

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**ENIDE LUCIANA BELMONT MONTEFUSCO**

**CELULASES DE ORIGEM FÚNGICA E ENDÓGENA EM INSETOS AQUÁTICOS**  
**FRAGMENTADORES**

**MANAUS**

**2020**

ENIDE LUCIANA BELMONT MONTEFUSCO

**CELULASES DE ORIGEM FÚNGICA E ENDÓGENA EM INSETOS AQUÁTICOS  
FRAGMENTADORES**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR: CARLOS GUSTAVO NUNES DA SILVA

COORIENTADORA: NEUSA HAMADA

COORIENTADOR: JUAN LUIS JURAT FUENTES

MANAUS

2020

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M774c Montefusco , Enide Luciana Belmont  
Celulases de origem fúngica e endógena em insetos aquáticos fragmentadores / Enide Luciana Belmont Montefusco . 2020  
135 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva  
Orientadora: Neusa Hamada  
Coorientador: Juan Luis Jurat Fuentes  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. celulose. 2. fungos. 3. insetos aquáticos. 4. Reserva Florestal Ducke. 5. Amazônia. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**ENIDE LUCIANA BELMONT MONTEFUSCO**

**CELULASES DE ORIGEM FÚNGICA E ENDÓGENA EM INSETOS AQUÁTICOS  
FRAGMENTADORES**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 30 de julho de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Yamile Benaion Alencar, Membro

Conselho Regional de Biologia, CRBIO-06

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Paula Benevides de Moraes, Membro

Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. João Vicente Braga Souza, Membro

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Jéssica Barros Aguiar Silva, Membro

Qualis Consultoria Acadêmica

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, meu orientador, por ter me aceitado com aluna, pela orientação, incentivo e confiança sempre com entusiasmo e leveza tornando esta caminhada mais agradável.

À Dra. Neusa Hamada, minha coorientadora, pela oportunidade de poder participar do projeto que gerou minha tese, pela orientação, incentivo e confiança.

Ao Dr. Juan Luis Jurat Fuentes, meu coorientador, por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar o Doutorado Sanduíche, além da oportunidade e experiência de conhecer outro país, cultura e diferentes pessoas que me ajudaram durante esse período.

Ao meu esposo, Matheus, pelo apoio, incentivo constante, sempre vibrando pelas minhas conquistas, por estar comigo nos momentos de inspiração e angústia. Tudo foi mais fácil com você ao meu lado.

À minha mãe, Edileuza, por acreditar em mim, por me oferecer tudo que era imprescindível para que eu pudesse chegar nesse momento.

Às amigas e parceiras do Laboratório de Biologia Molecular da UFAM, Hayssa e Suziane que sempre estavam de bem com a vida, compartilhando momentos felizes e, também, alguns difíceis. Obrigada pelo apoio e por sempre estarem dispostas a ajudar.

À uma amiga especial, Lorena, a qual já demonstrou ser uma excelente pessoa desde o primeiro dia em que conheci. Obrigada pelo apoio, por estar disposta a me ensinar sempre que eu precisei, pelas conversas e incentivo.

Às amigas da Amazonzyme, Pamella e Jéssica, como eu sobreviveria no mundo das enzimas sem vocês? Muito obrigada por todo o suporte, sempre ajudando a qualquer momento que eu precisei, pelas conversas, apoio e incentivo.

À amiga Keyty Oliveira, que mesmo morando em cidades diferentes, sempre demonstrou entusiasmo nos momentos em que precisei de sua ajuda, pelas conversas, incentivo e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Micologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade de estágio, no qual aprendi muito sobre fungos. Em especial à Jessica por ter me acolhido, pelas conversas e apoio.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia pela minha formação e por proporcionarem a estrutura e suporte necessários para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e apoio financeiro, o que possibilitou minha dedicação à realização dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia - REDE BIONORTE, pelo financiamento da pesquisa (processo nº 407843 / 2013-2).

Ao Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior - PDSE/CAPES pela bolsa de estudos concedida (processo nº 141267 / 2016-0).

Ao INCT ADAPTA II, financiado pelo CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (processo nº 465540 / 2014-7), FAPEAM - Fundação de Pesquisa do Estado do Amazonas (processo nº 062.1187 / 2017) e CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que financiou parte da pesquisa.

Agradeço sinceramente a todos aqueles que direta e indiretamente colaboraram para minha formação e para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Os insetos possuem diversas estratégias alimentares e uma delas é a utilização de substratos lignocelulósicos como fonte de energia, o que torna esses organismos uma fonte ideal para prospecção de novas enzimas celulolíticas. A matéria orgânica utilizada como recurso alimentar, geralmente, está colonizada por microrganismos. Estes convertem o substrato vegetal a um estado nutricional palatável, por meio da produção de enzimas que degradam este polímero. A busca por novas fontes de produção de enzimas celulolíticas trouxe evidências crescentes de que as celulasas, também, estão presentes no reino animal, particularmente em insetos. Assim, este estudo teve como objetivos identificar a diversidade de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de larvas de três insetos aquáticos fragmentadores, avaliar qualitativamente e quantitativamente a produção de enzimas celulolíticas de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de larvas de insetos aquáticos fragmentadores e descrever o perfil de expressão gênica de celulasas do trato digestório de larvas de *Phylloicus amazonas* (Insecta: Trichoptera). Larvas de três gêneros de insetos aquáticos: *Phylloicus* (Trichoptera), *Triplectides* (Trichoptera) e *Stenochironomus* (Diptera) foram estudadas. Foram identificados um total de 28 morfoespécies associadas ao intestino das larvas desses insetos, compreendendo *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma*. Quanto a avaliação qualitativa da produção de enzimas celulolíticas, 176 isolados produziram halo de hidrólise. Os resultados da análise enzimática, realizada através da quantificação dos açúcares redutores, demonstraram que o fungo *Penicillium* sp. A2PA4 possui uma boa capacidade na degradação da celulose. Por meio da análise do transcriptoma do intestino das larvas de *Phylloicus amazonas* Pather, 2003 foi possível encontrar a assinatura de genes de Endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase. Os resultados obtidos indicam que o intestino de larvas de insetos aquáticos é um substrato com potencial tanto para bioprospecção de fungos produtores de enzimas celulolíticas, quanto genes de celulase endógena.

**PALAVRAS-CHAVE:** Celulose; fungos; insetos aquáticos; Reserva Florestal Ducke, Amazônia.

## ABSTRACT

Insects have different feeding strategies and one of them is the use of lignocellulosic substrates as an energy source, which makes these organisms an ideal source for prospecting for new cellulolytic enzymes. The organic matter used as a food resource is usually colonized by microorganisms. These convert the plant substrate to a palatable nutritional state, through the production of enzymes that degrade this polymer. The search for new sources of cellulolytic enzyme production has brought increasing evidence that cellulases are present in the animal kingdom, particularly in insects. Thus, this study aimed to identify the diversity of cultivable filamentous fungi associated with the digestive tract of larvae of three shredder aquatic insects, to qualitatively and quantitatively evaluate the production of cellulolytic enzymes from cultivable filamentous fungi associated with the digestive tract of fragmenting aquatic insect larvae, describe the profile of gene expression of cellulases of the digestive tract of larvae of *Phylloicus amazonas* (Insecta: Trichoptera). Larvae from three aquatic insect genera: *Phylloicus* (Trichoptera), *Triplectides* (Trichoptera) and *Stenochironomus* (Diptera) were studied. A total of 28 morphospecies associated with the intestine of these insect larvae were identified, comprising *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* and *Trichoderma*. Regarding the qualitative evaluation of cellulolytic enzyme production, 176 isolates produced a hydrolysis halo. The results of the enzymatic analysis, carried out through the quantification of reducing sugars, showed that the fungus *Penicillium* sp. A2PA4 has a good capacity for cellulose degradation. Through gut transcriptome analysis of *Phylloicus amazonas* Pather, 2003 larvae it was possible to find the signature of Endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase genes. The results obtained indicate that the gut of aquatic insect larvae is a substrate with potential for both bioprospecting fungi producing cellulolytic enzymes and endogenous cellulase genes.

**KEYWORDS:** Cellulose; fungi; aquatic insects; Ducke Forest reserve, Amazon.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Larvas de <i>Phylloicus</i> sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) com detalhe para o abrigo feito com folhas (Fotos: A – LACIA; B- C. L. Goforth) .....	5
<b>FIGURA 2</b> - Larva de <i>Phylloicus</i> sp. com identificação das principais estruturas (Fonte: PES, 2001) .....	5
<b>FIGURA 3</b> - Representação do ciclo de vida de <i>Phylloicus</i> sp. (Trichoptera: Calamoceratidae): A – ovos; B – larva; C – pupa; D – adulto. (Fonte: Laboratório de Citotaxonomia e Inseto Aquáticos -LACIA) .....	5
<b>FIGURA 4</b> - Larvas de <i>Triplectides</i> sp. (Trichoptera: Leptoceridae) com detalhe para o abrigo feito com graveto (Fotos: A – F. F. Salles; B- J. Brito) .....	6
<b>FIGURA 5</b> - Larva de <i>Triplectides</i> sp. (Trichoptera: Leptoceridae) com identificação das principais estruturas (Fonte: PES, 2001) .....	6
<b>FIGURA 6</b> - Representação do ciclo de vida de <i>Triplectides</i> sp. (Trichoptera: Leptoceridae): A – ovos; B – larva no abrigo; C – pupa; D – adulto (Fonte: Laboratório de Citotaxonomia e Inseto Aquáticos -LACIA) .....	7
<b>FIGURA 7</b> - Larvas de <i>Stenochironomus</i> sp. (Diptera: Chironomidae) minadora de folhas. A – Larva fora do abrigo; B – Larva minando entre as superfícies abaxial e adaxial de uma folha (Fotos: Keyty Oliveira) .....	8
<b>FIGURA 8</b> - Larva de <i>Stenochironomus</i> sp. (Diptera: Chironomidae) com identificação das principais estruturas (Foto: Gizelle Amora) .....	8
<b>FIGURA 9</b> - Representação do ciclo de vida de <i>Stenochironomus</i> sp. (Diptera: Chironomidae) (Fonte: WALKER, 1987) .....	8
<b>FIGURA 10</b> - Representação ilustrativa dos compartimentos do intestino de um inseto (Fonte: TERRA; FERREIRA, 2012) .....	9
<b>FIGURA 11</b> - Modelo simplificado de ação das celulasas sobre a cadeia da celulose .....	14

<b>FIGURA 12</b> - Mapas do Brasil e Amazonas, indicando a localização da Reserva Florestal Ducke (RFD), em Manaus, onde os insetos aquáticos fragmentadores foram coletados. Círculos pretos representam os igarapés amostrados na RFD (Apêndice A) .....	18
<b>FIGURA 13</b> - Representação da distribuição dos conteúdos estomacais dos insetos fragmentadores nas placas de Petri com BDA .....	20
<b>FIGURA 14</b> - Método de armazenagem e cultivo de fungos filamentosos. A – Armazenamento dos esporos pelo método Castellani; B- Obtenção das estruturas reprodutivas por meio do microcultivo .....	20
<b>FIGURA 15</b> - Isolados fúngicos em meio com CMC. A – Revelação dos halos de hidrólise com o corante vermelho Congo; B – Placa com fungo corado .....	23
<b>FIGURA 16</b> - Curva padrão de glicose e equação da reta utilizada nos ensaios de FPase e CMCase .....	25
<b>FIGURA 17</b> - Visão macro e microscópica dos fungos filamentosos identificados isolados dos intestinos de <i>Phylloicus</i> (Trichoptera), <i>Triplectides</i> (Trichoptera) e <i>Stenochironomus</i> (Diptera) plaqueados em meio BDA por 7 dias à 27 °C. A1/A2 – <i>Aspergillus</i> sp.; B1/B2 – <i>Cladosporium</i> sp.; C1/C2 – <i>Paecilomyces</i> sp.; D1/D2 – <i>Penicillium</i> sp.; E1/E2 – <i>Pestalotiopsis</i> sp.; F1/F2 – <i>Trichoderma</i> sp. ....	30
<b>FIGURA 18</b> - Diagrama de Venn com o número de táxons fúngicos compartilhados entre os três gêneros de insetos estudados .....	33
<b>FIGURA 19</b> - Mapa da Reserva Florestal Ducke, localizada em Manaus, Amazonas, Brasil, mostrando os locais dos igarapés onde foram amostradas as larvas de insetos aquáticos fragmentadores (locais 1 a 10) .....	40
<b>FIGURA 20</b> - Vistas macro e microscópicas de fungos filamentosos isolados dos intestinos de <i>Phylloicus</i> (Trichoptera), <i>Triplectides</i> (Trichoptera) e <i>Stenochironomus</i> (Diptera), plaqueados em meio BDA por sete dias à 27 °C. A1 / A2 - <i>Cladosporium</i> sp.; B1 / B2 - <i>Pestalotiopsis</i> sp.; C1 / C2 - <i>Penicillium citrinum</i> ; D1 / D2 - <i>Talaromyces purpurogenus</i> ; E1 / E2 - <i>Trichoderma harzianum</i> ; F1 / F2 - <i>Umbelopsis</i> sp.; G1 / G2 - <i>Gliocephalotrichum</i> sp.; H1 / H2 - <i>Penicillium adametzii</i> .....	44

<b>FIGURA 21</b> - Perfil cinético da atividade em papel de filtro (FPase) em função do tempo, produzida por fermentação submersa em polpa de celulose até 240 h, 30 °C, 200 rpm. As amostras foram coletadas regularmente em intervalos de 24 h	59
<b>FIGURA 22</b> - Perfil cinético da atividade endoglucanásica (CMCase) em função do tempo, produzida por fermentação submersa em polpa de celulose até 240 h, 30 °C, 200 rpm. As amostras foram coletadas regularmente em intervalos de 24 h	59
<b>FIGURA 23</b> - Perfil cinético da atividade de $\beta$ -glucosidase em função do tempo, produzida por fermentação submersa em polpa de celulose até 240 h, 30 °C, 200 rpm. As amostras foram coletadas regularmente em intervalos de 24 h	60
<b>FIGURA 24</b> - Resultado do BLAST ( <i>hits</i> do BLASTx) e anotação ( <i>hits</i> do GO) executados no software Blast2GO	65
<b>FIGURA 25</b> - Distribuição das 10 espécies (Lepidoptera e Blattodea) que mais frequentemente apresentaram similaridade com as sequências <i>Phylloicus amazonas</i> (Trichoptera: Calamoceratidae)	66
<b>FIGURA 26</b> - Classificação geral das sequências obtidas na análise do transcriptoma de <i>Phylloicus amazonas</i> (Trichoptera: Calamoceratidae) de acordo com os termos da Gene Ontology (GO)	67
<b>FIGURA 27</b> - Distribuição dos transcritos anotados nos termos do Gene Ontology (GO)	68
<b>FIGURA 28</b> - Porcentagem das sequências de <i>Phylloicus amazonas</i> (Trichoptera: Calamoceratidae) encontrada nas principais classes enzimáticas	69

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Espécies de fungos mais representativas quanto a produção de celulasas .....	11
<b>TABELA 2</b> - Lista de espécies de insetos que possuem genes putativos de celulasas .....	12
<b>TABELA 3</b> - Recursos e aplicações de enzimas industriais de origem fúngicas ...	15
<b>TABELA 4</b> - Frequência da ocorrência (%) de táxons fúngicos isolados do intestino de larvas de <i>Phylloicus</i> spp. (P), <i>Triplectides</i> spp. (T) e <i>Stenochironomus</i> spp. (S) coletadas em igarapés localizados na Reserva Florestal Ducke (RFD), Manaus, Amazonas em julho de 2016. Ni= número de isolados fúngicos; Fo= frequência da ocorrência .....	32
<b>TABELA 5</b> - Índice de diversidade de Shannon (H') e de Simpson (D) das comunidades de fungos isolados dos intestinos das larvas de <i>Phylloicus</i> , <i>Triplectides</i> e <i>Stenochironomus</i> (Insecta) .....	33
<b>TABELA 6</b> - Número de isolados totais de fungos e número de isolados positivos para a atividade celulolítica em cada gênero de inseto aquático fragmentador. A coluna do índice enzimático (IE) indica o número de isolados com valores de IE $\geq 2,0$ .....	43
<b>TABELA 7</b> - Fungos filamentosos celulolíticos isolados dos intestinos de <i>Phylloicus</i> (Trichoptera), <i>Triplectides</i> (Trichoptera) e <i>Stenochironomus</i> (Diptera) - insetos aquáticos fragementadores, na região Amazônica, Brasil. A tabela mostra a identificação morfológica e molecular dos isolados com um índice enzimático $\geq 2,0$ após o crescimento em meio sintético carboximetil celulose. M = identificação morfológica; G = genotipagem molecular; IE = índice enzimático (índice médio $\pm$ DP, n = 3); (*) = porcentagem de similaridade as sequências deste estudo e aquelas disponíveis nos bancos de dados NCBI e UNITE .....	45

<b>TABELA 8</b> - Atividade celulolítica de <i>Penicillium</i> sp. A2PA4 e <i>Trichoderma reesei</i> QM941 (controle) durante os períodos de fermentação submersa com maior atividade enzimática .....	58
<b>TABELA 9</b> - Visão geral do sequenciamento Illumina e estatísticas da montagem <i>De novo</i> do transcriptoma de <i>Phylloicus amazonas</i> (Trichoptera: Calamoceratidae) .....	64
<b>TABELA 10</b> - Presença de genes $\beta$ -glucosidase e Endoglucanase expressos no transcriptoma de <i>Phylloicus amazonas</i> por <i>contig</i> utilizando o banco de dados NCBI <i>nr</i> . *Sequências correspondentes no banco de dados que estão vinculados a um determinado táxon .....	70
<b>TABELA 11</b> - Presença de genes $\beta$ -glucosidase e Endoglucanase expressos no transcriptoma de <i>Phylloicus amazonas</i> por <i>contig</i> utilizando o banco de dados de fungos. *Sequências correspondentes no banco de dados que estão vinculados a um determinado táxon .....	70
<b>TABELA 12</b> - Presença de genes de Pectinase e Qutinase expressos no transcriptoma de <i>Phylloicus amazonas</i> utilizando o banco de dados NCBI <i>nr</i> . *Sequências correspondentes no banco de dados que estão vinculados a um determinado táxon .....	71

**LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS**

°C	graus Celcius
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
µg/mL	Microlitro por mililitro
<i>x g</i>	Força centrífuga
BDA	Batata Dextrose Ágar
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CMC	Carboximetil celulose
CMCase	Carboximetil celulase (atividade de endoglucanase)
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GOD	Glicose oxidadase
GTF	Grupo trófico funcional
IE	Índice enzimático
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MgCl	Cloreto de magnésio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RSD	Reserva Florestal Ducke
rpm	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TE	Tris/EDTA
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1	Insetos aquáticos.....	3
2.1.1	<i>Phylloicus</i> Miller, 1880 (Trichoptera: Calamoceratidae).....	4
2.1.2	<i>Triplectides</i> Kolenati, 1859 (Trichoptera: Leptoceridae).....	6
2.1.3	<i>Stenochironomus</i> Kieffer, 1910 (Diptera: Chironomidae) .....	7
2.2	Sistema digestório dos insetos.....	9
2.3	Produção de celulases por fungos e insetos.....	10
2.4	Celulases.....	13
2.5	Produtos de interesse biotecnológico .....	14
3.	OBJETIVOS .....	16
3.1	Objetivo geral .....	16
3.2	Objetivos específicos .....	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1	Metodologia para realização do primeiro objetivo: Identificar a diversidade de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de larvas de três insetos aquáticos fragmentadores .....	17
4.1.1	Amostragem das larvas .....	17
4.1.2	Isolamento dos fungos filamentosos .....	18
4.1.3	Cálculo da concentração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) .....	20
4.1.4	Identificação molecular dos fungos filamentosos .....	20
4.1.5	Reação de amplificação do gene e sequenciamento.....	20
4.1.6	Análises da genotipagem.....	21
4.1.7	Análise da diversidade e frequência dos fungos filamentosos .....	21

4.2 Metodologia para realização do segundo objetivo: Avaliar qualitativamente e quantitativamente a produção de enzimas celulolíticas de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores. ....	22
4.2.1 Avaliação da produção de enzimas celulolíticas dos fungos isolados.....	22
4.2.2 Substrato para fermentação submersa e obtenção dos esporos da linhagem <i>Penicillium</i> sp. A2PA4.....	23
4.2.3 Preparação da curva padrão.....	23
4.2.4 Determinação de atividade de celulases totais – FPase.....	25
4.2.5 Determinação de atividade de endoglucanase – CMCase.....	26
4.2.6 Determinação de atividade de $\beta$ -glucosidase .....	26
4.3 Metodologia utilizada para realização do terceiro objetivo: Descrever o perfil de expressão gênica de celulases do trato digestório de <i>Phylloicus amazonas</i> Pather (Insecta: Trichoptera). ....	27
4.3.1 Amostragem das larvas de <i>P. amazonas</i> .....	27
4.3.2 Isolamento do RNA.....	27
4.3.3 Montagem da biblioteca de cDNA.....	28
4.3.4 Sequenciamento .....	28
4.3.5 Análise das sequências .....	28
4.3.6 Anotação funcional .....	29
CAPÍTULO 1 .....	30
FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVÁVEIS DO INTESTINO DE LARVAS DE INSETOS AQUÁTICOS FRAGMENTADORES.....	30
CAPÍTULO 2.....	37
FUNGOS CELULOLÍTICOS CULTIVÁVEIS ISOLADOS DO INTESTINO DE INSETOS AQUÁTICOS DA AMAZÔNIA <sup>1</sup> .....	37
CAPÍTULO 3.....	58
PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO <i>Penicillium</i> sp. A2PA4 ISOLADO DO INTESTINO DE LARVAS DE INSETOS AQUÁTICOS FRAGMENTADORES.....	58



CAPÍTULO 4.....	64
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DO INTESTINO DE LARVAS DE PHYLLOICUS AMAZONAS PATHER, 2003 .....	64
9. CONCLUSÃO GERAL .....	75
10. REFERÊNCIAS .....	76
APÊNDICES.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

Os insetos aquáticos representam cerca de 90% da fauna de invertebrados que vivem em ambientes aquáticos e participam de diversos processos ecológicos (HAMADA; NESSIMIAN; QUIRINO, 2019). Alguns destes insetos se alimentam de tecido de plantas aquáticas vivas, madeira e folhas em decomposição que se acumulam ao longo do curso d'água, sendo estes categorizados como fragmentadores (CUMMINS et al., 1989; MERRITT; CUMMINS, 1996). Estes insetos exercem um relevante papel convertendo a matéria orgânica grossa em partículas menores, tornando-a disponível para outros grupos tróficos, tais como os invertebrados coletores (CUMMINS et al., 1989). Estes organismos se adaptam a quase todos os tipos de habitats e de alimentação, sendo o intestino considerado a principal interface entre o inseto e o ambiente, facilitando estudos sobre a função e a comunidade de microrganismos associados ao intestino dos insetos (TERRA; FERREIRA, 1994).

Nesse contexto, alguns insetos evoluíram estratégias muito eficazes para utilizar como fonte de energia o substrato mais abundante na Terra, a celulose (ATALLA, 1999), portanto, esses organismos são ideais para prospecção de novas enzimas celulolíticas. Além disso, por serem exímios transformadores de matéria vegetal em alimento, investigar esse sistema poderá proporcionar um olhar mais detalhado sobre as vias de bioprocessos utilizadas. Alguns insetos aquáticos fragmentadores usam a matéria orgânica alóctone (madeira e folhas em decomposição da vegetação ripária) como recurso alimentar somente depois desta ter sido condicionada, ou seja, colonizada por microrganismos, os quais, por meio do metabolismo secundário, convertem esse tecido a um estado nutricional palatável e de fácil degradação (CUMMINS et al., 1989; GRAÇA et al., 2001, AßMANN et al., 2011, CASOTTI et al., 2015, BIASI et al., 2017).

Além da busca por enzimas produzidas por microrganismos, diversos estudos têm mostrado que insetos podem produzir enzimas que degradam a celulose. A transformação da celulose em glicose como fonte de energia é altamente eficiente quando realizada por insetos, pois sua principal fonte de alimentação é a matéria vegetal (SUN; ZHOU, 2009). O primeiro registro de celulase endógena em insetos foi feito em cupim (*Reticulitermes speratus* Kobe, Rhinotermitidae, Isoptera), o qual mostrou a habilidade dessa espécie em se alimentar de material celulósico, inclusive quando a microbiota do intestino foi retirada (YOKOE, 1964; MARTIN; MARTIN, 1978; SLAYTOR, 1992; BIGNELL et al., 1994; WATANABE et al., 1998). A celulase endógena, também, pode ser observada em baratas (Blattodea) (LO et al.

2000; NAKASHIMA et al. 2002; SCHARF et al. 2003; TOKUDA et al. 2004), gafanhotos (Orthoptera) (KIM et al., 2008), besouros (Coleoptera) (WEI et al., 2005, 2006a, 2006b, GENTA et al., 2006; KIM et al., 2008; WATANABE; TOKUDA, 2010), traça de livros (*Zygentoma*) (TREVES; MARTIN, 1994; POTHULA et al. 2019) e percevejos (Hemiptera) (ADAMS; DREW, 1965).

Estudos sobre a associação entre fungos e insetos aquáticos ainda são restritos na Amazônia (e.g., RIOS-VELASQUEZ et al., 2002, ALENCAR et al., 2003; FONSECA et al. 2008; PEREIRA et al. 2009; SANTOS et al. 2018a) sobretudo aqueles relacionados à produção de enzimas celulolíticas pelos fungos e/ou por insetos. Pesquisas dessa natureza podem contribuir com o conhecimento sobre a biodiversidade fúngica, fornecendo subsídios para compreensão de mecanismos de interações mutualísticas. Assim como, direcionar estudos sobre a coevolução destes sistemas simbiotes, identificação de espécies novas, descrição das comunidades de microrganismos, bem como a bioprospecção de novas enzimas celulolíticas de interesse industrial. Dessa forma, uma pesquisa abrangente é essencial para melhor entender os processos que ocorrem no sistema fungo-inseto, além do potencial biotecnológico que existe nesse ambiente.

O presente trabalho traz resultados sobre a diversidade de fungos filamentosos associados ao intestino de larvas de insetos aquáticos fragmentadores, o potencial de produção de enzimas celulolíticas pelos fungos isolados destes insetos e a presença de genes de celulases nos insetos estudados. Assim, o Capítulo 1 traz os resultados sobre a diversidade de fungos filamentosos cultiváveis associados do trato digestório dos três insetos aquáticos fragmentadores estudados. O Capítulo 2 são os resultados da avaliação da produção qualitativa de fungos celulolíticos isolados dos fungos filamentosos cultiváveis associados do trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores. O capítulo 3 traz os ensaios enzimáticos realizados com o *Penicillium* sp. A2PA2 isolado de larvas de *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae). E por fim, no Capítulo 4 foi descrito o perfil de expressão gênica de celulases do trato digestório de *Phylloicus amazonas* (Insecta: Trichoptera).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Insetos aquáticos

Grupo trófico funcional (GTF) é uma forma de categorizar os insetos de acordo com suas características comportamentais e morfológicas para obtenção do alimento (CUMMINS; MERRITT; ANDRADE, 2005). Os insetos aquáticos podem ser agrupados em cinco categorias: (1) coletores-catadores - aqueles que se alimentam de pequenas partículas de matéria orgânica no sedimento depositado no leito dos corpos d'água; (2) coletores-filtradores - quando filtram pequenas partículas de matéria orgânica em suspensão na coluna d'água; (3) fragmentadores - quando mastigam folhas ou tecido de plantas; (4) predadores - aqueles que engolem a presa inteira ou ingerem os fluidos do tecido corporal; (5) raspadores - quando raspam superfícies duras, alimentam-se de algas, microrganismos e matéria orgânica morta (CUMMINS; MERRITT, 1996).

Os insetos aquáticos pertencentes à categoria fragmentador participam da ciclagem de nutrientes e, ao reduzir o tamanho das partículas orgânicas, facilitam a ação de microrganismos na degradação da matéria vegetal (CUMMINS; MERRITT; ANDRADE, 2005, MERRITT et al., 2019). Os fragmentadores podem ser herbívoros alimentando-se de tecido de plantas aquáticas vivas ou podem ser detritívoros alimentando-se de madeira e folhas em decomposição e outras partículas orgânicas presentes no folhiço condicionado que se acumula ao longo do curso d'água (CUMMINS et al., 1989; MERRITT; CUMMINS, 1996). As larvas que consomem detrito têm grande importância ecológica como decompositores de material vegetal alóctone no sistema aquático.

Os fragmentadores, em geral, não consomem a matéria vegetal até que esta esteja condicionada, o condicionamento é a mudança da matriz do detrito foliar por adição da biomassa de microrganismos, ocasionando um enriquecimento nutricional e melhoramento da palatabilidade, já que desta forma a quantidade de nitrogênio é maior em comparação com as folhas que não foram condicionadas (MERRITT et al., 2019). A matéria orgânica vegetal, também, é utilizada para construir abrigos (*e.g.*, Trichoptera: Calamoceratidae, Leptoceridae) ou como substrato (*e.g.*, Diptera: Chironomidae). Alguns gêneros de Trichoptera, por exemplo *Phylloicus* (Calamoceratidae), demonstram preferências por folhas com menos qualidade, ou seja, menor concentração de fenóis (MORETTI et al., 2009). Muitos estudos sobre a alimentação destes gêneros são realizados com o intuito de investigar se há uma preferência por folhas que estão condicionadas por microrganismos. König et al. (2014), Navarro (2014) e Reis et al. (2018) demonstraram que existe essa preferência em consumir folhas condicionadas por

microrganismos; Moretti (2009) demonstrou que a baixa qualidade dos recursos alimentares reflete em uma menor abundância dos fragmentadores e uma decomposição mais lenta da matéria vegetal. Biasi (2017) encontrou uma alta abundância de hifomicetos em folhas C4, o que estimulou um maior consumo destas folhas por larvas de *Phylloicus*. Nos tratamentos realizados por Casotti et al. (2015), foi demonstrado que larvas de *Triplectides* (Leptoceridae) preferem folhas enriquecidas com microrganismos, pois estas conferem um recurso alimentar mais macio para os fragmentadores.

Quanto a larvas de *Stenochironomus* (Chironomidae), Sanseverino; Nessimian (2008) observaram a presença de matéria orgânica particulada e fungos no intestino das mesmas. Koroiva (2013) isolou 31 colônias de bactérias produtoras de enzimas celulolíticas do intestino de larvas de *Stenochironomus* minadoras de troncos e galhos submersos em decomposição. Mostrando que diversos microrganismos participam da degradação da matéria vegetal ingerida por larvas deste gênero.

### **2.1.1 *Phylloicus* Miller, 1880 (Trichoptera: Calamoceratidae)**

*Phylloicus* é um gênero endêmico da região Neotropical e, no Brasil, existem 22 espécies registradas (SANTOS et al., 2014), sendo que cinco destas ocorrem na Amazônia (PATHER, 2003). As larvas desse gênero constroem abrigos com fragmentos de folhas (Figura 1) que são mantidos unidos com seda produzida por glândulas labiais. Possuem cabeça escura, antena visível, peças bucais simples, o primeiro par de pernas é curto e forte, o segundo e o terceiro pares são similares, estreitos e longos, possui um par de verrugas no abdome e a falsa perna anal é curta com garra simples (Figura 2) (PES et al., 2019).

O estágio larval, em média, tem duração de 100 dias, o estágio seguinte, de pupa, tem duração média de 22 dias, após esse período o adulto emerge e ocorre a reprodução. Os ovos são depositados em tronco submerso, a postura, geralmente, é agrupada fixa e branca e os ovos são alongados e brancos (Figura 3) (REYES-TORRES; RAMÍREZ, 2018, BENTES et al., 2019).

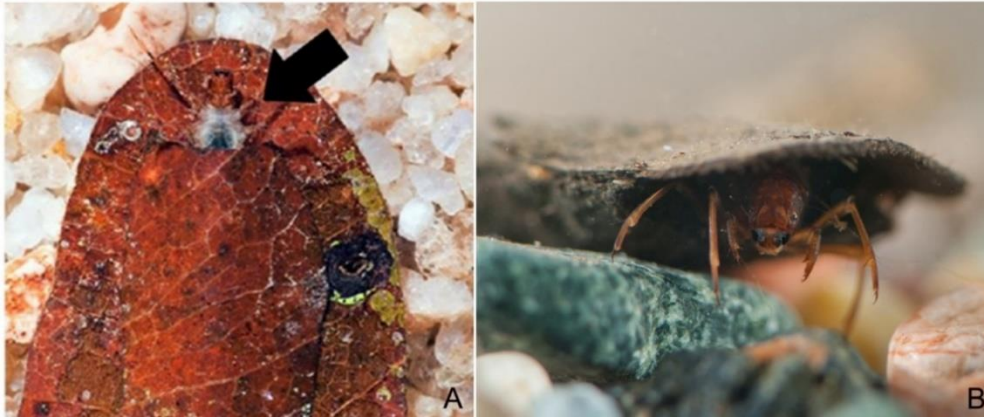


Figura 1. Larvas de *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) com detalhe para o abrigo feito com folhas (Fotos: A – LACIA; B- C. L. Goforth).

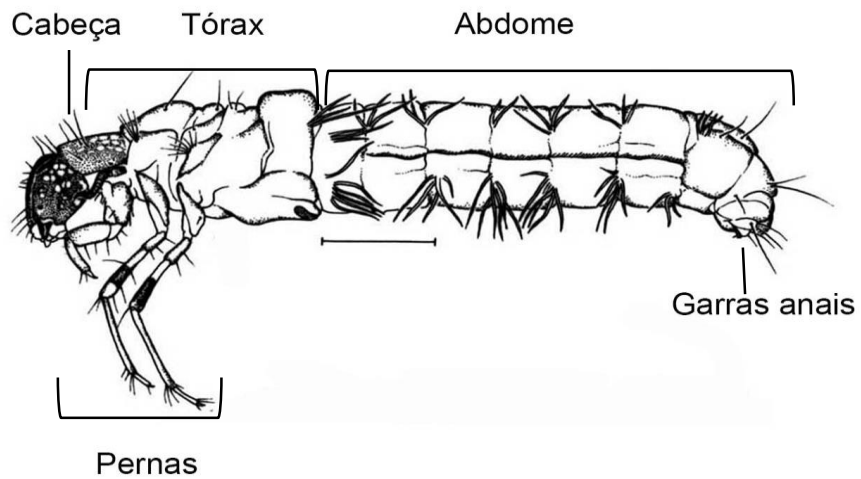


Figura 2. Larva de *Phylloicus* sp. com identificação das principais estruturas (Fonte: PES, 2001).

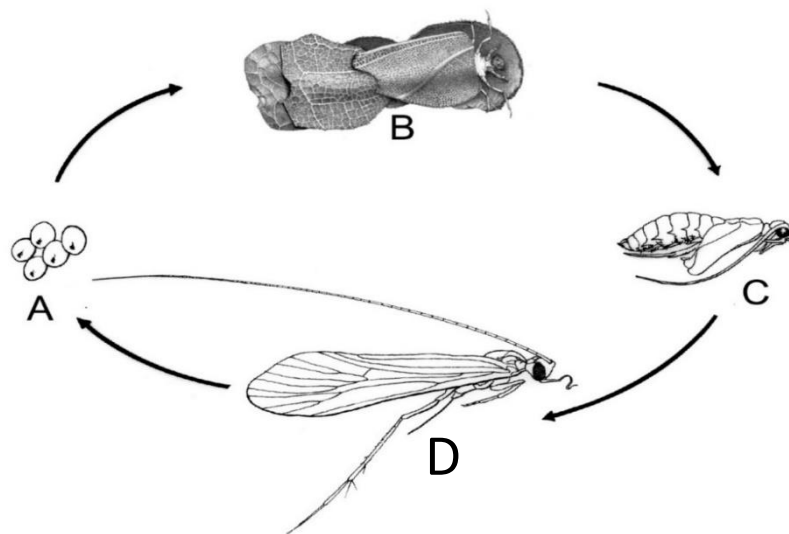


Figura 3. Representação do ciclo de vida de *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae): A – ovos; B – larva; C – pupa; D – adulto. (Fonte: Laboratório de Citotaxonomia e Inseto Aquáticos -LACIA).

### 2.1.2 *Triplectides Kolenati, 1859* (Trichoptera: Leptoceridae)

*Triplectides* é o gênero mais rico em espécies dentro da subfamília Triplectidinae com cerca de 70 espécies (HOLZENTHAL, 1988; MALM; JOHANSON, 2008) distribuídas pela América Central, América do Sul, sudeste da Ásia e Oceania, neste último ocorrendo uma alta diversidade de espécies (MALM; JOHANSON, 2008). Quanto a biologia, a larva cava pequenos gravetos, utilizando-os como abrigo, mas, as larvas podem, também, utilizar abrigos vazios de outros Trichoptera (Figura 4) (CAMARGOS; PES, 2011; PES et al., 2014).

As larvas possuem antenas visíveis, tórax quase que completamente esclerotizados, primeiro par de pernas curto e terceiro par de pernas longos projetando-se para fora do abrigo, possui um verruga dorsal e um par lateral no abdome e falsa perna anal curta com uma garra simples (Figura 5) (PES et al., 2014). O ciclo de vida é composto por ovo, larva, pupa e adulto (Figura 6).



Figura 4. Larvas de *Triplectides* sp. (Trichoptera: Leptoceridae) com detalhe para o abrigo feito com graveto (Fotos: A – F. F. Salles; B- J. Brito).

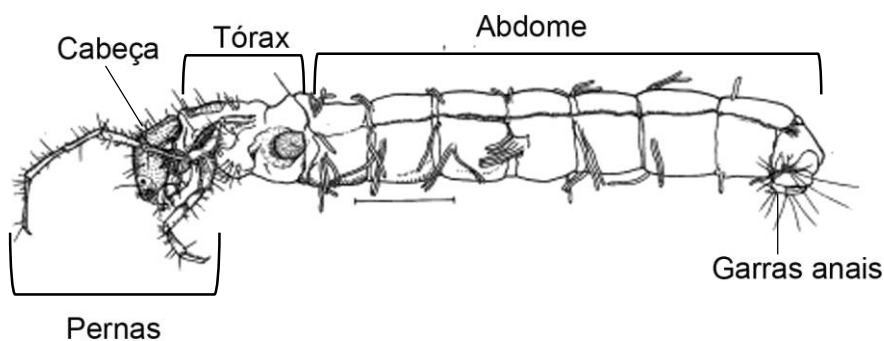


Figura 5. Larva de *Triplectides* sp. (Trichoptera: Leptoceridae) com identificação das principais estruturas (Fonte: PES, 2001).

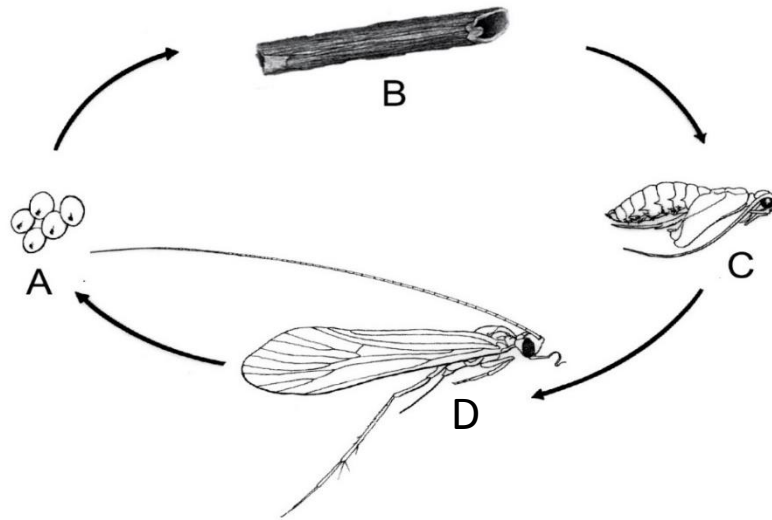


Figura 6. Representação do ciclo de vida de *Triplectides* sp. (Trichoptera: Leptoceridae): A – ovos; B – larva no abrigo; C – pupa; D – adulto (Fonte: Laboratório de Citotaxonomia e Inseto Aquáticos - LACIA).

### 2.1.3 *Stenochironomus* Kieffer, 1910 (Diptera: Chironomidae)

Gênero cosmopolita que ocorre em todas as regiões do mundo, exceto na Antártida, abriga cerca de 100 espécies e, destas, 21 espécies ocorrem no Brasil (DANTAS, 2016). Algumas larvas deste gênero minam folhas e pecíolos de plantas aquáticas ou substratos duros, como madeira submersa, podendo consumir detritos rígidos com alta concentração de lignina (TRIVINHO-STRIXINO, 2014) (Figura 7). Estas larvas possuem a cabeça achatada com mandíbulas muito duras, o abdome é mais estreito que o tórax, sendo o tórax mais forte, o que vai auxiliar na perfuração do substrato (Figura 8) (TRIVINHO-STRIXINO, 2014).

Larvas desse gênero são encontradas tanto em ambientes lóticos quanto lênticos, geralmente, minam plantas da divisão Magnoliophyta (Angiosperma) (BORKENT, 1984). A alta concentração de hemoglobina nessas larvas, representada pela coloração vermelha do seu corpo, possibilita que elas ocupem locais com baixa concentração de oxigênio (BERG, 1995). O ciclo de vida é considerado curto, experimentos realizados em laboratório revelam que estas larvas tem um curto período de vida e que o tempo máximo para a emergência do adulto é de 20 dias (DANTAS, 2010). Após a emergência e reprodução, os ovos são depositados em folha de macrófita aquática, folhicho ou raízes, a massa de ovos é gelatinosa fixa ou livre e os ovos são elipsoides (Figura 9) (BENTES et al., 2019).



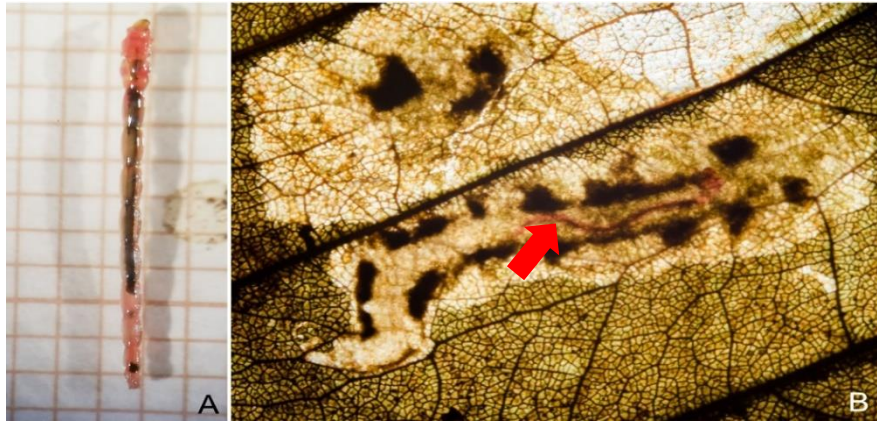


Figura 7. Larvas de *Stenochironomus* sp. (Diptera: Chironomidae) minadora de folhas. A – Larva fora do abrigo; B – Larva minando entre as superfícies abaxial e adaxial de uma folha (Fotos: Keyty Oliveira).



Figura 8. Larva de *Stenochironomus* sp. (Diptera: Chironomidae) com identificação das principais estruturas (Foto: Gizelle Amora).

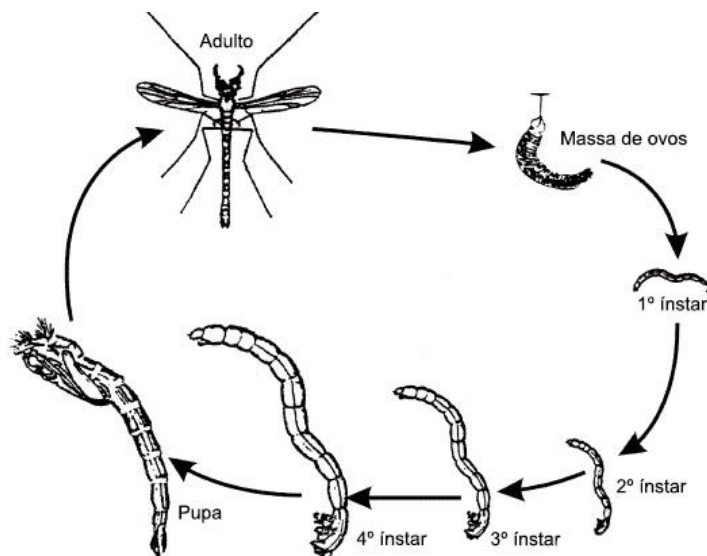


Figura 9. Representação do ciclo de vida de *Stenochironomus* sp. (Diptera: Chironomidae) (Fonte: WALKER, 1987).

## 2.2 Sistema digestório dos insetos

Durante a digestão dos alimentos, os insetos produzem enzimas em seus tratos digestórios, as quais irão hidrolisar o alimento que está em forma de macromoléculas para transformá-lo em moléculas menores que serão capazes de serem absorvidas pelo organismo. O sistema digestório dos insetos está dividido em três partes: anterior, médio e posterior (Figura 10). O intestino anterior é formado pela boca, faringe, esôfago e papo, onde o alimento é mastigado até chegar ao intestino médio. No intestino médio ocorre a digestão e absorção dos nutrientes devido à ausência de um revestimento cuticular e, é onde as enzimas são produzidas (TERRA; FERREIRA, 2012).

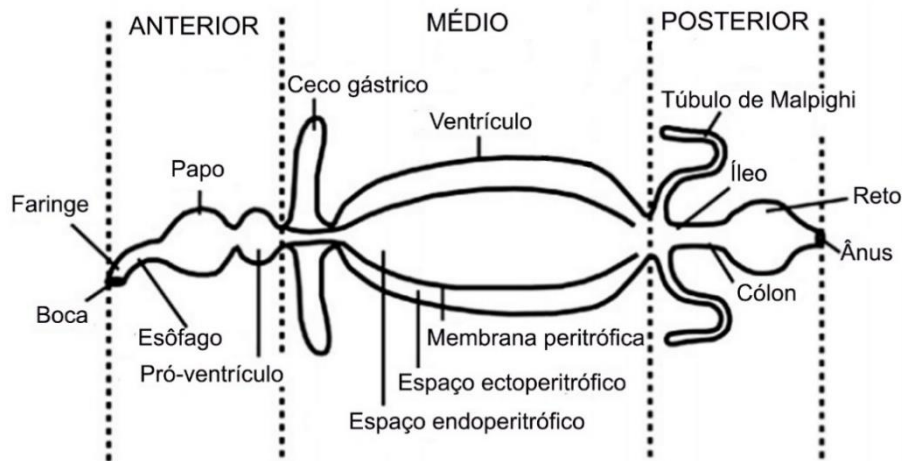


Figura 10. Representação ilustrativa dos compartimentos do intestino de um inseto (Fonte: TERRA; FERREIRA, 2012).

O espaço interno do intestino médio possui uma estrutura em forma de filme chamada membrana peritrófica, a qual separa o alimento do epitélio. Esta membrana é dividida em dois compartimentos, espaço endoperitrófico e espaço ectoperitrófico. Assim, o alimento que é degradado pelas enzimas é fracionado no interior da membrana peritrófica, passando para o espaço endoperitrófico, onde os nutrientes seguem para serem absorvidos pelas células. Na divisão entre o intestino médio e o posterior estão localizados os túbulos de Malpighi, os quais são responsáveis pela excreção. O intestino posterior é responsável pela absorção de água e íons, geralmente, essa porção do intestino abriga diversos microrganismos que auxiliam na digestão da celulose por meio da produção de enzimas celulolíticas (TERRA; FERREIRA, 2012).

A composição química dos alimentos ingeridos pelos insetos faz com que haja a necessidade da atuação de diferentes enzimas digestivas. Assim, estudos sobre essas enzimas são uma importante base para a compreensão da fisiologia desses organismos (ASADI, 2010).

### **2.3 Produção de celulases por fungos e insetos**

Muitos microrganismos são transientes ao longo do sistema digestivo de insetos podendo ser ingeridos com o alimento ou podendo residir no trato digestivo. Estes microrganismos exercem papéis importantes, ajudando a definir as características metabólicas nos insetos, servindo de alimento e, por meio dos insetos, ter uma disseminação facilitada (BRENNAN et al., 2004; VISÔTTO, 2007). Muitas das deficiências nutricionais sofridas pelos insetos, os quais se alimentam de uma ampla variedade de dietas, podem ser supridas pela presença de microrganismos (TAMAS et al., 2002).

Geralmente, os microrganismos estão envolvidos no processo alimentar dos insetos, já que estes se alimentam de dietas com moléculas complexas, como a celulose (WATANABE; TOKUDA, 2010) ou com deficiência nutricional, como o floema. Assim, os microrganismos auxiliam na digestão dessas moléculas, pois sua capacidade em degradar a celulose é alta e amplamente distribuída entre vários gêneros de fungos (MATTANOVICH et al., 2009).

A diversidade de fungos é determinada pelo substrato que o inseto se alimenta, mas também é possível que alguns desses microrganismos se adaptem a vida no intestino e desenvolvam uma relação mutualística (MORALES-JIMÉNEZ et al., 2009; GEIB et al., 2009; EGERT et al., 2003; ROJAS-JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ, 2015). Os fungos endosimbiontes podem formar uma comunidade complexa que além das funções básicas de digestão, também, exercem papéis não convencionais como síntese de vitaminas, resistência a patógenos, etc., estas funções tem implicações importantes para o inseto (SUH et al. 2005; ENGEL; MORAN, 2013; MORALES-JIMÉNEZ et al., 2012). Em contrapartida, o inseto promove um ambiente estável com frequente ingestão de nutrientes que são essenciais para o crescimento do fungo (EGERT et al., 2003; CEJA-NAVARRO et al., 2015).

Muitos estudos têm sido realizados com fungos, em particular, por estes serem eficazes na produção de enzimas e metabólitos, incluindo antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentícios (PUNT et al., 2002). Há uma grande variedade de microrganismos produtores de celulases na natureza (Tabela 1), mas apenas alguns produzem estas enzimas na

forma livre. No entanto, somente 2% da biodiversidade fúngica no mundo foi testada quanto a produção de enzimas (HASAN et al., 2006).

A busca por novas fontes de produção de enzimas celulolíticas trouxe evidências crescentes de que as celulasas também estão presentes no reino animal, particularmente em insetos (YOKOE; YASUMASU, 1964; LO et al., 2003; WATANABE; TOKUDA, 2010). Os principais representantes pertencem a 10 ordens distintas Zygentoma, Plecoptera, Blattodea, Orthoptera, Isoptera, Coleoptera, Trichoptera, Hymenoptera, Phasmida e Diptera (SUN; SCHARF, 2010). As celulasas de insetos degradam a biomassa lignocelulósica com facilidade e eficiência e servem como exemplo de biorreatores naturais (SU et al., 2013). Estes insetos usam o substrato lignocelulósico como fonte de alimentação e são bastante eficientes na degradação da celulose para transformá-la em glicose (SUN; ZHOU, 2009).

Tabela 1. Espécies de fungos mais representativas quanto a produção de celulasas.

<b>Espécies de fungos</b>	
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Aspergillus acculeatus</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Sporotrichum cellulophilum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Talaromyces emersonii</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Thielavia terrestres</i>
<i>Irpex lacteus</i>	<i>Trichoderma koningii</i>
<i>Penicillium funmiculosum</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Phanerochaete cryso sporium</i>	<i>Trichoderma viridae</i>

Fonte: FAO (1997).

Nos últimos anos, o número de novas celulasas, bem como genes codificadores destas enzimas tem aumentado continuamente (SU et al., 2013), sendo os insetos candidatos potenciais para busca de nova enzimas celulolíticas. A exemplo disto, o sequenciamento do genoma dos insetos tem fornecido evidências sobre genes putativos da celulase em algumas ordens de insetos como Phthiraptera (piolho), Hemiptera (afídeos) e Hymenoptera (abelhas e vespas) (KUNIEDA et al., 2006). Os genes de celulasas ou homólogos, até o momento, foram encontrados em 31 espécies de insetos, distribuídas em seis ordens (Tabela 2). Métodos

analíticos de meta e transcriptoma têm sido utilizados para estudar o sistema intestino de insetos e simbiontes e, um grande número de proteínas tem sido identificado, por exemplo,  $\beta$ -glucosidases já foram expressadas e caracterizadas por meio de bibliotecas de transcriptoma (WATANABE; NI, 2013). As  $\beta$ -glucosidases são encontradas, principalmente, no intestino de insetos, pois atuam como enzimas digestivas (TERRA; FERREIRA, 1994; TERRA; FERREIRA, 2005). Essas enzimas têm um grande papel na digestão dos insetos, pois hidrolisam oligossacarídeos da parede vegetal, podendo o produto final (glicose) ser absorvido facilmente pela hemolinfa (TERRA; FERREIRA, 2005).

Tabela 2. Lista de espécies de insetos que possuem genes putativos de celulases.

<b>Ordem/espécie</b>	<b>Família</b>	<b>Tipo de celulase</b>
<b>Orthoptera (grilos)</b>		
<i>Teleogryllus emma</i>	Gryllidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<b>Blattaria (baratas)</b>		
<i>Polyphaga aegyptiaca</i>	Polyphagidae	
<i>Blattella germanica</i>	Blattellidae	
<i>Panesthia angustipennis</i>	Blaberidae	
<i>Panesthia cribrata</i>	Blaberidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Salganea esakii</i>	Blaberidae	
<i>Periplaneta americana</i>	Blattidae	
<i>Cryptocercus clevelandi</i>	Cryptocercidae	
<b>Isoptera (cupins)</b>		
<i>Hodotermopsis sjoestedti</i>	Termopsidae	
<i>Neotermes koshunensis</i>	Kalotermitidae	
<i>Reticulitermes speratus</i>	Rhinotermitidae	
<i>Reticulitermes flavipes</i>	Rhinotermitidae	
<i>Coptotermes formosanus</i>	Rhinotermitidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Coptotermes acinaciformis</i>	Rhinotermitidae	
<i>Odontotermes formosanus</i>	Termitidae	
<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Termitidae	
<i>Nasutitermes walkeri</i>	Termitidae	
<b>Phthiraptera (piolhos)</b>		
<i>Pediculus humanus humanus</i>	Pediculidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<b>Hemiptera (percevejos)</b>		
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Aphididae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Lygus lineolaris</i>	Miridae	
<b>Coleoptera (besouros)</b>		
<i>Tribolium castaneum</i>	Tenebrionidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Apriona germari</i>	Cerambycidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Psacotha hilaris</i>	Cerambycidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase

<i>Oncideres albomarginata</i>	Cerambycidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<b>Ordem/espécie</b>	<b>Família</b>	<b>Tipo de celulase</b>
<i>Anoplophora malasiaca</i>	Cerambycidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Phaedon cochleariae</i>	Chrysomelidae	Endo- $\beta$ -1,4-xylanase
<i>Hypothenemus hampei</i>	Curculionidae	Endo- $\beta$ -1,4-xylanase
<b>Hymenoptera (abelhas, vespas)</b>		
<i>Apis mellifera</i>	Apidae	Endo- $\beta$ -1,4-glucanase
<i>Nasonia vitripennis</i>	Pteromalidae	

Fonte: Fischer et al. (2013).

## 2.4 Celulases

A degradação da celulose é realizada pelo efeito sinérgico de um complexo multienzimático formado por três componentes básicos:

(1) Endoglucanase (EC 3.2.1.4) que atua catalisando a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas presentes em porções internas das regiões amorfas da fibra de celulose gerando duas novas extremidades, uma redutora e uma não redutora. Também é conhecida como celulases, endo-1,4- $\beta$ -glicanases e carboximetil celulases (CMCase), tem como substratos naturais celulose, xiloglicana, carboximetil celulose (CMC), avicel (celulose microcristalina),  $\beta$ -glicana e xilana;

(2) Exoglucanase (EC 3.2.1.91) que atua nas extremidades redutoras e não redutoras das fibras de celulose gerando glicose ou celobiose como produto final. Conhecida, também, como celo-biohidrolase (CBH),  $\beta$ -1,4-celobio-hidrolase ou avicelases;

(3)  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) liberam monômeros de D-glicose por meio de catálise da hidrólise de celobiose e das extremidades não redutoras de celulose. Podem ser conhecidas como gentobiasas, celobiasas e amigdalases, possuem ampla especificidade por  $\beta$ -D-glicosídeos (Figura 11) (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

As celulases, exo e endoglucanases, agem na superfície da fibra celulósica alterando a função, morfologia e a conformação da estrutura cristalina e amorfa do arranjo celular (PARK et al., 2009). A utilização da celulose depende de um conjunto de ações sinérgicas dos três tipos de enzimas, onde a inibição ou ausência de uma das três torna a degradação da celulose parcial.

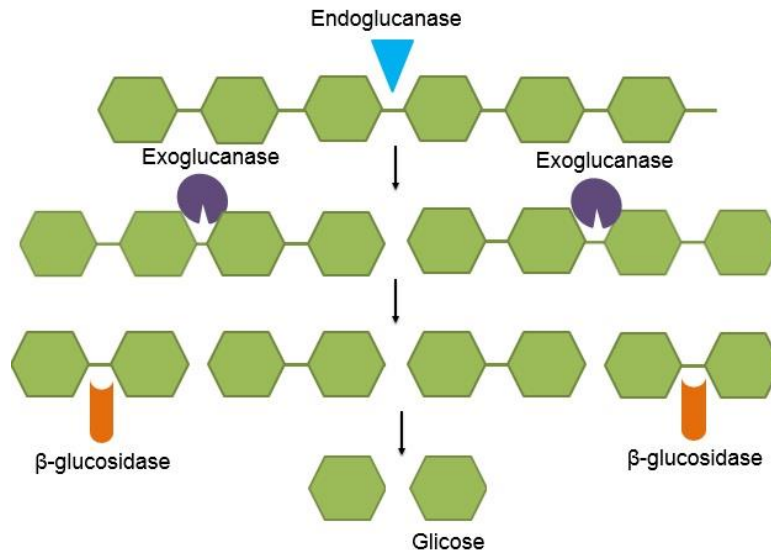


Figura 11. Modelo simplificado de ação das celulases sobre a cadeia da celulose.

## 2.5 Produtos de interesse biotecnológico

Enzimas são moléculas que aceleram diversos processos químicos e ainda tem a vantagem de serem ecologicamente viáveis, quando comparadas com catalizadores químicos. São consideradas catalizadores biológicos, em grande maioria de origem proteica, que aceleram reações em seres vivos. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de microrganismos (MONTEIRO; SILVA, 2009). O conhecimento sobre as enzimas teve um rápido aumento a partir do século XX, quando iniciou-se a determinação de suas estruturas e mecanismos de ação. Isso possibilitou uma maior compreensão e o emprego destas proteínas em diversos processos industriais nas áreas médica, alimentícia, têxtil, química, de papel e celulose, entre outras. A vantagem da utilização de enzimas na indústria se deve ao fato delas serem naturais, não tóxicas, específicas para determinadas ações e, poderem alterar as características de diversos tipos de resíduos contribuindo com a redução de poluição ambiental (MUSSATO, 2007). O mercado global de enzimas para a indústria de celulose e papel está em constante crescimento, juntamente com o crescente setor de combustível de segunda geração, a demanda por proteção ambiental e a redução de custos são essenciais. O mercado mundial de enzimas para celulose e papel deve crescer, aproximadamente, 4,4% nos próximos cinco anos e atingirá US\$ 95 milhões em 2024, de US\$ 73 milhões em 2019 (<https://www.theexpresswire.com>, 5 set 2019).

De todas as enzimas utilizadas comercialmente, aproximadamente metade são de origem fúngica. Inúmeros fatores favorecem enzimas de origem microbiana sobre as derivadas de plantas ou animais, incluindo a grande variedade de atividades catalíticas, maior rendimento,

facilidade de manipulação genética, produção rápida em meios de baixo custo e produção independente de fatores sazonais (MCKELVEY; MURPHY, 2017). Além de ser biodegradáveis e ativos em condições amenas em relação à temperatura e pH. Na Tabela 3, seguem algumas das aplicações industriais utilizando enzimas de origem fúngica.

Outras fontes estão sendo estudadas atualmente, por exemplo os insetos, na busca por enzimas de interesses biotecnológicos. Exemplos proeminentes de enzimas derivadas de insetos incluem peptidases, amilases, lipases e  $\beta$ -d-glucosidases. Peptidases altamente potentes para a degradação do glúten, uma proteína de armazenamento que pode causar distúrbios intestinais, pode ser encontradas em pragas de grãos. Vários insetos, como besouros e cupins de casca de árvore, são capazes de se alimentar de madeira, no campo da biotecnologia industrial, seus sistemas de enzimas celulolíticas principalmente de endo-1,4- $\beta$ -d-glucanases e  $\beta$ -d-glucosidases podem ser empregados para sacarificação da celulose (MIKA et al., 2013), isolamento de proteínas das cerdas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera) (REIS et al., 2001; REIS et al., 2006), isolamento de  $\beta$ -1,4-endoglucanase do intestino médio de *Eurycantha calcarata* (Lucas) (Phasmatodea) para digestão da superfície da região amorfa da celulose (SHELOMI et al., 2014). Assim, a busca por enzimas com alto potencial catalítico é de grande importância para o melhoramento da degradação da biomassa e produção de produtos que utilizam enzimas ao longo do seu processo.

Tabela 3. Recursos e aplicações de enzimas industriais de origem fúngicas.

Enzimas	Organismos	Principais áreas de aplicação
$\alpha$ - Amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>	Processamento de amido e indústria de alimentos
Celulases	<i>Trichoderma viride</i> , <i>T. reesei</i>	Indústria têxtil, celulose e papel
Celobiohidrolase	<i>T. viride</i> , <i>T. reesei</i>	Indústria têxtil, celulose e papel
Glucoamilase	<i>A. phoenicis</i> , <i>Rhizopus delemar</i>	Processamento de amido
Glucose oxidase	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	Têxtil e biosensor
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Indústria têxtil, celulose e papel
Lipases	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	Indústria de alimentos e detergente
Pectina liase	<i>T. reesei</i>	Indústria de alimentos
Proteases	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>R. delemar</i>	Indústria de alimentos e detergente
Xilanases	<i>T. reesei</i> , <i>T. konignii</i> , <i>A. niger</i>	Indústria têxtil, celulose e papel, panificação

Fonte: McKelvey; Murphy (2017).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar a dinâmica da degradação de celulose realizada por fungos simbiontes e por expressão gênica endógena em insetos aquáticos fragmentadores.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Identificar a diversidade de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de larvas de três insetos aquáticos fragmentadores.
- b) Avaliar qualitativamente e quantitativamente a produção de enzimas celulolíticas de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de larvas de insetos aquáticos fragmentadores.
- c) Descrever o perfil de expressão gênica de celulases do trato digestório de larvas de *Phylloicus amazonas* Pather (Insecta: Trichoptera).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Metodologia para realização do primeiro objetivo: Identificar a diversidade de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de larvas de três insetos aquáticos fragmentadores

#### 4.1.1 Amostragem das larvas

Foram coletadas larvas de *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae), *Triplectides* (Trichoptera; Leptoceridae) e *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em 10 igarapés de primeira e segunda ordem distribuídos em duas bacias hidrográficas da Reserva Florestal Ducke (RFD), localizada na Rodovia Estadual AM-010, km-26, Manaus, AM (Figura 12) no período de 2 a 10 de agosto de 2016. Em cada igarapé foi selecionado um trecho de 50 m, onde o substrato disponível (folhiço) foi coletado, com o auxílio de uma rede entomológica aquática, em cinco pontos distintos. Em cada ponto, três subamostras foram coletadas e inspecionadas em busca das larvas. Dessa forma, obteve-se um total de 72 larvas dos insetos aquáticos.

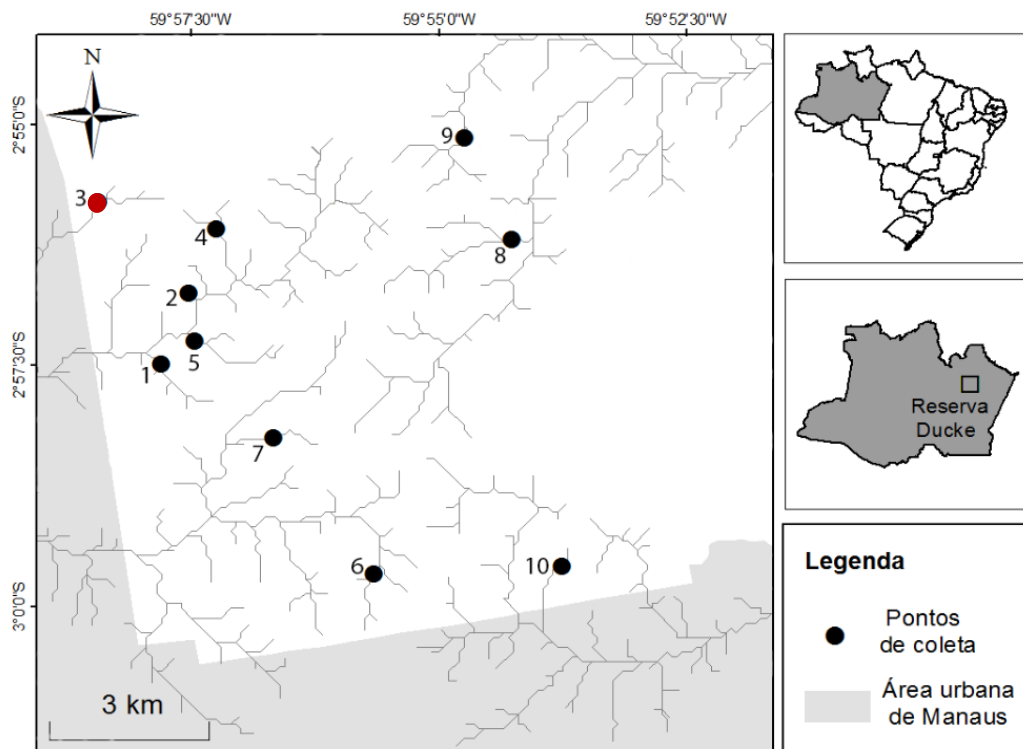


Figura 12. Mapas do Brasil e Amazonas, indicando a localização da Reserva Florestal Ducke (RFD), em Manaus, onde os insetos aquáticos fragmentadores foram coletados. Círculos pretos representam os igarapés amostrados na RFD (Apêndice A).

Cada indivíduo coletado foi retirado do abrigo (folha ou graveto), submerso em álcool 70% por 30 segundos e, em seguida, acondicionado em microtubo com água destilada esterilizada. Este procedimento ocorreu logo após a coleta para evitar a decomposição ou excreção do alimento em seus tratos digestórios. As amostras foram transportadas para o laboratório em caixa térmica para posterior dissecação dos intestinos. Os tratos digestórios dissecados foram transferidos para microtubos contendo 1 mL de água destilada estéril e homogeneizados.

#### **4.1.2 Isolamento dos fungos filamentosos**

Uma alíquota 100 µL de cada amostra homogeneizada foi espalhada por meio da técnica de *spread-plate* em placas de Petri, em triplicata, contendo meio BDA (Ágar Batata Dextrose) e 0,1 mg/L de antibiótico cloranfenicol (Figura 13), incubadas em estufa a 27 °C por 7 dias. O BDA é um meio de cultivo muito utilizado por ter sua metodologia já estabelecida, além de comprovada eficiência no cultivo de fungos (RIKER; RIKER, 1936).

Transcorrido o tempo de incubação das placas, realizou-se a contagem dos fungos crescidos e o isolamento dos mesmos por meio do subcultivo de cada um dos isolados em novas placas de BDA. Fotos foram feitas de cada colônia e de suas respectivas estruturas reprodutivas para posterior identificação morfológica.

Para obtenção das estruturas reprodutivas foi utilizado o método de microcultivo (Figura 14B), onde se preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, seguiu-se Kern; Blevins (1999). Um cubo de ágar foi colocado sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril. Os fungos foram semeados nos quatro lados do cubo de ágar e cobertos por uma lamínula esterilizada. Em seguida, foi adicionado 1 a 2 mL de água destilada estéril em um pequeno chumaço de algodão estéril, para evitar a desidratação do meio de cultura durante o crescimento do fungo.

As placas com microcultivo foram acondicionadas em uma caixa de isopor à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que o desenvolvimento de hifas foi observado. Para a fixação das estruturas microscópicas, a lamínula foi retirada com auxílio de uma pinça e montada sobre uma lâmina com uma gota de azul de lactofenol para melhor visualização das estruturas. As lâminas foram observadas em microscópio óptico sob objetiva de 40x, onde o tipo e cor da hifa, forma, disposição e formação de esporos foi analisado e fotografado utilizando-se um microscópio óptico Leica Microsystems com uma câmera Leica DFC295

acoplada ao microscópio e o programa Leica Application Suite – LAS, 4.2.0 para edição das fotos.

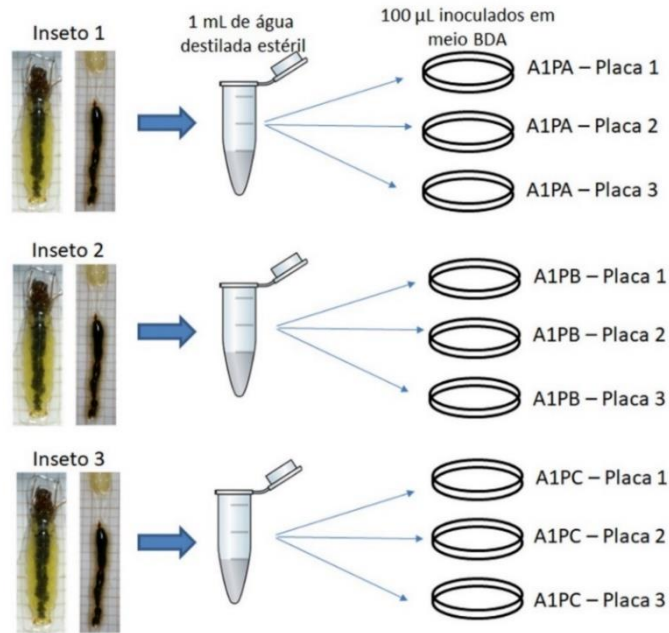


Figura 13. Representação da distribuição dos conteúdos estomacais dos insetos fragmentadores nas placas de Petri com BDA.

Durante o isolamento e purificação dos fungos estes foram armazenados seguindo o método de Castellani (Figura 14B), onde se faz inoculação de uma pequena porção do meio de cultura com o fungo e os adiciona em pequenos frascos contendo água destilada e esterilizada (CASTELLANI, 1939). Para determinar as morfoespécies seguiu-se os critérios propostos por Lacap et al. (2003) e Ibrahim et al. (2017), os quais incluem taxa de crescimento, forma e coloração das colônias e efeitos dos isolados no meio de cultura.

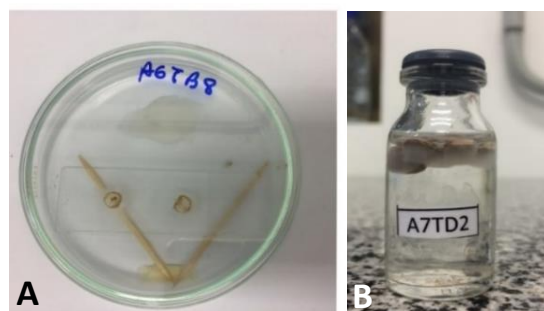


Figura 14. Método de armazenagem e cultivo de fungos filamentosos. A - Obtenção das estruturas reprodutivas por meio do microcultivo; B - Armazenamento dos esporos pelo método Castellani.

### 4.1.3 Cálculo da concentração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As colônias que se desenvolveram nas triplicatas de cada amostra foram contabilizadas. Dessa forma, a densidade foi estimada pelo total de UFC corrigido pelo fator de diluição sendo expresso em UFC/mL de trato digestório. Seguiu-se a fórmula:

$$UFC/mL = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias} \times FD}{0,1 \text{ mL}}$$

Onde, FD é o fator de diluição, que neste caso foi usado 1, pois não houve diluição do conteúdo digestivo dos insetos. 0,1 mL é a alíquota plaqueada das amostras do conteúdo digestivo dos insetos.

### 4.1.4 Identificação molecular dos fungos filamentosos

Primeiramente, os isolados foram previamente cultivados em caldo de batata natural (batata 200 g, glicose 20 g, ágar 15 g, água destilada 1000 mL). O caldo foi acondicionado em Erlenmeyers de 250 mL e pequenos blocos de ágar com massa micelial foram adicionados ao caldo, sendo incubados em BOD à 27 °C por 7 dias. Foi retirada uma alíquota de 500 µL de cada amostra e colocada em microtubo. Para a extração de DNA fúngico foi utilizado kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração final foi determinada usando The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) e o material armazenado a -20 °C até o seu uso.

### 4.1.5 Reação de amplificação do gene e sequenciamento

As regiões ITS1 - 5.8S - ITS2 fúngicas foram amplificadas por PCR a partir do DNA total usando os seguintes iniciadores ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (WHITE et al., 1990). A amplificação foi realizada em uma reação de 25 µL (Apêndice B) com o seguinte programa: 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 55 °C por 30 s; extensão a 72 °C por 40 s e extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos das extrações de DNA e da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio e purificados com kit GFX PCR DNA Gel Band (GE HealthCare™) de acordo com as recomendações do fabricante. Os

produtos da PCR foram sequenciados com os mesmos *primers* da PCR seguindo o protocolo BigDye® V3.1 em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems 3500 Thermo Fisher Scientific).

#### 4.1.6 Análises da genotipagem

Os *amplicons* resultantes da região ITS foram analisados utilizando-se o programa Geneious® 9.0.5 (KEARSE et al., 2012). Para checagem das sequências, utilizou-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Searching Tool, contra o banco de nucleotídeos) (ALTSCHUL et al., 1990) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e pelo banco de dados UNITE, exclusivo para fungos (NILSSON et al., 2018; <https://unite.ut.ee/>).

#### 4.1.7 Análise da diversidade e frequência dos fungos filamentosos

A frequência de espécies de fungos foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$Fo = \left( \frac{Ni}{N} \right) \times 100$$

Onde, Fo = frequência de ocorrência de táxons fúngicos; Ni = número de táxons fúngicos obtidos; N = total de táxons fúngicos. Apartir destes resultados, a frequência da espécie poderam ser classificadas da seguinte forma: < 0,5% = rara; ≥ 0,5 < 1,5% = ocasional; ≥ 1,5 < 3,0% = comum; ≥ 3,0% = abundante (SCHNITTLER; STEPHENSON, 2000). Para determinar se houve diferença significativa entre a frequência das morfoespécies identificadas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis considerando um nível de 5% de significância.

Para calcular a diversidade de fungos filamentosos do intestino das larvas foi usado do índice de diversidade Shannon-Wiener, um dos índices mais utilizados para caracterização das comunidades (FONSECA, 1985). O índice de Simpson foi utilizado para maior confiabilidade, ponderando a favor das espécies mais abundantes, é menos sensível à riqueza e atribui menor peso às espécies raras (MAGURRAN, 2004). Os softwares utilizados para as análises foram Microsoft Excel® e Past 2.17 (HAMMER; HAPPER; RAYAN, 2001).

## 4.2 Metodologia para realização do segundo objetivo: Avaliar qualitativamente e quantitativamente a produção de enzimas celulolíticas de fungos filamentosos cultiváveis associados ao trato digestório de insetos aquáticos fragmentadores.

### 4.2.1 Avaliação da produção de enzimas celulolíticas dos fungos isolados

Foi realizada a seleção de linhagens dos fungos filamentosos quanto a capacidade destas em crescer em meio contendo uma única fonte de carbono celulósica, cuja composição é mostrada no Apêndice C (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

As placas foram incubadas por 4 dias a 28 °C e em seguida submetidas a choque térmico de 50 °C em estufa por 16 horas. A atividade enzimática foi verificada pela formação de halos de degradação do polímero, os quais foram revelados a partir da incubação das placas em 10 mL de solução corante de vermelho Congo (1%) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão (NOGUEIRA; CAVALCANTE, 1996) (Figura 15). O corante Vermelho Congo tem a propriedade de se ligar a cadeias polissacarídicas. Ao lavar o meio com as células crescidas ocorre um descoramento na região onde a celulose foi hidrolisada, ou seja, onde há a presença de celulasas. Esta é uma medida indireta e qualitativa para a avaliação do potencial celulolítico de microrganismos. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

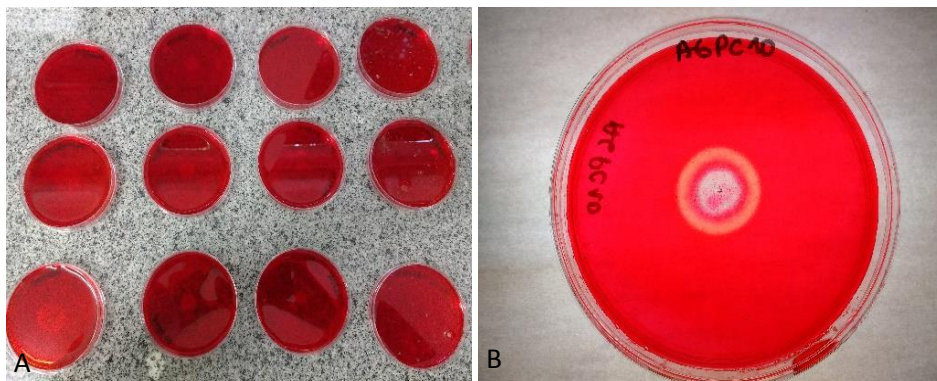


Figura 15. Isolados fúngicos em meio com CMC. A – Revelação dos halos de hidrólise com o corante vermelho Congo; B – Placa com fungo corado.

Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com auxílio de um paquímetro (mm). A atividade enzimática foi expressa em índice enzimático (IE) mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia ( $IE = dh/dc$ ) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; NOGUEIRA; CAVALCANTE, 1996). A partir desses

resultados foi selecionada uma linhagem para realizar o seu perfil cinético com relação a produção de enzimas celulolíticas.

#### **4.2.2 Substrato para fermentação submersa e obtenção dos esporos da linhagem *Penicillium* sp. A2PA4**

Para induzir a produção de enzimas do complexo celulolítico pelo fungo selecionado optou-se por utilizar como fonte de carbono a polpa de celulose, a qual foi cedida pela empresa Benaion Indústria de Papel e Celulose localizada na cidade de Manaus, AM. A polpa de celulose industrial é considerada uma excelente fonte de carbono alternativa para produção de enzimas por fungos filamentosos com capacidade de produzir enzimas lignocelulolíticas pela presença de substrato rico em polissacarídeos. Na indústria de papel e celulose, o material vegetal passa pelo processo de branqueamento, onde é retirada a lignina e grande parte da hemicelulose. Assim, esta biomassa tem 96,8% da sua composição formado por celulose, 0,008% de lignina e 3,1% de outras substância (OLIVEIRA et al., 2019).

Esporos dos fungos filamentosos selecionados foram suspensos em água destilada esterilizada e uma alíquota de 10 µL foi retirada e utilizada para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Em seguida, uma alíquota de 10 mL da suspensão de esporos foi adicionada em frascos Erlenmeyers de 250 mL acrescidos com meio basal + glicose 1% (Apêndice D).

Assim, foi retirado um volume de 20 mL da massa fúngica crescida em meio basal + glicose 1% e adicionado em 200 mL da polpa de celulose em triplicata. Os fatores físicos estão de acordo com o descrito na literatura para fungos filamentosos produtores de enzimas celulolíticas: a temperatura em torno de 28 a 30 °C, pH em torno de 5,0 e densidade do inóculo  $10^6$  (GHOSE, 1987; SZIJÁRTÓ et al, 2004). A cada 24 h foi retirada uma amostra, centrifugada e armazenada para a realização dos ensaios. Para uma comparação mais efetiva da produção de enzimas pelo fungo selecionado, usou-se, como controle, o fungo *Trichoderma reesei* QM9414 adquirido na Coleção de Culturas Tropicais Fundação André Tosello (CCT 2768).

#### **4.2.3 Preparação da curva padrão**

A glicose liberada nas reações utilizando o sobrenadante dos dois cultivos foi quantificada a partir do fator de calibração obtido das absorbâncias, em triplicata, da glicose



padrão de concentração conhecida: curva padrão de DNS para endoglucanase e kit GOD para  $\beta$ -glucosidase. O método DNS é descrito na literatura como confiável, adequado e possui sensibilidade de detecção de 1 a 20  $\mu\text{mol}$  de glicose (MILLER, 1959), apresentando desvios mínimos e um alto grau de linearidade. Os resultados obtidos foram medidos em U (unidade de atividade), Onde uma unidade de atividade será definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto. A atividade enzimática em U/ml foi calculada utilizando-se as equações para cada atividade enzimática definida pelas derivações de Ghose (1987). O cálculo de atividade específica foi utilizado para se estimar a porcentagem das proteínas correspondentes às enzimas celulolíticas do total de proteínas extracelulares produzidas. De acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\left(\frac{U}{\text{mL}}\right)}{\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

Onde: U/mL = Atividade enzimática; mg/mL = Concentração de proteínas totais.

A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS e calculado em mg/mL por meio da equação da reta construída nos mesmos volumes dos ensaios das amostras (Figura 16). Em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução DNS adicionou-se 1 mL de cada solução padrão de glicose. Os tubos foram agitados e aquecidos por 5 min à temperatura de 100 °C e após atingir a temperatura ambiente adicionou-se 13 mL de água destilada. O tubo apenas com água destilada foi utilizado como controle (branco) e as leituras de absorvância foram realizadas a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro (BioMate™, Thermo Scientific™).

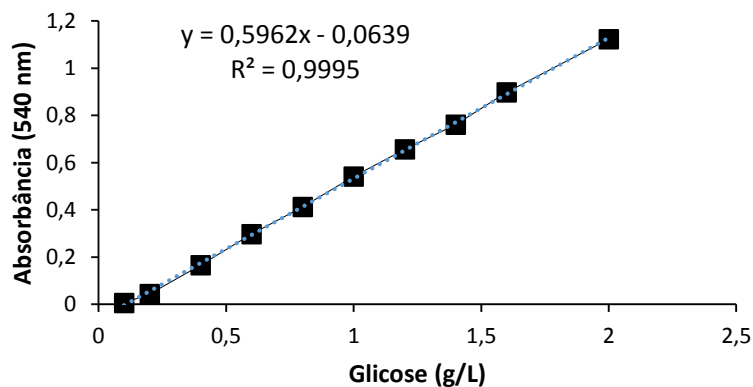


Figura 16. Curva padrão de glicose e equação da reta utilizada nos ensaios de FPase e CMCase.

#### 4.2.4 Determinação de atividade de celulases totais – FPase

A atividade FPase (atividade de papel de filtro) abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, a qual é determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro e da avaliação da atividade pela liberação de substâncias redutoras dosadas pelo método de Miller (1959) com ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS). A determinação foi baseada usando o protocolo de Ghose (1987), onde as fitas de papel filtro Whatman n° 1 (1,0 cm x 6,0 cm) foram inseridas em uma placa de 96 poços contendo 1 mL de tampão citrato pH 4,8, ao mesmo adicionou-se 0,5 mL do extrato enzimático.

A placa foi incubada a 50 °C por 1 hora, em seguida foi agitada em vórtex e retirado 100 µL para uma nova placa, adicionando-se 200 µL de reagente DNS e incubando a 100 °C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de água e homogeneizado por inversão. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. O branco reacional foi constituído pela tira de papel de filtro e o tampão, e utilizado para zerar o equipamento. Além do branco reacional foi feito também o controle da enzima que se constituiu de tampão e extrato enzimático, sem adição do substrato, os valores de absorbância destes foram subtraídos dos valores obtidos dos tubos de reação.

Para determinar a concentração de açúcares redutores liberados na reação foi utilizada a equação da curva padrão de glicose construída a partir de uma solução padrão na concentração de 10 mg/mL, em seguida a atividade enzimática foi calculada utilizando a equação abaixo, onde [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 2 mg de glicose (quantidade absoluta) durante o tempo de reação, e foi determinada por plotagem de duas diluições que liberaram glicose variável em relação a quantidade absoluta de glicose, através da representação gráfica da glicose liberada (mg/mL) em função da concentração de extrato enzimático.

$$Atividade(FPU) = \frac{0,37}{[E] \text{ para liberar } 2,0 \text{ mg de glicose}} U/mL$$

Obtenção de [E] a partir da diluição usada

$$Concentração = \frac{1}{diluição} = \left( \frac{Volume \text{ de extrato enzimático utilizado}}{Volume \text{ total da diluição}} \right)$$

#### 4.2.5 Determinação de atividade de endoglucanase – CMCase

Primeiramente, foi feita a diluição do extrato enzimático na proporção de 1:1 (100 uL de amostra e 100 uL de tampão citrato, 50 mM, pH 4.8). Em microtubos para controle do substrato e controle da enzima foram adicionados 50 uL de tampão citrato. Em seguida, adicionou-se 50 uL de solução de CMC 2% nas triplicadas das amostras e no controle do substrato. E foram adicionados 50 uL dos extratos enzimáticos nas triplicatas das amostras e controle da enzima. Levou-se ao banho maria a 50 °C por 15 min. Em seguida, adicionou-se 300 uL de DNS em todos os microtubos e levou-se ao banho-maria a 100 °C por 5 min. Logo após, acrescentou-se 1,5 mL de água destilada nos microtubos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, o branco foi utilizado para zerar o equipamento, sendo composto por DNS em tampão.

A concentração de glicose decorrente da reação foi calculada por meio da equação da curva padrão previamente elaborada nas mesmas condições das amostras e depois foi calculada a atividade enzimática de endoglucanases utilizando a equação abaixo. Onde [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 0,5 mg de glicose durante o tempo de reação, a qual foi determinada por meio da representação gráfica da glicose liberada em função da concentração de enzima.

$$Atividade(CMC) = \frac{0,185}{[E]_{para\ liberar\ 0,5\ mg\ de\ glicose_{diluição\ crítica}}} U/mL$$

#### 4.2.6 Determinação de atividade de β-glicosidase

A atividade da β-glicosidase foi quantificada segundo a metodologia de Ghose (1987). Onde foi usado como substrato 50 μL de solução de celobiose, a qual foi dissolvida em tampão citrato pH 4,8; essa solução de celobiose foi adicionada em microtubos tipo Eppendorf® de 2 mL contendo 50 μL de extrato enzimático diluído no mesmo tampão.

Os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 50 °C por 30 min, decorrida a reação foi determinada a concentração de glicose liberada através de um kit GOD (glicose oxidase) seguindo-se instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm, o branco foi utilizado para zerar o equipamento, sendo composto por solução de celobiose em tampão.

A atividade enzimática β-glicosidase foi calculada utilizando a equação abaixo, na qual [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para

liberar 1,0 mg de glicose durante o tempo de reação, que foi determinada por meio da representação gráfica da glicose liberada em função da concentração de enzima:

$$Atividade(Betaglico) = \frac{0,0926}{[E]_{para\ liberar\ 1,0\ mg\ de\ glicose\ diluição\ crítica}} U/mL$$

### **4.3 Metodologia utilizada para realização do terceiro objetivo: Descrever o perfil de expressão gênica de celulasas do trato digestório de *Phylloicus amazonas* Pather (Insecta: Trichoptera).**

#### **4.3.1 Amostragem das larvas de *P. amazonas***

Foram coletadas larvas de *P. amazonas* no igarapé Barro Branco da Reserva Florestal Ducke (RFD), localizada na Rodovia Estadual AM-010, km-26, Manaus, AM, Brasil (Figura 13 em vermelho) em agosto de 2018. As larvas foram coletadas com o auxílio de uma rede entomológica aquática. Cada indivíduo coletado foi retirado de seu abrigo (folha) e identificado, em campo, em nível de espécie com o auxílio de um taxonomista, sob lupa estereoscópica e dissecados, onde foram acondicionados em microtubos contendo RNAlater™ Solution (Ambion®) para a extração do RNA.

#### **4.3.2 Isolamento do RNA**

Foram dissecadas 10 larvas de *P. amazonas* para obtenção dos intestinos, formando *pools* com 5 intestinos em duplicata para realização da extração do RNA total. As amostras foram homogeneizadas com 10 µL de β-mercaptoetanol e 1 mL do tampão de lise fornecido no kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN) seguindo-se com as recomendações do fabricante.

A concentração do RNA total foi medida utilizando-se o kit Qubit RNA BR assay (Invitrogen™). Para a visualização do perfil eletroforético de RNA, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, corada com brometo de etideo. Para a análise de qualidade, as amostras foram resuspendidas em 40 uL de água pura e homogeneizadas e, em seguida, 4 µl foram usados no kit Agilent RNA 6000 Nano Reagents Part I (Agilente Technologies), sendo o restante do procedimento seguido de acordo com o protocolo do fabricante.

### 4.3.3 Montagem da biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA foi confeccionada para o sequenciamento na plataforma Illumina, utilizando-se o kit TrueSeq® Stranded mRNA (Illumina®) conforme instruções do fabricante. Utilizou-se 15 µl da amostra + 50 µL de água livre de nucleases, em seguida, as amostras seguiram por dois passos: 1) Purificação e fragmentação do mRNA - Este processo purificou as moléculas de mRNA contendo poliA usando esferas magnéticas ligadas por oligo poli-T com duas rodadas de purificação. E, na segunda eluição, o RNA foi fragmentado e preparado para a síntese de cDNA; 2) Síntese da primeira e segunda fitas do cDNA – utilizou-se o kit Truseq Stranded RNA LT Set A. Após esses passos, foram realizados os processos de adenilação, ligação e enriquecimento dos fragmentos de DNA. A qualidade da biblioteca foi validada usando o kit Agilent RNA 6000 Nano Reagents Part I (Agilent Technologies) para análise no Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### 4.3.4 Sequenciamento

A biblioteca de cDNA foi sequenciada usando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) na estrutura da UT Genomics Core Next Gen Sequencing Lab (Knoxville, Tennessee) e a biblioteca de *amplicon* foi ajustada para uma concentração inicial de 4 nM e sequenciada por um técnico profissional treinado seguindo protocolo Illumina.

Os seguintes passos foram seguidos utilizando-se o kit Miseq Reagent v3. Para a desnaturação e diluição, uma alíquota de 5 uL da biblioteca de 4 nM foi adicionada em 5 uL de NaOH (0,2 M), homogeneizado em vórtex e incubado em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, adicionou-se 990 uL de tampão HT1 para atingir a concentração de 20 pM. Após, dilui-se para uma concentração de 6 pM, onde 180 uL da biblioteca de 20 pM foi adicionada a 420 uL de tampão HT1. Combinou-se a biblioteca e o marcador PhiX a 2% (558 uL da biblioteca de 6 pM + 12 uL de Phix 10 pM). Por fim, realizou-se a desnaturação a 95 °C (2 minutos), a amostra foi colocada no gelo até o momento de uso.

### 4.3.5 Análise das sequências

Os dados brutos gerados pelo sequenciamento foram importados para o programa CLC Genomics Workbench v. 11.0.1, e com o auxílio da ferramenta Trim, foram filtrados e as bases de baixa qualidade (menor que 0,05) foram removidas. Para a montagem das sequências de

leitura (*reads*) em sequências contínuas (*contigs*), também, utilizou-se o programa CLC Genomics Workbench v. 11.0.1. A montagem *De novo* dos *contigs* foi feita utilizando as sequências filtradas e parâmetros de montagem do próprio programa.

Os *contigs* montados foram sujeitos a busca por similaridade no programa Blast2GO<sup>®</sup> 5.2.5, utilizando os bancos de dados de referência disponíveis no NCBI *nr* com os seguintes parâmetros do BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool): E-value de valor 1,0 E-3 e número de blast hits de valor 20.

#### **4.3.6 Anotação funcional**

A anotação funcional das sequências foi feita com os parâmetros padrões sugeridos por Conesa e Götz (2008) utilizando o programa Blast2GO<sup>®</sup> 5.2.5 que são corte (cut off) de 55, GO weight = 5 e filtros database nr e database nr\_alias\_fungi.

## CAPÍTULO 1

### FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVÁVEIS DO INTESTINO DE LARVAS DE INSETOS AQUÁTICOS FRAGMENTADORES

#### 5.1 RESULTADOS

Foram identificados um total de 28 morfoespécies e quatro espécies associadas ao intestino das larvas de *Phylloicus*, *Triplectides* e *Stenochironomus*, compreendendo *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* (Figura 17) identificados por morfologia e estruturas reprodutivas. Os gêneros *Gliocephalotrichum*, *Talaromyces* e *Umbelopsis* foram identificados por genotipagem (ver capítulo 2).

Quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) por intestino (Apêndices E, F e G) em *Phylloicus* obteve-se um total de  $2 \times 10^4$  UFC/mL, em *Triplectides* um total de  $5 \times 10^3$  UFC/mL e *Stenochironomus* um total de  $8 \times 10^2$  UFC/mL (Apêndices E, F e G).

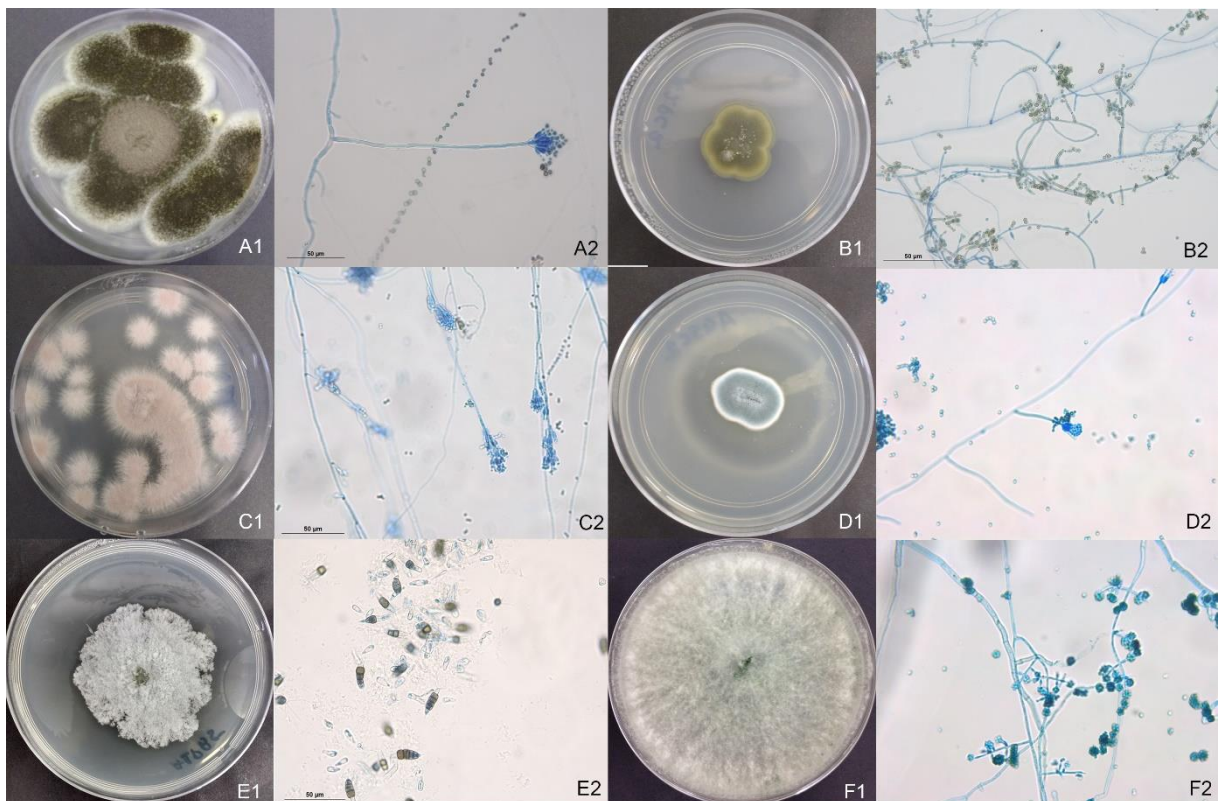


Figura 17. Visão macro e microscópica dos fungos filamentosos identificados isolados dos intestinos de *Phylloicus* (Trichoptera), *Triplectides* (Trichoptera) e *Stenochironomus* (Diptera) plaqueados em meio BDA por 7 dias à 27 °C. A1/A2 – *Aspergillus* sp.; B1/B2 – *Cladosporium* sp.; C1/C2 – *Paecilomyces* sp.; D1/D2 – *Penicillium* sp.; E1/E2 – *Pestalotiopsis* sp.; F1/F2 – *Trichoderma* sp.

As morfoespécies de fungos observadas nos três grupos de insetos analisados foram classificados, de acordo com a frequência, como raros, em sua maioria. Os gêneros classificados como abundantes foram *Penicillium* sp6 (48,3%), *Penicillium* sp7 (23,9%), *Penicillium* sp4 (10,4%) e *Pestalotiopsis* sp2 (3,65%) (Tabela 4). Não houve diferenças nas frequências dos táxons fúngicos associados aos três gêneros de insetos ( $\alpha = 0,05$ ;  $p = 0,136$ ).

Os valores encontrados para o índice de Shannon e índice de Simpson encontram-se na Tabela 5. O índice de Shannon indica maior diversidade na comunidade de fungos isolados do intestino de *Stenochironomus* enquanto que o de Simpson mostra maior diversidade na comunidade de fungos isolados do intestino de *Phylloicus* e a menor diversidade em *Stenochironomus*.

Os táxons fúngicos compartilhados entre os três gêneros de insetos analisados foram: *Penicillium* sp1, *Penicillium* sp3, *Penicillium* sp4, *Penicillium* sp5, *Penicillium* sp6, *Penicillium* sp7, *Trichoderma* sp1 e *Trichoderma* sp2. *Phylloicus* e *Triplectides* compartilharam 12 táxons fúngicos (todas as morfoespécies pertencentes ao gênero *Penicillium*, *Pestalotiopsis* sp2, *Pestalotiopsis* sp4, *Trichoderma* sp1, *Trichoderma* sp2 e *Trichoderma* sp3). *Phylloicus* e *Stenochironomus* compartilharam 10 táxons fúngicos (*Aspergillus* sp1, *Cladosporium* sp1, *Penicillium* sp1, *Penicillium* sp3, *Penicillium* sp4, *Penicillium* sp5, *Penicillium* sp6, *Penicillium* sp7, *Trichoderma* sp1 e *Trichoderma* sp2). *Triplectides* e *Stenochironomus* compartilharam 10 táxons fúngicos (*Cladosporium* sp4, *Penicillium adametzii*, *Penicillium* sp1, *Penicillium* sp3, *Penicillium* sp4, *Penicillium* sp5, *Penicillium* sp6, *Penicillium* sp7, *Trichoderma* sp1 e *Trichoderma* sp2) (Figura 18).



Tabela 4. Frequência da ocorrência (%) de táxons fúngicos isolados do intestino de larvas de *Phylloicus* spp. (P), *Triplectides* spp. (T) e *Stenochironomus* spp. (S) coletadas em igarapés localizados na Reserva Florestal Duque (RFD), Manaus, Amazonas em julho de 2016. Ni= número de isolados fúngicos; Fo= frequência da ocorrência.

Filo	Táxon fúngico	P		T		S		Fo (%)
		Ni	Fo (%)	Ni	Fo (%)	Ni	Fo (%)	
Ascomycota	<i>Aspergillus</i> sp1	1	0,14	0	0,00	1	1,33	0,20
Ascomycota	<i>Aspergillus</i> sp2	0	0,00	0	0,00	2	2,67	0,20
Ascomycota	<i>Cladosporium</i> sp1	1	0,14	0	0,00	1	1,33	0,20
Ascomycota	<i>Cladosporium</i> sp2	7	1,01	0	0,00	0	0,00	0,69
Ascomycota	<i>Cladosporium</i> sp3	0	0,00	0	0,00	2	2,67	0,20
Ascomycota	<i>Cladosporium</i> sp4	0	0,00	2	0,81	1	1,33	0,30
Ascomycota	<i>Gliocephalotrichum</i> sp1	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0,10
Ascomycota	<i>Paecilomyces</i> sp1	0	0,00	0	0,00	2	2,67	0,20
Ascomycota	<i>Paecilomyces</i> sp2	0	0,00	0	0,00	4	5,33	0,39
Ascomycota	<i>Penicillium adametzii</i>	0	0,00	1	0,41	1	1,33	0,20
Ascomycota	<i>Penicillium citrinum</i>	0	0,00	0	0,00	1	1,33	0,10
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp1	10	1,45	1	0,41	1	1,33	1,18
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp2	2	0,29	1	0,41	0	0,00	0,30
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp3	1	0,14	1	0,41	20	26,67	2,17
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp4	61	8,82	21	8,54	24	32,00	10,5
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp5	1	0,14	1	0,41	2	2,67	0,39
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp6	478	69,08	11	4,47	1	1,33	48,4
Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp7	61	8,82	175	71,14	7	9,33	24,0
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp1	5	0,72	0	0,00	0	0,00	0,49
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp2	35	5,06	2	0,81	0	0,00	3,65
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp3	2	0,29	0	0,00	0	0,00	0,20
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp4	3	0,43	4	1,63	0	0,00	0,69
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp5	4	0,58	0	0,00	0	0,00	0,39
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp6	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0,10
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp7	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0,10
Ascomycota	<i>Pestalotiopsis</i> sp8	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0,10
Ascomycota	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	0	0,00	2	0,81	0	0,00	0,20
Ascomycota	<i>Trichoderma harzianum</i>	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0,10
Ascomycota	<i>Trichoderma</i> sp1	7	1,01	6	2,44	3	4,00	1,58
Ascomycota	<i>Trichoderma</i> sp2	6	0,87	15	6,10	2	2,67	2,27
Ascomycota	<i>Trichoderma</i> sp3	2	0,29	1	0,41	0	0,00	0,30
Mucoromycota	<i>Umbelopsis</i> sp1	0	0,00	2	0,81	0	0,00	0,20
<b>Total</b>		<b>692</b>		<b>246</b>		<b>75</b>		

Tabela 5. Índice de diversidade de Shannon ( $H'$ ) e de Simpson ( $D$ ) das comunidades de fungos isolados dos intestinos das larvas de *Phylloicus*, *Triplectides* e *Stenochironomus* (Insecta).

Índice	<i>Phylloicus</i>	<i>Triplectides</i>	<i>Stenochironomus</i>
Shannon	1,26	1,21	2,11
Simpson	0,50	0,48	0,81
Equitabilidade	0,40	0,44	0,74

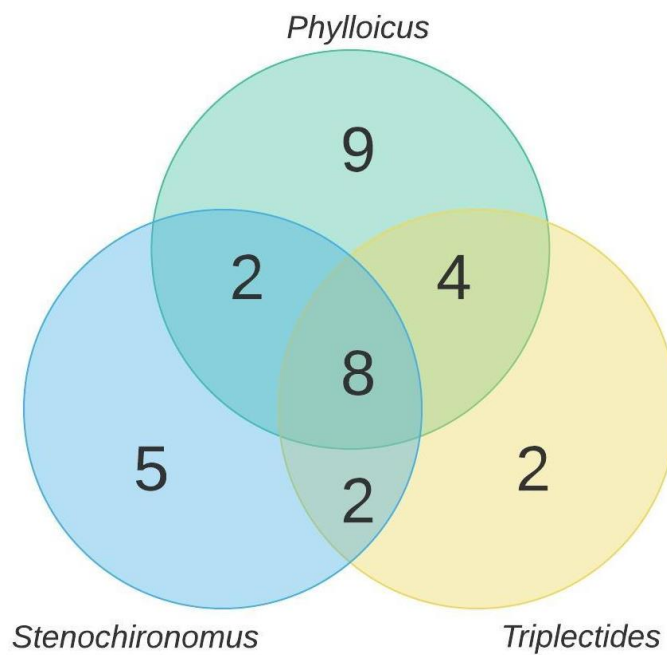


Figura 18. Diagrama de Venn com o número de táxons fúngicos compartilhados entre os três gêneros de insetos estudados.

## 5.2 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi verificada a presença de fungos filamentosos no intestino de larvas de *Phylloicus*, *Triplectides* e *Stenochironomus* coletadas em igarapés da Reserva Florestal Ducke em Manaus-AM. Os fungos identificados, em sua maioria pertencem ao filo Ascomycota, com exceção de *Umbelopsis* sp., cujo pertence ao filo Mucoromycota. Esta associação, também, foi encontrada em outros insetos como larvas de *Phylloicus* spp. coletadas em igarapés de Roraima, Pará e Tocantins, onde foi identificada uma diversa comunidade de fungos (33 táxons) (SANTOS et al., 2018); em larvas de *Nectophyche* (Leptoceridae) e *Triplectidae* (Leptoceridae), coletadas em igarapés de Tocantins e Espírito Santo, foram identificados 18 táxons todos pertencentes ao filo Ascomycota (SILVA, 2019). Do intestino de larvas de insetos terrestres, como os Lepidoptera, também, foram isolados fungos pertencentes ao filo Ascomycota (*Pestalotiopsis* sp. e *Penicillium* sp.) (SHAN et al., 2019), porém neste mesmo estudo fungos do filo Basidiomycota, também, foram isolados. A presença de fungos Ascomycota verificada no intestino de larvas de insetos aquáticos fragmentadores pode ser ocasionada devido sua dieta ser composta por folhas alóctones condicionadas. A comunidade fúngica de folhas submersas em água contém fungos foliares originários do ambiente terrestre, sendo a maioria desses fungos membros do filo Ascomycota (KOIVUSAARI et al., 2019; WOLFE et al., 2019). Este filo é considerado um decompositor primário e o mais abundante nos estágios iniciais da decomposição foliar (VOŘÍŠKOVÁ; BALDRIAN, 2013; ZHANG et al., 2017).

Fungos filamentosos associados ao intestino de larvas de insetos aquáticos fragmentadores tem sido investigados, principalmente, quanto às suas funções nesses organismos. Sabe-se que estes insetos se alimentam de matéria orgânica alóctone, principalmente folhas em decomposição de plantas vasculares vindas da vegetação ripária circundante (BÄRLOCHER; SRIDHARE, 2014), especialmente as que têm menor concentração de compostos secundários (NAVARRO et al., 2013; REZENDE et al., 2014; NAVARRO; GONÇALVES JR., 2017). Esta menor concentração de compostos nas folhas em decomposição se dá pelo condicionamento microbiano, que auxilia positivamente o consumo desse recurso pelos insetos (BIASI et al., 2019), pois o crescimento de fungos nas folhas em decomposição aumenta o seu conteúdo de proteínas, o que presumivelmente aumenta o valor nutricional das folhas (KAUSHIK; HYNES, 1968) e sua palatabilidade devido à decomposição por ação enzimática de compostos recalcitrantes (FINDLAY, 2010).

Nestes resultados, a equitabilidade nas amostras de fungos de *Stenochironomus* é maior do que nas amostras de *Phylloicus* e *Triplectides*. Os índices de diversidade analisam riqueza e equitabilidade, dessa forma, mede a homogeneidade na distribuição das abundâncias entre as espécies, ou seja, espécies que estão representadas em quantidades semelhantes (MAGNUSSON; MOURÃO; COSTA, 2015). No caso de *Stenochironomus* não houve a presença da maioria das morfoespécies de fungos identificadas fazendo com que amostra ficasse homogênea. Os valores do índice de Shannon obtidos para *Phylloicus* foram bem semelhantes com os obtidos no estudo de Santos et al., 2018a.

*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* são comumente encontrados na natureza e estes gêneros já foram isolados do intestino de besouros, percevejos, formigas, baratas (GAMA et al., 2002; MOREIRA et al., 2003; MORAES et al., 2004; LEMOS et al., 2006; NUNES e FRIZZAS, 2007; ROJAS-JIMÉNEZ E HERNÁNDEZ, 2015, XIAO et al., 2019) e insetos aquáticos, larvas de Simuliidae e Culicidae em estudos realizados na Amazônia (FONSECA et al., 2008; PEREIRA et al., 2009). Estes mesmos gêneros fúngicos, juntamente com *Cladosporium*, *Talaromyces*, *Pestalotiopsis* e *Umbelopsis*, recentemente foram isolados do intestino de larvas de *Phylloicus* e *Triplectides* (SANTOS, 2018; SILVA, 2019) na Amazônia e no Cerrado. Neste estudo, a ocorrência de *Gliocephalotrichum* sp. em intestino de insetos aquáticos é observada pela primeira vez, geralmente, as espécies desse gênero são isoladas do solo e de material em decomposição (LOMBARD et al., 2014).

A maioria dos táxons fúngicos identificados é compartilhada entre os três gêneros de insetos estudados (Figura 18). Por serem insetos de hábito fragmentador, alimentando-se de folhas alóctones condicionadas (CUMMINS; MERRITT; ANDRADE, 2005), a ingestão de fungos endofíticos e epifíticos disponíveis no recurso alimentar pode ocorrer e estes serem compartilhados facilmente. No entanto, diversos fatores podem ter influenciado a diferença na abundância e diversidade de táxons fúngicos identificados nos gêneros de insetos. O crescimento fúngico em folhas pode ser inibido devido a lixiviação de polifenóis (SUBERKROPP; GODSHALK; KLUG, 1976) ou estimulado por meio da lixiviação de nutrientes (JENSEN, 1974), características físicas e químicas do detrito podem influenciar diretamente a taxa de decomposição (ALVIN et al., 2015; GOMES, 2015), composição da vegetação ripária (KOMINOSKI et al., 2011; FERREIRA et al., 2016) e a qualidade intrínseca das folhas, influenciando o consumo do recurso (MARTINS et al., 2020).

Estudos sobre a interação entre fungos e insetos podem contribuir com o conhecimento sobre a diversidade fúngica, onde o intestino de insetos aquáticos podem ser fonte de novas espécies de fungos, além da compreensão dos mecanismo no sistema fungo-inseto.

### **5.3 CONCLUSÃO**

O intestino de insetos aquáticos fragmentadores pode abrigar uma elevada população de fungos filamentosos, a qual, nesse estudo obteve-se uma riqueza de 28 morfoespécies identificadas. A comunidade de fungos dos intestinos das larvas estudadas se mostrou bem similar havendo compartilhamento de morfoespécies entre os gêneros de insetos.

Os fungos isolados e identificados podem ser encontrados no ambiente terrestre, sugerindo que sejam provenientes das folhas em decomposição que entram no ambiente aquático, as quais são ingeridas pelas larvas.

## CAPÍTULO 2

### FUNGOS CELULOLÍTICOS CULTIVÁVEIS ISOLADOS DO INTESTINO DE INSETOS AQUÁTICOS DA AMAZÔNIA<sup>1</sup>

#### Resumo

Os fungos filamentosos têm sido alvo de estudos de bioprospecção, pois são excelentes produtores de enzimas extracelulares que podem ser potencialmente utilizadas pela bioindústria. Neste estudo, foram isolados fungos filamentosos do intestino de larvas de insetos aquáticos da Amazônia para avaliar sua atividade celulolítica. Foram coletadas 69 larvas de insetos fragmentadores de três gêneros distintos: *Phylloicus* Müller (Trichoptera: Calamoceratidae), *Triplectides* Kolenati (Trichoptera: Leptoceridae) e *Stenochironomus* Kieffer (Diptera: Chironomidae) em dez riachos de uma área protegida na Amazônia. A produção de micélio foi feita em meio BDA (Ágar Batata Dextrose). Os isolados foram transferidos para meio sintético com carboximetil celulose e o vermelho do Congo foi utilizado para determinar o índice enzimático. O halo de hidrólise, indicando a produção de celulases, foi observado em 175 isolados fúngicos (70% do total), dos quais 25 tinham índice enzimático  $\geq 2,0$  e pertenciam a sete gêneros de fungos. Os táxons fúngicos, tradicionalmente utilizados em aplicações biotecnológicas, *Cladosporium* Link, *Gliocephalotrichum* Ellis e Hesseltine, *Penicillium* Link, *Pestalotiopsis* Steyaert, *Talaromyces* Benjamin, *Trichoderma* Persoon e *Umbelopsis* Amos e Barnett foram isolados dos intestinos de larvas de *Phylloicus*, *Triplectides* e *Stenochironomus*. Nossos resultados indicam o potencial celulolítico de fungos associados aos intestinos de insetos aquáticos da Amazônia.

**Palavras-chave:** Celulase, hidrólise enzimática, *Phylloicus*, trituradores, Amazônia.

<sup>1</sup>Manuscrito aceito pela Revista Acta Amazonica. Neste capítulo utilizou-se as normas da própria revista.

## 6.1 INTRODUÇÃO

As celulasas produzidas por fungos são amplamente utilizadas na indústria e a demanda por microorganismos eficientes aumentou ao longo do tempo. Atualmente, as celulasas são empregadas na produção de alimentos, ração animal, etanol de segunda geração, sucos de frutas e vegetais, papel, vinho e têxteis, bem como na extração de celulose, processamento de amido, cervejarias, lavanderia e agricultura (Bhat 2000, Choi et al. 2015, Singh et al. 2016). As enzimas fúngicas são particularmente vantajosas quando comparadas as equivalentes de animais ou vegetais. Uma razão pela qual sua produção é menos onerosa seria que as enzimas são secretadas como complexos que funcionam em sinergia (Dashtban et al. 2009). Além disso, as enzimas fúngicas têm características físico-químicas diferentes (por exemplo, enzimas termoestáveis de organismos termofílicos) e são mais fáceis de produzir em larga escala (Dalmaso et al. 2015).

Muitos insetos que digerem madeira, folhagem e detritos (por exemplo, Isoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hymenoptera) (Martin 1983) usam a lignocelulose como sua principal fonte de alimento e são altamente eficientes na obtenção de glicose a partir da degradação da celulose (Sun e Zhou 2011). Naturalmente, insetos perfuradores de madeira têm sido objetos comuns de estudos visando a prospecção de enzimas lignocelulolíticas (Geib et al. 2010). Além disso, larvas de Diptera que minam folhas submersas (Koroiva 2013) e outras larvas de insetos fragmentadores (Rogers e Dora-Peterson 2010) foram consideradas como fontes potenciais de enzimas lignocelulolíticas para a indústria de biocombustíveis de segunda geração (Cook e Dora-Peterson 2010, Huang et al., 2010). Embora os insetos possam produzir celulasas endógenas (Watanabe e Tokuda 2010, Shelomi et al. 2014, Pothula et al. 2019), a hidrólise do polissacarídeo é realizada, principalmente, por enzimas extracelulares produzidas por microrganismos que colonizam o trato digestivo dos insetos, especialmente por fungos como *Aspergillus Micheli* ex Haller, *Fusarium* Link e *Penicillium* Link (Rojas-Jiménez e Hernández 2015).

Vários fungos filamentosos, como *Cladosporium* Link, *Penicillium* e *Trichoderma* Persoon, foram encontrados no intestino de Coleoptera e Diptera, *e.g.* Silvanidae (Coleoptera) (David et al. 1974), Tenebrionidae (Coleoptera) (Prabha et al., 2011) e espécies de Platypodidae (Coleoptera) (Henriques et al. 2009) e Culicidae (Diptera) (Fonseca et al. 2008, Pereira et al. 2009, Maketon et al. 2014). No entanto, a evolução e a dinâmica das comunidades de microrganismos e seus hospedeiros insetos ainda não são totalmente compreendidas (Bobay e Raymann 2019).

Em geral, os microrganismos participam dos processos digestivos de insetos com dieta deficiente nutricionalmente, como insetos que se alimentam de floema ou de moléculas complexas como a celulose (Watanabe e Tokuda 2010). Sua capacidade de degradar celulose, em particular, é alta e amplamente distribuída entre diferentes taxa. Por exemplo, microrganismos associados ao trato digestivo de várias espécies de cupins degradam a celulose e a lignina, fornecendo aos insetos glicose e ácidos graxos que serão usados como fonte de energia (Breznak, 2002). Em contraste, com a compreensão sobre bactérias associadas ao intestino de insetos, que foram amplamente documentadas (por exemplo, Schaaf e Dettner 1997, Lundgren e Lehman 2010, Vojvodic et al. 2013), pouco se sabe sobre as relações entre insetos e fungos associados (McCreadie 2011, Shao et al. 2015). Em ambientes de água doce, uma simbiose elaborada ocorre em insetos aquáticos fragmentadores. Esses insetos se alimentam de matéria orgânica alóctone (madeira em decomposição e folhas) somente após esta estar condicionada, ou seja, colonizada por microrganismos, os quais convertem esse tecido em alimento mais palatável por meio de enzimas extracelulares (Gessner et al. 1999, Abelho 2001, Gulis e Bärlocher 2017).

Na floresta Amazônica, onde a diversidade de insetos é uma das mais altas do mundo, ainda é incipiente o conhecimento sobre o sistema fungos-insetos e fungos produtores de celulase associados aos insetos aquáticos (Rios-Velasquez et al. 2002, Alencar et al. 2003,



Fonseca et al. 2008, Pereira et al. 2009, Santos et al. 2018a, Santos et al. 2018b). A investigação da microbiota intestinal de insetos aquáticos pode levar à descoberta de processos metabólicos e interações com potenciais aplicações biotecnológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade celulotítica de fungos filamentosos isolados do intestino de insetos aquáticos fragmentadores, esperando identificar novas enzimas celulolíticas em espécies pouco estudadas de insetos da Amazônia.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Coleta dos insetos**

Larvas de insetos aquáticos fragmentadores pertencentes aos gêneros *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae), *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) e *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) foram coletadas em dez igarapés localizados em duas bacias hidrográficas da Reserva Florestal Ducke, RFD, Amazonas (Brasil) (Figura 19). Os leitos dos igarapés são compostos por areia e folhas e estes são sombreados pela vegetação ripária (Mendonça et al. 2005). Os valores de pH variaram de 4,4 a 5,4, essa acidez é causada pelo alto teor de matéria orgânica e pelo solo arenoso da bacia de drenagem do rio Negro. A condutividade elétrica da água variou de 7 a 23  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , a velocidade da água de 0,04 a 0,17  $\text{cm s}^{-1}$ , a concentração de oxigênio dissolvido de 5,8 a 6,8  $\text{mg L}^{-1}$  e a temperatura da água de 24,8 a 26,8 °C.

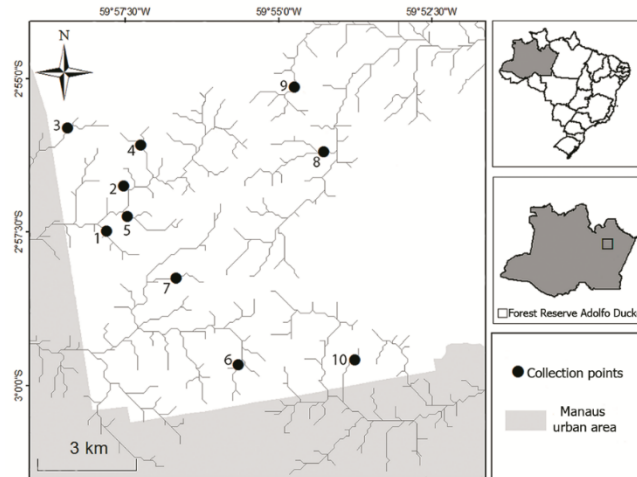


Figura 19. Mapa da Reserva Florestal Ducke, localizada em Manaus, Amazonas, Brasil, mostrando os locais dos igarapés onde foram amostradas as larvas de insetos aquáticos fragmentadores (locais 1 a 10).

As larvas de insetos foram coletadas com o auxílio de uma rede entomológica aquática e identificadas em nível de gênero no campo (Hamada et al. 2014). No total, capturamos 69 larvas: 24 de *Phylloicus* spp., 20 de *Triplectides* spp. e 25 de *Stenochironomus* spp. Cada larva foi removida de seu abrigo (folha ou graveto), esterilizada por 30 segundos em álcool a 70% e armazenada em um microtubo com água destilada estéril. As larvas foram processadas logo após a coleta para evitar a decomposição ou excreção do conteúdo de seus tratos digestivos.

### 6.2.2 Isolamento, purificação e caracterização morfológica de fungos filamentosos

As larvas foram dissecadas sob um microscópio estereoscópio usando pinças e tesouras esterilizadas. Os intestinos foram removidos e transferidos para microtubos contendo 1 mL de água destilada estéril. Após a homogeneização, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) suplementado com 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  de Cloranfenicol e incubadas à 27 °C por sete dias. Para purificação, os fungos filamentosos que não mostraram contaminação foram transferidos separadamente para novas placas de Petri contendo BDA. Após a obtenção de culturas fúngicas puras, a preservação foi realizada pelo método de Castellani (Castellani, 1939). Os isolados fúngicos foram identificados com base em características macromorfológicas, como cor, forma, tamanho e borda, entre outras características relevantes (Lacap et

al. 2003, Ibrahim et al. 2017). Para observar as características micromorfológicas, os isolados fúngicos foram microcultivados, corados com Lactofenol e examinados sob um microscópio óptico Leica Microsystems com uma câmera Leica DFC295 acoplada e o *software* Leica Application Suite (LAS, 4.2.0).

### 6.2.3 Atividade celulolítica

Os isolados fúngicos foram avaliados quanto à produção de celulases em meio carboximetil celulose (CMC) ( $\text{NaNO}_3$ :  $3,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ :  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4$ :  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{KCl}$ :  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; CMC:  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ; ágar:  $20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) (Ruegger e Tauk-Tornisielo 2004). As placas foram incubadas à  $27^\circ \text{C}$  por quatro dias e depois submetidas a choque térmico por 16 horas à  $50^\circ \text{C}$ . O halo de degradação foi observado utilizando 10 mL de solução vermelho do Congo ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) por 30 min e 5 mL de solução de  $\text{NaCl}$   $0,5 \text{ M}$  em tampão Tris-HCl  $0,1 \text{ M}$ , pH 8,0 (Nogueira e Cavalcante 1996). Estes ensaios foram realizados em triplicada. Calculamos o índice enzimático (IE) de todos os isolados que produziram um halo de degradação. O IE foi calculado como a razão entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro da colônia (Hankin e Anagnostakis, 1975). Os isolados fúngicos que apresentaram alta atividade enzimática, aqui definidos como  $\text{E.I.} \geq 2,0$  (Lealem e Gashe 1994), foram ainda identificados por análise molecular.

### 6.2.4 Análises moleculares

Os isolados fúngicos foram cultivados em caldo de batata natural por cinco dias em agitador rotativo (150 rpm) à  $27^\circ \text{C}$ . A extração do DNA foi realizada usando um kit de isolamento de DNA genômico de fungos/leveduras (Norgen Biotek, ON, CAN), seguindo as instruções do fabricante. As regiões ITS1-5.8S-ITS2 do fungo foram amplificadas por PCR usando os iniciadores ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al. 1990). A amplificação foi realizada em uma

reação de 50 µL contendo 2 µL de DNA genômico, 0,3 µL de Taq DNA polimerase - Platinum® 5U / µL, 1,25 µL de tampão de reação (10 ×), 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 2,5 µL de MgCl (50 mM), 0,5 µL de cada *primer* (20 µM) e 15,95 µL de água Milli-Q estéril com a seguinte programação: 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 55 °C por 30 s; extensão a 72 °C por 40 s e extensão final a 72 °C por 5 min. Os *amplicons* foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v), purificados com kit de purificação de bandas de gel DNA GFX™ PCR (GE Healthcare, EUA) e sequenciados seguindo o protocolo BigDye® V3.1 em um sequenciador ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

### 6.2.5 Taxonomia

A sequência consenso de ambas as cadeias de DNA foi obtida usando o *software* Geneious® 9.0.5 (Kearse et al. 2012). O alinhamento das sequências consenso foi realizado com o banco de dados de genomas de fungos depositados no GenBank usando a Ferramenta de Busca Básica de Alinhamento Local (BLAST) (Altschul et al. 1990) do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). Além disso, o banco de dados UNITE também foi usado (Nilsson et al. 2018; <https://unite.ut.ee/>).

## 6.3 RESULTADOS

Das 69 larvas de insetos aquáticos coletadas, 46 apresentam crescimento de fungos nas placas com o conteúdo intestinal. Um total de 248 fungos foram isolados dos intestinos das larvas de *Phylloicus*, *Triplectides* e *Stenochironomus*. Entre esses isolados fúngicos, 175 produziram celulases: 84 dos intestinos das larvas de *Phylloicus*, 55 das larvas de *Triplectides* e 36 das larvas de *Stenochironomus* (Tabela 6). Dos 175 isolados avaliados para produção de celulase, 25 apresentaram índice enzimático  $\geq 2,0$ . Considerando todos os fungos isolados dos

intestinos de *Stenochironomus*, 22,4% apresentaram  $IE \geq 2,0$ . Em *Triplectides*, foram 8% e nas larvas de *Phylloicus*, 6,2% (Tabela 1).

Tabela 6. Número de isolados totais de fungos e número de isolados positivos para atividade celulolítica em cada gênero de inseto aquático fragmentador. A coluna do índice enzimático (IE) indica o número de isolados com valores de  $IE \geq 2,0$ .

Gêneros de insetos aquáticos	Número de insetos aquáticos com crescimento fúngico	Número de isolados fúngicos		
		Total	Positivo	$IE \geq 2,0$
<i>Phylloicus</i> spp.	19	112	84	7
<i>Triplectides</i> spp.	19	87	55	7
<i>Stenochironomus</i> spp.	8	49	36	11
Total	46	248	175	25

A maioria dos isolados fúngicos identificados foram Eurotiomycetes, dos quais 15 foram identificados como *Penicillium* (Eurotiales: Trichocomaceae), cujo IE variou de 2,0 a 4,0. Um desses isolados foi atribuído a *Talaromyces* (Eurotiales: Trichocomaceae), como pode ser visto na Tabela 7, o isolado A1TB1 foi identificado como *Penicillium* sp. baseado na morfologia, mas como *Talaromyces purpurogenus* (Stoll), com base na análise molecular. Outro grupo representativo foi Dothideomycetes, com seis isolados identificados como *Cladosporium* (Capnodiales: Davidiellaceae). O grupo dos Ascomycetes foi representado por um isolado do gênero *Pestalotiopsis* (Xylariales: Amphisphaeriaceae) e o Sordariomycetes foi representado por um isolado do gênero *Trichoderma* (Hypocreales: Hypocreaceae) (Tabela 7; Figura 20).

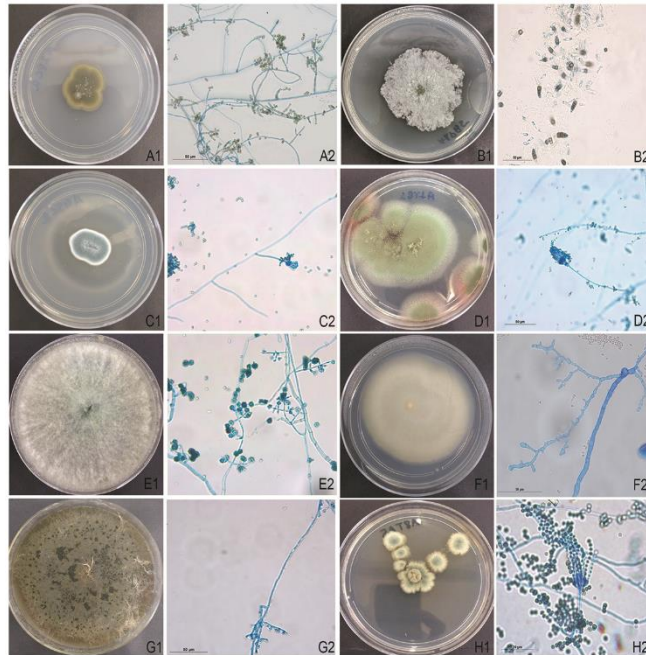


Figura 20. Vistas macro e microscópicas dos fungos filamentosos isolados dos intestinos de *Phylloicus* (Trichoptera), *Triplectides* (Trichoptera) e *Stenochironomus* (Diptera), plaqueados em meio BDA por sete dias à 27 °C. A1 / A2 - *Cladosporium* sp.; B1 / B2 - *Pestalotiopsis* sp.; C1 / C2 - *Penicillium citrinum*; D1 / D2 - *Talaromyces purpurogenus*; E1 / E2 - *Trichoderma harzianum*; F1 / F2 - *Umbelopsis* sp.; G1 / G2 - *Glioscephalotrichum* sp.; H1 / H2 - *Penicillium adametzii*.

A identificação taxonômica molecular confirmou a maioria de nossas identificações baseadas em morfologia (Tabela 7). Dois isolados foram identificados apenas em nível de gênero: *Glioscephalotrichum* (Hypocrales: Nectriaceae) e *Umbelopsis* (Mucorales: Umbelopsidaceae). Quatro isolados foram identificados em nível da espécie: *Trichoderma harzianum* Rifai, *Talaromyces purpurogenus*, *Penicillium adametzii* Zalesky e *P. citrinum* Thom.

Tabela 7. Fungos filamentosos celulolíticos isolados dos intestinos de *Phylloicus* (Trichoptera), *Triplectides* (Trichoptera) e *Stenochironomus* (Diptera) - insetos aquáticos fragmentadores, na região Amazônica, Brasil. A tabela mostra a identificação morfológica e molecular dos isolados com um índice enzimático  $\geq 2,0$  após o crescimento em meio sintético de carboximetil celulose. M = identificação morfológica; G = genotipagem molecular; IE = índice enzimático (índice médio  $\pm$  DP, n = 3); (\*) = porcentagem de similaridade entre as sequências deste estudo e aquelas disponíveis nos bancos de dados NCBI e UNITE.

Número da amostra	Inseto	Isolado fúngico	Gênero/especie	Tipo de identificação	IE	Identidade *	Número de acesso
1	<i>Phylloicus</i>	A1PA3	<i>Cladosporium</i> sp.	M	2.3 $\pm$ 0.3		
2	<i>Phylloicus</i>	A1PB5	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	G	3.1 $\pm$ 0.8	97%	KF887030.1
4	<i>Phylloicus</i>	A2PA4	<i>Penicillium</i> sp.	G	3.9 $\pm$ 0.2	99%	JQ889696.1
5	<i>Phylloicus</i>	A2PC2	<i>Cladosporium</i> sp.	G	2.8 $\pm$ 0.5	87%	MH655007.1
11	<i>Phylloicus</i>	A5PA3	<i>Gliocephalotrichum</i> sp.	G	2.9 $\pm$ 0.4	94%	MH397480.1
17	<i>Phylloicus</i>	A8PB5	<i>Penicillium</i> sp.	M	2.1 $\pm$ 0.2		
20	<i>Phylloicus</i>	A9PB4	<i>Trichoderma harzianum</i>	G	2.3 $\pm$ 0.1	100%	MN262498.1
2	<i>Triplectides</i>	A1TB1	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	G	3.0 $\pm$ 0.0	99%	MK108916.1
2	<i>Triplectides</i>	A1TB3	<i>Penicillium</i> sp.	G	2.0 $\pm$ 0.4	97%	MK775828.1
8	<i>Triplectides</i>	A4TA1	<i>Penicillium</i> sp.	M	2.8 $\pm$ 0.3		
8	<i>Triplectides</i>	A4TA3	<i>Umbelopsis</i> sp.	G	3.7 $\pm$ 0.5	98%	MF101390.1
17	<i>Triplectides</i>	A8TA5	<i>P. adametzii</i>	G	4.0 $\pm$ 0.6	99%	JN714932.1
17	<i>Triplectides</i>	A8TA7	<i>Penicillium</i> sp.	G	3.9 $\pm$ 0.4	94%	KF848945.1
17	<i>Triplectides</i>	A8TA9	<i>Penicillium</i> sp.	G	2.5 $\pm$ 0.0	93%	MH268036.1
3	<i>Stenochironomus</i>	A1SC3	<i>Penicillium</i> sp.	G	2.5 $\pm$ 0.1	85%	KC181929.1
4	<i>Stenochironomus</i>	A2SA2	<i>Penicillium</i> sp.	M	2.1 $\pm$ 0.8		
4	<i>Stenochironomus</i>	A2SA4	<i>Penicillium</i> sp.	M	2.8 $\pm$ 0.8		
4	<i>Stenochironomus</i>	A2SA5	<i>Penicillium</i> sp.	M	2.2 $\pm$ 0.1		
5	<i>Stenochironomus</i>	A2SB2	<i>Cladosporium</i> sp.	M	2.0 $\pm$ 0.5		
5	<i>Stenochironomus</i>	A2SB3	<i>P. adametzii</i>	G	2.0 $\pm$ 0.3	99%	JN714932.1

7	<i>Stenochironomus</i>	A3SA1	<i>Cladosporium</i> sp.	M	3.1±0.5		
8	<i>Stenochironomus</i>	A4SA1	<i>Penicillium</i> sp.	G	2.3±0.1	97%	MN238763.1
10	<i>Stenochironomus</i>	A4SC2	<i>P. citrinum</i>	G	2.1±0.4	99%	KM278038.1
12	<i>Stenochironomus</i>	A5SB3	<i>Cladosporium</i> sp.	M	2.5±0.1		
13	<i>Stenochironomus</i>	A5SC1	<i>Cladosporium</i> sp.	M	2.9±0.4		

---



## 6.4 DISCUSSÃO

Encontrou-se uma interessante diversidade de fungos cultiváveis nos intestinos de larvas de insetos aquáticos que ainda não foram estudadas. No geral, descobrimos que as tripas das larvas de *Phylloicus*, *Triplectides* e *Stenochironomus* são colonizadas por fungos *Cladosporium*, *Gliocephalotrichum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e *Umbelopsis* que têm espécies tradicionalmente usadas em aplicações biotecnológicas.

Curiosamente, entre os isolados, os fungos do gênero *Penicillium* foram os produtores mais comuns e mais eficientes de celulase em meio sólido quando comparado com *Trichoderma*, que é o grupo fúngico mais bem estudado para a celulases, e esses fungos são decompositores muito poderosos da celulose cristalina (Galliano et al., 1988, Ahamed e Vermette 2008, Gusakov 2011). Existem estudos mostrando que as cepas de *Penicillium* podem ser tão boas quanto as cepas de *Trichoderma* na produção de celulases, com base em indicadores como nível de produção e desempenho hidrolítico da celulase por unidade de atividade ou por miligrama de proteína (Gusakov 2011, Syed et al. 2013, Carvalho et al., 2014). Recentemente, Santos et al. (2018b) investigaram os fungos filamentosos isolados dos intestinos de larvas de *Phylloicus* usando métodos clássicos e moleculares e encontraram 21 isolados pertencentes ao gênero *Penicillium*. Assim, este estudo corrobora com a existência de uma associação entre fungos filamentosos e larvas de insetos aquáticos.

Outros gêneros de fungos isolados durante este estudo têm atividade celulolítica conhecida. *Gliocephalotrichum*, por exemplo, é comumente considerado como um fungo saprófito (Lombard et al. 2014) e este é o primeiro registro de sua associação com intestino de larvas de insetos. *Umbelopsis*, que produziu celulases em meio sólido com carboximetil celulose, coloniza substratos ricos em carboidratos simples e foi encontrado associado a insetos Curculionidae (Silva et al. 2015). Sabe-se também que *Talaromyces* está associado a insetos como Cynipidae (Hymenoptera) (Seifert et al. 2004) e foi registrado no intestino médio de

*Aedes aegypti* (Diptera) (Angleró-Rodríguez et al. 2017). Algumas espécies de *Talaromyces* (*T. emersonii* CBS 814.70 e *T. cellulolyticus* Fujii) são capazes de produzir enzimas celulolíticas (Inoue et al. 2014). A espécie *T. purpurogenus*, que é importante na bioindústria devido à capacidade de produzir enzimas celulolíticas (Belancic et al. 1995), foi recentemente transferida para o gênero *Penicillium* (Samson et al. 2011). Recentemente, *Talaromyces* recebeu todas as espécies do subgênero *Penicillium Biverticillium* (Samson et al. 2011), uma vez que esses dois táxons formam um grupo monofilético (Yilmaz et al. 2014).

Os resultados deste estudo ampliam o conhecimento da diversidade e funções dos fungos associados ao intestino de insetos aquáticos, uma vez que poucos estudos semelhantes foram realizados com espécies da Amazônia (por exemplo, Santos et al. 2018b). Santos e colaboradores (2018b) identificaram fungos isolados do intestino de larvas de *Phylloicus* nos estados do Pará e Tocantins, Brasil, nos biomas Amazônia e Cerrado, respectivamente, sugerindo a ocorrência de diferentes comunidades de fungos associados nos ecossistemas. Embora existam estudos sobre fungos associados aos insetos, faltam estudos sobre o microbioma intestinal (*e.g.*, Fonseca et al. 2008, Pereira et al. 2009). Além disso, estudos sobre a microbiota intestinal de insetos aquáticos na Amazônia foram concentrados na classe Trichomycetes (*e.g.*, Rios-Velásquez et al. 2002, Alencar et al. 2003).

Nossos resultados sugerem que a micobota intestinal isolada e avaliada aqui pode degradar efetivamente a celulose. A presença de fungos celulolíticos nos intestinos de insetos aquáticos fragmentadores pode ser explicada pela preferência por folhas condicionadas por microrganismos, que aumentam a palatabilidade das folhas através da decomposição de compostos estruturais, diminuindo a resistência das mesmas, tornando-as mais macias devido à degradação por enzimas fúngicas durante o condicionamento (Graça et al. 2001, Aßmann et al. 2011, Casotti et al. 2015, Biasi et al. 2017, Reis et al. 2018). No experimento de Graça et al. 2001, as folhas condicionadas foram preferidas pelos insetos em comparação às folhas não-

condicionadas. Na mesma linha de estudo, Reis et al. 2019 mostrou que altas concentrações de taninos em folhas não condicionadas são inibitórias e não são consumidas pelas larvas de insetos. Gonçalves-Júnior et al. (2017) compararam as características de cinco folhas comuns encontradas em riachos localizados na Reserva Florestal Ducke em Manaus, Amazonas e observaram que os insetos analisados, assim como os fragmentadores em geral, eram mais frequentes nas folhas de *Mabea speciosa* Müll. Arg (Euphorbiaceae). As folhas desta espécie vegetal apresentaram maior teor de polifenóis e menor quantidade de celulose do que as demais plantas do mesmo estudo, além de maior concentração de biomassa fúngica (Gonçalves-Júnior et al. 2017). Assim, podemos inferir que esses insetos aquáticos fragmentadores estão se alimentando de folhas condicionadas por fungos que iniciam o processo de decomposição por meio de enzimas extracelulares, facilitando a digestão pelas larvas (Graça et al. 2001, Aßmann et al. 2011, Casotti et al. 2015, Botti et al. 2017, Reis e outros 2018).

## 6.5 CONCLUSÃO

Este estudo contribui para o conhecimento da microbiota associada aos intestinos de larvas de insetos aquáticos, no entanto, permanece indescritível até que ponto a microbiota fúngica influencia a vida de seu hospedeiro. No geral, esperamos que pesquisas futuras sobre a microbiota de insetos aquáticos fragmentadores contribuam para o nosso entendimento das interações fungos-hospedeiro. A presença de fungos celulolíticos nos intestinos de insetos aquáticos reforça o potencial biotecnológico para a prospecção de enzimas celulolíticas. Este estudo, também, traz novas informações sobre as identidades e características funcionais dos fungos simbióticos de insetos aquáticos na Amazônia que ainda não foram estudados. À medida que os dados disponíveis sobre os simbiotes aumentam, aumenta também o entendimento das relações ecológicas entre esses fungos e seus hospedeiros. Mais pesquisas são essenciais para

entender melhor os processos que ocorrem no sistema fungo-inseto, além do potencial biotecnológico desses processos.

## 6.6 REFERÊNCIAS

- Abelho, M. 2001. From litterfall to breakdown in streams: a review. *The Scientific World Journal*, 1: 656-680.
- Ahamed, A.; P. Vermette. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40: 399-407.
- Alencar, Y.B.; Rios-Velásquez C.M.; Lichtwardt R.W.; Hamada N. 2003. Trichomycetes (Zygomycota) in the digestive tract of arthropods in Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 799–810.
- Altschul, S.F.; Gish W.; Miller W.; Myers E.W. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403–410.
- Angleró-Rodríguez, Y.I., Talyuli O.A.C.; Blumberg B.J.; Kang S; Demby C.; Shields A.; Carlson J.; Jupatanakul N.; Dimopoulos G. 2017. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. *eLife*. 6: 1–20.
- Aßmann, C.; Rinke K.; Nechwatal J.; Elert E. V. 2011. Consequences of the colonisation of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. *Freshwater biology*, 56: 839-852.
- Belancic, A.; Scarpa J.; Peirano A.; Diaz R. 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: Purification and properties of two of the enzymes. *Journal of Biotechnology*, 41: 71–79.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 355–383.

- Biasi, C.; Graça M. A. S.; Santos S.; Ferreira V. 2017. Nutrient enrichment in water more than in leaves affects aquatic microbial litter processing. *Oecologia*, 184: 555-568.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 . . . 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98: 426–438.
- Bobay, L. M.; Raymann K.. 2019. Population Genetics of Host-Associated Microbiomes. *Current Molecular Biology Reports*, 5: 128-139.
- Breznak, J.A. 2002. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 13-18.
- Carvalho, M.L.A.; Carvalho, D.F.; Gomes, E.D.; Maeda, R.N.; Anna, L.M.M.S; Castro, A.M.; Pereira-Júnior, N. 2014. Optimization of cellulase production by *Penicillium funiculosum* in stirred tank bioreactor using multivariate response surface analysis. *Enzyme Research*, 2014: 1–8.
- Casotti, C. G.; Kiffer-Junior, W. P.; Costa, L. C.; Rangel, J. V.; Casagrande, L. C.; Moretti, M. S. 2015. Assessing the importance of riparian zones conservation for leaf decomposition in streams. *Natureza & Conservação*, 13: 178-182.
- Castellani, A. 1939. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 65-72.
- Choi, J. M.; Han, S. S.; Kim, H. S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future. *Biotechnology Advances*, 33: 1443–1454.
- Cook, D. M.; Doran-Peterson, J. 2010. Mining diversity of the natural biorefinery housed within *Tipula abdominalis* larvae for use in an industrial biorefinery for production of lignocellulosic ethanol. *Insect Science*, 17: 303–312.
- Dalmaso, G. Z.; Ferreira, D.; Vermelho, A. B. 2015. Marine extremophiles: A source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, 13: 1925-1965.

- Dashtban, M.; Schraft, H.; Qin, W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities and perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5: 578–595.
- David, M. H.; Mills, R. B.; Sauer, D. B. 1974. Development and oviposition of *Ahasverus advena* (Coleoptera: Silvanidae) on seven species of fungi. *Journal of Stored Products Research*, 10: 17–22.
- Fonseca, Q. R.; Sarquis, M. I. M.; Hamada, N.; Alencar Y. B. 2008. Occurrence of filamentous fungi in *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello (Diptera: Simuliidae) larvae in Central Amazonia, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 282–285.
- Galliano, H.; Gas, G.; Durand, H. 1988. Lignocellulose biodegradation and ligninase excretion by mutant strains of *Phanerochaete chrysosporium* hyperproducing cellulases. *Biotechnology Letters*, 10: 655–660.
- Geib, S.M.; Tien, M.; Hoover, K. 2010. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based peptide analysis of gut proteins from larval asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. *Insect Science*, 17: 253–264.
- Gessner, M. O.; Chauvet, E.; Dobson, M. 1999. A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos*, 85: 377 – 383.
- Gonçalves-Jr, J. F.; Couceiro, S. R. M.; Rezende, R. S.; Martins, R. T.; Ottoni-Boldrini, B. M. P.; Campos, C. M.; Silva, J. O.; Hamada, N. 2017. Factors controlling leaf litter breakdown in Amazonian streams. *Hydrobiologia*. 792: 195–207.
- Graça, M. A. S.; Cressa, C.; Gessner, M. O.; Feio, M. J.; Callies, K. A.; Barrios, C. 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater biology*. 46: 947-957.

- Gulis, V.; Bärlocher, F. 2017. Fungi: biomass, production, and community structure. In: F. R. Hauer; Lamberti, G. A. (Eds.). *Methods in stream ecology*. v. 1. Academic Press, San Diego, Califórnia, p.177-192.
- Gusakov, A.V.et al.(2007) Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose.*Biotechnol. Bioeng.*97, 1028–1038
- Gusakov, A. V. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29: 419–425.
- Hamada, N.; Nessimian, J. L.; Querino, R. B. 2014. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Editora INPA, Manaus, 2014, 274p.
- Hankin, L.; Anagnostakis S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*. 67: 597–607.
- Henriques, J.; Inacio, M. L.; Sousa, E. 2009. Fungi associated to *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae) in cork oak. *Revista Ciências Agrárias*, 32: 55–56.
- Huang, S. W.; Zhang, H. Y.; Marshall, S.; Jackson, T. A. 2010. The scarab gut: A potential bioreactor for bio-fuel production. *Insect Science*, 17: 175–183.
- Ibrahim, M.; Sieber, T. N.; Schlegel, M. 2017. Communities of fungal endophytes in leaves of *Fraxinus ornus* are highly diverse. *Fungal Ecology*, 29: 10-19.
- Inoue, H., Decker, S. R.; Taylor, L. E.; Yano, S.; Sawayama, S. 2014. Identification and characterization of core cellulolytic enzymes from *Talaromyces cellulolyticus* (formerly *Acremonium cellulolyticus*) critical for hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels*, 7: 1-13.
- Kearse, M., Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S. *et al.* 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647–1649.

- Koroiva, R.; Souza, C. W. O.; Toyama, D.; Henrique-Silva, F.; Fonseca-Gessner A. A. 2013. Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Genetics and Molecular Research*, 12: 3421–3434.
- Lacap, D. C.; Hyde, K. D.; Liew, E. C. Y. 2003. An evaluation of the fungal ‘morphotype’ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12: 53–66.
- Lealem, F.; gashe, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, p. 348-352, 1994.
- Lombard, L.; Serrato-Diaz, L. M.; Cheewangkoon, R.; French-Monar, R. D.; Decock, C.; Crous, P. W. 2014. Phylogeny and taxonomy of the genera *Gliocephalotrichum*. *Persoonia*, 32: 127–140.
- Lundgren, J.G.; Lehman, R.M. 2010. Bacterial gut symbionts contribute to seed digestion in an omnivorous beetle. *PLoS ONE* 5: e10831.
- Shelomi, M.; Watanabe, H.; Arakawa, G. 2014. Endogenous cellulase enzymes in the stick insect (Phasmatodea) gut. *Journal of Insect Physiology*, 60: 25-30.
- Maketon, M.; Amnuaykanjanasin, A.; Kaysorngup, A. 2014. A rapid knockdown effect of *Penicillium citrinum* for control of the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 727–736.
- Martin, M. M. 1983. Cellulose digestion in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 75A: 313–324.
- McCreadie, J. W.; Adler, P. H.; Beard, C. E. 2011. Ecology of symbiotes of larval black flies (Diptera: Simuliidae): distribution, diversity, and scale. *Environmental Entomology*, 40: 289–302.
- Mendonça, F. P.; Magnusson, W. E.; Zuanon, J. 2005. Relationships between habitat characteristics and fish assemblages in small streams of Central Amazonia. *Copeia*. 4: 751–764.



- Nilsson, R. H.; Larsson, K. H.; Taylor, A. F. S.; Bengtsson-Palme, J.; Jeppesen, T. S.; Schigel D. *et al.* 2018. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 1–6: 178-182.
- Nogueira, E. B. S.; Cavalcanti M. A. Q. 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia*. 27: 7–9.
- Pereira, E. D. S.; Sarqui,s M. I. M.; Ferreira-Keppler, R. L.; Hamada, N.; Alencar Y. B. 2009. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in municipalities of the Brazilian Amazon. *Neotropical Entomology*, 38: 352–359.
- Pothula, R.; Shirley, D.; Perera, O. P.; Klingeman, W. E.; Oppert, C.; Abdelgaffar, H. M. Y.; Johnson, B. R.; Jurat-Fuentes, J. L. 2019. The digestive system in *Zygentoma* as an insect model for high cellulase activity. *PLoS ONE*. 14:1-16.
- Reis, D. F.; Machado, M. M. D.; Coutinho, N. P.; Rangel, J. V.; Morettican, M. S; Morais, P. B. 2018. Feeding preference of the shredder *Phylloicus* sp. for plant leaves of *Chrysophyllum oliviforme* or *Miconia chartacea* after conditioning in streams from different biomes. *Brazilian Journal of Biology*, 79: 22 -28.
- Rios-Velásquez, C.M.; Hamada, N. 2002. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with the digestive tract of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello and *Simulium ulysseesi* (Py-Daniel & Coscarón) (Diptera: Simuliidae) larvae, in Central Amazônia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 423–426.
- Rogers, T.E.; Doran-Peterson, J. 2010. Analysis of cellulolytic and hemicellulolytic enzyme activity within the *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae) larval gut and characterization of *Crocebacterium ilecola* gen. nov. sp. nov., isolated from the *Tipula abdominalis* larval hindgut. *Insect Science*, 17: 291–302.

- Rojas-Jimenez, K.; Hernandez M. 2015. Isolation of fungi and bacteria associated with the guts of tropical wood-feeding Coleoptera and determination of their lignocellulolytic activities. *International Journal of Medical Microbiology*, 2015: 285018.
- Ruegger, M. J. S.; Tauk-Tornisielo S. M. 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 27: 205–211.
- Samson, R. A.; Yilmaz, N.; Houbraeken, J.; Spierenburg, H.; Seifert, K. A.; Peterson, S. W.; Varga, J.; Frisvad, J. C. 2011. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70: 159– 184.
- Santos, T. T.; Oliveira, D. P.; Cabette, H. S. R.; Morais, P. B. 2018a. The digestive tract of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) harbours different yeast taxa in Cerrado streams, Brazil. *Symbiosis*. 77: 147 – 160.
- Santos, T. T.; Oliveira, K. A.; Vital, M. J. S.; Couceiro, S. R. M.; Morais, P. B. 2018b. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, 13: 317-325.
- Schaaf, O.; Dettner, K.. 1997. Microbial diversity of aerobic heterotrophic bacteria inside the foregut of two tyrophilous water beetle species (Coleoptera: Dytiscidae). *Microbiological Research*, 152: 57–64.
- Seifert, K.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Louis-Seize, G. 2004. *Penicillium cecidicola*, a new species on cynipid insect galls on *Quercus pacifica* in the western United States. *Studies in Mycology*, 50: 517–523.
- Silva, X.; Terhonena, E.; Suna, H.; Kasanenab, R.; Heliövaaraa, K.; Jalkanenc, R.; Asiegbua, F. O. 2015. Comparative analyses of fungal biota carried by the pine shoot beetle (*Tomicus piniperda* L.) in Northern and Southern Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 30: 497–506.

- Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P. K. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotechnology Journal*, 6: 1-15.
- Shao, M.W.; Lu, Y.H.; Miao, S.; Zhang, Y.; Chen, T-T, Zhang Y-L, 2015. Diversity, bacterial symbionts and antibacterial potential of gut-associated fungi isolated from the *Pantala flavescens* larvae in China. *PloS One*, 10: e0134542.
- Souza, R. F. Análise de expressão diferencial em transcriptomas. Curso de introdução à bioinformática aplicada a genômica. Disponível em: [http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01\\_curso\\_transcriptoma.pdf](http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01_curso_transcriptoma.pdf). Acesso em: 20 jan. de 2019.
- Sun, J. Z.; Zhou, X. G. 2011. Utilization of lignocelluloses feeding insects for viable biofuels: an emerging and promising area of entomological science. In: T. Liu; Kang, L. (Eds.). *Recent Advances in Entomological Research: From Molecular Biology to Pest Management*. Springer, Heidelberg and Berlin, p. 251–291.
- Syed, S.; Riyaz-Ul-Hassan, S.; Johri, S. 2013. A novel cellulase from endophtye, *Penicillium* sp. NFCC 286. *American Journal of Microbiological Research*, 1: 84-91.
- Vojvodic, S.; Rehan, S. M.; Anderson, K. E. 2013. Microbial Gut diversity of africanized and european honey bee larval instars. *PLoS One*. 8: e72106.
- Watanabe, H.; Tokuda G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 609–632.
- White, T. J., Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White T. J. (Eds.). *PCR Protocols*. Academic Press, London, p. 315-322.
- Yilmaz, N.; Visagie, C. M.; Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Samson, R. A. 2014. Polyphasic taxonomy of the genera *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 78: 175–341.

### CAPÍTULO 3

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Penicillium* sp. A2PA4 ISOLADO DO INTESTINO DE LARVAS DE INSETOS AQUÁTICOS FRAGMENTADORES

### 7.1 RESULTADOS

As duas cepas de fungos utilizadas nos experimentos, *Penicillium* sp. A2PA4, (isolado do intestino de *Phylloicus*) e a cepa comercial *Trichoderma reesei* QM941 (controle), produziram enzimas celulolíticas ao longo das 240 h de fermentação (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade celulolítica de *Penicillium* sp. A2PA4 e *Trichoderma reesei* QM941 (controle) durante os períodos de fermentação submersa com maior atividade enzimática.

Atividade enzimática	<i>Penicillium</i> sp. A2PA4		<i>Trichoderma reesei</i> QM941	
	Tempo de fermentação	U/mL	Tempo de fermentação	U/mL
Fpase	168 h	0,054±0,0	192 h	0,135±0,0
CMCase	240 h	0,647±0,0	168 h	2,132±0,1
β-glucosidase	240 h	1,846±0,1	192 h	0,644±0,1

Para *Trichoderma reesei* QM9414 os tempos com maiores valores de atividade enzimática (FPase) foram 192 h (0,135 U/mL) e 240 h (0,119 U/mL) e para *Penicillium* sp. A2PA4 houve dois momentos de discreta elevação de produção enzimática em 48 h (0,053 U/mL) e 168 h (0,054 U/mL). A produção de enzimas celulolíticas (atividade de FPase) pelo *Penicillium* sp. A2PA4 foi mais baixa, quando comparada com *T. reesei* QM9414, com pouca variação ao longo do tempo de fermentação (Figura 21), havendo diferença significativa ao longo de todo o período de fermentação ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0,01$ ;  $gl=2$ ). Quanto a atividade enzimática de Endoglucanase (CMCase) de *Penicillium* sp. A2PA4 foi observado um aumento ao longo do tempo de incubação do isolado, a maior atividade ocorreu em 240 h de fermentação com uma produção de 0,647 U/mL (Figura 21). No geral, a produção de endoglucanase por este isolado não foi alta quando comparada com *T. reesei* QM9414 ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0,002$ ;  $gl=2$ ), nesse último, o pico de produção ocorreu em 72 h (1,864 U/mL) e a produção manteve-se elevada ao longo do período de incubação, chegando a 2,132 U/mL em 168 h, em seguida a produção de enzima reduziu levemente (Figura 22).

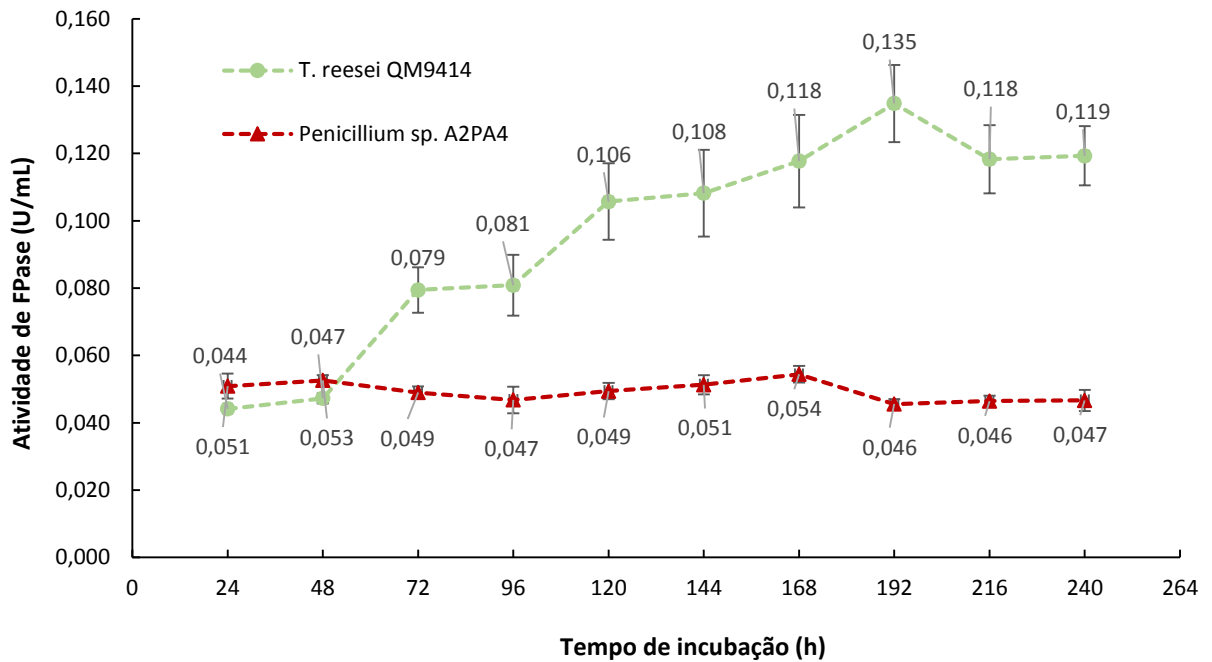


Figura 21. Perfil cinético da atividade em papel de filtro (FPase) em função do tempo, produzida por fermentação submersa em polpa de celulose até 240 h, 30 °C, 200 rpm. As amostras foram coletadas regularmente em intervalos de 24 h.

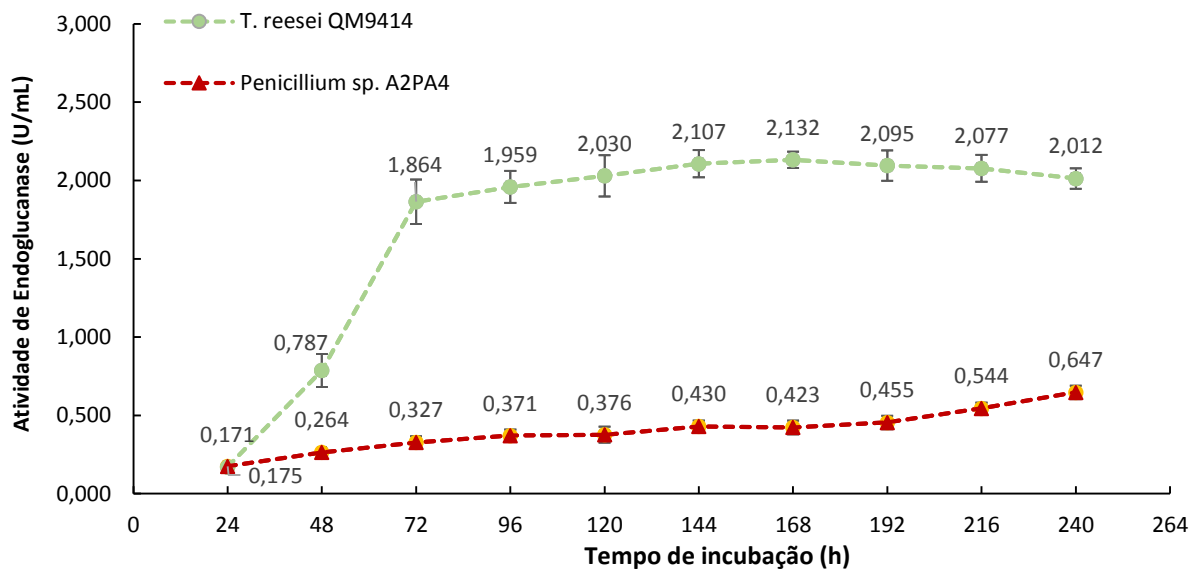


Figura 22. Perfil cinético da atividade endoglucanásica (CMCase) em função do tempo, produzida por fermentação submersa em polpa de celulose até 240 h, 30 °C, 200 rpm. As amostras foram coletadas regularmente em intervalos de 24 h.

Na atividade de  $\beta$ -glucosidase, *Penicillium* sp. A2PA4 apresentou maior produção de enzimas quando comparado com o *T. reesei* QM9414 ( $\alpha=0,05$ ;  $p= 0,006$ ;  $gl= 2$ ). Foi observado um aumento crescente na produção de  $\beta$ -glucosidase ao longo do período de incubação com a maior taxa de produção (1,846 U/mL) em 240 h. A produção de  $\beta$ -glucosidase em *T. reesei* QM9414 foi mais baixa do que em *Penicillium* sp. A2PA4 e com oscilações ao longo do período de incubação. Houve um aumento da produção nas primeiras 24 h (0,219 U/mL) e em seguida essa produção diminuiu, voltando a se elevar em 192 h (0,644 U/mL) e, novamente, diminuiu em 216 h (Figura 23).

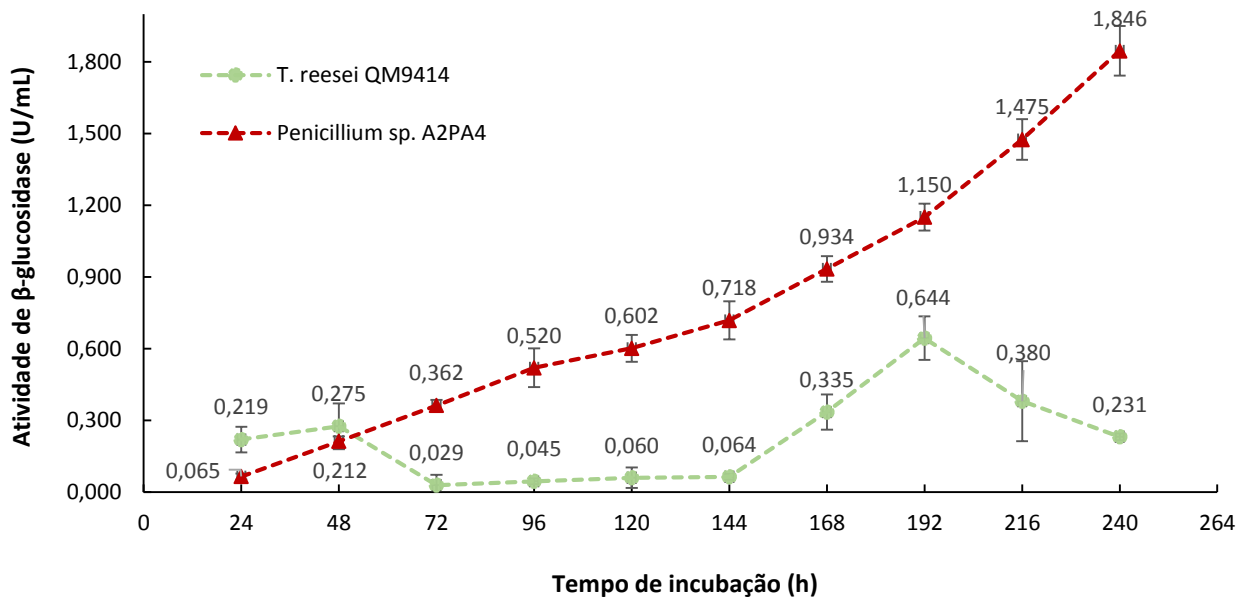


Figura 23. Perfil cinético da atividade de  $\beta$ -glucosidase em função do tempo, produzida por fermentação submersa em polpa de celulose até 240 h, 30 °C, 200 rpm. As amostras foram coletadas regularmente em intervalos de 24 h.

## 7.2 DISCUSSÃO

Fungos filamentosos se destacam por ter um grande potencial para o desenvolvimento industrial e tecnológico de celulases. A busca por fungos que demonstrem excelentes resultados na produção enzimática vem ocorrendo por décadas. Sabe-se que as cepas pertencentes ao gênero *Trichoderma* são as mais produtivas por serem potentes degradadoras da celulose cristalina (MARGEOT et al., 2009; GUSAKOV, 2011). No entanto, a busca por alternativas às enzimas produzidas por espécies desse gênero pode trazer novas cepas mais eficientes na degradação da celulose, pois muitas outras cepas de fungos vem demonstrando seu potencial para produção de enzimas celulolíticas (IKEDA et al., 2007, MARTINS et al., 2008, EL-NAGGAR et al., 2015; PAULA et al., 2019).

*Penicillium* tem sido estudado por sua alta capacidade de produzir enzimas extracelulares com bom desempenho na hidrólise de lignocelulose (CHEN et al., 2010; ZAMPIERI et al., 2013; SYAFRIANA et al., 2014) em comparação com outras espécies fúngicas (CHEN et al., 2010), pois tem fácil recuperação e estabilidade (BAI et al., 2013). Adicionalmente, estudos têm documentado um melhor desempenho na síntese de certas celulases quando comparado com enzimas de *Trichoderma* (BERLIM et al., 2005; GUSAKOV et al., 2007; MARTINS et al., 2008; CASTRO et al., 2010).

*Penicillium* sp. A2PA4 mostrou habilidade metabólica para a produção de CMCase, porém quando comparada com a cepa comercial de *T. reesei* QM9414 a produção não foi elevada, mas é possível perceber que a produção da enzima se mantém ao longo da fermentação. Isso demonstra que a produção de glicose ocorre, mas que não houve necessidade de uma grande produção de enzimas para a degradação do substrato. Este resultado é semelhante com as atividades de endoglucanase (CMCase) de *Penicillium citrinum* realizadas por Santa-Rosa (2018), que obtiveram um valor de 0,604 U/mL. O desempenho de espécies de *Penicillium* na produção de celulases em comparação com enzimas de *Trichoderma* tem sido bem documentado (GUSAKOV et al., 2007; SINGH et al., 2009; CHEKUSHINA et al., 2013), ainda assim sua maior vantagem é na produção de  $\beta$ -glucosidase (GUSAKOV, 2011).

*Penicillium* sp. A2PA4 demonstrou maior produção de  $\beta$ -glucosidase quando comparado com a cepa *T. reesei* QM9414. Uma das razões para um melhor desempenho de *Penicillium* sp. pode ser uma atividade específica mais alta de enzimas-chave na biodegradação de celulose e, em particular, a de celobiohidrolases (GUSAKOV et al., 2007; MORAZOVA et

al., 2010). Além de outras propriedades das celulases, como termoestabilidade, suscetibilidade à inibição do produto, adsorção à lignina ou inibição por compostos derivados da lignina (VOUTILAINEN et al., 2008; KROGH et al., 2009; LEE et al., 2010). No estudo de Santa-Rosa et al. (2018) com *Penicillium citrinum*, a produção de  $\beta$ -glucosidase foi maior a partir de 96 h com um pico máximo em 216 h (0,058 U/mL). Sendo esta produção  $\beta$ -glucosidase mais baixa do que a encontrada em *T. reesei* QM9414 (0,644 U/mL) e no *Penicillium* sp. A2PA4 (1,846 U/mL) no presente estudo. Espécies de *Trichoderma*, em particular, *T. reesei* recebem bastante atenção quanto a produção de enzimas celulolíticas, mas a atividade da  $\beta$ -glucosidase desta espécie é baixa de acordo com Peterson e Nevalainen (2012). Ainda neste ensaio, observou-se uma variação na produção de  $\beta$ -glucosidase pela cepa *T. reesei* QM9414, onde há dois picos de produção mais elevados, porém a produção não se mantém estável por muito tempo. Possivelmente, o nível de açúcares redutores no meio de cultivo estava elevado causando um efeito repressivo na síntese enzimática (BOTELLA et al., 2007) e a partir da diminuição do açúcar no meio a cepa retomou a produção de enzimas.

A  $\beta$ -glucosidase é indispensável para aumentar a produção de glicose em substratos celulósicos, já que esta enzima atua em oligossacarídeos e dímeros derivados da hidrólise inicial de celulases, liberando os monômeros de açúcares redutores (DAVIES; HENRISSAT, 1995). Diante disso, os resultados obtidos pelo *Penicillium* sp. A2PA4 demonstram que este fungo é um candidato promissor para a produção de  $\beta$ -glucosidase, a qual pode ser utilizada em conjunto com enzimas produzidas por outros fungos no intuito de melhorar o processo de degradação de substratos celulósicos na indústria. Ainda, podendo ser utilizada em expressão heteróloga, juntamente com outras celulases e hemicelulases, hidrolisando a biomassa ou agindo como enzimas acessórias.



### 7.3 CONCLUSÃO

A avaliação qualitativa da atividade celulolítica por meio do índice enzimático, cujos resultados estão descritos no capítulo 2, mostrou que a maioria dos fungos isolados do intestino das larvas de insetos aquáticos fragmentadores produziu enzimas que hidrolisam celulose. Dessa forma, este teste qualitativo tem uma boa resposta para seleção inicial de fungos produtores de enzimas celulolíticas. E, utilizando-se o critério do índice enzimático, pode-se selecionar isolados fúngicos com potencial produção de celulases.

A cepa *Penicillium* sp. A2PA4 mostrou-se capaz de produzir celulases por meio de fermentação submersa com produção de endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase em nível igual e/ou maior aos citados na literatura e aos utilizados industrialmente. Para verificar a viabilidade industrial de *Penicillium* sp. A2PA4 serão necessários testes pilotos para verificar a escalabilidade da produção enzimática, seu desempenho hidrolítico na degradação de substratos celulósicos, além de outros parâmetros, como produtividade da cepa, concentração de proteínas no final da fermentação seguidos de etapas de purificação, efeito do pH e temperatura.

Diante dos resultados, volta-se a atenção para um nicho da microbiologia ambiental pouco explorado, o intestino de larvas de insetos aquáticos. Esse substrato se apresenta doravante como um potencial para a busca de novos fungos produtores de enzimas celulolíticas.

## CAPÍTULO 4

### ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DO INTESTINO DE LARVAS DE *Phylloicus amazonas* PATHER, 2003

#### 8.1 RESULTADOS

##### 8.1.1 Sequências do transcriptoma

A biblioteca de cDNA gerou 63.484.572 *reads* (leituras) de sequenciamento bruto, com um comprimento médio de 75 pb. Os dados brutos foram filtrados para remoção das sequências de baixa qualidade resultando em 56.038.396 *reads* de alta qualidade. Com a montagem *De novo* obteve-se um resultado de 22.919 *contigs* (sequências), com um N50 de 765 pb e média de comprimento de 592 pb (Tabela 9).

Tabela 9. Visão geral do sequenciamento Illumina e estatísticas da montagem *De novo* do transcriptoma de *Phylloicus amazonas* (Trichoptera: Calamoceratidae).

<b>Sequenciamento</b>	<i>Reads</i> brutos (paired-end)	63,484,572
	<i>Reads</i> de alta qualidade	56,038,396
	GC (%)	48
<b>Montagem <i>De novo</i></b>	<i>Contigs</i> montados	22,919
	Média de comprimentos dos <i>contigs</i> (bp)	592
	N50	765

##### 8.1.2 Identificação dos transcritos e dados da anotação

Dos *contigs* analisados, 1.538 tiveram *hits* (similaridade) no BLASTx, enquanto 13.865 não mostraram *hits* com as sequências do banco de dados não-redundante. Dos mesmos *contigs* analisados, 5.182 apresentaram GO *hit* no mapeamento de termos funcionais, ou seja, 40% das sequências foram anotadas (Figura 24).

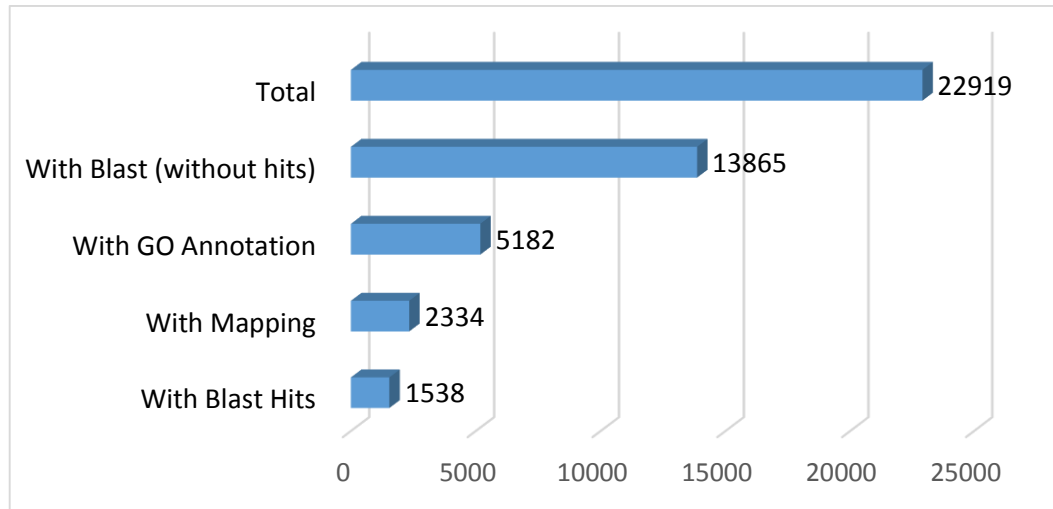


Figura 24. Resultado do BLAST e anotação executados no software Blast2GO.

Os *contigs* analisados apresentaram similaridade com diversas espécies de outros insetos ao longo do processo de anotação. As 10 espécies que mais tiveram suas sequências comparadas com as sequências de *P. amazonas* foram *Papilio xuthus* L., *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Papilio machaon* L., *Spodoptera litura* (Fabricius), *Bombyx mori* L., *Amyelois transitella* (Walker), *Bicyclus anynana* (Butler), *Plutella xylostella* (L.) e *Pieris rapae* L. (Figura 25). Todas essas sequências pertencem a ordem Lepidoptera com exceção de *Cryptotermes secundus* (Hill), a qual pertence a ordem Blattodea. As cinco espécies mais representativas numericamente foram *P. xuthus*, a qual obteve mais sequências comparadas com *P. amazonas* com 8.219 hits; *H. armigera* com 7.387 hits, *P. machaon* com 6.213 hits, *S. litura* com 5.976 hits e *B. mori* com 5.887 hits.

Ainda durante o processo de anotação, foi feita a distribuição das espécies com melhores *hits*, onde a análise leva em consideração apenas a distribuição das espécies com o melhor alinhamento, ou seja, menor E-value, dentre os possíveis resultados do BLAST. Da mesma forma, todos os primeiros cinco melhores hits foram comparados com sequências de Lepidoptera: *P. xylostella* (488 hits), *A. transitella* (471 hits), *S. litura* (426 hits), *B. mori* (421 hits) e *H. armigera* (376 hits).

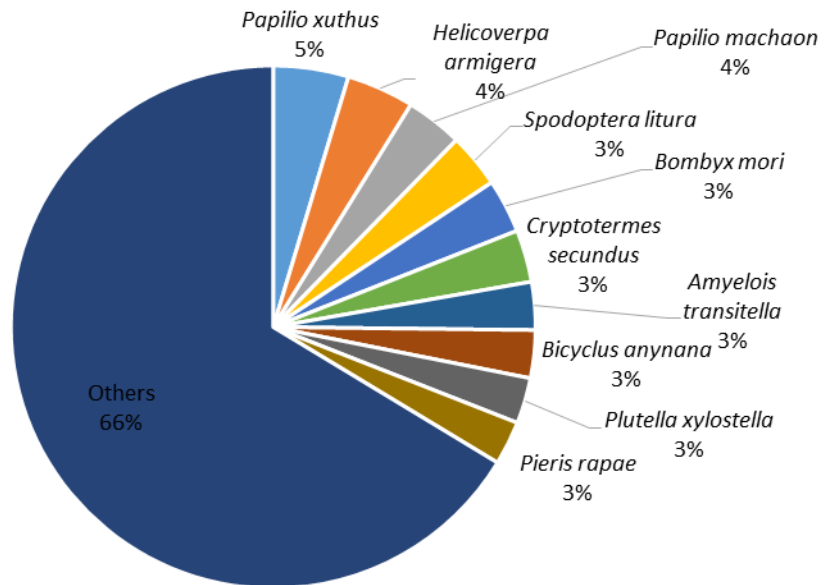


Figura 25. Distribuição das 10 espécies (Lepidoptera e Blattodea) que mais frequentemente apresentaram similaridade com as sequências *Phylloicus amazonas* (Trichoptera: Calamoceratidae).

### 8.1.3 Ontologia gênica

Utilizando a ferramenta computacional Gene Ontology (GO, NCBI) foi possível a inferir a quantidade de sequências relacionadas a cada categoria do banco de dados do GO. Esta análise resultou em transcritos com termos atribuídos a categorias de Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular com 6.890 (38,5%), 6.456 (36,1%) e 4.530 (25,3%), respectivamente (Figura 26).

Para o termo Função Molecular, os *contigs* envolvidos em atividade catalítica (2.654) e reação de *binding* (2.412) são os mais frequentes. Na categoria de atividade catalítica, os termos mais frequentes encontrados foram atividade de transferase (175), atividade de hidrolase (149), atividade de oxidoreductase (144), podendo estar envolvidas no processo de degradação da celulose. Para categoria reação de *binding* foram ligação de ATP (500), ligação de íon (287), ligação de ácido nucléico (193), estes termos estão demonstrados na Figura 27.

Para o termo Processo Biológico, processo de oxidação-redução (177) foi o mais encontrado, seguido pelo processo de tradução (102) e transporte transmembrana (93). A figura 27 traz outros termos associados a este domínio. No termo Componente Celular, os *contigs* envolvidos em componente integral da membrana (737), membrana (426) e núcleo (388) foram os mais abundantes.

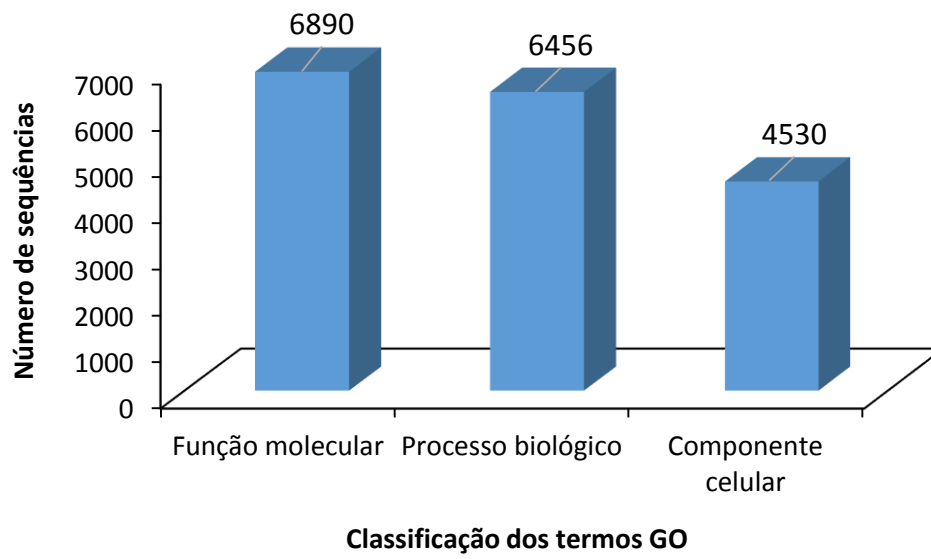


Figura 26. Classificação geral das seqüências obtidas na análise do transcriptoma de *Phylloicus amazonas* (Trichoptera: Calamoceratidae) de acordo com os termos da Gene Ontology (GO).

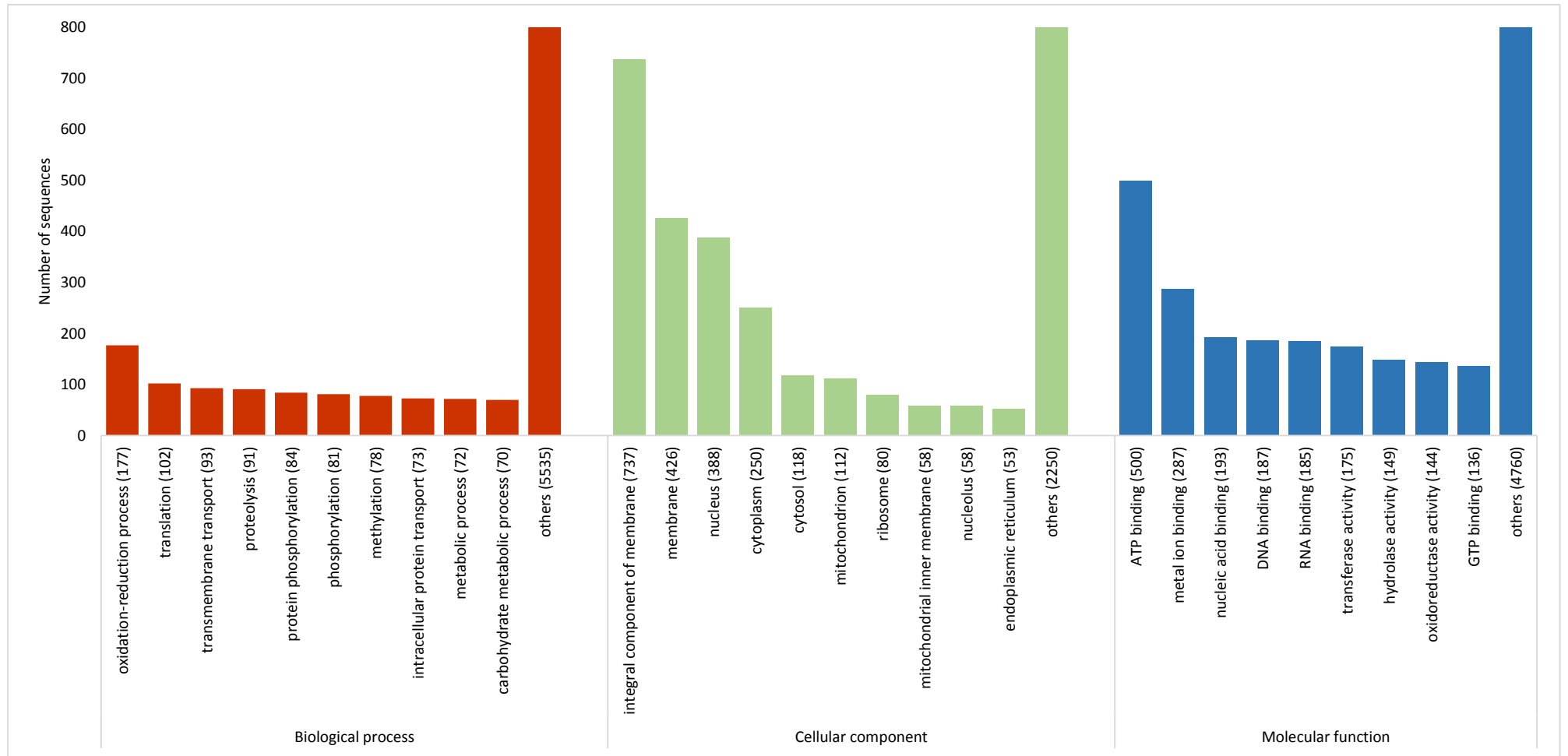


Figura 27. Distribuição dos transcritos anotados nos termos do Gene Ontology (GO).

### 8.1.4 Classificação enzimática

Um total de 1.386 sequências foram encontradas com predição de atividade enzimática. A classe de enzimas mais representada dentro das sequências de *P. amazonas* foi Hidrolase (E.C. 3) com 691 sequências seguida pelas Transferases (E.C. 2) com 347 sequências e Oxidoredutases (E.C. 1) com 183 sequências. Em menores números foram encontradas Ligases (69 sequências, E.C. 6), Isomerases (52 sequências, E.C. 5) e Liases (44 sequências, E.C. 4), respectivamente (Figura 28).

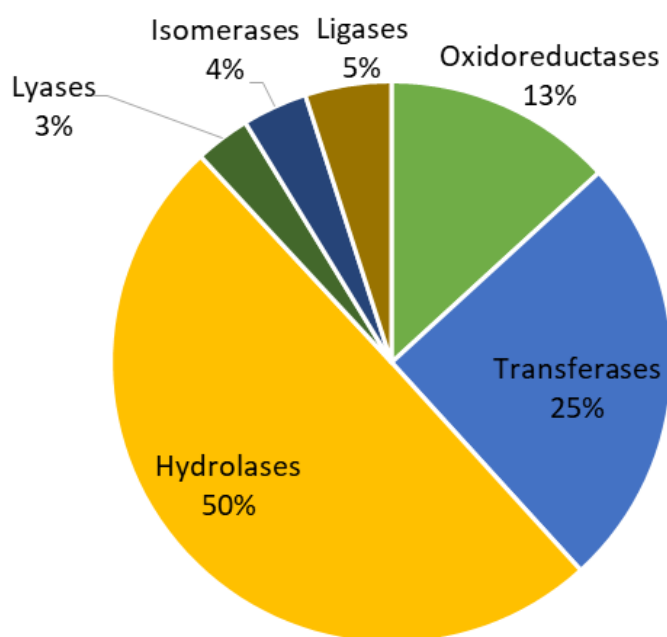


Figura 28. Porcentagem das sequências de *P. amazonas* (Trichoptera: Calamoceratidae) encontrada nas principais classes enzimáticas.

### 8.1.5 Genômica comparativa de genes expressos de celulases

A análise funcional dos genes expressos por *P. amazonas* identificou possíveis genes codificadores de enzimas com atividade em carboidratos com duas famílias de glicosil hidrolases (GH1 e GH48), as quais foram identificadas como Endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. Sequências de enzimas celulolíticas (Endoglucanase, Exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase) disponíveis no NCBI foram comparadas com sequências do transcrito de *P. amazonas*. Estas sequências foram analisadas quanto a sua similaridade com sequências de outras espécies de insetos e de fungos (Tabelas 10 e 11), sendo possível observar que as sequências dos genes que

expressaram Endoglucanase em *P. amazonas* tem 100% de similaridade com as sequências de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Insecta: Coleoptera) e somente 62,1% é similar com a sequência de *Rhizopus microsporus* Tiegh. (Fungi). O mesmo ocorreu com as sequências dos genes de  $\beta$ -glicosidase expressos por *P. amazonas*, onde tiveram maior similaridade com as sequências de insetos do que com as sequências de fungos, veja tabela 10.

Tabela 10. Presença de genes  $\beta$ -glicosidase e Endoglucanase expressos no transcriptoma de *P. amazonas* por *contig* utilizando o banco de dados NCBI *nr*. \*Sequências correspondentes no banco de dados que estão vinculados a um determinado táxon.

<i>Contig</i>	Enzima	Organismo*	E-value	Score	Similaridade	Número de acesso
<b>18165</b>	Endoglucanase	<i>L. decemlineata</i>	4,60E-61	641	100,0%	ADU33352
<b>22815</b>	Endoglucanase	<i>L. decemlineata</i>	6,32E-66	240	100,0%	ADU33352
<b>21385</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>H. armigera</i>	6,86E-22	466	85,5%	PZC77127
<b>17248</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>B. anynana</i>	1,79E-40	485	85,2%	XP_0239494 51
<b>6151</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>S. litura</i>	3,77E-34	524	81,3%	XP_0228305 60
<b>2943, 6151</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>A. darlingi</i>	5,57E-34	534	79,2%	ETN64736
<b>61, 410, 2752</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>A. transitella</i>	0	516	72,2%	XP_0131828 36
<b>17</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>P. xuthus</i>	0	511	72,0%	KPJ12243
<b>189, 3193</b>	$\beta$ -glicosidase	<i>C. lapponica</i>	0	495	72,0%	AJE75667

Tabela 11. Presença de genes  $\beta$ -glicosidase e Endoglucanase expressos no transcriptoma de *P. amazonas* por *contig* utilizando o banco de dados de fungos. \*Sequências correspondentes no banco de dados que estão vinculados a um determinado táxon.

<i>Contig</i>	Enzima	Organismo*	E-value	Score	Similaridade	Número de acesso
6132	$\beta$ -glicosidase	<i>Fusarium oxysporum</i>	2,46E-09	487	57.5%	XP_01825155 0
10985	$\beta$ -glicosidase	<i>Penicillium expansum</i>	1,93E-52	483	53.5%	XP_01659780 8
22815	Endoglucanase	<i>Rhizopus microsporus</i>	8,10E-23	241	62.1%	XP_02346570 9



### 8.1.6 Genes expressos não relacionados à celulases

Transcritos de pectinase (GH 28) e quitinase (GH 18) com uma alta similaridade com sequências de outros insetos, também, estão presentes no transcriptoma do intestino de *P. amazonas* (Tabela 12). Foi observado que as sequências dos genes que expressaram pectinase em *P. amazonas* tem 100% de similaridade com as sequências de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera), 89,4% de similaridade com *P. machaon* (Lepidoptera) e 80,2% de similaridade com *Galleria mellonella* (Lepidoptera), respectivamente.

Tabela 12. Presença de genes de Pectinase e Quitinase expressos no transcriptoma de *P. amazonas* utilizando o banco de dados NCBI *nr*. \*Sequências correspondentes no banco de dados que estão vinculados a um determinado táxon.

<b>Contig</b>	<b>Enzima</b>	<b>Organismo*</b>	<b>E-value</b>	<b>Score</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Número de acesso</b>
1046	Quitinase	<i>L. decemlineata</i>	2,10 E-1-7		100%	XP_023015726
11550	Pectinase	<i>L. decemlineata</i>	2,00 E-85	263	100%	AEX93414
13252	Pectinase	<i>Papilio machaon</i>	1,00 E-76		89.4%	KPJ10750
13252	Pectinase	<i>G. mellonella</i>	2,00E-78	251	80,20%	KPJ10750

## 8.2 DISCUSSÃO

São diversos os processos biológicos e fisiológicos envolvidos no sistema digestório de um inseto, por exemplo, digestão de alimentos, interação com microrganismos simbiotes, desintoxicação, entre outros. Com abordagens mais amplas como a de RNAseq aplicadas ao transcriptoma é possível analisar a expressão gênica, descobrir novas regiões dos genomas que são transcritas, identificar moléculas de RNAs que participam de processos regulatórios e estudar a expressão diferencial em diferentes locos (SOUZA, 2015).

Até o momento, nenhum transcriptoma do intestino de larvas de *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) havia sido analisado, os estudos existentes foram sobre o transcriptoma da larva de *Micropterma lateralis* (Stephens) (Trichoptera: Limnephilidae) (HOPPELER et al. 2016), da antena de *Rhyacophila nubila* Zetterstedt (Trichoptera: Rhyacophilidae) (YUVARAJ et al. 2018), de adultos de *Stenopsyche tienmushanensis* Hwang (Trichoptera: Stenopsychidae) (LUO et al. 2018) e transcriptoma de adultos de Trichoptera para estudo filogenético sobre a ordem (KJER et al. 2016). A análise de transcriptomas específicos do intestino de insetos pode contribuir com o conhecimento sobre componentes moleculares específicos e, também, pode identificar moléculas com potencial para aplicações práticas. A análise do perfil de transcrição de larvas de *P. amazonas* em busca da presença de genes de celulasas trouxe a primeira caracterização da expressão gênica dessa espécie.

A genômica comparativa de genes que expressam celulasas mostrou uma alta similaridade das sequências de celulasas de *P. amazonas* com sequências de outros insetos, como da ordem Lepidoptera. Isso pode ser explicado por duas premissas: 1) As espécies pertencentes a esta ordem são mais estudadas e devido a isso existe uma maior quantidade de sequências depositadas no BLAST. Das 16 mil espécies descritas de Trichoptera até o momento (<https://entweb.sites.clemson.edu/database/trichopt/>), apenas seis possuem seu genoma completo depositado no banco de dados do Genbank e dentre essas seis nenhuma pertence à mesma família Calamoceratidae, a qual pertence *P. amazonas*; 2) Tal ordem de insetos está, filogeneticamente, relacionada com a ordem de *P. amazonas*, sendo reconhecidas como grupos irmãos (GULLAN; CRANSTON, 2017). Essa proximidade entre as duas ordens valida as sequências de celulasas comparadas, já que não existe um banco de dados de sequências nucleotídicas sobre intestino de larvas de Trichoptera. Uma comparação, também, foi realizada contra o banco de dados de fungos, os resultados obtidos foram de baixa similaridade entre as

sequências de celulases de *P. amazonas* e sequências de fungos celulolíticos. Dessa forma, pode ser inferido que as sequências analisadas neste transcriptoma são endógenas e não de simbioses.

Outras enzimas de interesse foram encontradas: pectinase e quitinase. Pectinases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica da pectina e, geralmente, são produzidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias (UENOJO; PASTORE, 2014). Shelomi et al. (2014) ao analisarem o transcriptoma do intestino médio de Phasmida (bicho-pau) descobriram que as enzimas são endógenas e que esses insetos obtiveram os genes através da transferência horizontal de bactérias. No entanto, quando as sequências de *P. amazonas* foram analisadas contra o banco de dados de microrganismos, estas mostraram baixa similaridade com sequências de pectinase de outros organismos como fungos e bactérias.

As quitinases são enzimas do tipo glicosil hidrolases que clivam ligações  $\beta$ -1,4 entre unidades de N-acetilglicosaminas da quitina (BARRETTO et al., 2011), os principais produtores de quitinases são os organismos que possuem quitina no seu exoesqueleto (insetos) ou parede celular (fungos) (YAMAGUCHI, 2003). Uma hipótese sugerida por Scully et al. (2013) é de que as quitinases identificadas em besouros da família Cerambycidae estariam envolvidas na degradação da parede celular de fungos associados aos recursos alimentares para ser utilizada como fonte de nitrogênio e carboidrato. Em *P. amazonas* foram identificadas sequências de quitinases com alta similaridade com sequências de uma espécie de besouro, sugerindo que os genes são endógenos, pois correspondem a genes de insetos.

### 8.3 CONCLUSÃO

O presente estudo contribui com o incremento do conhecimento sobre genes de celulasas em insetos da ordem Trichoptera, mostrando a ocorrência desses genes em larvas de insetos aquáticos fragmentadores, mesmo este sendo um grupo de insetos que possui importante função ecológica em ecossistemas aquáticos, nunca havia sido estudado nesse nível de abordagem.

Os resultados obtidos por meio do estudo do transcriptoma de larvas de *P. amazonas* sugerem que as sequências de celulasas identificadas são endógenas e que, provavelmente, agem em conjunto com as celulasas de fungos celulolíticos associados. Também, foi possível identificar genes de outras enzimas, como pectinase e quitinase, as quais são de grande importância biotecnológica.

## 9. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo trouxe resultados de grande relevância para a ciência, demonstrando que há interação entre fungos simbiontes e larvas de insetos aquáticos fragmentadores, os fungos simbiontes tem potencial para produção de celulases, existe uma diversidade de fungos associados ao intestino dessas larvas que deve ser estudada mais profundamente, e além de mostrar que larvas de *P. amazonas* possuem genes de celulases endógenos. Estudos sobre fungos associados ao intestino de insetos aquáticos contribuem para um melhor entendimento dessa interação, tanto sobre a diversidade dos fungos quanto sua interação biológica e ecológica.

A comunidade fúngica do intestino das larvas dos insetos aquáticos analisadas é abundante em *Penicillium*, no entanto, tem a presença de outros gêneros bastante conhecidos pela ciência, como fungos já descritos associados a insetos imaturos e adultos, fungos celulolíticos, fungos que produzem pigmentos e patogênicos. Por meio da análise qualitativa, utilizando-se de halo de hidrólise foi possível indicar que os isolados fúngicos são celulolíticos e que a análise quantitativa, com o índice enzimático, é um excelente método para se fazer uma seleção de fungos com potencial para produção de celulases. No entanto, esforços devem ser realizados para que pesquisas de bioprospecção de fungos celulolíticos em insetos tenham mais espaço na pesquisa.

A abordagem metodológica de análise do transcriptoma do intestino de larvas de *P. amazonas* trouxe resultados inéditos para a ciência. Sendo possível demonstrar que esta espécie de inseto aquático possui genes que expressam enzimas celulolíticas, como a  $\beta$ -glucosidase e a Endoglucanase. Fato que indica que a atividade de degradação das folhas ingeridas pelas larvas pode ser realizada em conjunto: enzimas celulolíticas dos fungos associados e enzimas endógenas.

## 10. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. B.; DREW, M. E. A cellulose-hydrolyzing factor in aphid saliva. **Canadian Journal of Zoology**, v. 43, p. 489-496, 1965.
- ALENCAR, Y. B. et al. Trichomycetes (Zygomycota) in the digestive tract of arthropods in Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 799-810, 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS E.W. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215: 403–410, 1990.
- ALVIN, E. A. C. C; MEDEIROS, A. O; REZENDE, R. S; GONÇALVES JR, J. F. Leaf breakdown in a natural open tropical stream. **Journal of Limnology**, v. 74, n. 2, p. 248-260, 2015.
- ASADI, A.; GHADAMYARI, M.; SAJEDI, R.H.; SENDI, J.J.; TABARI, M. Biochemical characterization of midgut, salivary glands and haemolymph alpha-amylases of *Naranga aenescens*. **Bulletin of Insectology**, v. 63, 175e181, 2010.
- ATALLA R. H. **The Individual Structures of Native Cellulose**. In: 10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON WOOD AND PULPING CHEMISTRY. Atlanta, E.U.A. Anais, p. 608-614.
- ABMANN, C.; RINKE K.; NECHWATAL J.; ELERT E. V. Consequences of the colonisation of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. **Freshwater biology**, 56: 839-852, 2011.
- BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, Y.; HAN, X.; YANG, Q. Purification and characterization of beta 1,4-glucanases from *Penicillium simplicissimum* H-11. **BioRes**, v. 8, n. 3, 3657-3671, 2013.

BÄRLOCHER, F.; SRIDHAR, K.R. Association of animals and fungi in leaf decomposition. In: JONES, E.B.G; HYDE, K.D; PANG, K. L. (eds.) **Freshwater fungi and fungus-like organisms**. Berlin: De Gruyter, p. 413-441, 2014.

BARRETO, I. K. S. P.; ASSIS, S. A.; JUNIOR, G. L. V. **Caracterização da enzima quitinase produzida pela levedura *Pseudozyma* sp. CCMB 300**. Seminário de Iniciação Científica XV - SEMIC, 2011. Sessão V: Ciências da Saúde. Feira de Santana, 2011.

OLIVEIRA, J. B.; SANTA-ROSA, P. S; BELMONT, E. L. L; NUNES-SILVA, C. G. **Caracterização de celulases produzidas por fungo filamentosso isolado do intestino de inseto aquático *Phylloicus* (Insecta: Trichoptera: Calamoceratidae)**. In: RAMOS, C. A. (org.) Estudos e ensaios em biotecnologia: Uma coletânea de trabalhos desenvolvidos por acadêmicos da área de biotecnologia. Latvia: Novas Edições Acadêmicas, 2019, p. 265.

BENTES, S.P.C.; HAMADA, N.; FERREIRA-KEPPLER, R.L. **Caracterização morfológica de ovos de insetos aquáticos e seus habitats na Amazônia central, Brasil**. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R. B. Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. 2. ed. Manaus: Editora INPA, 2019, p. 724.

BERG, H. B. **Larval food and feeding behaviour**. In: P. D. Armitage, P. S. Cranston & L. C. V. Pinder (eds.), *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London, p. 136-168, 1995.

BERLIN A et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme Microb Technol*, v. 37, n. 2, p. 175-184, 2005.

BIASI, C.; COGO, G.B.; HEPP, L.U.; SANTOS, S. Shredders prefer soft and fungal-conditioned leaves, regardless of their initial chemical traits. ***Iheringia Sér Zool***, v. 109: e2019004, 2019.

BIASI, C.; GRAÇA M. A. S.; SANTOS S.; FERREIRA V. Nutrient enrichment in water more than in leaves affects aquatic microbial litter processing. ***Oecologia***, v. 184, p. 555-568, 2017.

BIGNELL, D. E. **Soil-feeding and gut morphology in higher termites**. In: HUNT, J. H.; NALEPA, C. A. (eds.). *Nourishment and evolution in insect societies*. Boulder: Westview Press, 1994, p.131-159.

BORKENT, A., The systematics and phylogeny of the *Stenochironomus* complex (*Xestochironomus*, *Harrisius*, and *Stenochironomus*) (Diptera: Chironomidae). **Mem. Entomol. Soc. Can.**, v. 128, p. 1-269, 1984.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I. de; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p.98-101, 2007.

BRENNAN, Y. et al. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3609-3617, 2004.

CAMARGOS, L.M; PES, A.M.O. The grass is always greener on the other side: *Triplectides* Kolenati, 1859 (Leptoceridae) and *Marilia* Müller, 1880 (Odontoceridae) occupying cases of other Trichoptera species. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 4, p. 353–356, 2011.

CASOTTI, C. G.; KIFFER-JUNIOR, W. P.; COSTA, L. C.; RANGEL, J. V.; CASAGRANDE, L. C.; MORETTI, M. S. Assessing the importance of riparian zones conservation for leaf decomposition in streams. **Natureza & Conservação**, v. 13, p. 178-182, 2015.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 65-72, 1939.

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

CEJA-NAVARRO, J. A. et al. Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. **Nature Communications**, v. 6, n. 7618, p. 1-9, 2015.



CHEKUSHINA, A.V., DOTSENKO, G.S. & SINITSYN, A.P. Comparing the efficiency of plant material bioconversion processes using biocatalysts based on *Trichoderma* and *Penicillium verruculosum* enzyme preparations. **Catal. Ind.**, v. 5, p. 98–104, 2013.

CHEN, H. S.; HUANG Q. Y.; LIU L. N.; CAI P.; LIANG W.; LI M. Poultry manure compost alleviates the phytotoxicity of soil cadmium: influence on growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.). **Pedosphere**, v. 20, p. 63–70, 2010.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **Int. J. Plant Genomics**, 619832, 2008.

CUMMINS, K. W.; MERRIT, R. W.; ANDRADE, C. N. The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 40, p. 71-90, 2005.

CUMMINS, K. W., MERRIT, R. W. **Ecology and distribution of aquatic insects**. In: MERRIT, R. W.; CUMMINS, K. W. (eds.) An introduction to the aquatic insects of North America. 3 rd. Editora Kendall/Hunt Publ. Co., Dubuque, IA, pp. 74-86, 1996.

CUMMINS, K.W. et al. Shredders and riparian vegetation. Leaf litter that falls into streams influences communities of stream invertebrates. **BioScience**, v. 39, p. 24-30, 1989.

DANTAS, G.P.; HAMADA, N.; MENDES, H. Contribution to the knowledge of *Stenochironomus* Kieffer (Diptera, Chironomidae) from Brazil: seven new species and description of females and immatures of some previously known species. **Zootaxa**, v. 4117, n. 1, p. 1–47, 2016.

DANTAS, G.P.S. **Taxonomia de *Stenochironomus* Kieffer, 1919 (Chironomidae: Diptera), na Amazônia Central, Brasil**. 2010. f. 106. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2010.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.

EGERT, M. et al. Microbial community structure in midgut and hindgut of the húmus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabeidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6659-6668, 2003.

EL-NAGGAR, N.E.A.; HAROUN, S.A.; OWEIS, E.A.; SHERIEF, A.A. Identification of newly isolated *Talaromyces pinophilus* and statistical optimization of  $\beta$ -glucosidase production under solid-state fermentation. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 45, n. 7, p. 712-729, 2015.

ENGEL, P.; MORAN, N.A. The gut microbiota of insects: diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 699-735, 2013.

FERREIRA, V.; KORICHEVA, J.; POZO, J.; GRAÇA, M.A.S. A meta-analysis on the effects of changes in the decomposition of native forests on litter decomposition in streams. **Forest ecology and management**, v. 364, p. 27-38, 2016.

FINDLAY, S. Stream microbial ecology. **J. N. Am. Benth. Soc**, v. 29, p. 170–181, 2010.

FISCHER, R.; OSTAFE, R.; TWYMAN, R.M. **Cellulases from insects**. In: VILCINSKAS, A. (ed.), *Yellow Biotechnology II: Insect Biotechnology in Plant Protection and Industry*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 136. Berlin: Springer, p. 51–64, 2013.

FONSECA, G.A.B. The vanishing Brazilian Atlantic forest. **Biol Conserv**, v. 34, p. 17-34, 1985.

FONSECA, Q. R. et al. Occurrence of filamentous fungi in *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello (Diptera: Simuliidae) larvae in Central Amazonia, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 282–285, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. Series title: **FAO Agricultural Services Bulletins** - 128, 1997.

GAMA, F. C. et al. Fungos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae) e aos frutos de *Coffea canephora* em Machadinho D'oeste, RO, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, n. 71, p. 169-171, 2002.

GEIB, S. M.; TIEN, M.; HOOVER, K. Identification of proteins involved in lignocellulose degradation using in gel zymogram analysis combined with mass spectroscopy-based peptide analysis of gut proteins from larval Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. **Insect Science**, v. 17, p. 253–264, 2010.

GEIB, S.M. et al. Effect of host tree species on cellulase activity and bacterial community composition in the gut of larval Asian longhorned beetle. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 686-699, 2009.

GENTA, F. A. et al. Potencial role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 593-601, 2006.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOMES, P.P. Influência da química do detrito foliar e da água sobre a comunidade de hifomicetos aquáticos. 2015, 97 f. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasília, 2015.

GRAÇA, M. A. S. The role of invertebrates on leaf decomposition in streams: a review. **International Review of Hydrobiology**, v. 86, p. 383-393, 2001.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: Fundamentos da Entomologia**. 5. ed. São Paulo: ROCA, 2017. 460 p.

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol. Bioeng**, v. 97, n. 5, p. 1028–1038, 2007.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

GUSAKOV, A. V.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A. P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1028-1038, 2007.

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R. B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. 2. ed. Manaus: Editora INPA, 2019, 724p.

HAMMER O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOLZENTHAL, R. W. Systematics of Neotropical *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 81, n. 2, p. 187-208, 1988.

HOPPELER, F.; ROTTER, B.; KREZDORN, N.; PAULS, S.U. A larval transcriptome of the limnephilid caddisfly *Micropterna lateralis* (Stephens, 1837) (Trichoptera: Limnephilidae). **Aquatic Insects**, v. 37, n. 3, p. 253–257, 2016.

IKEDA, Y.; HAYASHI, H.; OKUDA, N.; PARK, E. Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnol Prog**, v. 23, n. 2, p. 333-338, 2007.

JENSEN, V. **Decomposition of angiosperm tree leaf litter**. In: Dickinson, C.; Pugh, G. (eds). Biological of plant litter decomposition. San Diego: Academic Press, p. 69-104, vol. 2, 1974.

KAUSHIK, N. K.; HYNES, H. B. N. Experimental study on the role of autumn shed leaves in aquatic environments. **Journal of Ecology**, v. 56, p. 229-543, 1968.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S. et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647–1649, 2012.

KIM, N., et al. Molecular cloning and characterization of a glycosyl hydrolase family cellulase distributed throughout the digestive tract of the cricket *Teleogryllus emma*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 150B, p. 368-376, 2008.

KJER, K.M.; THOMAS, J.A.; ZHOU, X.; FRANDBSEN, P.B.; PRENDINI, E.; HOLZENTHAL, R.W. Progress on the phylogeny of caddisflies. In: Vshivkova, T.S., Morse, J.C., (eds) Proceedings of the 14th International Symposium on Trichoptera, Vladivostok, Russia, 2012.

KOIVUSAARI, P.; TEJESVI, M.V.; TOLKKINEN, M.; MARKKOLA, A.; MYKRA, H.; PIRTTILA, A.M. Fungi originating from tree leaves contribute to fungal diversity of litter in streams. **Front. Microbiol.**, v. 10, 2019.

KONIG, R.; HEPP, L.U.; SANTOS, S. Colonisation of low- and high-quality detritus by benthic macroinvertebrates during leaf breakdown in a subtropical stream. **Limnologia Ecology and Management of Inland Waters**, v. 45, p. 61-68, 2014.

KOROIVA, R.; SOUZA, C. W. O.; TOYAMA, D.; HENRIQUE-SILVA, F.; FONSECA-GESSNER, A. A. Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. **Genetic. Mol. Res.**, v. 12, p. 3421–3434, 2013.

KROGH, K. B. R. M.; KASTBERG, H.; JØRGENSEN, C. I.; BERLIN, A.; HARRIS, P. V.; OLSSSEN, L. Cloning of a GH5 endoglucanase from genus *Penicillium* and its binding to different lignins. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 44, n. 6–7, p. 359–367, 2009.

KUNIEDA, T. et al. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honeybee genome. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 563-576, 2006.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.

LEE, K.M.; JEYA, M.; JOO, A. R.; SINGH, R.; KIM, I. W.; LEE, J. K. Purification and characterization of a thermostable endo- $\alpha$ -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 46, n. 3-4, p. 206-211, 2010.

LEMOS, A. A. et al. Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. **Mycoses**, v. 49, n. 1, p. 23-25, 2006.

LIN, S.; ZOU, Z.; ZHOU, C.; ZHANG, H.; CAI, Z. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms underlying adenosine biosynthesis in anamorph strain of caterpillar fungus. **Biomed Res Int.** v. 1864168, 2019.

LO, N. et al. Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. **Current Biology**, v. 10, p. 801-4, 2000.

LO, N.; WATANABE, H.; SUGIMURA, M. Evidence for the presence of a cellulase gene in the last common ancestor of bilaterian animals. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 270, p. S69-S72, 2003.

LOMBARD, L.; SERRATO-DIAZ, L. M.; CHEEWANGKOON, R.; FRENCH-MONAR, R. D.; DECOCK, C.; CROUS, P. W. Phylogeny and taxonomy of the genera *Gliocephalotrichum*. **Persoonia**, v. 32, p. 127-140, 2014.

LUO, S.; TANG, M.; FRANDSEN, P.B.; STEWART, R.J.; ZHOU, X. The genome of an underwater architect, the caddisfly *Stenopsyche tienmushanensis* Hwang (Insecta: trichoptera). **Gigascience**, v. 7, n. 12, p. 143, 2018.

SHELOMI, M.; JASPER, W.C.; ATALLAH, J.; KIMSEY, L.S.; JOHNSON, B.R. Differential expression of endogenous plant cell wall degrading enzyme genes in the stick insect (Phasmatodea) midgut. **BMC Genomics**, v. 15, p. 917, 2014.

MAGNUSSON, W. E.; MOURÃO, G. M.; COSTA, F. R. C. **Estatística sem Matemática**. Londrina, Editora Planta, p. 214, 2015.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2004.

MALM, T.; JOHANSON, K. A. Description of eleven new *Triplectides* species (Trichoptera; Leptoceridae) from New Caledonia. **Zootaxa**, v. 1816, p. 1-34, 2008.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MARTIN, M. M. Cellulose digestion in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 75A, n. 3, p. 313-324, 1983.

MARTIN, M. M.; MARTIN, J. S. Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. **Science**, v. 199, p. 1453-1455, 1978.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 5, p.1417-1424, 2008.

MARTINS, R.T., GONÇALVES, J.F., CAMPOS, C.M. et al. Leaf consumption by invertebrate aquatic shredders in the Amazon: effects of climate change and microbial conditioning. **Limnology**, v. 21, p. 257–266, 2020.

MATTANOVICH, D. et al. Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome. **Microbial Cell Factories**, v. 53, p. 8, 2009.

MCKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. **Biotechnological Use of Fungal Enzymes**. In: KAVANAGH, K. (ed.) *Fungi: Biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd, p. 179–204, 2011.

MERRITT, R. W.; CUMMINS, K. W.; CAMPBELL, E. Y. **Uma abordagem Funcional Para a caracterização de riachos brasileiros**. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R. B. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. 2. ed. Manaus: Editora INPA, v. 1, p. 724, 2019.

MERRITT, R.W.; CUMMINS, K.W. **An introduction to the Aquatic Insects of North America**. 3 rd Edition. Kendall/Hunt Publishing Company. xiii +, p . 862, 1996.

MIKA N, ZORN H, RUHL M. Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 136, p. 1–17, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosilylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORAES, L. M. P. **Amilases**. In: SAID, S.; PIETRO, R. (Orgs.) *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

MORALES-JIMÉNEZ, J. et al. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 879–91, 2009.



MORALES-JIMÉNEZ, J. et al. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 268–78, 2012.

MOREIRA, D. O. et al. Ants as carriers of antibiotic-resistant bacteria in hospitals. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MORETTI, A. C. et al. Práticas corporais/atividade física e políticas públicas de promoção da saúde. **Revista Saúde e Sociedade**, v.18, n.2. p. 346-354, 2009.

MOROZOVA, V.V.; GUSAKOV, A.V.; ANDRIANOV, R.M.; PRAVILNIKOV, A. G.; OSIPOV, D. O.; SINITSYN, A. P. Cellulases of *Penicillium verruculosum*. **Biotechnol. J.**, v. 5, n. 8, p. 871–880, 2010.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosas ferramentas na indústria. **Instituto Ciência Hoje**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NAKASHIMA, K. et al. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 777–84, 2002.

NAVARRO, F. K. S.; GONÇALVES JUNIOR, J. F. Effect of leaf decomposition stage and water temperature on fragmentation activity of a shredder invertebrate species in lotic ecosystems. **Iheringia**, v. 107, 2017.

NAVARRO, F. K. S. P. Avaliação experimental do efeito do controle *Top-Down* e *Bottom-Up* sobre a cadeia de detritos em ambiente aquático. 122 f. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasília, 2014.

NAVARRO, F. K. S. P.; REZENDE, R.D.S., GONCALVES JUNIOR, J.F. Experimental assessment of temperature increase and presence of predator carcass changing the response of invertebrate shredders. **Biota Neotropica**, v. 13, p. 28-33, 2013.

NILSSON, R. H.; LARSSON, K. H.; TAYLOR, A. F. S.; BENGTSSON-PALME, J.; JEPPESEN, T. S.; SCHIGEL D. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic Acids Research**, v. 1–6, p. 178-182, 2018.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7–9, 1996.

NUNES, R.V.; FRIZZAS, M.R. Microbiota da flora intestinal de besouros (Coleoptera: Scarabaeidae) no Parque Olhos d'Água. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 5, n. 1/2, p. 1-13, 2007.

PARK, S; JOHNSON, D.K.; ISHIZAWA, C.I.; PARILLA, P.A.; DAVIS, M.F. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state C-13 nuclear magnetic resonance. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 641–647, 2009.

PAULA, C. et al. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (*Catão cave*) in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.

PEREIRA, E. D. S. et al. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in municipalities of the Brazilian Amazon. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 352-359, 2009.

PES, A. M. O. **Taxonomia e estrutura de comunidade de Trichoptera (Insecta) no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil**. 164 f. Dissertação (Mestrado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2001.

PES, A. M. O.; SANTOS, A. P. M.; BARCELOS-SILVA, P.; CAMARGOS, L. M. **Ordem trichoptera**. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R. B. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. 2. ed. Manaus: Editora INPA, 2019. v. 1. 724 p.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - thirty years of strain improvement. *Microbiology*, v. 158, p. 58–68, 2012.

POTHULA, R.; SHIRLEY, D.; PERERA, O.P.; KLINGEMAN, W.E.; OPPERT, C.; ABDELGAFFAR, H.M.Y.; JOHNSON, B.R.; JURAT-FUENTES, J. L. The digestive system in *Zygentoma* as an insect model for high cellulase activity. **PLoS One**, v. 14, n. 2, 2019.

PRATHER, L. A. Revision of the Neotropical caddisfly genus *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae). **Zootaxa**, v. 275, p. 1–214, 2003.

PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 200-206, 2002.

REIS, C.V.; PORTARO, F.C.; ANDRADE, S.A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B.L.; SAMPAIO, C. A. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (LOPAP) biochemical characterization. **Thromb. Res.**, v. 102, n. 5, p. 427-36, 2001.

REIS, C.V.; ANDRADE, S.A.; RAMOS, O.H.P.; RAMOS, C.R.R.; HO, P.L.; BATISTA, I.F.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure–function insights. **Biochem. J.**, v. 398, p. 295-302, 2006.

REIS, D. F.; MACHADO, M. M. D.; COUTINHO, N. P.; RANGEL, J. V.; MORETTI, M. S.; MORAIS, P.B. Feeding preference of the shredder *Phylloicus* sp. for plant leaves of *Chrysophyllum oliviforme* or *Miconia chartacea* after conditioning in streams from different biomes. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 22–28, 2019.

REYES-TORRES, L.J.; RAMÍREZ, A. Life history and phenology of *Phylloicus pulchrus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in a tropical rainforest stream of Puerto Rico. **Revista de Biología Tropical**, v. 66, p. 814–825, 2018.

REZENDE, R.S.; PETRUCIO, M.M.; GONÇALVES JÚNIOR, J.F. The effects of spatial scale on breakdown of leaves in a tropical watershed. **PLoS One**, v. 9, n. 5, 2014.

RIKER, A.J.; RIKER, R.S. **Isolation, culture, and inoculation**. In: RIKER, A.J.; RIKER, R.S (eds.). Introduction to research on plant diseases; a guide to principles and practice for studying various plant-disease problems. Madison. University of Wisconsin, p. 44-58, 1936.

RIOS-VELÁSQUEZ, C.M.; HAMADA, N. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with the digestive tract of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello and *Simulium ulyssesi* (Py-Daniel & Coscarón) (Diptera: Simuliidae) larvae, in Central Amazônia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 423–426, 2002.

ROJAS-JIMÉNEZ, K.; HERNÁNDEZ, M. Isolation of fungi and bacteria associated with the guts of tropical wood-feeding Coleoptera and determination of their lignocellulolytic activities. **International Journal of Microbiology**, v. 285018, 2015.

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

SANSEVERINO, A.M.; NESSIMIAN, J.L. Larvas de Chironomidae (Diptera) em depósitos de folhagem submerso em um riacho de primeira ordem da Mata Atlântica (Rio de Janeiro, Brasil). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 1, p. 95-104, 2008.

SANTA-ROSA, P. S. et al. Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 31, p. 84–92, 2017.

SANTOS, A. P. M.; DUMAS, L. L.; JARDIM, G. A. SILVA, A. L. R.; NESSIMIAN, J. L. Brazilian Caddisflies: Checklists and Bibliography. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/braziliancaddisflies>>. Acesso em 13 jul de 2019.

SANTOS, T. T. **Fungos associados ao trato digestório de *Phylloicus* spp. (Trichoptera: calamoceratidae) em riachos de baixa ordem na Amazônia brasileira**. 2018. 138f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia Rede Bionorte, Palmas, 2018.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, D. P.; CABETTE, H. S. R.; MORAIS, P. B. The digestive tract of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) harbours different yeast taxa in Cerrado streams, Brazil. **Symbiosis**, v. 77, p. 147-160, 2018a.

SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, K. A.; VITAL, M. J. S.; COUCEIRO, S. R. M.; MORAIS, P. B. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 13, p. 317-325, 2018b.

SCHARF, M. E. et al. Caste - and development-associated gene expression in a lower termite. **Genome Biology**, v. 4, p. R62, 2003.

SCHNITTLER, M.; STEPHENSON, S.L. Myxomycetes biodiversity in four different forest types in Costa Rica. **Mycologia**, v. 92, p. 626-637, 2001.

SCULLY, E.D.; HOOVER, K.; CARLSON, J.E.; TIEN, M.; GEIB, S.M. Midgut transcriptome profiling of *Anoplophora glabripennis*, a lignocellulose degrading cerambycid beetle. **BMC Genomics**, v. 14, p. 850, 2013.

SILVA, J. B. A. **Bioprospecção de fungos celulolíticos associados ao trato digestório de insetos aquáticos em córregos do Cerrado e Mata atlântica**. 2019. 127f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia Rede Bionorte, Palmas, 2019.

SINGH, R. et al. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: comparison with commercial cellulase. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 6679–6681, 2009.

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

SOUZA, R. F. 2015. **Análise de expressão diferencial em transcriptomas**. Disponível em: [http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01\\_curso\\_transcriptoma.pdf](http://www.uel.br/laboratorios/lbi/pages/arquivos/curso/01_curso_transcriptoma.pdf). Acesso em: 27 out. 2019.

SU, L. et al. Evaluation of cellulolytic activity in insect digestive fluids. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2432-2441, 2013.

SUBERKROPP, K.; GODSHALK, G. L.; KLUG, M. J. Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. **Ecology**, v. 57, p. 720–727, 1976.

SUH, S. O. et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycology Research**, v. 109, p. 261-265, 2005.

SUN, J. Z.; SCHARF, M. E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. **Journal of Insect Science**, v. 17, p. 163-165, 2010.

SUN, J. Z.; ZHOU, X. G. Utilization of lignocelluloses feeding insects for viable biofuels: an emerging and promising area of entomological science. **Recent Advances in Entomological Research**, p. 251–291, 2009.

SYAFRIANA, V.; NUSWANTARA, S. MANGUNWARDYO, W.; LISDIYANTI, P. Enhancement of 3-glucosidase activity in *Penicillium* sp. by random mutation with ultravioleta and ethyl methyl sulfonate. **Ann. Bogor**, v. 18, p. 27-34, 2014.

SZIJÁRTÓ, N. et al. Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p.115–124, 2004.

TAMAS, I. et al. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. **Science**, v. 296, p. 2376–2379, 2002.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109B, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. **Biochemistry of Digestion**. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K. (eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford p. 171-224, 2005.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.L. **Molecular and evolutionary physiology of insect digestion**. In: PANIZZI A.R, PARRA J.R.P (eds.) *Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management*, p. 93-119, 2012.

TOKUDA, G. et al. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3219–3228, 2004.

TREVES, D. S.; MARTIN, M. M. Cellulose digestion in primitive hexapods: effect of ingested antibiotics on gut microbial populations and gut cellulase levels in the firebrat, *Thermobia domestica* (Zygentoma, Lepismatidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, 1994.

TRIVINHO-STRIXINO, S. 2019. **Ordem Diptera, Família Chironomidae, Guia de identificação de larvas**. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R. B. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. 2. ed. Manaus: Editora INPA, 2019. v. 1. 724p.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

VISÔTTO, L. E. **Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) e caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao seu trato intestinal**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

VOŘÍŠKOVÁ, J.; BALDRIAN, P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. **ISME J**, v. 7, p. 477–486, 2013.

VOUTILAINEN, S.P.; PURANEN, T.; SIIKA-AHO, M. et al. Cloning, expression, and characterization of novel thermostable family 7 cellobiohydrolases. **Biotechnol. Bioeng.** 101(3), 515–528, 2008.

WALKER, I. The biology of streams as part of Amazonian forest ecology. **Experientia**, v. 43, p. 279–287, 1987.

WATANABE, H. et al. A cellulase gene of termite origin. **Nature**, v. 394, p. 330–331, 1998.

WATANABE, H.; NI, J. **Functional Gene Resources from Cellulose-Feeding Insects for Novel Catalysts**. In: SUN, J.; DING, S.Y.; PETERSON, J. D. Biological conversion of biomass for fuels and chemicals: explorations from natural utilization systems. RSC publishing, 2013.

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

WEI, Y. D. et al. N-glycosylation is necessary for enzymatic activity of a beetle (*Apriona germari*) cellulase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, p. 331–336, 2005.

WEI, Y. D. et al. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 145, p. 220-29, 2006a.

WEI, Y. D. et al. N-linked glycosylation of a beetle (*Apriona germari*) cellulase Ag-EGase II is necessary for enzymatic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 435–41, 2006b.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE T. J. (eds.). PCR Protocols. Academic Press, London, p. 315-322, 1990.

WOLFE, E.R.; YOUNGINGER, B.S.; LEROY, C.J. Fungal endophyte-infected leaf litter alters in-stream microbial communities and negatively influences aquatic fungal sporulation. **Oikos**, v. 128, p. 405–415, 2019.



XIAO, R.; WANG X.; XIE E.; JI T.; LI X.; MUHAMMAD A. An IMD-like pathway mediates the intestinal immunity to modulate the homeostasis of gut microbiota in *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). **Dev. Comp. Immunol.**, v. 97, p. 20–27, 2019.

YAMAGUCHI, M. M.; SATO, H. H.; FERRACINI-SANTOS, L. Seleção de microrganismo produtor de quitinase e avaliação dos métodos de semipurificação da enzima. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis - SC. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, 2003.

YOKOE, Y. Cellulase activity in the termite, *Leucotermes speratus*, with new evidence in support of a cellulase produced by the termite itself. **Scientific Papers of the College of General Education**, v. 14, p. 115-120, 1964.

YOKOE, Y.; YASUMASU, I. The distribution of cellulase in invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 13, p. 323-338, 1964.

YUVARAJ, J. K., ANDERSSON, M. N., ANDERBRANT, O., AND LÖFSTEDT, C. Diversity of olfactory structures: a comparative study of antennal sensilla in Trichoptera and Lepidoptera. **Micron**. v. 111, p. 9-18, 2018.

ZAMPIERI, D.; GUERRA, L.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Secretion of endoglucanases and  $\beta$ glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. **Ind. Crop. Prod.**, v. 50, p. 882-886, 2013.

ZHANG, T.; LIU, M.; WANG, Y.Y.; WANG, Z.J.; WEI, X.L.; WEI, J.C. Two new species of Endocarpon (Verrucariaceae, Ascomycota) from China. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7193, 2017.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Locais de coletas na Reserva Florestal Adolfo Ducke, município de Manaus, Amazonas, Brasil.

Ponto de coleta	Igarapé	Latitude	Longitude
1	Acará 33	02°57'10.30"S	59°57'30.10"W
2	Acará 14	02°57'29.00"S	59°57'48.00"W
3	Barro Branco	02°55'48.46"S	59°58'26.43"W
4	Acará 22	02°56'05.30"S	59°57'14.79"W
5	Acará 23	02°56'44.97"S	59°57'31.16"W
6	Bolívia 21	02°59'39.70"S	59°55'39.09"W
7	Bolívia 14	02°58'15.17"S	59°56'40.12"W
8	Tinga 22	02°56'11.67"S	59°54'16.00"W
9	Água Branca	02°55'08.59"S	59°54'44.60"W
10	Ipiranga 21	02°59'35.29"S	59°53'45.67"W

**APÊNDICE B** - Volume e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR.

Reagentes/ concentração inicial	Quantidade na reação
Taq DNA polimerase - Platinum® 5U/μL	0,2 μL
Tampão 10 X	2,0 μL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,0 μL
dNTPs 10 mM	0,5 μL
Primer forward 10 μM	0,5 μL
Primer reverse 10 μM	0,5 μL
DNA fúngico 20 ng/μL	1,5 μL
Água	18,8 μL
	<b>25 μL</b>

**APÊNDICE C** - Composição do meio de triagem em placas de Petri.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	3,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
CMC	10,0
Ágar	20,0

**APÊNDICE D** - Meio basal proposto por Mandels; Weber (1969).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1,4
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0016
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0014
CoCl <sub>2</sub>	0,002
Peptona	1,0
Ureia	0,3
Extrato de levedura	0,25

**APÊNDICE E** - Contagem de UFC obtidas dos tratos digestivos de *Phylloicus* (Trichoptera). UFC/mL = nº de colônias x fator de diluição (1) / alíquota plaqueada (0,1 mL).

IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PA	A	96	3040	188,4
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PA	B	116		
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PA	C	92		
<b>Total de colônias A1PA</b>				<b>304</b>		
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PB	A	3	110	
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PB	B	5		
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PB	C	3		
<b>Total de colônias A1PB</b>				<b>11</b>		
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PC	A	0	20	
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PC	B	1		
1	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A1PC	C	1		
<b>Total de colônias A1PC</b>				<b>2</b>		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PA	A	1	110	191,15
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PA	B	7		
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PA	C	3		
<b>Total de colônias A2PA</b>				<b>11</b>		
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PB	A	36	1270	
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PB	B	43		
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PB	C	48		
<b>Total de colônias A2PB</b>				<b>127</b>		
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PC	A	2	50	

2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PC	B	1			
2	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A2PC	C	2			
2		<b>Total de colônias A2PC</b>		<b>5</b>			
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA	
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PA	A	69		1396,9	
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PA	B	35			
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PA	C	27			
		<b>Total de colônias A3PA</b>		<b>131</b>	1310		
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PB	A	12			
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PB	B	16			
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PB	C	15			
		<b>Total de colônias A3PB</b>		<b>43</b>	430		
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PC	A	178			
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PC	B	152			
3	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A3PC	C	154			
		<b>Total de colônias A3PC</b>		<b>484</b>	4840		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL		MÉDIA GEOMÉTRICA
4	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A4PA	A	0			10
4	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A4PA	B	1			
4	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A4PA	C	0			
		<b>Total de colônias A4PA</b>		<b>1</b>	10		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA	
5	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A5PA	A	7		180	
5	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A5PA	B	4			
5	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A5PA	C	7	180		

Total de colônias A5PA					18		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA	
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PA	A	5	100	149,7	
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PA	B	3			
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PA	C	2			
<b>Total de colônias A6PA</b>				<b>10</b>			
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PB	A	5	210		
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PB	B	6			
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PB	C	10			
<b>Total de colônias A6PB</b>				<b>21</b>			
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PC	A	4	160		
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PC	B	9			
6	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A6PC	C	3			
<b>Total de colônias A6PC</b>				<b>16</b>			
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA	
7	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A7PA	A	1	40	40	
7	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A7PA	B	3			
7	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A7PA	C	0			
<b>Total de colônias A7PA</b>				<b>4</b>	40		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA	
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PA	A	122	3090	824,4	
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PA	B	109			
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PA	C	78			
<b>Total de colônias A8PA</b>				<b>309</b>			
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PB	A	12	220		

8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PB	B	8		
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PB	C	2		
<b>Total de colônias A8PB</b>				<b>22</b>		
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PC	A	5		
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PC	B	7		
8	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A8PC	C	5		
<b>Total de colônias A8PC</b>				<b>17</b>	170	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PA	A	4		
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PA	B	2		
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PA	C	3		
<b>Total de colônias A9PA</b>				<b>9</b>	90	
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PB	A	2		
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PB	B	2		
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PB	C	2		
<b>Total de colônias A9PB</b>				<b>6</b>	60	257,99
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PC	A	66		
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PC	B	145		
9	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A9PC	C	107		
<b>Total de colônias A9PC</b>				<b>318</b>	3180	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PA	A	52		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PA	B	62		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PA	C	0	1140	279,7

<b>Total de colônias A10PA</b>				<b>114</b>		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PB	A	1		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PB	B	1		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PB	C	1		
<b>Total de colônias A10PB</b>				<b>3</b>	30	
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PC	A	5		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PC	B	18		
10	Intestino de <i>Phylloicus</i>	A10PC	C	41		
<b>Total de colônias A10PC</b>				<b>64</b>	640	
<b>Total de UFC/mL das larvas de <i>Phylloicus</i></b>					<b>20820</b>	<b>2934,88</b>



**APÊNDICE F** - Contagem de UFC obtidas dos tratos digestivos de *Triplectides* (Trichoptera). UFC/mL = nº de colônias x fator de diluição (1) / alíquota plaqueada (0,1 mL).

IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TA	A	51	1710	284,7365987
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TA	B	60		
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TA	C	60		
<b>Total de colônias A1TA</b>				<b>171</b>		
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TB	A	3	150	
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TB	B	10		
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TB	C	2		
<b>Total de colônias A1TB</b>				<b>15</b>		
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TC	A	1	90	
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TC	B	6		
1	Intestino de <i>Triplectides</i>	A1TC	C	2		
<b>Total de colônias A1TC</b>				<b>9</b>		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TA	A	5	90	44,81404747
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TA	B	2		
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TA	C	2		
<b>Total de colônias A3TA</b>				<b>9</b>		
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TB	A	0	20	
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TB	B	1		
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TB	C	1		
<b>Total de colônias A3TB</b>				<b>2</b>		
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TC	A	2	50	

2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TC	B	1		
2	Intestino de <i>Triplectides</i>	A3TC	C	2		
<b>Total de colônias A3TC</b>				<b>5</b>		
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TA	A	2		131,0370697
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TA	B	2		
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TA	C	1		
<b>Total de colônias A4TA</b>				<b>5</b>	50	
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TB	A	3		
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TB	B	14		
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TB	C	28		
<b>Total de colônias A4TB</b>				<b>45</b>	450	
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TC	A	2		
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TC	B	3		
4	Intestino de <i>Triplectides</i>	A4TC	C	5		
<b>Total de colônias A4TC</b>				<b>10</b>	100	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TA	A	47		432,2899288
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TA	B	32		
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TA	C	53		
<b>Total de colônias A6TA</b>				<b>132</b>	1320	
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TB	A	31		
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TB	B	2		
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TB	C	3		
<b>Total de colônias A6TB</b>				<b>36</b>	360	

6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TC	A	6		
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TC	B	5		
6	Intestino de <i>Triplectides</i>	A6TC	C	6		
<b>Total de colônias A6TC</b>				<b>17</b>	170	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TA	A	2		44,26727679
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TA	B	2		
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TA	C	4		
<b>Total de colônias A7TA</b>				<b>8</b>	80	
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TB	A	2		
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TB	B	1		
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TB	C	1		
<b>Total de colônias A7TB</b>				<b>4</b>	40	
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TC	A	1		
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TC	B	1		
7	Intestino de <i>Triplectides</i>	A7TC	C	4		
<b>Total de colônias A7TC</b>				<b>6</b>	60	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
8	Intestino de <i>Triplectides</i>	A8TA	A	2		110
8	Intestino de <i>Triplectides</i>	A8TA	B	8		
8	Intestino de <i>Triplectides</i>	A8TA	C	1		
<b>Total de colônias A8TA</b>				<b>11</b>	110	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TA	A	2		54,51361778
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TA	B	2	60	

10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TA	C	2	
<b>Total de colônias A10TA</b>				<b>6</b>	
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TB	A	1	
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TB	B	1	
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TB	C	1	
<b>Total de colônias A10TB</b>				<b>3</b>	30
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TC	A	1	
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TC	B	1	
10	Intestino de <i>Triplectides</i>	A10TC	C	1	
<b>Total de colônias A10TC</b>				<b>9</b>	90
<b>Total de UFC/mL das larvas de <i>Triplectides</i></b>					<b>5140</b>
					<b>1101,66</b>

**APÊNDICE G** - Contagem de UFC obtidas dos tratos digestivos de *Stenochironomus* (Diptera). UFC/mL = nº de colônias x fator de diluição (1) / alíquota plaqueada (0,1 mL).

IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SA	A	2	30	26,20741394
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SA	B	0		
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SA	C	1		
<b>Total de colônias A1SA</b>				<b>3</b>		
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SB	A	1	20	
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SB	B	1		
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SB	C	0		
<b>Total de colônias A1SB</b>				<b>2</b>		
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SC	A	1	30	
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SC	B	2		
1	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A1SC	C	0		
<b>Total de colônias A1SC</b>				<b>3</b>		
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
2	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SA	A	16	230	105,4628097
2	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SA	B	4		
2	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SA	C	3		
<b>Total de colônias A2SA</b>				<b>23</b>		
2	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SB	A	1	30	
2	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SB	B	1		
2	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SB	C	1		
<b>Total de colônias A2SB</b>				<b>3</b>		

2	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SC	A	1		
2	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SC	B	0		
2	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A2SC	C	16		
<b>Total de colônias A2SC</b>				<b>17</b>	170	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
3	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A3SA		1		
<b>Total de colônias A3SA</b>				<b>1</b>	10	10
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SA	A	1		
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SA	B	0		
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SA	C	0		
<b>Total de colônias A4SA</b>				<b>1</b>	10	
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SB	A	3		
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SB	B	3		
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SB	C	0		
<b>Total de colônias A4SB</b>				<b>6</b>	60	
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SC	A	0		
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SC	B	0		
4	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A4SC	C	0		
<b>Total de colônias A4SC</b>				<b>0</b>	0	24,49489743
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SA	A	1		
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SA	B	0		
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SA	C	0		
<b>Total de colônias A5SA</b>				<b>1</b>	10	15,87401052

5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SB	A	1		
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SB	B	3		
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SB	C	0		
<b>Total de colônias A5SB</b>				<b>4</b>	40	
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SC	A	0		
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SC	B	1		
5	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A5SC	C	0		
<b>Total de colônias A5SC</b>				<b>1</b>	10	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SA	A	0		
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SA	B	0		
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SA	C	2		
<b>Total de colônias A6SA</b>				<b>2</b>	20	
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SB	A	1		
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SB	B	0		
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SB	C	1		
<b>Total de colônias A6SB</b>				<b>2</b>	20	
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SC	A	1		
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SC	B	0		
6	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A6SC	C	0		
<b>Total de colônias A6SA</b>				<b>1</b>	10	15,87401052
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SA	A	1		
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SA	B	0		
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SA	C	1		
<b>Total de colônias A7SA</b>				<b>2</b>	20	12,5992105

7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SB	A	0		
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SB	B	0		
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SB	C	1		
<b>Total de colônias A7SB</b>				<b>1</b>	10	
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SC	A	1		
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SC	B	0		
7	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A7SC	C	0		
<b>Total de colônias A7SC</b>				<b>1</b>	10	
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SA	A	0		
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SA	B	0		
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SA	C	0		
<b>Total de colônias A8SA</b>				<b>0</b>	0	
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SB	A	0		
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SB	B	0		
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SB	C	0		
<b>Total de colônias A8SB</b>				<b>0</b>	0	
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SC	A	0		
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SC	B	0		
8	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A8SC	C	0		
<b>Total de colônias A8SC</b>				<b>0</b>	0	20
IGARAPÉ	SUBSTRATO	AMOSTRA	PLACA	OCORRÊNCIA	Nº TOTAL DE UFC/mL	MÉDIA GEOMÉTRICA
9	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SA	A	1		
9	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SA	B	0		
9	Intestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SA	C	0		
<b>Total de colônias A9SA</b>				<b>1</b>	10	12,5992105



9	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SB	A	0		
9	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SB	B	0		
9	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SB	C	1		
<b>Total de colônias A9SB</b>				<b>1</b>	10	
9	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SC	A	0		
9	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SC	B	0		
9	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A9SC	C	0		
<b>Total de colônias A9SC</b>				<b>0</b>	0	
<b>IGARAPÉ</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>PLACA</b>	<b>OCORRÊNCIA</b>	<b>Nº TOTAL DE UFC/mL</b>	<b>MÉDIA GEOMÉTRICA</b>
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SA	A	1		
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SA	B	1		
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SA	C	1		
<b>Total de colônias A10SA</b>				<b>3</b>	30	
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SB	A	1		
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SB	B	1		
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SB	C	1		
<b>Total de colônias A10SB</b>				<b>3</b>	30	
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SC	A	1		
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SC	B	0		
10	Instestino de <i>Stenochironomus</i>	A10SC	C	1		
<b>Total de colônias A10SC</b>				<b>2</b>	20	26,20741394
<b>Total de UFC/mL das larvas de <i>Stenochironomus</i></b>					<b>880</b>	<b>269,32</b>

**APÊNDICE H** - Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados do trato digestório de *Phylloicus* (Trichoptera), cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 4 dias a 28 °C. I.E. = índice enzimático; dh – diâmetro do halo/dc- diâmetro da colônia. O índice enzimático foi calculado para cada repetição do teste.

Isolados	IE dh/dc	IE médio	Desvio padrão	Isolados	IE dh/dc	IE médio	Desvio padrão
<b>A1PA3</b>	2,0	2,3	0,3	<b>A7PA1</b>	1,0	1,0	0,0
	2,6				1,0		
	2,2				1,0		
<b>A1PB1</b>	1,4	1,4	0,2	<b>A8PA1</b>	1,0	1,0	0,0
	1,6				1,0		
	1,3				1,0		
<b>A1PB3</b>	1,6	1,6	0,1	<b>A8PB2</b>	1,1	1,0	0,1
	1,7				1,0		
	1,4				1,0		
<b>A1PB4</b>	1,9	1,8	0,1	<b>A8PB3</b>	1,0	1,1	0,4
	1,8				1,5		
	1,8				0,8		
<b>A1PB5</b>	3,7	3,1	0,8	<b>A8PB5</b>	2,0	2,1	0,2
	2,2				2,4		
	3,4				2,0		
<b>A1PC2</b>	2,3	1,9	0,4	<b>A8PB6</b>	1,1	1,1	0,0
	1,6				1,1		
	1,6				1,1		
<b>A2PA2</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A8PC2</b>	1,0	1,0	0,0
	1,0				1,0		
	1,0				1,0		
<b>A2PA4</b>	3,5	3,9	0,2	<b>A8PC3</b>	1,0	1,0	0,0
	4,2				1,0		
	4,0				1,0		
<b>A2PB1</b>	1,8	1,0	0,9	<b>A8PC5</b>	1,5	1,4	0,1
	1,3				1,3		
	0,0				1,3		
<b>A2PB2</b>	1,8	1,8	0,1	<b>A8PC12</b>	1,0	1,0	0,0
	1,7				1,0		
	2,0				1,0		
<b>A2PB3</b>	2,0	1,8	0,3	<b>A8PC13</b>	1,4	1,4	0,1
	2,0				1,3		
	1,5				1,4		
<b>A2PB5</b>	1,2	1,2	0,0	<b>A8PC14</b>	1,5	1,6	0,3
	1,2				1,9		
	1,3				1,3		
<b>A2PB6</b>	1,5	1,6	0,2	<b>A8PC15</b>	1,0	1,0	0,0
	1,8				1,0		
	1,4				1,0		
<b>A2PB8</b>	2,1	2,0	0,1	<b>A8PD3</b>	1,0	1,0	0,0

	1,9				1,0		
	1,9				1,0		
<b>A2PC1</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A8PD4</b>	1,4	1,3	0,2
	1,0				1,1		
	1,0				1,4		
<b>A2PC2</b>	2,5	2,8	0,5	<b>A9PA2</b>	1,8	1,8	0,0
	2,5				1,8		
	3,3				1,8		
<b>A3PB1</b>	1,4	1,4	0,0	<b>A9PA4</b>	2,0	2,0	0,0
	1,4				2,0		
	1,4				2,0		
<b>A3PB8</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A9PB1</b>	1,0	1,0	0,0
	1,0				1,0		
	1,0				1,0		
<b>A3PC1</b>	1,8	1,8	0,0	<b>A9PB3</b>	1,0	1,2	0,3
	1,8				1,0		
	1,8				1,6		
<b>A5PA2</b>	1,7	1,5	0,2	<b>A9PB4</b>	2,3	2,3	0,1
	1,2				2,4		
	1,6				2,3		
<b>A5PA3</b>	2,5	2,9	0,4	<b>A9PB5</b>	1,2	1,3	0,3
	3,0				1,0		
	3,3				1,6		
<b>A5PA4</b>	1,5	1,4	0,1	<b>A9PB6</b>	1,4	1,4	0,1
	1,4				1,4		
	1,4				1,5		
<b>A5PA5</b>	1,4	1,5	0,1	<b>A9PB7</b>	1,3	1,3	0,0
	1,6				1,3		
	1,6				1,3		
<b>A5PA6</b>	1,2	1,4	0,4	<b>A9PB8</b>	1,1	1,0	0,0
	1,1				1,0		
	1,9				1,0		
<b>A5PA7</b>	1,4	1,1	0,2	<b>A9PB9</b>	1,0	1,0	0,0
	1,0				1,0		
	0,9				1,0		
<b>A6PA4</b>	1,4	1,4	0,0	<b>A9PB10</b>	1,7	1,8	0,1
	1,4				1,8		
	1,5				1,8		
<b>A6PA5</b>	1,5	1,5	0,0	<b>A9PC2</b>	1,3	1,6	0,4
	1,4				1,3		
	1,5				2,0		
<b>A6PB1</b>	1,4	1,3	0,1	<b>A9PD3</b>	1,6	1,6	0,1
	1,3				1,7		
	1,3				1,5		
<b>A6PB3</b>	1,2	1,2	0,0	<b>A9PD4</b>	1,2	1,2	0,1

	1,3				1,1		
	1,2				1,2		
<b>A6PB6</b>	1,3	1,1	0,3	<b>A9PD5</b>	1,0	1,0	0,0
	1,6				1,0		
	1,0				1,0		
<b>A6PB7</b>	2,4	2,3	0,1	<b>A9PD6</b>	1,0	1,0	0,0
	2,3				1,0		
	2,3				1,0		
<b>A6PB8</b>	1,2	1,2	0,1	<b>A9PD7</b>	1,4	1,5	0,1
	1,3				1,6		
	1,1				1,4		
<b>A6PB10</b>	1,4	1,3	0,1	<b>A9PE5</b>	1,1	1,1	0,0
	1,2				1,1		
	1,2				1,1		
<b>A6PC1</b>	1,2	1,2	0,1	<b>A9PE8</b>	1,1	1,1	0,0
	1,0				1,1		
	1,3				1,1		
<b>A6PC2</b>	1,5	1,3	0,3	<b>A10PA1</b>	1,3	1,2	0,1
	1,0				1,3		
	1,3				1,2		
<b>A6PC3</b>	1,4	1,4	0,0	<b>A10PB1</b>	1,0	1,0	0,0
	1,4				1,0		
	1,4				1,0		
<b>A6PC6</b>	1,5	1,4	0,2	<b>A10PB2</b>	1,0	1,2	0,2
	1,5				1,4		
	1,2				1,2		
<b>A6PC7</b>	1,2	1,2	0,1	<b>A10PB4</b>	1,3	1,3	0,1
	1,1				1,2		
	1,3				1,3		
<b>A6PC8</b>	1,7	1,3	0,4	<b>A10PB5</b>	1,5	1,2	0,3
	1,0				1,0		
	1,3				1,0		
<b>A6PC10</b>	1,2	1,2	0,0	<b>A10PC2</b>	1,3	1,1	0,2
	1,2				1,0		
	1,3				1,0		
<b>A6PC12</b>	1,1	1,1	0,0	<b>A10PC3</b>	1,7	1,8	0,2
	1,2				2,1		
	1,1				1,7		
<b>A6PC13</b>	1,2	1,1	0,1	<b>A10PD1</b>	1,0	1,0	0,0
	1,3				1,0		
	1,0				1,0		

**APÊNDICE I** - Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados do trato digestório de *Triplectides* (Trichoptera), cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 4 dias a 28 °C. I.E. = índice enzimático; dh – diâmetro do halo/dc- diâmetro da colônia. O índice enzimático foi calculado para cada repetição do teste.

Isolados	IE dh/dc	IE médio	Desvio padrão	Isolados	IE dh/dc	IE médio	Desvio padrão
<b>A1TB1</b>	3,0	3,0	0,0	<b>A4TD2</b>	1,6	1,6	0,0
	3,0				1,5		
	3,0				1,5		
<b>A1TB2</b>	1,8	1,6	0,2	<b>A4TD3</b>	1,5	1,5	0,0
	1,5				1,5		
	1,4				1,5		
<b>A1TB3</b>	2,5	2,0	0,4	<b>A4TD4</b>	1,9	1,7	0,2
	1,8				1,7		
	1,8				1,4		
<b>A1TB4</b>	1,9	1,6	0,3	<b>A4TD5</b>	1,0	1,0	0,0
	1,4				1,0		
	1,4				1,0		
<b>A1TC2</b>	1,5	1,5	0,1	<b>A4TD6</b>	1,6	1,7	0,1
	1,6				1,6		
	1,6				1,8		
<b>A1TC3</b>	2,2	2,2	0,0	<b>A6TA1</b>	1,7	1,6	0,1
	2,2				1,5		
	2,2				1,6		
<b>A1TC4</b>	1,9	1,8	0,1	<b>A6TA2</b>	1,3	1,3	0,1
	1,8				1,3		
	1,8				1,4		
<b>A3TA1</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A6TA7</b>	1,9	1,5	0,3
	1,0				1,5		
	1,0				1,3		
<b>A3TA5</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A6TA10</b>	1,0	1,0	0,0
	1,0				1,0		
	1,0				1,0		
<b>A3TB1</b>	1,8	1,5	0,3	<b>A6TB4</b>	1,0	1,0	0,0
	1,5				1,0		
	1,2				1,0		
<b>A3TC1</b>	1,8	1,4	0,3	<b>A6TB7</b>	1,8	1,6	0,3
	1,3				1,7		
	1,3				1,3		
<b>A4TA1</b>	3,0	2,8	0,3	<b>A6TC2</b>	1,0	1,1	0,1
	2,4				1,0		
	3,0				1,2		
<b>A4TA2</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A6TC3</b>	1,3	1,3	0,1
	1,0				1,4		
	1,0				1,4		
<b>A4TA3</b>	3,7	3,4	0,5	<b>A6TC4</b>	1,0	1,0	0,0

	3,7				1,0		
	2,8				1,0		
<b>A4TA4</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A6TC6</b>	1,9	1,7	0,2
	1,0				1,7		
	1,0				1,4		
<b>A4TA5</b>	1,7	1,6	0,1	<b>A6TC8</b>	1,0	1,0	0,0
	1,7				1,0		
	1,4				1,0		
<b>A4TB2</b>	1,7	1,7	0,2	<b>A6TC9</b>	1,4	1,1	0,3
	1,9				1,0		
	1,6				1,0		
<b>A4TB3</b>	1,5	1,6	0,3	<b>A7TA6</b>	1,0	1,2	0,2
	1,9				1,4		
	1,4				1,3		
<b>A4TB6</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A7TB1</b>	1,0	1,0	0,0
	1,0				1,0		
	1,0				1,0		
<b>A4TB7</b>	1,4	1,6	0,2	<b>A7TC1</b>	1,3	1,3	0,0
	1,7				1,2		
	1,7				1,3		
<b>A4TB8</b>	2,5	1,8	0,6	<b>A7TD2</b>	1,5	1,4	0,1
	1,4				1,4		
	1,4				1,3		
<b>A4TB9</b>	2,0	1,8	0,2	<b>A8TA2</b>	1,0	1,0	0,0
	1,7				1,0		
	1,7				1,0		
<b>A4TB10</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A8TA5</b>	4,3	4,0	0,6
	1,0				3,3		
	1,0				4,3		
<b>A4TB12</b>	1,5	1,5	0,0	<b>A8TA7</b>	3,5	3,9	0,4
	1,5				4,2		
	1,5				4,0		
<b>A4TB13</b>	1,7	1,6	0,0	<b>A8TA9</b>	2,5	2,5	0,0
	1,7				2,5		
	1,6				2,5		
<b>A4TC1</b>	1,0	1,2	0,3	<b>A10TC1</b>	1,7	1,6	0,1
	1,0				1,7		
	1,6				1,5		
<b>A4TC5</b>	1,4	1,3	0,1	<b>A10TC3</b>	1,8	1,8	0,2
	1,4				1,6		
	1,2				1,8		
<b>A4TD1</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A10TC4</b>	2,5	2,5	0,1
	1,0				2,6		
	1,0				2,5		

**APÊNDICE J** - Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados do trato digestório de *Stenochironomus* (Diptera), cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 4 dias a 28 °C. I.E. = índice enzimático; dh – diâmetro do halo/dc- diâmetro da colônia. O índice enzimático foi calculado para cada repetição do teste.

Isolados	IE dh/dc	IE médio	Desvio padrão	Isolados	IE dh/dc	IE médio	Desvio padrão
<b>A1SA3</b>	1,4	1,4	0,2	<b>A3SB1</b>	1,0	1,0	0,0
	1,3				1,0		
	1,6				1,0		
<b>A1SA4</b>	1,4	1,4	0,0	<b>A4SA1</b>	2,2	2,3	0,1
	1,4				2,5		
	1,4				2,3		
<b>A1SB2</b>	2,4	2,4	0,0	<b>A4SB1</b>	1,8	1,6	0,2
	2,4				1,6		
	2,4				1,4		
<b>A1SC1</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A4SB2</b>	2,3	2,0	0,4
	1,0				2,1		
	1,0				1,5		
<b>A1SC3</b>	2,4	2,5	0,1	<b>A4SB3</b>	2,2	1,8	0,4
	2,5				1,4		
	2,6				1,9		
<b>A1SC5</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A4SC1</b>	2,0	1,9	0,1
	1,0				1,9		
	1,0				1,8		
<b>A1SC7</b>	1,8	1,8	0,0	<b>A4SC2</b>	1,4	2,1	0,6
	1,7				2,2		
	1,8				2,6		
<b>A2SA1</b>	1,3	1,4	0,1	<b>A5SB1</b>	2,0	2,0	0,2
	1,5				2,2		
	1,5				1,7		
<b>A2SA2</b>	3,0	2,1	0,8	<b>A5SB2</b>	2,5	2,5	0,1
	1,9				2,4		
	1,4				2,5		
<b>A2SA3</b>	1,1	1,1	0,1	<b>A5SB3</b>	2,5	2,9	0,4
	1,1				3,0		
	1,0				3,3		
<b>A2SA4</b>	2,0	2,8	0,8	<b>A5SC1</b>	2,0	2,2	0,3
	3,5				2,0		
	2,8				2,5		
<b>A2SA5</b>	2,3	2,2	0,1	<b>A6SA1</b>	1,1	1,7	0,6
	2,1				1,8		
	2,1				2,3		
<b>A2SA8</b>	3,6	3,7	0,2	<b>A7SA1</b>	1,0	1,0	0,0
	3,4				1,0		
	3,9				1,0		
<b>A2SB2</b>	1,7	2,0	0,5	<b>A7SA2</b>	1,0	1,0	0,0

	2,5				1,0		
	1,8				1,0		
<b>A2SB3</b>	2,3	2,0	0,3	<b>A7SB1</b>	2,3	1,9	0,3
	1,8				1,8		
	1,8				1,8		
<b>A2SC1</b>	1,0	1,0	0,0	<b>A8SD1</b>	1,1	1,1	0,0
	1,0				1,1		
	1,0				1,1		
<b>A2SC2</b>	1,0	1,1	0,2	<b>A8SD2</b>	3,0	2,5	0,9
	1,3				3,0		
	1,0				1,5		
<b>A3SA1</b>	3,7	3,1	0,5				
	3,0						
	2,8						