO, M.R., GUTIERREZ-CORREA, M., LINDEN, J.C., TENGERDY, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**. 16:967-972, 1994.

Centro Nacional de Referência em Biomassa – CENBIO – Disponível em: <http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp>. Acesso em setembro de 2008.

CERDA, H.; FERNANDEZ, G.; LOPEZ, A.; VARGA, J. Olfactory attraction of the sugar cane weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant odors, and its aggregation pheromone. **Florida Entomologist**. 82:103-112, 1999.

CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**. 11:265–270, 1984

CHOI, B.K.; WYSS, C.; GÖBEL, U.B. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. **Journal of Clinical Microbiology**. 34(8):1922-1925, 1996.

CLARRIDGE J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. 17(4):840-862, 2004.

COCHET, N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. **Enzyme and Microbial Technology**. 13:104-109, 1991

COFFEY, D.G.; BELL, D.A.; HENDERSON, A. Cellulose and cellulose derivatives. In: STEPHEN, A.M. (1ª Edição.). **Food Polysaccharides and their Applications**. New York, USA: Marcel Dekker, 1995. 654p.

COLE, J. R., CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M., TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**. 35:D169-D172, 2007.

COLLIN, P.H. **Dictionary of Environment & Ecology**. 5ª Edição. PH Collin Bloomsbury Publishing. 2004. 264p.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) - Terceiro levantamento da safra de 2008 de cana-de-açúcar. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3cana_de_acucar.pdf>. Acesso em Dezembro de 2008.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**. 3:39-109, 1985.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M.; ALMEIDA, L.C.; CASTILHO, H.J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 22:553-558, 1987.

DELALIBERA Jr., I.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. 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). **Environmental Entomology**. 34(3):541-547, 2005.

DELALIBERA Jr, I.; VASANTHAKUMAR, A.; BURWITZ, B. J.; SCHLOSS, P. D.; KLEPZIG, K. D.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K. F. Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera) colonizing Red Pine. **Symbiosis**. 43:93-104, 2007.

Departamento da Cana-de-açúcar e Agroenergia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – datado de 1/06/2007. Disponível em: <http://www.castilhogestao.com.br/docs/etanol%20a%20hora%20do%20brasil_rita%20volpato.pdf>. Acesso em Dezembro de 2008.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**. 49:71-92, 2004.

DILLON, R.J.; EL KORDY, E.; SHEHATA, M.; LANE, R.P. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 90: 699-673, 1996.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Encarte de Informações Agronômicas**. 110:25-32. 2005.

DOJKA, M.A.; HUGENHOLTZ, P.; HAACK, S.K.; PACE, N.R. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**. 64:3869–3877, 1998.

DOMINGO, J.W.S., KAUFMAN, J.W.; KLUG, M.J.; HOLBEN, W.E.; HARRIS, D.; TIEDJE, J.M. Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community in crickets. **Molecular Ecology**. 7:761-767, 1988.

DOUGLAS, A.E. Microbial brokers of insect-plant interactions. In: PROCEEDINGS OF EIGHTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INSECT-PLANT RELATIONSHIPS, 1992, Kluwer, Dordrecht. **Simpósio**. p.329–336.

DOUGLAS, A. E. & SMITH, D. C. Are endosymbioses mutualistic? **Trends in Ecology & Evolution**. 4:350–352, 1989.

DOUGLAS, A. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. **Annual Review of Entomology**. 43:17-37, 1998.

EGERT, M., WAGNER, B.; LEMKE, T.; BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. W. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Applied and Environmental Microbiology**. 69:6659-6668, 2003.

ERENO, Dinorah. Simbiose Letal. Inseticida biológico usa parceria de bactéria e nematóide para combater praga da cana. REVISTA FAPESP, EDIÇÃO IMPRESSA Nº 135. 2007.

EWING, W.H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4ª Edição. New York: Elsevier, 1986. 536 p.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Indicadores IBGE Estatística da Produção Agrícola**. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em Dezembro de 2007.

Instituto de Expansão Agrícola (IEA). **Expansão da Agroindústria Sucroalcooleira: Nova Configuração Para São Paulo**. Alceu de Arruda Veiga Filho. 2005. CCTC-IEA sob número HP-83/2005. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=3390>> . Acesso em: Dezembro de 2008.

FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

FRANZ, N.M. & VALENTE, R.M. Evolutionary trends in Derelomini flower weevils (Coleoptera: Curculionidae): from associations to homology. **Invertebrates Systematics**, 19(6):499-530, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO S.; CARVALHO, S. R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ed. Agrícola Ceres Ltda. 1978. 649 p.

GASHE, B.A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. **Journal of Applied Bacteriology**. 73:79-82, 1992.

GENTA, F.A.; DILLON, R.J.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**. 52(6): 593-601, 2006.

GIBLIN-DAVIS, R.M.; PEÑA, J.E.; DUNCAN, R.E. Lethal pitfall trap for evaluation of semiochemical mediated attraction of *Metamasius hemipterus sericeus* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**. 77: 247-255, 1994.

GIBLIN-DAVIS, R.M.; PEÑA, J.E.; DUNCAN, R.E. Evaluation of entomogenous nematodes and chemical insecticides for control of *Metamasius hemipterus sericeus* (Olivier) (Coleoptera:Curculionidae). **Journal of Entomological Science**. 31:240-251, 1996.

GIOVANNONI, S. J. The Polymerase chain reaction. In: E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (eds.) **Modern Microbiological Methods: Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics**. New York: John Wiley and Sons,1991. 177-203 p.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98, 1999.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 68:669-684, 2004.

HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**. 67: 597-607, 1975.

HENDERSON, A; PARDINI, R.; REBELLEO, J.F.S.; VANIN, S. & ALMEIDA, D. Pollination of *Bactris* (Palmae) in an amazon Forest. **Brittonia**. 52(2):160-171, 2000.

HOFFMAN J.D.; LAWSON F.R.; YAMAMOTO R. Tobacco hornworms. **In: Insect Colonization and Mass Production**. New York: Academic Pres, 1966. p. 479-486.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M. & PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**. 180:4765-4774, 1998.

HUMMEL, S. & HERRMANN, B. 1994. **General aspects of sample preparation**. In: Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens (B. Herrmann & S. Hummel, eds.). New York: Springer-Verlag, 1994. p.59-67.

HUNT, J. & CHARNLEY, A. K. Abundance and distribution of the gut flora of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 38:378-385, 1981.

HURLBERT, S.H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**. 52(4):577-586, 1971.

IZIQUE, Claudia. Nova Fronteira. Ampliação da produção de etanol no país dependerá de investimentos em ciência básica e aplicada. PESQUISA FAPESP, EDIÇÃO IMPRESSA Nº 146, ABRIL 2008.

KANE, M.D. & BREZNAK, J.A. Effect of host diet on production of organic acids and methane by cockroach gut bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 57: 2628–2634, 1991.

KATAOKA, M.; UEDA, K.; KUDO, T.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**. 151(2):249-255, 1997.

KAUFMAN, M.G. & KLUG, M.J. The contribution of hindgut bacteria to dietary carbohydrate utilization by crickets (Orthoptera, Gryllidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 98A:117-123, 1991.

KENT, A. D. & TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**. 56:211-236, 2002.

KIM, S.W., KANG, S.W., LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**. 59:63-67, 1997.

KINUURA, H. 1995. Symbiotic fungi associated with Ambrosia beetles. **Japan Agricultural Research Quarterly**. 29: 57-63, 1975.

KUHAD, R.C. & SINGH, A. Enhanced production of cellulases by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 9:100-101, 1993.

H. KUMURA, H.; TANOUE, Y.; TSUKAHARA, M.; TANAKA, T.; SHIMAZAKI, K. Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. **American Dairy Science Association**. 87:4050-4056, 2004.

KURASAWA, T., YACHI, M., SUTO, M., KAMAGATA, Y., TAKAO, S., TOMITA, F. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**. 58:106-110, 1992.

KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(9)3614-3621, 1997.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**. 312(5782):1917, 2006.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing**. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. United Kingdom : John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 1991. p. 115-175.

LEITE, L. G.; FILHO, A. B.; TAVARES, F. M.; GINARTE, C. M. A.; ALMEIDA, L. C.; BOTELHO, P. S. M. Alternativa de controle: Bicudo da cana-de-açúcar. **Cultivar Grandes Culturas**. 83ª Edição. 2005. Disponível em <www.cultivar.inf.br>. Acesso em Dezembro de 2008.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; BATISTA FILHO, A. Potencial para produção e uso de nematóides entomopatogênicos para o controle de pragas e necessidade de pesquisas no Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8, São Pedro, 2005. **Livro de Resumos**. São Pedro: SEB, p.51.

LEITE, L.G; BATISTA FILHO, A.; TAVARES, F. M.; GINARTE, C.M.A. Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar. **Revista Cultivar**. Março, 2005. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=39#>. Acesso em Novembro de 2008.

LEFÈVRE, C.; CHARLES, H.; VALLIER, A.; DELOBEL, B.; FARRELL, B.; HEDDI, A. Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils: Evidence for bacterial replacement. **Molecular Biology and Evolution**. 21:965-973, 2004.

LLOYD, M., INGER, R.F. & KING, F.W. On the diversity of reptile and amphibian species in a bornean rain forest. **American Naturalist**. 102(928):497-515, 1968.

LU, J.J.; PERNG, C.L.; LEE, S.Y.; WAN, C.C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**. 38(6):2076-2080, 2000.

LUDWIG, J.A. & REYNOLDS, J.F. **Statistical ecology**. A primer on methods and computing. New York: J. Wiley & Sons, 1988.

LYSENKO, O. Non-spore forming bacteria pathogenic to insects: incidence and mechanisms. **Annual Review of Microbiology**. 39:673-95, 1985.

MAGURRAN, A.E. **Measuring biological diversity**. Oxford, UK: Blackwell Press., 2003.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; DYMOCK, D.; WADE, W.G. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. 64(2):795-799, 1998.

MARTIN, M.M. **Invertebrate-Microbial Interactions: Ingested Fungal Enzymes in Arthropod Biology**. Cornell, Ithaca. 1987.

MANSFIELD, S. D. & MEDER, R. Cellulose hydrolysis - the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**. 10(2) 159-169, 2003.

MARQUES, Fabrício. Vias para avançar como líder do etanol. FAPESP lança programa para impulsionar pesquisa em bioenergia PESQUISA FAPESP, EDIÇÃO IMPRESSA Nº 149, JULHO 2008.

MARVALDI, A.E. & LANTERI, A.A. Key to higher taxa of South America weevils based on adult characters (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Chilena de História Natural**. 78:67-87, 2005.

MATOS, R.M.B.; SILVA, E.M.R. da; BERBARA, R.L.L. **Biodiversidade e Índices**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Dez. 1999. 20p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 107).

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. In: Borém, A (Ed.) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 205-252.

MAYNARD SMITH, J. & SZATHMÁRY, E. **The major transitions in evolution**. W. H. Freeman Spektrum. Oxford, New York. 1995.

MAYNARD, C.; BERTHIAUME, F.; LEMARCHAND, K.; HAREL, J.; PAYMENT, P.; BAYARDELLE, P.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**. 71(12):8548-57, 2005.

MCCABE, K.M.; ZHANG, Y.H.; HUANG, B.L.; WAGAR, E.A.; MCCABE, E.R. Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. **Molecular Genetics and Metabolism**. 66(3):205-211. 1999.

MEAD, L. J.; KHACHATOURIANS, G. G.; JONES, G. A. Microbial Ecology of the Gut in Laboratory Stocks of the Migratory Grasshopper, *Melanoplus-Sanguinipes* (Fab) (Orthoptera, Acrididae). **Applied and Environmental Microbiology**. 54:1174-1181, 1988.

MENDES, R.S., EVANGELISTA, L.R., THOMAZ, S.M., AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. A unified index to measure ecological diversity and species rarity. **Ecography**. 31(4):450-456, 2008.

MONTEGUT, D.; INDICTOR, N.; KOESTLER, R. J. Fungal deterioration of cellulosic textiles: a review. **International Biodeterioration**. 28:209-226, 1991.

MORAES, A. M. L.; JUNQUEIRA, A. C. V.; CELANO, V.; COSTA, G. L.; COURA, J. R. Fungal Flora of the digestive tract of *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius neglectus*,

Diptelanogaster maximus and *Panstrongylus megistus*, vectors of *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909. **Brazilian Journal of Microbiology**. 35:288-291. 2004.

MUNSON M. A.; BANERJEE A.; WATSON T. F.; WADE W.G. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(7):3023-3029, 2004.

NADALINI, M.F.C. **Caracterização genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudokoningii***. 1997. 142f. Tese de Doutorado em Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

NARDON, P.; KERMARREC, A.; NARDON, C. Distinctive Morphological Features of the Larvae of *Cosmopolites sordidus* (Germar) and *Metamasius hemipterus* (Linne) (Coleoptera-Curculionidae) Banana-Tree Parasites. **Fruits**. 39:180-187, 1984.

NEEFS, J.M.; VAN DE PEER, Y.; DE RIJK, P.; GORIS, A.; DE WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 18 Suppl:2237-2317, 1990.

OBENG-OFORI, D.; TORTO, B.; NJAGI, P.G.N.; HASSANALI, A.; AMIANI, H. Fecal volatiles as part of the aggregation pheromone complex of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera, Acrididae). **Journal of Chemical Ecology**. 20:2077-87, 1994.

OHKUMA M.; SHIMIZU, H.; THONGARAM, T.; KOSONO, S.; MORIYA, K.; TRAKULNALEAMSAI, S.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. An Alkaliphilic and Xylanolytic *Paenibacillus* Species Isolated from the Gut of a Soil-Feeding Termite. **Microbes Environ**. 18:145-151, 2003.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, 276: 734-740, 1997.

PEET, R.K. The measurement of species diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 5:285-307, 1974.

PEÑA J.E.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; & DUNCAN, R. Impact of indigenous *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on banana weevil and rotten sugarcane weevil (Coleoptera: Curculionidae) populations in banana in Florida. **Journal of Agricultural Entomology**. 12: 163-167. 1995.

PETTI C.A.; POLAGE C.R.; SCHRECKENBERGER P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 43(12):6123-6125, 2005.

PHAFF, H. J. & STARMER W.T. **Yeasts associated with plants, insects and soil**. In: **The yeasts**. A. H. Rose & J. S. Harrison (eds.). London: Academic Press, 1987. p. 123-180.

PIELOU, E.C. *Ecological Diversity*. New York : Wiley Interscience, 1975. 165 p.

PRECETTI. A. & ARRIGONI, E. Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**. São Paulo. 1990. 15p.

PRECETTI, A. A. C. M. & TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col., Curculionidae). In: COPERSUCAR (Ed.). **Reunião Técnica Agrônômica: pragas da cana-de-açúcar**. São Paulo, 1983. 32-37.

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

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 66:2541-2547, 2000.

ROS, P.B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* 20 subsp. *xyli***. 2004. 58f. Dissertação de Mestrado, Piracicaba/SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, 2004.

ROTHMAN, R.E.; MAJMUDAR, M.D.; KELEN, G.D.; MADICO, G.; GAYDOS, C.A.; WALKER, T.; QUINN, T.C. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. **The Journal of Infectious Diseases**. 186(11):1677-81, 2002.

SALVIO, G.M.M. & D'AGOSTO, M. Ciliados nas cavidades do estômago de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 53(6): 686-690, 2001.

SANTO-DOMINGO, J.W.; KAUFMAN, M.G.; KLUG, M.J.; HOLBEN, W.E.; HARIS, D.; TIEDJE, J.M. Influence on diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. **Molecular Ecology**. 7:761-767, 1998.

SAVAGE D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review in Microbiology**. 31:107-133, 1977.

SCHLOSS, P. D. and HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**. 71:1501-1506, 2005.

SCHMALENBERGER A.; SCHWIEGER F.; TEBBE C.C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(8):3557-3563, 2001.

SEBAT, J.L.; COLWELL, F.S.; CRAWFORD, R.L. Metagenomic Profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. **Applied and Environmental Microbiology**. 9(8):4927-4934, 2003.

SITTENFELD, A.; URIBE-LORO, L.; MORA, M.; NIELSEN, V., ARRIETA, G.; JANZEN, D. H. Does a polyphagous caterpillar have the same gut microbiota when feeding on different species of food plants? **Revista de Biologia Tropical**. 50(2):547-560, 2002.

SLAYTOR, M. Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? **Comparative Biochemistry and Physiology**. 103B:775-784, 1992.

SMITH, W. & GRASSLE, J.F. Sampling properties of a family of diversity measures. **Biometrics**. 33:283-292, 1977.

SORIANO, M.; BLANCO, A.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp with high activity on pectin: cloning and characterization. **Microbiology-Uk**. 146:89-95, 2000.

SOUTHERN ASSOCIATION OF AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION DIRECTORS. **Cotton Insects**. SERA-IEG-23. Boll Weevil Information Exchange Group.

2001. Disponível em <http://cipm.ncsu.edu/ent/Southern_Region/SAAESD/2001min.htm>. Acesso em Dezembro de 2008.

SRISODSUK, M. **Mode of action of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose**. Dissertação de doutorado. VTT Publications 188, Espoo, Finlândia. 1994.

SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; MCHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**. 12:3137-3145, 2003.

TEATHER, R.M. & WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. 43:777-780, 1982.

TEIXEIRA, J. C. **Nutrição de ruminantes**. Lavras: Edições FAEPE, 1992. 239p.

Termo de Referência do Workshop de Melhoramento Genético e Biotecnologia – IAC – Centro de Citricultura – Cordeirópolis – 2007. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/ver_work.php?work_id=47>. Acesso em Novembro de 2008.

TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**. 35:181-200. 1990.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. **Biochemistry of digestion**. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4. Oxford: Elsevier, 2005. p. 171–224.

TOKUDA, G.; Lo, N.; WATANABE, H.; SLAYTOR, M.; MATSUMOTO, T. Metazoon cellulase genes from termites: intron-exon structures and sites of expression. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1447:146-159, 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research**. 22:4673-4680, 1994.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**. 34(1):33-39, 2005.

VANIN, S. A. Curculionidae. In: Brandão C. R. F. & Canello. E. (eds) **Invertebrados terrestres**. volume 5. Biodiversidade no Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX. Joly, C. A. & Bicudo, C. E. M. (orgs.). São Paulo, FAPESP.133-140, 1999.

VARMA, A.; KOLLI, B. K.; PAUL, J.; SAXENA, S.; KONIG, H. Lignocellulose Degradation by Microorganisms from Termite Hills and Termite Guts - a Survey on the Present State-of-Art. **Fems Microbiology Reviews**. 15:9-28, 1994.

VASANTHAKUMAR, A., DELALIBERA Jr., I., HANDELSMAN, J., KLEPZIG, K.D., SCHLOSS, P.D., RAFFA, K.F.Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. **Environmental Entomology**. 35:1710-1717, 2006.

VAURIE, P. **Revision of the genus *Sphenophorus* in South America**. 30 p - 23 figuras. 1978.

VAURIE, P. A revision of the Neotropical genus *Metamasius* (Coleoptera: Curculionidae, Rhynchophorinae). Species groups I and II . Bull. **American Museum of Natural History**. 131: 213- 337, 1996.

VETTORE A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.D.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**. 24:1-7, 2001.

WARNECKE, F.; LUGINBÜHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T.H.; STEGE, J.T.; CAYOUE, M.; MCHARDY, A.C.; DJORDJEVIC, G.; ABOUSHADI, N.; SOREK, R.; TRINGE, S.G.; PODAR, M.; MARTIN, H.G.; KUNIN, V.; DALEVI, D.; MADEJSKA, J.; KIRTON, E.; Platt, D.; SZETO, E.; SALAMOV, A.; BARRY, K.; MIKHAILOVA, N.; KYRPIDES, N.C.; MATSON, E.G.; OTTESEN, E.A.; ZHANG, X.; HERNÁNDEZ, M.; MURILLO, C.; ACOSTA, L.G.; RIGOUTSOS, I.; TAMAYO, G.; GREEN, B.D.; CHANG, C.; RUBIN, E.M.; MATHUR, E.J.; ROBERTSON, D.E.; HUGENHOLTZ, P.; LEADBETTER, J.R. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**. 450(7169):560-565, 2007

WALENCIAK, O.; ZWISLER, W.; GROSS, E. M. Influence of *Myriophyllum spicatum*-derived tannins on gut microbiota of its herbivore *Acentria ephemerella*. **Journal of Chemical Ecology**. 28:2045-2056, 2002.

WATANABE, H.; NODA, H.; TOKUDA, G.; LO, N. A cellulase gene of termite origin. **Nature**. 394,330-331, 1998.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. 173:697-703, 1991.

WIGGLESWORTH, V.B. Digestion in the tsetse-fly: a study of structure and function. **Parasitology** 21:288-291, 1929.

WILSEY, B.J.; CHALCRAFT, D.R.; BOWLES, C.M.; WILLIG, M.R. Relationships among indices suggest that richness is an incomplete surrogate for grassland biodiversity. **Ecology**. 86(5):1178-1184, 2005.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**. 51:221-271, 1987.

WOLDA, H. Diversity, diversity indices and tropical cockroaches. **Oecologia**. 58(3):290-298, 1983.

WOOD, T. M. & MCCRAE, S. I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. **Biochemical Journal**. 171:61-72. 1978.

WOODRUFF, R.E. & BARANOWSKI, R.M. *Metamasius hemipterus* (Linnaeus) recently established in Florida (Coleoptera: Curculionidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services Division of Plant Industry. **Entomology Woodruff**. Circular No. 272, 4p., 1985.

WOODWARD, J. & WISEMAN, A. Purification and properties of beta-glucosidase from *Aspergillus terreus*. **Applied and Environmental Microbiology**. 44,1289-1295, 1982.

Workshop Tecnológico sobre “Pragas da Cana-de-açúcar” - ESALQ/USP – Piracicaba, SP, 2007.

Workshop Tecnológico Sobre “Pragas da Cana-de-Açúcar, Controle Biológico e Controle Químico de Pragas em Cana-de-Açúcar, Piracicaba, 2007.

World Development Report 2008: Agriculture for Development. Biofuels: The Promise and the Risks. World Bank, 2008. Disponível em: <<http://go.worldbank.org/UK40ECPQ20>>. Acesso em Janeiro de 2009.

Anexos

Anexo A – Composição do meio da dieta alimentar artificial das larvas

Caseína: 122 g

Sais de Wesson: 35 g

Açúcar: 76 g

Germe de Trigo: 108 g

Bagaço de cana-de-açúcar: 30 g

Acetato ascórbico: 15 g

Wintomylon: 2,5 ml

Caragenato: 90 g

Solução KOH: 35 ml

Solução B: 53 ml

H₂O (componentes sólidos): 1100 ml

H₂O (componente para dissolver caragenato): 2000 ml

Solução de KOH: 11,25g KOH
200 ml de H₂O destilada

Solução B: 70 g de Nipagin
70 g de ácido sórbico
800 ml de álcool 70%

Anexo B – Extração de DNA utilizando protocolo CTAB

As amostras que estavam em um tubo de 1,5 ml com TE 1x foram vortexadas por 5 minutos em velocidade máxima para permitir a separação das células bacterianas da parede do intestino. Foram adicionados 60 µl de SDS 10 % e 2 mg/ml de proteinase K para promover a lise celular. As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas durante 3 horas a 56 °C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 800 x g. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Adicionou-se 100 µl de NaCl 5 M em cada tubo e misturou-se vigorosamente. Adicionou-se 80 µl de CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide 10% - 0.7 M NaCl). Os tubos foram misturados em vortex e incubados de 10 a 15 minutos a 65 °C. Adicionou-se 700 µl de clorofórmio, homogenizou-se as amostras no vortex e centrifugou-se por 5 minutos a 9.300 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, aproximadamente 700 µl, excluindo a interface. Adicionou-se 700 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram vortexadas e centrifugadas por 5 minutos a 9.300 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 0,6 volumes de isopropanol foi adicionado. Os tubos foram misturados por inversão 4 vezes e depois centrifugados por 1 minuto a 9.300 x g. Descartou-se o sobrenadante e guardou-se o pellet. Adicionou-se 1 ml de etanol 70 % e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 9.300 x g. O etanol foi descartado e o pellet, depois de seco, resuspendido em 100 µl de água mili-Q autoclavada. O DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Anexo C – Características dos meios utilizados para isolamento e cultivo de microrganismos.

O meio TSA é utilizado para isolar e cultivar microrganismos fastidiosos e não-fastidiosos. Este meio suporta o crescimento de uma grande variedade de microrganismos tanto anaeróbios quanto aeróbios. Também proporciona o crescimento de leveduras. A combinação da caseína com peptona de soja torna o meio altamente nutritivo fornecendo nitrogênio orgânico, especialmente aminoácidos e peptídeos de cadeia mais longa. O cloreto de sódio mantém equilíbrio osmótico. Agar é o agente responsável pela solidificação. Uma vez que carece de carboidratos (fonte de carbono) é muito útil no estudo de reações hemolíticas. Se desejado, os antibióticos podem ser facilmente incorporados, bem como outros suplementos ou inibitória agentes.

O meio YPD é uma mistura de peptona, extrato de levedura e dextrose em proporções ótimas para o cultivo de microrganismos, principalmente o de leveduras. Esse meio contém peptona como fonte de carbono, nitrogênio, vitaminas e minerais. Extrato de levedura fornece vitaminas do complexo B, que estimulam o crescimento bacteriano. A dextrose é a fonte de carboidratos. Agar é o agente responsável pela solidificação.