

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diversidade molecular de procariotos em solo
de cupinzeiro e seu agente *Cornitermes*
cumulans

ORIENTADO: Patrícia Silva Costa

ORIENTADOR: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento

CO- ORIENTADOR: Prof. Edmar Chartone-Souza

BELO HORIZONTE

Janeiro - 2011

Patrícia Silva Costa

Diversidade molecular de procariotos em
solo de cupinzeiro e seu agente
Cornitermes cumulans

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento
Co-Orientador: Prof. Edmar Chartone de Souza

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
2011

“Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited to all we now know and understand, while imagination embraces the entire world, and all there ever will be to know and understand.”

Albert Einstein

Agradecimento Especial

Dedico meu trabalho aos meus pais, meus irmãos e cunhada, que foram a minha força e perseverança; e ao Marco, meu amor, meu companheiro que esteve sempre ao meu lado e me incentivou a continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força, saúde e perseverança para continuar indo em frente.

Aos meus pais Marco Antônio e Olga, por vocês serem o meu exemplo de luta e resignação, por toda paciência, dedicação e amor. Se eu estou aqui hoje devo a vocês.

Ao Marco, meu companheiro de todas as horas, por sempre me apoiar e me incentivar. Eu te amo muito.

Aos meus irmãos Carlos e Adriana e à minha cunhada Chirlei, por todo o carinho e amizade.

Às minhas sobrinhas Maria Clara e Isabella por fazerem os meus sábados mais felizes.

Aos meus avós, que não estão mais comigo, mas que sei que estão torcendo por mim.

Aos meus tios, que tanto torceram por mim, obrigada.

À professora Andréa Maria Amaral Nascimento por toda paciência, dedicação e sabedoria. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Edmar Chartone-Souza pela dedicação e conhecimentos passados.

Às meninas e meninos do LGM - Mariana, Isabela, Cláudia, Flaviane, Will, Etiene, Thaís, Juliana, Clarisse, Zelina, Alexandre, Magna, Patrícia, Luís – pela amizade e por todos os momentos alegres que nós compartilhamos no laboratório.

À professora Mônica Bucciarelli Rodriguez pelo carinho, amizade, puxões de orelha e conhecimentos passados.

À professora Adlane Villas-Boas, por me abrir as portas do laboratório, pela amizade e conhecimentos passados.

Às técnicas Andréa Reis, Paixão e Maria Rosa pela paciência, amizade e pelas contribuições essenciais para o desenvolvimento dos experimentos e na preparação de materiais.

Ao Pesquisador Francisco José Zorzenon da Unidade Laboratorial de Referência em Pragas Urbanas, Instituto Biológico de São Paulo, pela identificação taxonômica do cupim.

À FAPEMIG, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do operon ribossômico dos procaríotos
- Figura 2** - Árvore filogenética ilustrando os maiores filos do domínio *Bacteria*.
- Figura 3** - Árvore filogenética com a distribuição das relações simbióticas, indicando as bactérias e arqueias com seus respectivos hospedeiros eucariotos.
- Figura 4** - Estrutura do trato gastrointestinal de um cupim inferior (A) e de cupim superior (B).
- Figura 5** - Árvore mostrando a diversidade bacteriana no trato gastrointestinal de várias espécies de cupins
- Figura 6A** - Imagens do cupinzeiro da espécie *Cornitermes cumulans* e da coleta das amostras de solo da superfície e das galerias internas do cupinzeiro.
- Figura 6B** - Imagem da abertura do cupinzeiro restaurada pela atividade dos cupins.
- Figura 7** - Amplicons do fragmento do gene de rRNA 16S de bactéria em gel de agarose 1%.
- Figura 8** - Amplicon do fragmento do gene rRNA 16S de arqueia em gel de agarose 1%.
- Figura 9** - Perfil de restrição dos amplicons dos genes de rRNA 16S das amostras de CP, SC e SR utilizando três enzimas de restrição distintas.
- Figura 10** - Dendograma mostrando o perfil de restrição gerado pela digestão com a enzima *AluI* entre as amostras CP, SC e SR determinada pela análise do perfil gerado ARDRA.
- Figura 11** - Curva de rarefação observada dos clones seqüenciados contendo o gene rRNA 16S bacteriano e do número de OTUs da biblioteca SC.
- Figura 12** - Distribuição das OTUs da biblioteca de rRNA 16S bacteriano do solo do cupinzeiro.
- Figura 13 A, B e C** - Árvores filogenéticas das OTUs bacterianas da amostra de solo SC. A: Árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Proteobacterium; B: Árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Actinobacterium; C: Árvore filogenética das OTUs pertencentes aos demais filos Planctomycetes, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Cloroflexi, Bactéria_incertae_sedis, Verrucomicrobia, Firmicutes, Acidobacteria e Unclassified_Bacteria.
- Figura 14** - Árvore filogenética das OTUs de bactérias do cupim da espécie *Cornitermes cumulans*.
- Figura 15** - Árvore filogenética das OTUs de arqueias da amostra de solo SC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições da PCR para a amplificação de bactérias e arqueias.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos solos estudados.

Tabela 3 - Análise dos clones, diversidade das seqüências e cobertura das bibliotecas de bactéria e de arqueia das amostras solo de cupinzeiro (SC) e de cupim (CP).

Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da amostra SC.

Tabela 5 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de bactéria de CPB.

Tabela 6 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de arqueia de SC.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE - Abundance-based coverage estimator

Al²⁺ - Alumínio

AmoA - gene Ammonia monooxygenase

ARDRA - Amplified rDNA restriction analysis/ "análise de restrição do DNA ribossômico amplificado"

Ca²⁺ - Cálcio

CO₂ - Dióxido de carbono

CP - cupim

Cu - cobre

cm - centímetro

DGGE - Denaturing gradient gel electrophoresis/ "eletroforese em gel de gradiente desnaturante"

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Fe - ferro

H₂ - Hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

ITS - Intergenic 16S-23S transcribed spacer/ "Região espaçadora intergênica 16S - 23S rDNA"

K - Potássio

Kb - Kilobase

KCl - Cloreto de Potássio

M - Molar

Mg²⁺ - Magnésio

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

Mn - Manganês

m - Metro

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mM - Milimolar

µg - Micrograma

μ l - Microlitro
 μ M - Micromolar
 N^{2-} - Nitrogênio
 N° - Número
 NH_3 - Amônia
NaCl - Cloreto de sódio
ng - Nanograma (10^{-9})
OTU - Operational taxonomic unit/ "unidade taxonômica operacional"
P - Fósforo
PCR - Polymerase Chain Reaction / "Reação em Cadeia da Polimerase"
pb - pares de base
pH - potencial hidrogeniônico
rDNA - Ácido desoxirribonucléico ribossômico
RDP - Ribosomal Database Project II
RNA - Ácido ribonucléico
rDNA - Ácido desoxirribonucléico ribossômico
rRNA - Ácido ribonucléico ribossômico
RPM - rotação por minuto
SC - solo do cupinzeiro
SR - solo de referência
TBE - Tampão Tris-borato de EDTA
U - Unidade
UPGMA - Unweighted pair group methods with arithmetic mean
Zn - zinco

SUMÁRIO

Agradecimento Especial	I
Agradecimento	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
SUMÁRIO	VII
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 – INTRODUÇÃO	3
1.1 - Considerações Iniciais	4
1.2 - Diversidade de procariotos	5
1.3 - O operon de RNA ribossômico	7
1.4 - Simbiose entre procariotos e eucariotos.....	12
1.5 - Os cupins e suas interações com o ambiente.....	14
2 – OBJETIVOS	18
2.1 - Objetivo Geral.....	19
2.2 - Objetivo Específico.....	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 -Amostragens.....	21
3.2 - Determinações de fatores abióticos e identificação taxonômica do cupim.....	21
3.3 - Extração de DNA total.....	22
3.4 - Amplificação por PCR do gene rRNA 16S	23
3.5 - Perfil de restrição do amplicon de rRNA16S.....	24
3.6 - Construção de bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S.....	24
3.7 - Extração do DNA plasmidiano, seqüenciamento do gene de rRNA 16S e análise filogenética.....	25
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 - Determinações de fatores abióticos.....	28
4.2 - Amplificação, construção e análise das bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S de bactéria e arqueia.....	29
4.3 – Perfil de restrição do amplicon do rDNA16S bacteriano.....	32
4.4 - Diversidade das bibliotecas de clones de rDNA 16S.....	34
5 – CONCLUSÃO.....	50
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
7 – ANEXOS.....	63

Resumo

A simbiose entre insetos e procariontos é reconhecida como sendo essencial para a sobrevivência desses invertebrados. A microbiota existente no trato gastrointestinal de cupins, insetos sociais, é diversa e a sua função vem sendo caracterizada. Este estudo pesquisou a diversidade molecular de procariontos em solo do cupinzeiro e de seu agente *Cornitermes cumulans*, utilizando uma abordagem independente de cultivo. Assim amostras de solo do cupinzeiro (SC), do solo de referência (SR) e do cupim (CP) - *Cornitermes cumulans* - foram coletadas. O amplicon do gene de rRNA 16S de bactérias foi usado para a análise do *fingerprint* ARDRA das amostras SC, SR e CP e para a construção de bibliotecas de clones de SC e CP. Além disso, a construção da biblioteca de clones do gene de rRNA 16S de arqueias foi obtida para a amostra SC. A análise do perfil de restrição do gene de rRNA 16S revelou que as comunidades bacterianas de SC, SR e de CP foram distintas, sendo as comunidades SR e CP mais similares. A análise filogenética utilizando o gene de rRNA 16S revelou uma alta diversidade nas comunidades bacterianas de SC, detectando 67 OTUs que foram afiliadas a dez filos: Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Gemmatimonadetes e Bacteria_incertae_sedis. Por outro lado, a comunidade de arqueias da amostra SC apresentou apenas duas OTUs que se afiliaram ao filo Chrenoarcheota. A comunidade bacteriana de *Cornitermes cumulans* apresentou oito OTUs que foram afiliadas a quatro filos: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Synergistetes. Dos filos bacterianos identificados, Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria foram comuns a ambas as comunidades em SC e CP. Os índices de Shannon-Weaver e Simpson e os valores ACE e Chao1 obtidos mostraram que SC e CP apresentaram uma alta diversidade bacteriana enquanto SC apresentou uma baixa diversidade de arqueia. Deste modo, os resultados revelam uma diversidade bacteriana, ainda não explorada, no solo do cupinzeiro e no cupim *Cornitermes cumulans*.

Abstract

Symbiosis between insects and prokaryotes are recognized as essential to the survival of these invertebrates. The bacterial community in the gastrointestinal tract of termites, social insects, is diverse and the function of this microbiota has been characterized. This study investigated the molecular diversity of prokaryotes in soil of the mound and its agent *Cornitermes cumulans* using a cultivation-independent approach. Thus, samples of the termite nest soil (SC), reference soil (SR) and termite (CP) - *Cornitermes cumulans* - were collected. The amplicon of the 16S rRNA gene of bacteria was used for the ARDRA *fingerprint* analysis of the SC, SR and CP samples and the construction of libraries from SC and CP. Moreover, the construction of 16S rDNA library from archaea was obtained using SC sample. Analysis of restriction profiles of 16S rRNA gene revealed that bacterial communities in SC, SR and CP were different, although SR and CP communities were more similar. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences revealed a high diversity of bacterial communities in SC, detecting 67 OTUs which were affiliated to ten phyla: Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, Gemmatimonadetes and Bacteria_incertae_sedis. On the other hand, the community of archaea of the sample SC showed that only two OTUs affiliated to the phylum Chrenoarcheota. The bacterial community of *Cornitermes cumulans* presented eight OTUs which were affiliated with four phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Synergistetes. Identified bacterial phyla, Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria were common to both communities in SC and CP. The Shannon-Weaver and Simpson indices and the ACE and Chao1 values showed that SC and CP had high bacterial diversity while SC had a low diversity of archaea. Thus, the results reveal bacterial diversity, yet unexplored, in the soil of termite mound and *Cornitermes cumulans*.

1 - Introdução

1.1 - Considerações gerais

O estudo sobre a diversidade de procariotos vem se destacando devido à importância desses pequenos organismos para o funcionamento da biosfera, uma vez que desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes e de energia em nosso planeta como consequência de sua grande versatilidade metabólica. O solo, recurso natural não renovável, abriga uma grande extensão da biodiversidade da Terra ainda por ser descoberta. A diversidade de procariotos nesse ambiente ainda não é bem conhecida e acredita-se que apenas 0,1 a 1% dos microrganismos que habitam os solos foram cultivados, identificados e caracterizados (Zhang & Xu, 2008). Este importante recurso vem sofrendo com o aumento das atividades antrópicas prejudicando a capacidade dos microrganismos presentes de desempenharem plenamente suas funções.

No ambiente natural os procariotos mantêm relações vitais entre si e com outros organismos mais complexos. Vários eucariotos são intimamente associados com microrganismos que são benéficos e essenciais para seu desenvolvimento e sua saúde. Dentre essas associações ecológicas destacam-se a simbiose – grupo de associações que podem ser benéficas (comensalismo e mutualismo) – e as associações maléficas para um dos participantes (parasitismo) (Chaves *et al.*, 2009). A simbiose entre microrganismos e diversas espécies de insetos é bem conhecida. Os cupins são insetos sociais, considerados engenheiros do solo devido às transformações físico-químicas que causam quando constroem seus ninhos. A microbiota existente em seu trato gastrointestinal é diversa desempenhando diferentes funções, como a digestão da celulose, a fixação de nitrogênio, ambas realizadas pelas bactérias, e a produção de metano através de H_2 e CO_2 pelas arqueias metanogênicas. Portanto, sua microbiota é essencial para o desempenho das funções e sobrevivência desse inseto no ambiente, ou

seja, a análise da microbiota no trato gastrointestinal dos cupins e do solo de seu ninho é um importante passo para o entendimento de como esse pequeno inseto interage com o ambiente.

1.2 – Diversidade de procariotos

Estima-se que o nosso planeta tenha sido formado há aproximadamente 4,6 bilhões de anos. Entretanto, a história de vida na Terra iniciou com o surgimento de organismos procariotos há aproximadamente 3,8 bilhões de anos. Através de processos evolutivos, os procariotos vieram a colonizar e dominar a maioria dos ecossistemas, superando os limites nos quais a vida pode existir. Eles desempenham papel fundamental na origem e evolução de outras formas de vida. Além disso, os microrganismos são a base para o funcionamento da biosfera, participando de ciclos biogeoquímicos, síntese de produtos naturais, biocatálise, conversão de energia e processos de biorremediação devido a sua enorme versatilidade metabólica (Schleifer, 2004; Xu, 2006; Pontes *et al.*, 2007).

A descoberta, o cultivo e o estudo de novos microrganismos vêm sendo um dos objetos de estudo dos microbiologistas desde os primórdios da bacteriologia. Robert Koch (1880) foi um dos responsáveis pelo surgimento da bacteriologia a partir do desenvolvimento de técnicas laboratoriais: o cultivo de microrganismos foi de extrema importância para a consolidação da Microbiologia, sendo que a maioria das informações contidas atualmente em livros-texto vieram do estudo de organismos em cultura pura (Handelsman, 2004). Entretanto, o surgimento das técnicas moleculares e de métodos independentes de cultivo demonstrou que o cultivo não detectava a real diversidade dos microrganismos. Além disso, os estudos com cultura purificada dava ênfase ao

isolamento dos microrganismos de suas comunidades e direcionava o foco para seu comportamento em ambientes biologicamente simples, como a placa de Petri e os tubos de ensaio, dificultando o entendimento de suas funções no ambiente. Assim, por um longo período, a análise das comunidades microbianas complexas foi prejudicada (Shapiro & Dworkin, 1997).

Até a década de 1980 a classificação taxonômica se baseava em comparações fenotípicas, incluindo características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e químicas das células. Para superar a dificuldade e as limitações encontradas nas técnicas de cultivo, técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (Mullis, 1987) e o sequenciamento de DNA (Sanger, 1977), foram desenvolvidas e tiveram forte impacto sendo extremamente valiosas em diversas áreas da ciência, em particular na classificação microbiana. A introdução do sequenciamento do gene de RNA ribossômico (rRNA) 16S e seu uso como marcador molecular trouxe uma dimensão filogenética à taxonomia bacteriana e tem fornecido informações consideráveis sobre a relação taxonômica, papel ecológico e a evolução de espécies de procariotos encontradas nas amostras ambientais, sem a necessidade de isolamento e cultivo (Rappé & Giovannoni, 2003; Tringe & Hugenholtz, 2008; Nascimento, 2011).

De acordo com as análises dos genes de rRNA, os seres vivos são classificados em três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaria*, sendo que os dois primeiros (procariotos) são constituídos exclusivamente por microrganismos. Diversos estudos apontam que os microrganismos são os seres vivos mais comuns da biosfera. Nos oceanos, eles constituem $3,6 \times 10^{29}$ células, totalizando 3×10^{11} toneladas de carbono em sua biomassa. Sabe-se, ainda, que as bactérias são responsáveis por 98% da produção primária de carbono e são mediadores importantes em todos os ciclos biogeoquímicos. Outro exemplo, dessa extraordinária diversidade, é a microbiota

gastrointestinal humana estimada em 40.000 espécies, com 10^{13} a 10^{14} células e um genoma total contendo, pelo menos, 100 vezes mais genes do que o genoma humano (Frank & Pace, 2008). A diversidade no solo é imensa sendo estimado que um grama de solo possa conter mais de 10 bilhões de microrganismos. Estima-se que um grama de solo contenha 4×10^7 células procarióticas abrangendo cerca de 2000 a 18000 genomas procarióticos distintos dependendo do tipo de solo (Daniel, 2005).

O solo é um ambiente altamente complexo e dinâmico que surgiu através de uma interação íntima de bilhões de anos entre os processos bióticos e abióticos. É um material altamente poroso e a heterogeneidade de sua estrutura física existe em micro e macro-escala e, por tudo isso, é considerado um biomaterial que possui características únicas (O'Donnell *et al.*, 2007).

O solo possui uma biota que contém uma diversidade maior do que qualquer outro ecossistema. Os microrganismos que compõem esta biota desempenham funções essenciais para o funcionamento desse ambiente, pois atuam nas reações de ciclagem e fluxos dos vários nutrientes essenciais, influenciando na formação da estrutura e na manutenção da qualidade do solo (Martins, 2010). A atividade e biodiversidade das bactérias do solo são diretamente influenciadas por mudanças desse ambiente. Diversos estudos vêm demonstrando que mudanças no conteúdo de água, pH, tipo de solo e propriedades do solo afetam a microbiota presente no ambiente (Bossio & Scow, 1998; Fierer & Jackson, 2006; Wu *et al.*, 2008; Carney & Matson, 2006; Jangid *et al.*, 2008). Portanto, o estudo da diversidade procariótica em diferentes ambientes é essencial para o entendimento da função desses microrganismos e como eles se adaptam em cada solo.

1.3 – O operon de RNA ribossômico

Com o surgimento dos estudos filogenéticos dos procariotos, tornou-se necessário a escolha de um cronômetro molecular ideal para as inferências sobre as relações evolutivas entre os microrganismos. A análise dos genes ribossômicos é muito utilizada para essas inferências filogenéticas, especialmente de procariotos, aumentando assim o conhecimento sobre a diversidade procariótica em diversos ecossistemas (Tourova, 2003).

Os RNAs ribossômicos (rRNA) são moléculas antigas, constituintes importantes do ribossomo, responsável pela síntese protéica de todos os organismos e de amplo interesse evolutivo tanto em procariotos como em eucariotos. Nos procariotos esta organela é formada por duas subunidades ribossômicas: a subunidade 30S, composta por proteínas e o rRNA 16S, e a subunidade 50S, composta por proteínas e dos rRNAs 5S e 23S (Woese, 1987).

Para garantir a produção dos três tipos de RNA em quantidades iguais, os genes que dão origem aos rRNAs de ambas as subunidades, 5S (120 pb), 16S (1542 pb) e 23S (2904 pb), estão organizados em um único operon como ilustrado na Figura 1. Apesar da maioria das espécies de procariotos possuir no máximo duas cópias do operon ribossômico, algumas espécies podem conter múltiplas cópias em seu genoma variando de três a oito e, em poucas espécies, chegando a 15 cópias (Tourova, 2003).

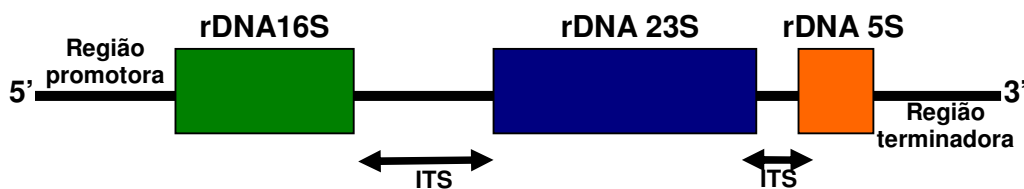


Figura 1 – Representação esquemática do operon ribossômico de procariotos.

A escolha dos genes de rRNA para os estudos filogenéticos é decorrente de diversas características: os rRNAs são fundamentais para a maquinaria de síntese protéica e, portanto, são funcionalmente e evolutivamente homólogos para todos os seres vivos; estes genes não sofrem transferência lateral; os genes de rRNA possuem seqüência extremamente conservada, porém com fragmentos variáveis possibilitando a diferenciação de gêneros diferentes (Olsen *et al.*, 1986; Woese, 1987; Tourova, 2003).

Dentre os três genes ribossômicos, os genes dos RNAs 16S e 23S possuem regiões altamente variáveis, permitindo o alinhamento das seqüências, com variabilidade suficiente para a diferenciação de procariotos no nível de gênero e até mesmo espécies. Estas características tornam estas moléculas ótimos cronômetros evolutivos para os estudos filogenéticos dos procariotos. O rRNA 16S vem tendo destaque nos estudos de diversidade, evolução e ecologia dos procariotos por ter o tamanho adequado para ser estudado e por possuir regiões filogeneticamente informativas em sua seqüência (Madigan *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2007).

Com o surgimento da PCR e do seqüenciamento do gene de rRNA16S foi possível para Woese e colaboradores, em 1987, distinguir 12 filos do domínio *Bacteria*, através de metodologias baseadas no cultivo bacteriano. Atualmente, os filos descritos por Woese são denominados Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chlamydiae, Planctomycetes, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Spirochaetes, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus e Thermotogae. Desde 1987, outros 14 filos foram descobertos e caracterizados através de técnicas dependentes de cultivo, estando entre eles filos bem conhecidos como Fusobacteria, Acidobacteria, Nitrospira, Aquificae, entre outros (Figura 2) (Rappé & Giovannoni, 2003). Em 1996, o surgimento do seqüenciamento de rRNA 16S obtidas de amostras ambientais, através de técnicas independentes de cultivo,

desencadeou o aparecimento de 26 novos filos sem representantes cultivados (Hugenholtz *et al.*, 1998; Handelsman, 2004).

Atualmente, no domínio *Archaea* são conhecidos cinco filos, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Thaumarchaeota e Nanoarchaeota. O conhecimento sobre a diversidade desse domínio só foi possível através do seqüenciamento do gene de rRNA 16S e de técnicas moleculares independentes de cultivo, já que existem grandes dificuldades no cultivo de seus membros, tendo somente dois filos, Crenarchaeota e Euryarchaeota, com representantes cultivados (Madigan *et al.*, 2004; Allers & Mevarech, 2005; Gribaldo & Brochier-Armanet, 2006).

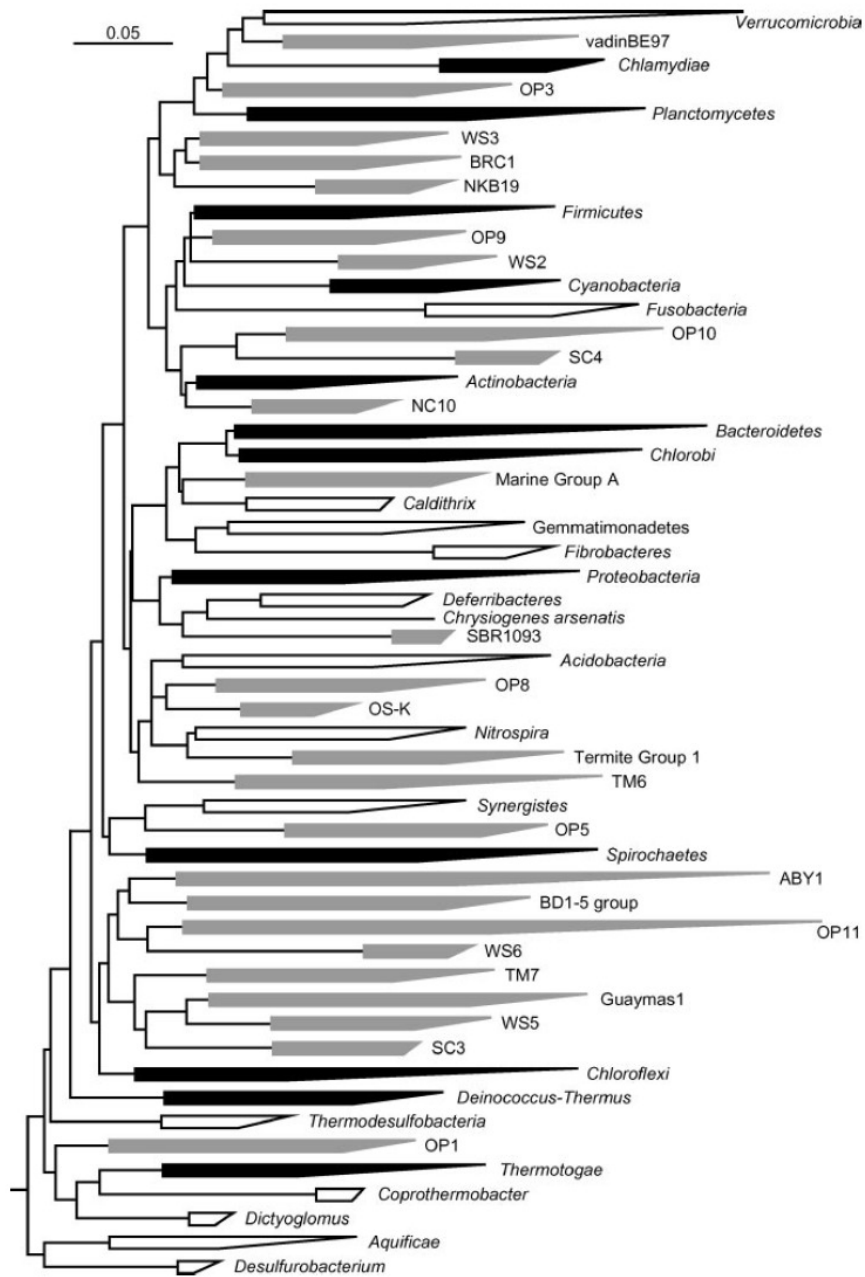


Figura 2 – Árvore filogenética ilustrando os filos do domínio *Bacteria*. Em negro estão os 12 filos originais descritos por Woese (1987), em branco estão os 14 filos reconhecidos através da técnica de cultivo a partir de 1987 e em cinza estão os 26 candidatos a filo que não possuem representantes cultivados. Fonte: Rappé & Giovannoni (2003).

1.4 – Simbiose entre procariotos e eucariotos

As relações de simbiose devem ter ocorrido desde o início da vida na Terra, com importante papel na evolução de diversos organismos. Os procariotos, além de desempenharem funções que são essenciais para o ecossistema, exercem papel importante na sobrevivência de diversos organismos eucariotos, invertebrados e vertebrados, através de relações simbióticas - Figura 3 (Schleifer, 2004; Moya *et al.*,2008).

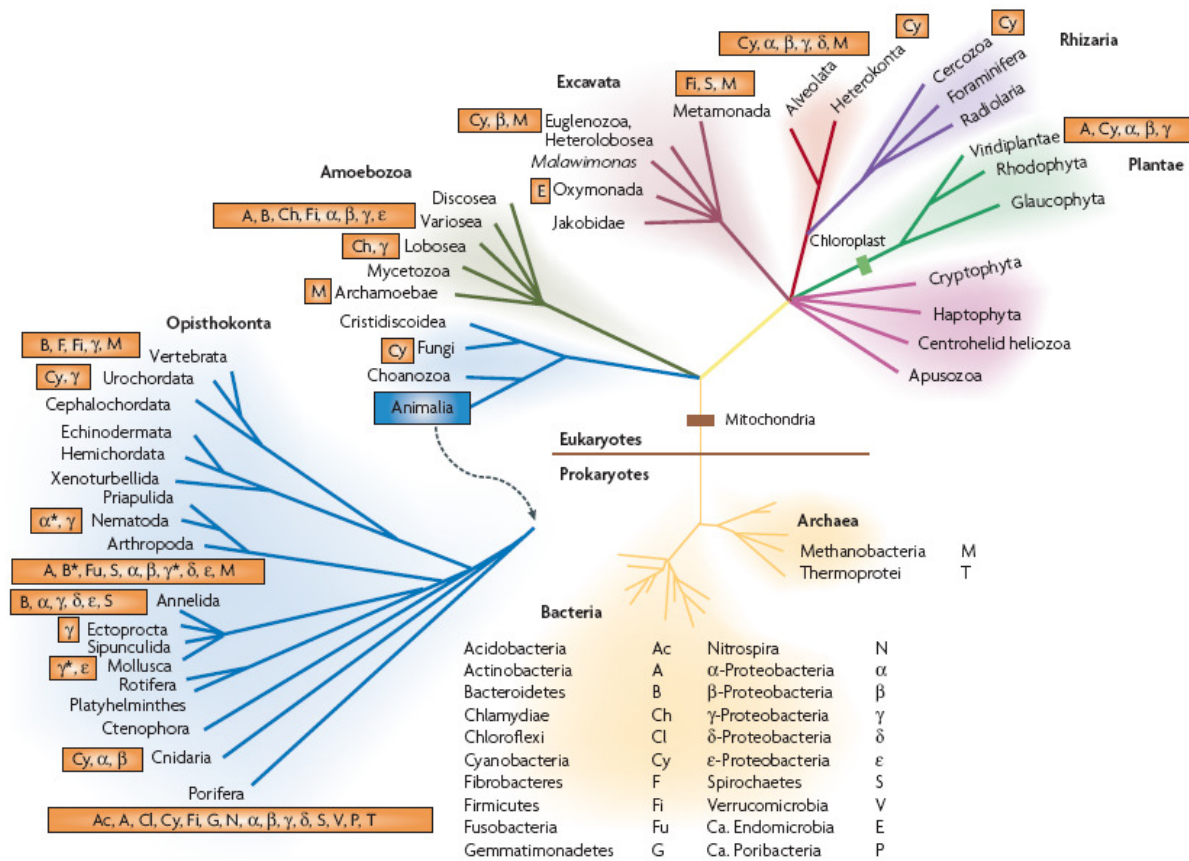


Figura 3 – Árvore filogenética com a distribuição das relações simbióticas, indicando as bactérias e arqueias com seus respectivos hospedeiros eucariotos. O asterisco indica que o genoma completo foi seqüenciado e está disponível. Fonte: Moya *et al.* (2008).

Existem diferentes formas de interação entre os procariotos e seus hospedeiros, que podem ser negativas (parasitismo) ou positivas (comensalismo e mutualismo) e estas podem estar relacionadas com o ambiente onde estes microrganismos se encontram (Little *et al.*, 2008). As relações entre o simbionte e o hospedeiro podem ser nomeadas como endossimbióticas (o simbionte está localizado dentro da célula hospedeira) e ectossimbióticas (o simbionte está localizado fora da célula hospedeira) (Moya *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2009).

Esta diversidade de interações inclui bactérias que desempenham funções que são comuns às necessidades de diversos hospedeiros, como as bactérias que auxiliam na digestão e vivem no trato gastrointestinal de diversos vertebrados e invertebrados (Figura 3). Também existem bactérias que exercem atividades incomuns, como a bioluminescência, que se desenvolveram em poucos hospedeiros (Madigan *et al.*, 2004; Provorov *et al.*, 2008; Ruby, 2008). Existem associações que são utilizadas atualmente na agricultura, como a associação de bactérias fixadoras de nitrogênio com as raízes das leguminosas e gramíneas (Figura 3). Portanto, as associações entre microrganismos e eucariotos podem ser utilizadas como estratégias para a realização de diversas funções na natureza, como a ciclagem de nutrientes e outras aplicações biotecnológicas (Pernthaler *et al.*, 2008).

As interações entre os insetos e seus simbioses são diversas e essenciais na sobrevivência de vários representantes da classe Insecta. Estas interações são geralmente baseadas em aspectos nutricionais, onde o simbionte fornece nutrientes que não estão disponíveis na dieta do inseto e em troca ganha o suprimento de diversos metabólitos produzidos pelo inseto (Chaves *et al.*, 2009).

A abundância e diversidade de bactérias e arqueias simbióticas do trato gastrointestinal de cupins são bastante conhecidas. Aproximadamente de 10^6 a 10^8

células procarióticas estão presentes em um único trato gastrointestinal, sendo que a maioria são células bacterianas (Hongoh, 2010). Até o momento, esses procariotos simbiotes foram caracterizados como decompositores de lignino-celulose, ácido úrico e outros compostos aromáticos. Além disso, são capazes de realizar fixação de nitrogênio e produzir metano através de H_2 e CO_2 (Brune, 2006; Hongoh, 2010). Atualmente, somente 13 espécies de cupins superiores e inferiores tiveram sua microbiota intestinal investigada através da análise do gene de rRNA 16S. Estes estudos comprovaram a grande diversidade que existe no trato destes insetos, demonstrando que a maioria dos 1500 filotipos obtidos apresentou baixa similaridade com linhagens cultivadas e exclusividade em relação ao trato gastrointestinal (Hongoh, 2010).

1.5 – Os cupins e suas interações com o ambiente

A classe Insecta apresenta uma enorme diversidade, formando o maior grupo do reino animal, organizada em 32 ordens. A ordem Isoptera inclui os cupins que são um grupo complexo com 2900 espécies descritas e apresentam uma variação considerável em termos de comportamento social e nutricional (Lima & Costa-Leonardo, 2007).

Existem sete famílias na ordem Isoptera: *Mastotermitidae*, *Kalotermitidae*, *Termopsidae*, *Hodotermitidae*, *Serritermitidae*, *Rhinotermitidae* e *Termitidae* (Lima & Costa-Leonardo, 2007). Os cupins são insetos sociais que habitam regiões tropicais e temperadas, caracterizados por indivíduos com diferenças morfofisiológicas e apresentando uma divisão de trabalhos baseada na reprodução. A sociedade dos cupins apresenta apenas um casal capaz de reproduzir, o rei e a rainha. Os outros indivíduos são estéreis e são responsáveis pela defesa, os soldados, e pela busca do alimento e manutenção do cupinzeiro, os operários (Korb, 2007; Lima & Costa-Leonardo, 2007;

Hongoh, 2010). A alimentação dos jovens, dos soldados e dos reprodutores é realizada com a ajuda dos operários. Os operários são responsáveis por fornecer alimentação estomodeal - saliva ou alimento regurgitado - ou proctodeal - fezes líquidas ricas em simbiontes (Lima & Costa-Leonardo, 2007).

As famílias de cupins da ordem Isoptera são divididas em dois grupos baseados na anatomia do trato gastrointestinal e na constituição de seus simbiontes (Ohkuma, 2001). As famílias Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae e Rhinotermitidae são constituídas por cupins denominados inferiores, um grupo que possui populações diversas de procariotos e protistas flagelados simbiontes e um trato gastrointestinal simples. A família *Termitidae* é constituída por cupins denominados superiores que não apresentam simbiose com protistas flagelados, possuem uma maior diversidade nutricional e apresentam um trato gastrointestinal mais desenvolvido (Ohkuma, 2001; Lima & Costa-Leonardo, 2007) (Figura 4).

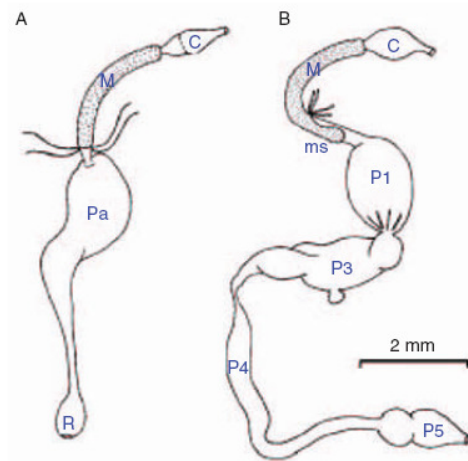


Figura 4 - Estrutura do trato gastrointestinal de um cupim inferior (A) e de cupim superior (B). Todos os cupins inferiores apresentam sua microbiota em um único compartimento dilatado do trato (Pa) que se reduz através do cólon em direção ao reto (R). Na maioria dos cupins superiores o trato é mais alongado e tem dilatações adicionais. Abreviações: estômago (C), intestino (M), segmento misto (ms), e segmento proctodeal (P1–P5). Fonte: Brune, 2006.

A alimentação dos cupins inferiores se restringe basicamente à madeira, enquanto a alimentação dos cupins superiores é mais diversa. Estes se alimentam de madeira, grama, líquen, solo e serrapilheira. A habilidade de degradar celulose transformou os cupins em pragas, apesar de somente 10% dos cupins serem responsáveis pelos estragos causados em construções (Lima & Costa-Leonardo, 2007; Hongoh, 2010).

Os cupins são considerados consumidores primários ou decompositores exercendo um papel ecológico de extrema importância para o ambiente, já que através do consumo de celulose eles atuam na reciclagem de nutrientes. Além disso, os cupins são insetos conhecidos como “engenheiros do solo” por sua enorme influência nas características do solo (Lima & Costa-Leonardo, 2007; Rückamp *et al.*, 2010).

O cupinzeiro construído por esses insetos geralmente é feito de matriz mineral misturada a fezes ou saliva, dependendo da espécie de cupim. Estas construções são a causa principal das modificações físicas, como a capacidade de conter água, densidade e estabilidade estrutural, e modificações químicas do solo, capacidade de troca de cátions e conteúdo de matéria orgânica (Fall *et al.*, 2007). Estas alterações podem afetar a atividade e a biodiversidade das bactérias, que são diretamente influenciadas por mudanças no solo (Bossio & Scow, 1998; Fierer & Jackson, 2006; Wu *et al.*, 2008; Carney & Matson, 2006; Jangid *et al.*, 2008).

Cornitermes cumulans (Kollar, 1932) é uma espécie de cupim, que pertence à família Termitidae, conhecida como “cupim de montículo” por causa dos enormes cupinzeiros que constrói e pela sua alta incidência em pastagens. Esta espécie é exclusiva da região neotropical e seus cupinzeiros são os mais abundantes no Brasil, principalmente no Cerrado, tornando-se uma espécie chave para este ecossistema. Esta espécie constrói ninhos utilizando matriz mineral e saliva que variam, em média, de 50 a 100 cm de altura. A alimentação desta espécie de cupim é baseada em serrapilheira – folhas, em geral, e raízes mortas de gramíneas (Constantino, 2005; Buschini, 2006; Lima & Costa-Leonardo, 2007). Não foi encontrada na literatura caracterização da microbiota do trato gastrointestinal de *Cornitermes cumulans* e do solo de seu cupinzeiro, embora já seja conhecida em outras 13 espécies.

A diversidade filogenética bacteriana já foi investigada em cinco espécies de cupins inferiores e oito espécies de cupins superiores. Das 13 espécies que tiveram a microbiota estudada, nove se alimentam de madeira (*Cryptotermes cavifrons*, *Coptotermes formosans*, *Reticulitermes flavipes*, *Reticulitermes speratus* e *Reticulitermes* sp. RPK, *Odontotermes formosanus*, *Microcerotermes* spp. *Nasutitermes ephratae* e *Nasutitermes takasagoensis*), duas espécies se alimentam de serrapilheira

(*Macrotermes gilvus* e *Macrotermes michaelseni*) e duas se alimentam apenas de solo (*Cubitermes orthognathus* e *Termes comis*). Esses estudos revelaram a presença de 24 filos bacterianos (Figura 5). Os filos encontrados mais frequentemente no trato gastrointestinal de cupins são Firmicutes, Spirochaetes, Proteobacteria e Bacteroidetes.

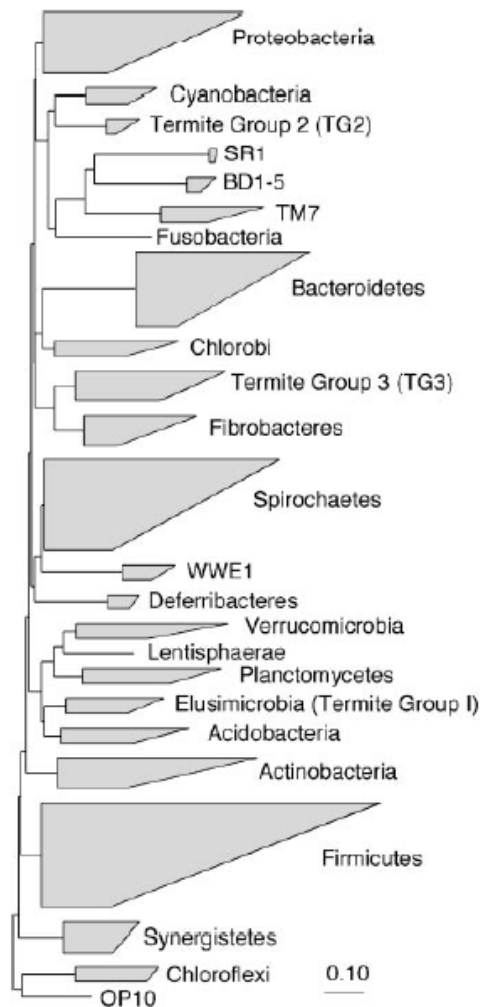


Figura 5 – Árvore mostrando a diversidade bacteriana no trato gastrointestinal de várias espécies de cupins

A identificação da microbiota do trato gastrointestinal de cupins e do solo do cupinzeiro tem revelado uma grande diversidade de bactérias não afiliadas a qualquer

filo do domínio Bacteria, podendo estas, então, representarem novos taxons (Dillon & Dillon, 2004). Portanto, a análise da biodiversidade no solo do cupinzeiro é essencial para se conhecer o funcionamento e as modificações causadas por esse inseto no ambiente.

2 – OBJETIVOS

2.1-Objetivo Geral

Identificar e avaliar a diversidade filogenética de bactérias e arqueias em solo do cupinzeiro (Cerrado) e de seu agente *Cornitermes cumulans*.

2.2- Objetivos específicos

1. Analisar os fatores abióticos da amostra de solo do cupinzeiro da espécie *Cornitermes cumulans* e compará-los com a do solo de referência.
2. Analisar o perfil de restrição dos amplicons do gene de rRNA 16S (ARDRA) das amostras do cupim e dos solos do cupinzeiro e de referência.
3. Obter e analisar, por método independente de cultivo, seqüências do fragmento do gene de rRNA 16S da microbiota do solo do cupinzeiro (bactéria e arqueia) e do cupim (bactéria).
4. Avaliar a diversidade filogenética das amostras do cupim e do solo do cupinzeiro.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Área de Estudo

O cupinzeiro de *Cornitermes cumulans*, em estudo, possui 1,03 m de altura e localiza-se na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais (19°52'36" S - 43°58'16" W), Campus Pampulha, em uma região caracterizada como Campo Sujo, ecossistema exclusivamente herbáceo-arbustivo, pertencente ao bioma Cerrado.

3.1 – Amostragens

Cem cupins (CP) da espécie *Cornitermes cumulans*, 250 g do solo do cupinzeiro (SC) e 250 g do solo de referência (SR), distante 60 cm do cupinzeiro amostrado, foram coletados assepticamente. A abertura efetuada na parede do cupinzeiro para a coleta do solo foi de 40 cm de profundidade (Figura 6A). Após 48 horas, esta abertura havia sido restaurada, indicando intensa atividade dos cupins (Figura 6B).



Figura 6A – Imagens do cupinzeiro da espécie *Cornitermes cumulans* e da coleta das amostras de solo da superfície e das galerias internas do cupinzeiro.



Figura 6B – Imagem da abertura do cupinzeiro restaurada pela atividade dos cupins.

3.2 - Determinações de fatores abióticos e identificação taxonômica do cupim

A composição mineral quantitativa das amostras de SC e SR foi determinada utilizando o Extrator Mehlich 1 para quantificação de P, Fe, Zn, Mn e Cu, o Extrator KCl – 1mol/L – para quantificação de Ca, Mg e Al e o Extrator Acetato de Cálcio – 0,5mol/L para quantificação de H+Al e análise granulométrica. Essa análise foi realizada no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. A identificação taxonômica do cupim foi realizada pela Unidade Laboratorial de Referência em Pragas Urbanas, Instituto Biológico de São Paulo, 15 operárias foram fixadas em etanol 70% e enviadas juntamente a fotos do cupinzeiro para a identificação.

3.3 - Extração de DNA total

O DNA total das amostras dos SC e SR foi extraído utilizando-se o UltraClean® Mega Soil DNA Isolation Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração do DNA total da amostra SC, solo da parte interna e da parte externa da parede do

cupinzeiro foi misturado em proporções iguais. A extração do DNA total do cupim foi realizada de acordo com Corby-Harris *et al.* (2007). Antes da extração do DNA total dos cupins, esses foram inicialmente lavados da seguinte maneira: água destilada estéril (5x), etanol 70% (5x), seguido de hipoclorito de sódio 6% (5x) e finalizando com água destilada esterelizada (5x). Em seguida, os cupins foram macerados utilizando nitrogênio líquido. O macerado foi então colocado em tubo de 1,5 ml e ressuspensionado em 200 µl de tampão STE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA e 150mM NaCl), acrescido de lisozima (4mg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 40 µl de SDS 10% acrescidos de proteinase K (0,2 mg/ml). A suspensão foi misturada com o auxílio de um vortex e incubada a 55°C, por 10 horas. Após este período, adicionou-se RNase A (Invitrogen) e incubou por 1 hora a 37°C. Posteriormente, 500 µl de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) foram adicionados e centrifugou-se a velocidade de 13.200 rpm (Eppendorf), por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionaram-se 500 µl de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O tubo foi centrifugado a 13.200 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo adicionado 1 ml de etanol 100%. Então, o tubo foi invertido de 3 a 5x e centrifugado a velocidade 13.200 rpm por 10 minutos. Após isto, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1,5 ml de etanol 70%. Centrifugou-se a 13.200 rpm, por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O tubo foi mantido à temperatura ambiente até que o sedimento de DNA ficasse totalmente seco e, em seguida, o sedimento de DNA foi ressuspensionado em 30 µl de água bideionizada esterelizada (milliQ^R). Os DNAs das amostras de SC, SR e CP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), em uma tensão de 80 volts e visualizado sob luz ultravioleta.

3.4 - Amplificação por PCR do gene de rRNA 16S

Fragmentos dos genes de rRNA 16S de bactéria foram amplificados por PCR *touchdown*. As reações foram conduzidas com os iniciadores 8f (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') e 907r (5' TACGGHTACCTTGTTACGACTT 3') (Lane, 1991) específicos para bactéria, gerando um amplicon de 899 pb e os iniciadores 16SAf (5'TTATTGGGCCTAAAGCRT3') e 1400Ar (5' CGGCGAATTCGTGCAAGGAGCAGGGAC 3') de acordo com Clementino *et al.* (2007), específicos para arqueia, gerando um amplicon de 850 pb. A mistura para a reação da PCR (20 µL) consistia de 40 ng de DNA molde, tampão de PCR, 0,5 µM de cada um dos iniciadores, 0,4 mM de cada dNTP e 1 U de *Dreamtaq* polimerase (Fermentas, Canadá). A PCR foi conduzida em um termociclador (Eppendorf) e as condições para amplificação dos genes de rRNA 16S de bactéria e arqueia estão descritas na Tabela 1. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e foram eluídos do gel utilizando-se o kit DNA Extraction Kit (Fermentas, Canadá), de acordo com instruções do fabricante.

Tabela 1 – Condições da PCR para a amplificação do gene de rRNA 16S de bactérias e arqueias.

Etapas	Bactéria		Arqueia	
	Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial	94	5 minutos	94	2 minutos
Desnaturação	94	1 minuto	94	1 minuto
Anelamento dos iniciadores	53 – 45*	1 minuto	55**	1 minuto
Extensão	72	3 minutos	72	3 minutos
Extensão final	72	10 minutos	72	30 minutos

* A temperatura cai 1°C a cada dois ciclos (uma repetição por temperatura);

**Repetição do ciclo – 30 vezes;

3.5 – Perfil de restrição do amplicon do gene de rRNA 16S

Os amplicons do gene de rRNA 16S foram digeridos separadamente com três enzimas de restrição que reconhecem seqüências de quatro (*Alu I*) e seis (*NlaIV* e *AflIII*) nucleotídeos, de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA). O perfil de restrição foi analisado em gel de poliacrilamida 6% em tampão Tris–Borate–EDTA (TBE). Após a eletroforese a 200 V por 1 hora, o gel foi fotografado e os perfis foram analisados usando o programa BioNumerics versão 6.0 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Belgium). As imagens dos géis digitalizadas foram convertidas e normalizadas usando o marcador 50 pb plus (Ludwig Biotec). A similaridade entre os perfis foi calculada usando o coeficiente de correlação de Pearson. A análise do agrupamento foi gerada usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

3.6 - Construção de bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S

Os amplicons purificados do gene de rRNA 16S foram clonados no vetor pJET1.2/blunt Cloning Vector utilizando o CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Canadá), de acordo com as instruções do fabricante. A bactéria *Escherichia coli* XL1 Blue eletrocompetente foi transformada e semeada em placas contendo meio LB, suplementado com ampicilina (100 µg/ml), as quais foram incubadas a 37°C, por 18 horas. As colônias contendo os plasmídios com os insertos foram selecionadas através da resistência à ampicilina. Essas colônias foram transferidas, com palitos esterilizados, para microplacas com 96 poços contendo 300 µl de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg /mL) e glicerol (25% v/v), incubadas a 37°C por 24 horas e estocadas a -80°C.

3.7 - Extração do DNA plasmidiano, seqüenciamento do gene de rRNA 16S e análise filogenética

Plasmídeos contendo os insertos de rDNA 16S foram extraídos, utilizando-se GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Canadá), de acordo com as instruções do fabricante, e os insertos foram amplificados por PCR, usando iniciadores específicos do vetor pJET1.2 *forward* (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') e pJET1.2 *reverse* (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'), para a verificação do tamanho do fragmento contido no vetor. A mistura da reação consistia de 150 ng do DNA plasmidiano, DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit e 0,5 µM de cada um dos iniciadores, resultando em 10 µL do volume total. A reação foi colocada em um termociclador utilizando um programa com os seguintes passos: desnaturação por 2 segundos a 95°C, avançando para 35 ciclos de desnaturação por 25 segundos a 95°C, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão por 3 minutos a 60°C. As seqüências parciais foram checadas para a qualidade, alinhadas e editadas para a produção de um consenso usando os programas Phred v.0.020425 (Erwing & Green, 1998), Phrap v.0.990319 (Green, 1994) e Consed 12.0 (Gordon *et al.*, 1998). As seqüências foram comparadas com os bancos de dados disponíveis, usando-se as ferramentas de pesquisa do GenBank BLASTN e RDP Seqmatch para determinar as afiliações filogenéticas aproximadas.

As OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) foram definidas a partir do programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005), considerando o nível de distância genética de 3%, uma vez que níveis $\geq 97\%$ de similaridade entre seqüências têm sido proposto para classificar um microrganismo em nível de espécie (Drancourt *et al.*, 2000). A cobertura das bibliotecas foi calculada usando-se a equação $C = 1 - (n/N) \times 100$, onde n

significa o número de OTUs e N o número de seqüências analisadas na biblioteca (Good, 1953). As relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se o programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) usando-se o método neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Determinações de fatores abióticos

A análise dos fatores abióticos mostrou que os solos investigados possuem diferentes composições (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantificação dos parâmetros físico-químicos dos solos do cupinzeiro (SC) e de referência (SR).

Amostras de solo	Parâmetros										
	pH	P*	K*	Ca ²⁺ **	Mg ²⁺ **	Al ²⁺ **	H+Al**	Zn*	Fe*	Mn*	Cu*
SR	5,23	1,6	40	0,98	0,28	0,67	4,9	1,21	27,4	5,3	0,32
SC	5,7	1,5	138	3,64	0,89	0,2	6,1	4,61	128,2	49,5	1,27

* mg/dm³

** cmol_c/dm³

Os resultados obtidos confirmam o enriquecimento de todos os minerais do solo do cupinzeiro (SC) em relação ao solo de referência (SR), exceto do Al. Este dado pode ser explicado pelo fato da concentração de Al²⁺ e o pH do solo estarem intimamente relacionados: em pHs ácidos ocorre uma alta fixação do Al²⁺, fazendo com que a concentração deste mineral seja alta, enquanto em pH alcalino ocorre deficiência desse mineral (Camargos, 2005). Além disso, a concentração menor de Al no solo do cupinzeiro pode ser explicada também por este íon formar complexos com a matéria orgânica do solo (Santi Sarcinelli et al., 2009). Portanto, espera-se uma menor concentração de Al²⁺ na amostra SC onde o pH e a concentração de matéria orgânica foi ligeiramente maior do que da amostra SR. Por outro lado, todos micronutrientes detectados (Zn, Fe, Mn e Cu) apresentaram maiores concentrações na amostra SC do que na amostra SR.

Segundo Holt & Lepage (2000), os cupinzeiros possuem altas concentrações de Ca, Mg e K quando comparados com solos adjacentes. Esse enriquecimento ocorre porque os cupins selecionam no solo adjacente partículas ricas desses minerais para a construção de seus ninhos. De acordo com Camargos (2005), a quantidade de P disponível nos solos do cupinzeiro e de referência é relativamente baixa e não apresentou diferenças significativas. Esse resultado do P é diferente dos resultados geralmente encontrados, onde o solo do cupinzeiro apresenta uma maior concentração de P do que o solo de referência (Santi Sarcinelli et al., 2009). A análise granulométrica revelou que as amostras SR e SC são argilosas, pois apresentaram 41% e 50% de teor de argila, respectivamente, propriedade característica do Cerrado.

4.2 - Amplificação, construção e análise das bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S de bactéria e arqueia

As técnicas clássicas (por exemplo cultivo) de identificação das comunidades procarióticas, utilizadas desde o início da microbiologia, não são adequadas para o estudo das comunidades ambientais porque não abrangem a sua real diversidade. As técnicas independentes de cultivo permitiram superar essa dificuldade tendo sido de grande importância para a descoberta do imenso mundo microbiano pois apenas ínfima parte dele (menos de 1%) é cultivável nas condições clássicas de laboratório. Portanto, para análise da diversidade de ambientes complexos como o solo é essencial a utilização de técnicas independentes de cultivo para uma visão real da comunidade de procariotos presentes na amostra.

Neste estudo a amplificação do fragmento do gene de rRNA 16S de bactérias das amostras de SR e SC e do CP foi realizada com sucesso (Figura 7).

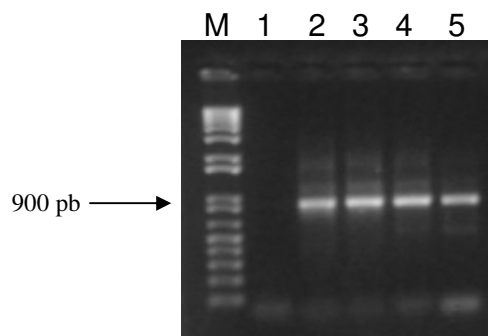


Figura 7 – Amplicons do fragmento do gene de rRNA 16S de bactéria em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); 1: controle negativo; 2 a 4: amostras de SC, SR e CP e 5: C+.

Por outro lado, a amplificação do gene de rRNA 16S para arqueias só foi obtida para a amostra SC (Figura 8), embora inúmeras modificações para a amplificação das amostras SR e CP fossem testadas como: tipos de Taq polimerase, tampão para PCR (KCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), concentrações de MgCl_2 (1 mM a 2,5 mM), concentrações de iniciadores (0,2 μM a 0,5 μM) e quatro iniciadores específicos para arqueia 16SAf (5'-TTATTGGGCCTAAAGCRTC-3') e 1400Ar (5'-CGGCGAATTCGTGCAAGGAGCAGGGAC-3') (Clementino *et al.*, 2007); 25F (5'-CYGGTTGATCCTGCCRG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane *et al.* 1991); 21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') e 958R (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'), (DeLong, 1992); mcrA-F (5'-GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWASCGC-3') e mcrA-R (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3') (Luton *et al.*, 2002).

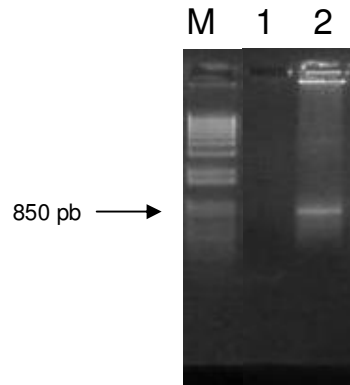


Figura 8 – Amplicon do fragmento do gene de rRNA 16S de arqueia em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); 1: controle negativo; 2: amostra de SC.

De acordo com Hongoh (2010), as bactérias são predominantes no trato gastrointestinal de cupins, sendo pequena a presença de arqueias, variando de 0 a 10% das células procarióticas presentes no trato das espécies de cupins já estudadas. Portanto, a ausência de amplificação pode ser explicada pela falta ou baixa quantidade de arqueias no trato gastrointestinal de *Cornitermes cumulans*, não tendo sido detectada pela PCR. Além disso, de acordo com Brune (2006) a quantidade de arqueias no trato gastrointestinal dos cupins aparentemente está relacionada com a dieta. Em cupins que se alimentam de serrapilheira ou madeira, como *Cornitermes cumulans*, a quantidade de arqueias é menor (0,1 a 1,7%), enquanto em cupins que se alimentam de solo é de 1,4 a 3,1%.

As bibliotecas dos genes de rRNA 16S específicos para bactérias (SC e CP) e arqueias (SC) foram construídas e apresentaram cerca de 1000, 500 clones e 400 clones, respectivamente. As bibliotecas foram validadas a partir da amplificação dos insertos utilizando-se iniciadores específicos do vetor pJET1.2/blunt.

4.3 – Perfil de restrição do amplicon do rDNA16S bacteriano

ARDRA é uma técnica simples baseada na análise de restrição por digestão do rDNA 16S amplificado. Essa técnica vem sendo bastante utilizada para análises das mudanças na estrutura das comunidades bacterianas (Kent & Triplett, 2002). A análise de restrição da sequência do gene de rRNA 16S foi realizada utilizando-se três enzimas de restrição para comparar as comunidades bacterianas das amostras CP, SC e SR (Figura 9).

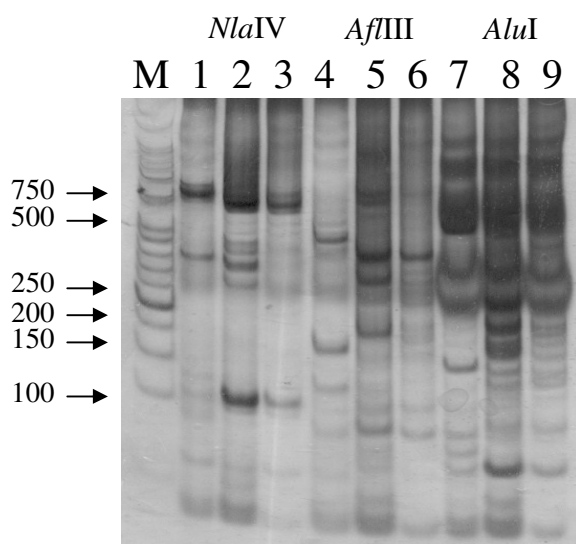


Figura 9 – Perfil de restrição dos amplicons dos genes de rRNA 16S das amostras de CP, SC e SR utilizando três diferentes enzimas de restrição. M: marcador de peso molecular 50 pb Plus (Ludwig Biotec); 1 a 3: amplicons de CP, SC e SR digeridos com *NlaIV*; 4 a 6: amplicons de CP, SC e SR digeridos com *AfIII*; 7 a 9: amplicons de CP, SC e SR digeridas com *AluI*.

A análise dos perfis ARDRA obtidos com as enzimas de restrição *NlaIV*, *AfIII* e *AluI* revelou que 10 a 14, 12 a 14 e 11 a 15 fragmentos, respectivamente, foram detectados, com tamanhos variando de 50 a 1200 pb. Das três enzimas de restrição

testadas *AluI* mostrou melhor capacidade em distinguir diferentes seqüências do gene de rRNA 16S das amostras CP, SC e SR. O dendrograma (Figura 10) gerado a partir do *fingerprint* ARDRA/*AluI* mostrou que os três ambientes analisados possuem uma microbiota distinta, sendo que as comunidades bacterianas das amostras CP e SR foram as mais próximas (85% de similaridade), enquanto a amostra SC foi a mais dissimilar (40% de similaridade).

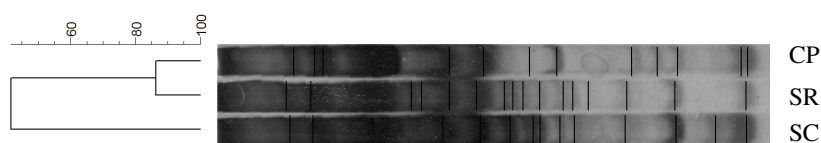


Figura 10 – Dendrograma gerado pelo *fingerprint* ARDRA/*AluI*. CP, cupim; SC, solo do cupinzeiro e SR solo de referência. A similaridade (%) entre as amostras foi calculada usando o coeficiente de Pearson, e os dados foram agrupados utilizando o UPGMA.

De acordo com Holt & Lepage (2000), a maioria dos cupins cava, constrói e se alimenta do e no solo durante toda sua vida. Além disso, eles constroem seus ninhos utilizando o solo adjacente, acrescido de saliva e (ou) fezes (Fall *et al.*, 2007). Essa íntima relação pode fazer com que a microbiota do trato gastrointestinal de *Cornitermes cumulans* seja mais similar ao solo adjacente do que ao solo do cupinzeiro. Em contraste, Fall *et al.* (2007), usando a técnica de eletroforese em gel gradiente desnaturante (DGGE), observaram uma maior similaridade entre a microbiota do trato gastrointestinal de *Cubitermes niokoloensis* e do solo do cupinzeiro do que da microbiota do solo adjacente. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de *Cornitermes cumulans* se alimentar apenas de serrapilheira enquanto *Cubitermes niokoloensis* se alimenta apenas

de solo. Além disso, *Cornitermes cumulans* constrói seu ninho utilizando saliva, ao contrário do *Cubitermes niokoloensis* que utiliza fezes.

4.4 - Diversidade das bibliotecas de clones de rDNA 16S

Para a análise filogenética das bibliotecas de bactérias SC e CP e de arqueia SC, 151, 8 e 40 clones, respectivamente, foram selecionados aleatoriamente e seqüenciados. Vinte e sete seqüências foram identificadas como quimeras e excluídas das análises posteriores (Tabela 3). Os clones que apresentaram a mesma seqüência foram considerados como pertencentes a uma mesma OTU. A maioria das seqüências teve identidade com bactérias não cultiváveis obtidas dos mais variados ambientes, com predominância do solo (Tabela 4).

Tabela 3 - Análise dos clones, diversidade das seqüências e cobertura das bibliotecas de bactéria e de arqueia das amostras do solo do cupinzeiro (SC) e do cupim (CP).

Amostras	SCB	SCA	CPB
Clones	151	40	8
Quimeras*	25	2	0
OTUs	67	2	8
Cobertura da biblioteca (%)	65	95	10
Índice de Shannon	394,9	0,12	204,3
Índice de Simpson	0,018	0,94	0.027
Chao 1	145	2	18,5
ACE	175	0	36

* Seqüências quiméricas foram incluídas no número total de clones, mas excluídas da análise filogenética.

B, bactéria e A, arqueia.

Os índices de diversidade são geralmente utilizados para comprovar a riqueza da comunidade em determinado ambiente (Hill *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2001). Os índices de diversidade de Shannon-Weaver e Simpson avaliam a diversidade dos clones, sendo que o primeiro é determinado pela riqueza das OTUs detectadas e o segundo é influenciado pela abundância da OTU mais comum na amostra (Hughes *et al.*, 2001). Os

índices ACE e Chao1 avaliam a riqueza de OTUs. Os índices de Shannon-Weaver e Simpson e os valores ACE e Chao1 obtidos mostraram que a biblioteca de bactéria SC teve uma alta diversidade e a biblioteca de arqueia SC uma baixa diversidade (Tabela 3).

A curva de rarefação da biblioteca de bactéria SC foi obtida comparando o número de OTUs encontradas em relação ao número de clones seqüenciados (Figura 11). A curva demonstrou uma tendência à estabilidade do número de OTUs detectadas, indicando que a maior parte das bactérias presentes nesse ambiente foi provavelmente detectada. Este resultado foi suportado pelo cálculo da cobertura da biblioteca que foi de 65%. A cobertura da biblioteca de arqueia foi de 95% indicando que a maioria da diversidade de arqueias da amostra foi detectada. As curvas de rarefação relativas às bibliotecas de arqueia SC e de bactéria CP não foram construídas devido ao número baixo de OTUs detectadas. O número de clones analisados da biblioteca de bactérias CP alcançou apenas 10% da cobertura indicando a necessidade de um número maior de clones seqüenciados para a detecção da diversidade de bactérias presentes nessa amostra.

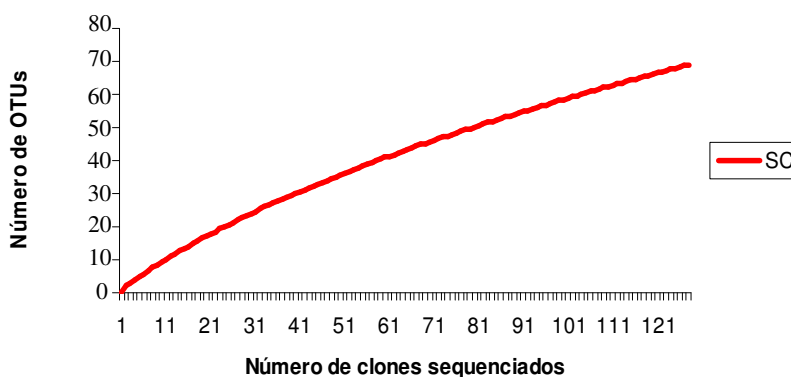


Figura 11 - Curva de rarefação observada dos clones seqüenciados contendo o gene rRNA 16S bacteriano e do número de OTUs da biblioteca SC.

A análise filogenética do fragmento do gene de rRNA 16S revelou que as 67 OTUs afiliaram-se a dez filós: Actinobacteria (31%), Proteobacteria (18%), Bacteria_incertae_sedis (10,5%), Acidobacteria (9%), Firmicutes (7,5%), Planctomycetes (7,5%), Bacteroidetes (4,5%), Verrucomicrobia (1,5%), Chloroflexi (1,5%), e Gemmatimonadetes (1,5%) (Figura 12). Cinco OTUs foram afiliadas a Unclassified Bacteria (7,5%). Essas seqüências sugerem a presença de novos filós que ainda não foram descritos.

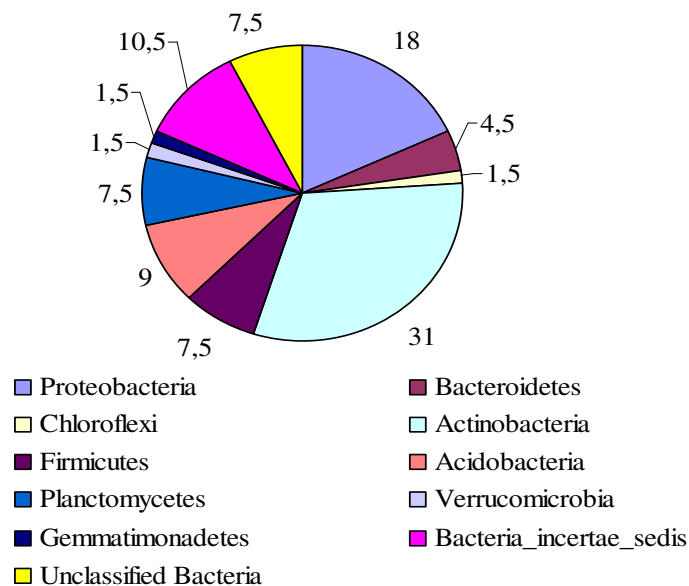


Figura 12 - Distribuição das OTUs da biblioteca do gene de rRNA 16S bacteriano do solo do cupinzeiro. Os números indicam a porcentagem representativa de cada filo na biblioteca.

As 21 OTUS afiliadas a Actinobacteria, filo predominante na biblioteca, foram representadas pelas sub-classes *Actinobacteridae*, *Rubrobacteridae* e *Acidimicrobidae*. Dentre os gêneros representados encontram-se: *Marmoricola*, *Nocardioides*,

Planosporangium, *Pseudonocardia* e *Actinomadura* (Tabela 4 e Figura 13A). Dentre as 12 OTUs do filo Proteobacteria, as classes α -, β - e γ -proteobacteria estavam presentes. A classe α -proteobacteria (10 OTUs) foi representada pelos gêneros *Caulobacter* (3 OTUs), e *Porphyrobacter* (1 OTU), *Bradyrhizobium* (1 OTU) e β -proteobacteria somente pelo gênero *Burkholderia* (1 OTU) (Tabela 4 e Figura 13B).

O filo Acidobacteria foi representado por 6 OTUs, todas relacionadas a bactérias do solo, da classe *Acidobacteria_Gp1*. As OTUS afiliadas aos filos Firmicutes (5 OTUs), Planctomycetes (5 OTUs), Bacteroidetes (3 OTUs), Verrucomicrobia (1 OTU), Chloroflexi (1 OTU) e Gemmatimonadetes (1 OTU) foram todas detectadas em baixa frequência (Tabela 4 e Figura 13C).

O solo é o habitat que contém os mais diversos macro e microrganismos, sendo as bactérias o maior grupo tanto em número de células quanto em diversidade. Os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrumicrobia, Firmicutes e Planctomycetes são detectados em alta frequência em estudos sobre a microbiota de diversos tipos de solo. Os quatro primeiros filos representam mais de 75% das seqüências do gene de rRNA 16S encontradas em bibliotecas de amostras de solo (Hugenholtz *et al.*, 1998; Kent & Triplett, 2002; Zhang & Xu, 2008). Em uma análise da microbiota de solo de Cerrado preservado e de solo de Cerrado transformado em pastagens, houve predominância do filo Proteobacteria (27 e 32%) seguido por, Actinobacteria (20 e 30%) e Acidobacteria (10 e 20%), respectivamente. Além disso, eles identificaram os gêneros *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (Proteobacteria), que têm como uma das atividades no solo a fixação de nitrogênio e estimulação do crescimento de plantas, respectivamente (Hennecke, 1990; Preisig *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 2005).

Estudos anteriores sobre a microbiota dos ninhos de *Odontotermes yunnanensis* e de *Cubitermes niokoloensis* têm sido relatados. Em nossa amostra, as bactérias foram

afiliadas a 10 filos (Figura 12). Em outros estudos, usando DGGE (Fall *et al.* 2007) e a região do ITS e construção de bibliotecas de clones do gene de rRNA 16S seguida de seqüenciamento (Long *et al.*, 2010), as bactérias foram afiliadas a 6 e 4 filos, respectivamente. Verrucomicrobia, Planctomycetes, Gemmatimonadetes e Bacteria_incertae_sedis foram detectados em nossa análise, mas não foram observados por Long *et al.* (2010) e Fall *et al.* (2007). Além disso, Chloroflexi foi identificado neste estudo e por Fall *et al.* (2007). Em contraste, Firmicutes foi o filo predominante (77%) no estudo de Long *et al.* (2010).

Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da amostra SC.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Seqüência ou Microrganismo próximo	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
Actinobacteria	21	1	<i>Marmoricola</i> sp.	GQ339891.1	98	Solo de campo de ginseng
		3	<i>Marmoricola</i> sp.	DQ448721.1	97	Sedimento marinho
		1	<i>Nocardioides</i> sp.	GQ339903.1	94	Solo de campo de ginseng
		1	<i>Propionibacterineae</i> bacterium	AB271050.1	98	Solo de campo de ginseng
		6	<i>Nocardioides</i> sp.	AB183711.2	95	Sedimento de leito de rio
		1	Uncultured <i>Rubrobacteridae</i> bacterium	AY395403.1	96	Solo de pastagem
		4	<i>Actinomycetales</i> strain	AF408964.1	97	Solo
		2	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone	GQ203333.1	94	Solo de floresta descídua
		1	Uncultured <i>Rubrobacteraceae</i> bacterium	EF073491.1	94	Solo de pastagem

Continuação Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da amostra SC.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Seqüência ou Microrganismo próximo	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
		2	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone	EF219772.1	97	Solo sob musgos
		1	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone	GQ203304.1	97	Solo de floresta descídua
		1	<i>Actinomycetales</i> strain	AF408985.1	96	Solo
		1	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone	EU298132.1	97	Solo de agricultura
		1	<i>Planosporangium flavigriseum</i>	AM232832.1	99	Solo
		1	Uncultured <i>Actinobacterium</i>	GU168003.1	91	Solo
		2	Uncultured <i>Rubrobacteridae</i> bacterium	AY150911.1	96	Superfície de solo com grama
		2	Uncultured <i>Pseudonocardia</i> clone	AY494649.1	97	Brânquia de salmão
		1	Uncultured <i>Actinobacterium</i> clone	GQ203393.1	99	Solo de floresta descídua
		1	Uncultured <i>Actinobacterium</i> clone	GQ203330.1	95	Solo de floresta descídua
		1	<i>Actinomadura</i> sp.	FJ462361.1	93	Sedimento marinho
		1	Uncultured <i>Acidimicrobiaceae</i> bacterium	AB517669.1	93	Solo vulcânico
Proteobacteria	12	8	Uncultured <i>Rhodospirillaceae</i> bacterium	AM159371.1	99	Raiz de arroz e rizosfera
		1	<i>Burkholderia</i> sp.	EF495209.1	99	Solo
		8	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.	FJ889262.1	99	Solo agrícola

Continuação Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da amostra SC.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Seqüência ou Microrganismo próximo	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
		1	Uncultured <i>Acetobacteraceae</i> bacterium	AM934721.1	87	Solo contaminado com hidrocarboneto
		1	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.	DQ188371.1	97	Lavado bronco- alveolar de crianças com fibrose cística
		1	Uncultured <i>Porphyrobacter</i> sp.	EU299496.1	97	Pastagens restauradas
		1	Uncultured bacterium clone	EU148696.1	96	Microbiota do intestino de um besouro
		3	Uncultured <i>Crenotrichaceae</i> bacterium	EF019007.1	99	Rizosfera com diferentes concentrações de CO ₂
		2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	HM125059.1	99	Nódulo de raiz
		1	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.	FJ889262.1	96	Solo agrícola
		1	Uncultured <i>Alpha</i> <i>proteobacterium</i>	EF613898.1	99	Solo agrícola plantado com arroz geneticamente modificado
		1	Uncultured <i>Hyphomicrobiaceae</i> bacterium	EF020320.1	96	Rizosfera com diferentes concentrações de CO ₂
Bacteria_incertae_ sedis	7	1	<i>Ktedonobacter</i> <i>racemifer</i>	AB510917.2	97	Solo
		1	Bacterium SOSP1-79	AM180160.1	94	Solo
		2	Uncultured bacterium clone	EF516062.1	89	Solo de pastagem
		4	Bacterium SOSP1-79	AM180160.1	93	Arenito endolítico
		7	Bacterium SOSP1-79	AM180160.1	98	Solo
		1	Uncultured bacterium clone	AY425783.1	90	Depósito vulcânico
		1	Uncultured bacterium clone	AY425783.1	92	Depósito vulcânico
Acidobacteria	6	3	Uncultured <i>Edaphobacter</i> sp.	EU440643.1	98	Solo agrícola

Continuação Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da amostra SC.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Seqüência ou Microrganismo próximo	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
		1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium	EF073913.1	99	Solo de pastagem
		3	Uncultured <i>Acidobacteriales</i> bacterium	EF075617.1	98	Solo de floresta
		1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium	EF072654.1	98	Solo agrícola
		1	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium	FJ870604.1	98	Solo de floresta
		1	Uncultured <i>Acidobacteriales</i> bacterium	EF075617.1	99	Solo de floresta
Firmicutes	5	2	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	EF073401.1	97	Solo de pastagem
		1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	EF073550.1	97	Solo de pastagem
		2	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	EF073550.1	96	Solo agrícola
		1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	EF072422.1	95	Solo agrícola
		1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	EF072000.1	96	Solo agrícola
Planctomycetes	5	2	Uncultured <i>Eubacterium</i> clone	AJ292687.1	95	Solo contaminado com bifenil
		1	Uncultured bacterium clone	HM845824.1	95	Swab de pele de camundongo
		2	Uncultured bacterium clone	EF516309.1	96	Solo de pastagem
		1	<i>Planctomycetales</i> bacterium	AY673166.1	95	Solo
		1	Uncultured bacterium clone	EU299519.1	94	Pastagem restaurada
Unclassified Bacteria	5	7	Uncultured bacterium clone	FJ360644.1	98	Rocha basáltica subglacial
		1	Uncultured bacterium clone	EU134696.1	93	Solo de pradaria

Continuação Tabela 4 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones bacterianos da amostra SC.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Seqüência ou Microrganismo próximo	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
		1	Uncultured bacterium clone	GU219637.1	97	Depósito vulcânico
		1	Uncultured bacterium clone	HQ445651.1	98	Saprólito de quartzos
		2	Uncultured bacterium clone	EU135006.1	89	Solo
Bacteroidetes	3	3	<i>Segetibacter koreensis</i>	AB267478.1	96	Solo de campo de ginseng
		1	Uncultured bacterium clone	HM270463.1	98	Pele do antebraço
		1	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium	FM866275.1	94	Mina de rejeito de urânio
Chloroflexi	1	2	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium	AY922056.1	93	Solo agrícola
Verrucomicrobia	1	1	Uncultured bacterium clone	EU335421.1	98	Solo
Gemmatimonadetes	1	1	Uncultured <i>Gemmatimonadetes</i> bacterium	EF663076.1	93	Solo

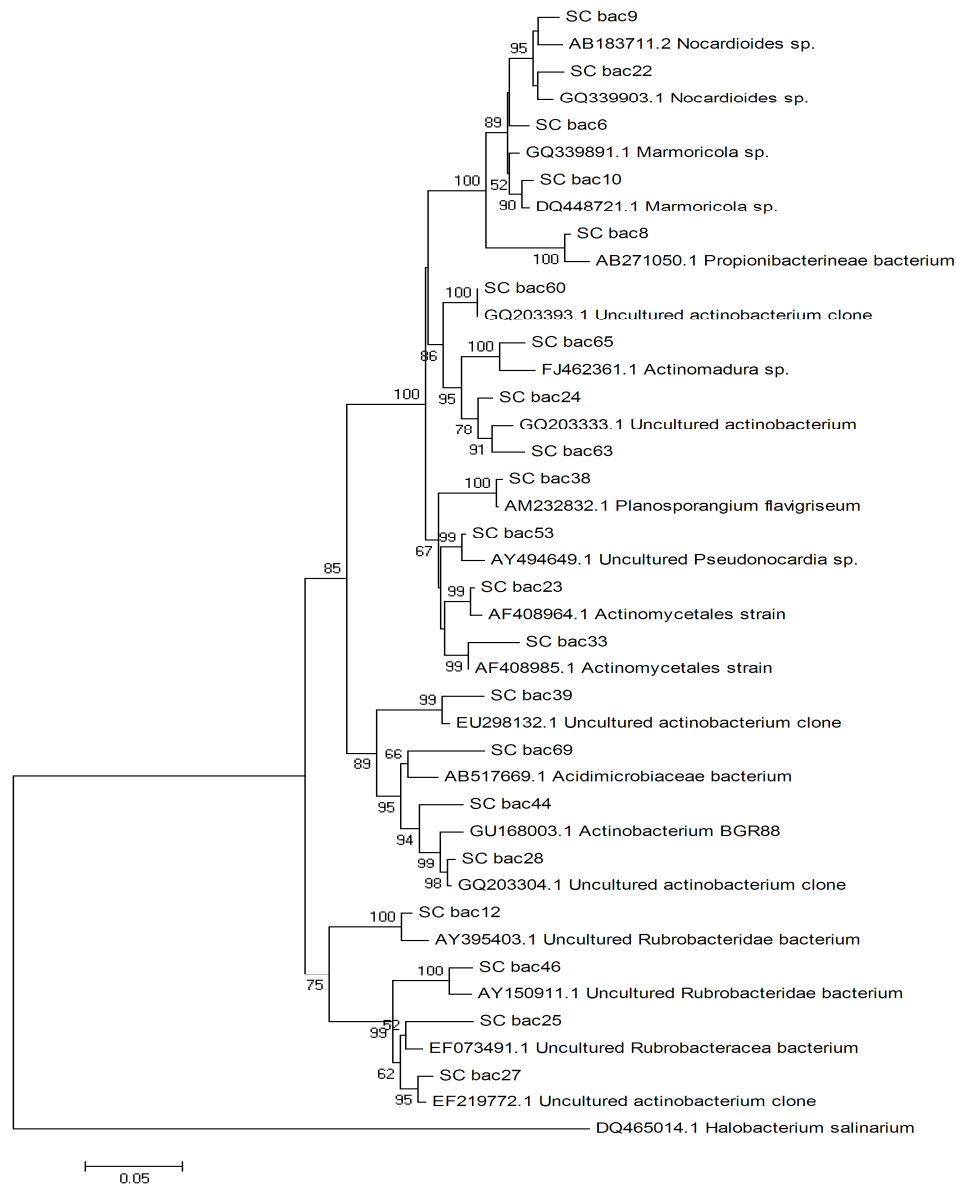


Figura 13A - Árvore filogenética das OTUs bacterianas da amostra de solo SC. Valores de bootstrap >50% podem ser visualizados. As árvores foram separadas para uma melhor visualização das relações filogenéticas. A: árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Proteobacteria; B: árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Actinobacteria; C: árvore filogenética das OTUs pertencentes aos demais filos Planctomycetes, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Chloroflexi, Bactéria_incertae_sedis, Verrucomicrobia, Firmicutes, Acidobacteria e Unclassified_Bacteria.

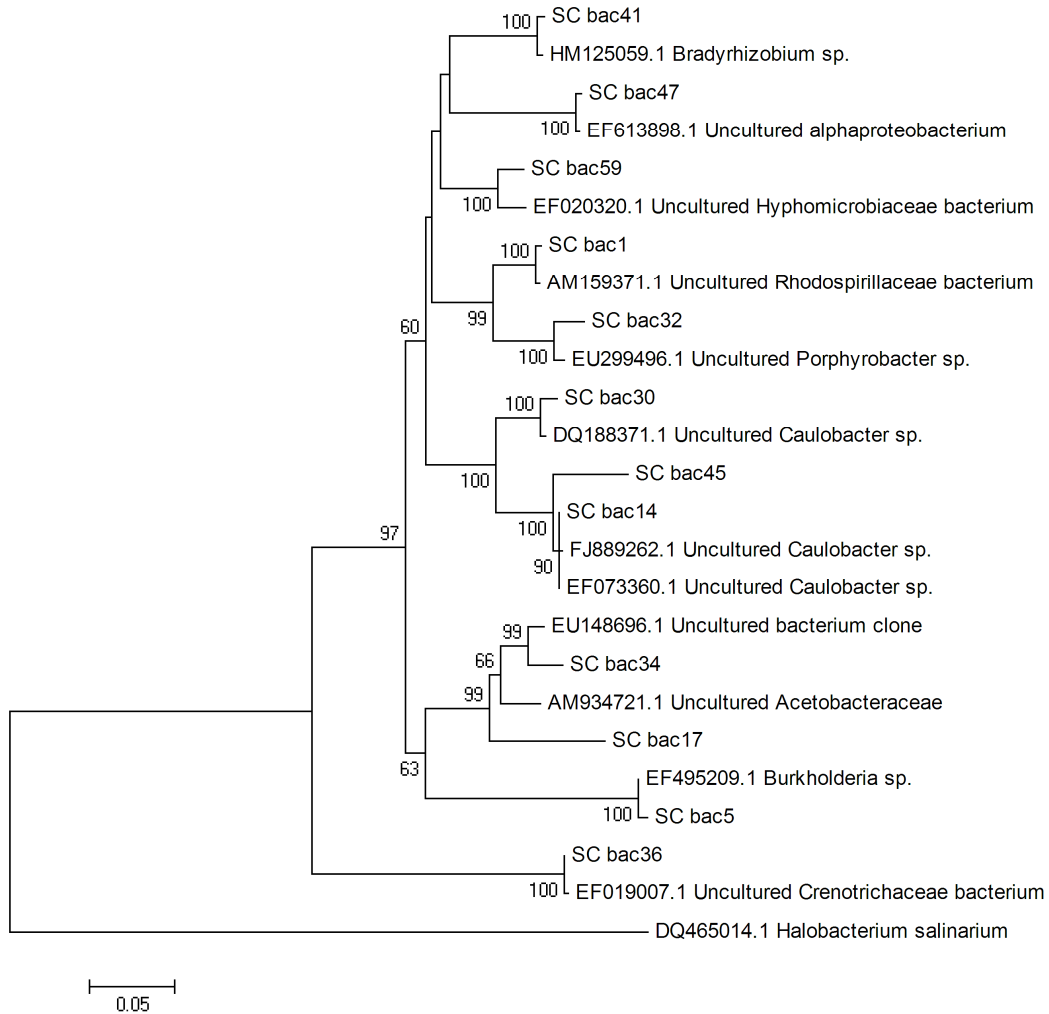


Figura 13B - Árvore filogenética das OTUs bacterianas da amostra de solo SC. Valores de bootstrap >50% podem ser visualizados. As árvores foram separadas para uma melhor visualização das relações filogenéticas. A: árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Proteobacteria; B: árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Actinobacteria; C: árvore filogenética das OTUs pertencentes aos demais filos Planctomycetes, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Chloroflexi, Bactéria_incertae_sedis, Verrucomicrobia, Firmicutes, Acidobacteria e Unclassified_Bacteria.

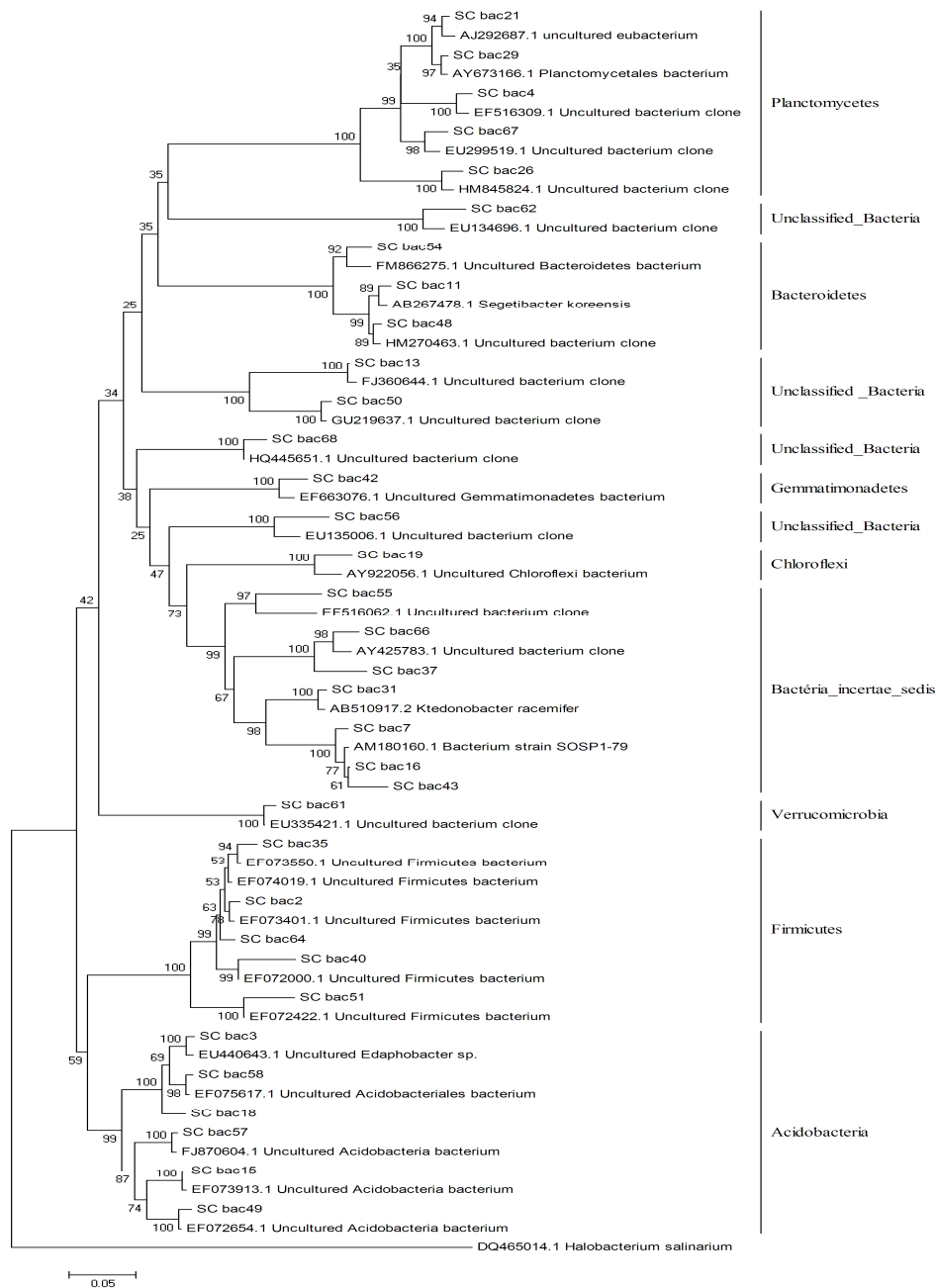


Figura 13C - Árvore filogenética das OTUs bacterianas da amostra de solo SC. Valores de bootstrap >50% podem ser visualizados. As árvores foram separadas para uma melhor visualização das relações filogenéticas. A: árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Proteobacteria; B: árvore filogenética das OTUs pertencentes ao filo Actinobacteria; C: árvore filogenética das OTUs pertencentes aos demais filos Planctomycetes, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Cloroflexi, Bactéria_incertae_sedis, Verrucomicrobia, Firmicutes, Acidobacteria e Unclassified_Bacteria.

A análise filogenética da biblioteca de bactérias CP mostrou que as sete OTUs afiliaram a quatro filos: Firmicutes (2 OTUs), Proteobacteria (1 OTU), Actinobacteria (1 OTU) e Synergistetes (1 OTU). Duas OTUs foram afixadas a Unclassified_Bacteria. As classes encontradas representando esses filos foram *β-proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia* e *Synergistia* (Tabela 5 e Figura 14).

Tabela 5 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de bactéria de CP.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Sequência ou Microrganismo próximo	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
Firmicutes	2	1	Uncultured bacterium clone	AY160781.1	89	Trato intestinal de <i>Cubitermes orthognathus</i>
		1	Uncultured bacterium clone	FJ374205.1	93	Trato gastrointestinal de larva de besouro
Unclassified_Bacteria	2	1	Uncultured bacterium clone	HM556268.1	98	Jardim de fungo criado pela espécie de formiga <i>Atta colombica</i>
		2	Uncultured bacterium clone	EU134277.1	93	Solo de pradaria
Proteobacteria	1	1	<i>Chromobacterium</i> sp.	AB426118.1	99	Solo
Actinobacteria	1	1	<i>Micrococcaceae</i> bacterium	DQ490458.1	92	Deposito vulcânico
Synergistetes	1	1	Uncultured <i>Synergistetes</i> bacterium	AB522155.1	95	Trato intestinal de <i>Reticulitermes santonensis</i>

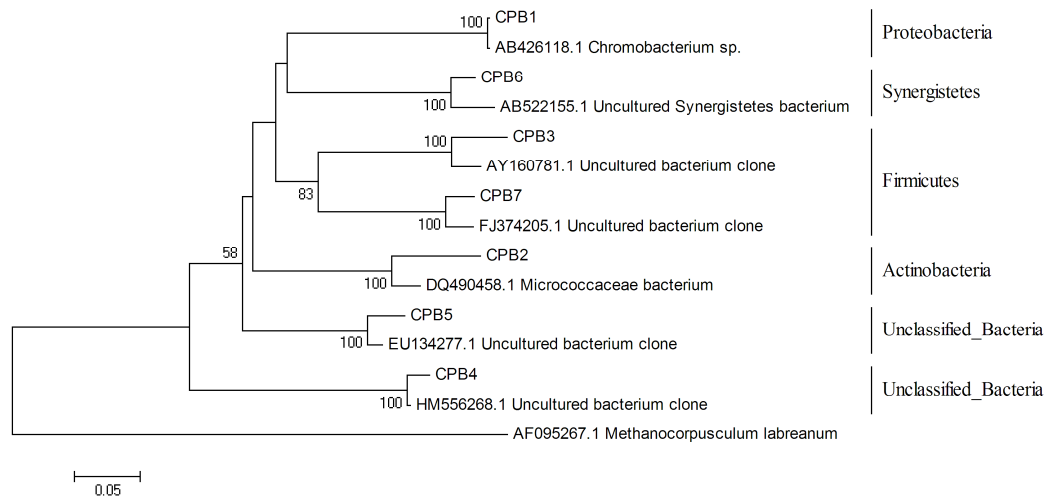


Figura 14 - Árvore filogenética das OTUs de bactérias do cupim da espécie *Cornitermes cumulans*. Valores de bootstrap >50% podem ser visualizados.

A microbiota do trato gastrointestinal de nove gêneros de cupins, *Cryptotermes*, *Coptotermes* e *Reticulitermes* (cupins inferiores), e *Macrotermes*, *Odontotermes*, *Cubitermes*, *Microcerotermes*, *Termes* e *Nasutitermes* (cupins superiores) já foi caracterizada. Identificaram-se 21 filos demonstrando a grande diversidade existente no trato gastrointestinal dos cupins (Hongoh, 2010). Na microbiota de cupins inferiores 12 filos foram identificados: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Fibrobacteres, Fusobacteria, Elusimicrobia (antigo termite group 1) e Chlamydia (Ohkuma & Kudo, 1995; Hongoh *et al.*, 2003; Shinzato *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2007; Hongoh *et al.*, 2007). Por outro lado, a microbiota dos cupins superiores constituiu-se de 15 filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Planctomycetes, Deferribacteres, Chlorobi, Fibrobacteres, Synergistetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Chloroflexi, OP11 e TM7. Além disso, os candidatos a filo TG1, TG2 e TG3 foram encontrados tanto no trato gastrointestinal dos cupins superiores quanto

dos inferiores (Schmitt-Wagner *et al.*, 2003; Hongoh *et al.*, 2005; Thongaram *et al.*, 2005; Hongoh *et al.*, 2006; Fall *et al.*, 2007; Shinzato *et al.*, 2007; Lefebvre *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2010). Neste estudo, os filos encontrados, até o momento, em *Cornitermes cumulans* também foram identificados nas pesquisas mencionadas anteriormente.

Nos cupins inferiores, os filos predominantes foram Firmicutes, Spirochaetes, Bacteroidetes e Proteobacteria. Esses filos aparentemente desempenham funções essenciais no trato de seus hospedeiros. A classe *Clostridia* (Firmicutes) foi detectada em alta frequência no trato gastrointestinal de diversas espécies de cupins e foi sugerido que sua função no trato seria a fermentação de carboidratos por meio da redução de CO₂ a acetato (acetogênese) e a fixação de N²⁻ (Kane *et al.*, 1991; Ohkuma & Kudo, 1995; Shinzato *et al.*, 2005). Esta classe foi detectada também na biblioteca de bactéria de CP e uma das OTUs apresentou similaridade com uma seqüência do trato intestinal de *Cubitermes orthognathus*, espécie de cupim da família *Termitidae*, a mesma de *Cornitermes cumulans*.

Os outros filos encontrados em alta frequência no trato gastrointestinal também são importantes, como Spirochaetes, Bacteroidetes e Proteobacteria. O primeiro possui representantes que são simbioses obrigatórios dos protozoários do trato de cupins inferiores, o segundo auxilia na conversão de ácido úrico em CO₂, acetato e NH₃ em condições anaeróbicas e o terceiro tem como função a fixação de nitrogênio (Shinzato *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2007). Desses filos, somente Proteobacteria foi encontrado na biblioteca de bactéria CP, mas isso pode, provavelmente, ser devido à baixa cobertura dessa biblioteca.

A identificação de comunidades de arqueias de ambientes não extremófilos é importante para entender o seu papel ecológico em diferentes tipos de ambientes. A análise filogenética da biblioteca de arqueia SC apresentou baixa diversidade, com

apenas duas OTUs, sendo que uma das OTUs reuniu 37 dos 38 clones analisados (Tabela 3). Ambas as OTUs afiliaram-se com alta similaridade ao filo Crenarchaeota (Tabela 6). A classe que representou esse filo foi *Thermoprotei*. As relações filogenéticas das duas OTUs da biblioteca de arqueias de SC podem ser visualizadas na Figura 15.

Tabela 6 - Afiliação filogenética e distribuição dos clones de arqueia de SC.

Grupo Filogenético	OTU	Clones	Microrganismos	Nº Acesso	Identidade (%)	Habitat do microrganismo relacionado
Crenarchaeota	2	37	Uncultured Crenarchaeotes archaeon	CU916928.1	98	Digestor anaeróbio mesofílico de tratamento de lodo de esgoto
		1	Uncultured Crenarchaeote clone	AY454553.1	91	Sedimento estuarino

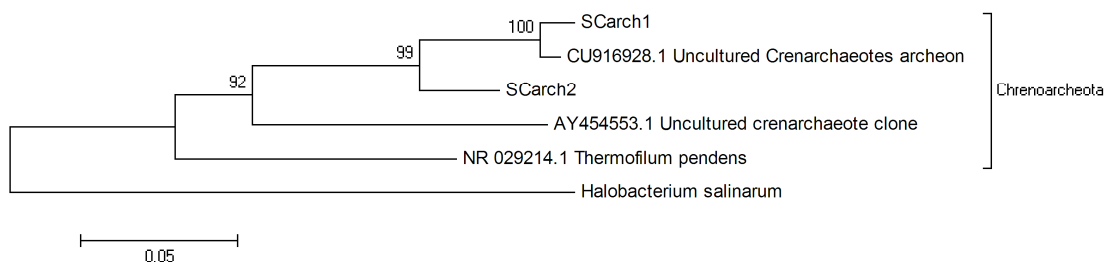


Figura 15 - Árvore filogenética das OTUs de arqueias da amostra de solo SC. Valores de bootstrap >50% podem ser visualizados.

Apesar da maioria dos estudos sobre a presença de arqueias no trato de cupins tenha identificado somente arqueias metanogênicas, alguns estudos detectaram a presença de arqueias não-metanogênicas no trato gastrointestinal de algumas espécies de cupins (Brune, 2006). Segundo Shinzato et al. (1999), a espécie de cupim

Reticulitermes speratus possui em seu trato arqueias pertencentes a *Thermoplasmatales*. Essa ordem, pertencente ao filo Euryarcheota, juntamente com representantes do filo Crenarchaeota, foi encontrada no estudo da microbiota do trato gastrointestinal do cupim *Cubitermes orthognathus* (Friedrich et al., 2001). As arqueias do filo Crenarchaeota detectadas no solo do cupinzeiro de *Cornitermes cumulans*, neste estudo, podem ter sua origem no trato gastrointestinal de *Cornitermes cumulans*, apesar da não detecção de arqueias na presente pesquisa.

A presença de arqueias no solo é extremamente baixa, abrangendo de 0,5 a 3,8% dos procariotos que os habitam (Ochsenreiter et al., 2003; Timonen & Bomberg, 2009). O filo Crenarchaeota, apesar de até recentemente ter apenas representantes isolados de ambiente extremos, vem sendo encontrado em diversos ambientes, incluindo diferentes tipos de solo (Bintrim et al., 1996; Ochsenreiter et al., 2003; Clementino et al., 2007; Timonen & Bomberg, 2009). Em uma descrição da comunidade de arqueias de solo de várzea, na Amazônia, a predominância nas quatro bibliotecas de rDNA 16S investigadas foi do filo Crenarchaeota com 56 a 71% das seqüências pertencentes à classe *Thermoprotei* (Pazinato et al., 2010). Segundo Tagliaferro (2005), somente clones do filo Crenarchaeota foram obtidos da análise de solo de Cerrado e de solo de pastagens.

Alguns estudos vêm considerando as arqueias pertencentes a esse filo essenciais na oxidação de amônia em solos, já que a presença do gene *amoA* de arqueia, responsável por essa atividade, é mais abundante do que a presença do gene *amoA* de bactérias, indicando que esses microrganismos exercem um importante papel na ciclagem de nitrogênio no ambiente (Treusch et al. 2005; Leininger et al. 2006; Timonen & Bomberg, 2009).

5 - CONCLUSÃO

A análise do *fingerprint* ARDRA revelou que as comunidades bacterianas de SC, SR e CP são distintas, embora as comunidades do solo do cupinzeiro e seu agente sejam mais dissimilares. Além disso, a análise filogenética do gene de rRNA 16S permitiu a caracterização das comunidades de procariotos e os índices de diversidade revelaram uma alta diversidade nas comunidades bacterianas do solo do cupinzeiro e de *Cornitermes cumulans*. Considerando que a caracterização taxonômica das comunidades de procariotos é uma importante etapa no entendimento de seu papel ecológico, esses resultados podem auxiliar no esclarecimento da função desses procariotos no solo do cupinzeiro e em *Cornitermes cumulans*.

6 - REFERÊNCIAS

- Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsman J., Roberts G.P. & Goodman R.M.** (1997) Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 277-282.
- Bossio D.A. & Scow K.M.** (1998) Impacts of Carbon and Flooding on Soil Microbial Communities: Phospholipid Fatty Acid Profiles and Substrate Utilization Patterns. *Biomedical and Life Sciences*, 35: 265-278.
- Brune A.** (2006) Symbiotic Associations Between Termites and Prokaryotes. p. 439-474. *In* Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. & Dworkin, M. (eds.), *Prokaryotes*. Third edition, Springer.
- Buschini M.L.T.** (2006) Spatial Distribution of Nests of *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae) in a Pasture in the Municipality of Rio Claro (SP), Brazil. *Ambiência*, 2:65-72.
- Camargos S.L.** (2005) Interpretação de análise de solos. Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Departamento de Solos e Engenharia Rural.
- Carney K.M. & Matson P.A.** (2006) The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microbial Ecology*, 52: 226-238.
- Chaves S., Neto M. & Tenreiro R.** (2009) Insect-symbiont systems: From complex relationships to biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 4:1753–1765.
- Clementino M.M., Fernandes C.C., Vieira R.P., Cardoso A.M., Polycarpo C.R. & Martins O.B.** (2007) Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. *Journal of Applied Microbiology*, 103:141–151.

Constantino, R. 2005. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma Cerrado. In: Scariot A.; Silva J. C. S.; Felfili J. M. (Org.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 319-333.

Corby-Harris V., Pontaroli A.C., Shimkets L.J., Bennetzen J.L., Habel K.E. & Promislow D.E.L. (2007) Geographical Distribution and Diversity of Bacteria Associated with Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:3470-3479.

Daniel R. (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews*, 3:470-478.

Delong E.F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89:5685-5689.

Dillon R.J. & Dillon V.M. (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49:71–92

Drancourt M., Bollet C., Carlouz A., Martelin R., Gayral J.-P. & Raoult D. (2000) 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical Microbiology*, 34: 3623-3630.

Erwing B, Green P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred II, error probabilities. *Genome Research*. 8: 186-194.

Fall S., Hamelin J., Ndiaye F., Assigbetse K., Aragno M., Chotte J.L. & Brauman A. (2007) Differences between Bacterial Communities in the Gut of a Soil-Feeding Termite (*Cubitermes niokoloensis*) and Its Mounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 7: 5199–5208.

Fierer N. & Jackson R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103: 626–631.

- Fisher M., Miller D., Brewster C., Husseneder C. & Dickerman A.** (2007) Diversity of Gut Bacteria of *Reticulitermes flavipes* as Examined by 16S rRNA Gene Sequencing and Amplified rDNA Restriction Analysis. *Current Microbiology*, 55:254-259.
- Frank D.N. & Pace N.R.** (2008) Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24:4–10.
- Good, I.J.** 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237–262.
- Gordon D, Abajian C, Green P.** (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*. 8: 195–202.
- Green P.** (1994). PHRAP documentation. <http://www.phrap.org>.
- Gribaldo S. & Brochier-Armanet C.** (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361:1007–1022.
- Handelsman J.** (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:669-685.
- Hennecke H.** (1990) Nitrogen fixation genes involved in *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Federation of European Biochemical Society*, 268(2): 422-426.
- Hill T.C.J., Walsh K.A., Harris J.A. & Moffett B.F.** (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 1-11.
- Holt J.A. & Lepage M.** (2000) Termites and Soil Properties. p. 389-407. *In* Abe T., Bignell D.E. and Higashi M. (eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, USA.
- Hongoh Y., Ohkuma M. & Kudo T.** (2003) Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 231-242.

Hongoh Y., Deevong P., Inoue T., Moriya S., Trakulnaleamsai S., Ohkuma M., Vongkaluang C., Noparatnaraporn N. & Kudo T. (2005) Intra- and Interspecific Comparisons of Bacterial Diversity and Community Structure Support Coevolution of Gut Microbiota and Termite Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6590–6599.

Hongoh Y., Ekpornprasit L., Inoue T., Moriya S., Trakulnaleamsai S., Ohkuma M., Noparatnaraporn N. & Kudo T. (2006) Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. *Molecular Ecology*, 15: 505–516.

Hongoh Y., Sato T., Dolan M.F., Noda S., Ui S., Kudo T. & Ohkuma M. (2007) The Motility Symbiont of the Termite Gut Flagellate *Caduceia versatilis* Is a Member of the “*Synergistes*” Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6270–6276.

Hongoh Y. (2010) Diversity and Genomes of Uncultured Microbial Symbionts in the Termite Gut. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74:1145-1151.

Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L. & Pace N. (1998) Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *The Journal of Bacteriology*, 180: 366–376.

Hughes J.B., Hellmann J.J. & Ricketts T.H. (2001) Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4399–4406.

Jangid K., Williams M.A., Franzluebbbers A.J., Sanderlin J.S., Reeves J.H., Jenkins M.B., Endale D.M., Coleman D.C. & Whitman W.B. (2008) Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 1-11.

- Kane, M.D., Brauman A., and Breznak J.A.** (1991) *Clostridium mayombeii* sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. Archives of Microbiology, 156:99–104.
- Kent A.D. & Triplett E.W.** (2002) Microbial communities and their Interactions in soil and rhizosphere ecosystems. Annual Review of Microbiology, 56:211–36.
- Koch R.** (1880) Investigations into the etiology of traumatic infective diseases. New Sydenham Society, London.
- Korb J.** (2007) Termites. Current Biology, 17: 995-999.
- Lane, D.J.** (1991). 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York, N.Y., USA.
- Lefebvre T., Miambi E., Pando A., Diouf M. & Rouland-Lefèvre C.** (2009) Gut-specific actinobacterial community structure and diversity associated with the wood-feeding termite species, *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) described by nested PCR-DGGE analysis. Insectes Sociaux, 56: 269–276.
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C. & Schleper C.** (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature Letters, 442:806-809.
- Lima J.T. & Costa-Leonardo A.M.** (2007) Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). Biota Neotropica, 7: 243-250.
- Little AE, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF, Handelsman J.** (2008). Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. Annual Review of Microbiology. 62: 375-401.

- Long Y.-H., Xie L., Liu N., Yan X., Li M.-H., Fan M.-Z. & Wang Q.** (2010) Comparison of gut-associated and nest-associated microbial communities of a fungus-growing termite (*Odontotermes yunnanensis*). *Insect Science*, 17:265–276.
- Luton P.E., Wayne J.M., Sharp R.J. & Riley P.W.** (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analyses of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148:3521-3530.
- Madigan M.T., Martinko J.M. and Parker J.** (2004) *Microbiologia de Brock*. Prentice Hall, 10ª edição. São Paulo.
- Martins M.A.** (2010) *Microbiologia do solo*. Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/LSOL_345_1113400965.pdf. Acesso em: 23 de outubro, 2010.
- Moya A., Peretó J., Gil R. & Latorre A.** (2008) Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews*, 9: 218-229.
- Mullis KB & Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350.
- Nascimento A.M.A.** (2011) Use of the rRNA operon and genomic repetitive sequences for the identification of bacteria. *In* de Bruijn F.J. (ed.), *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. John Wiley & Sons, Inc.
- Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L. & Schleper C.** (2003) Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 5:787–797.
- O'Donnell A.G., Young I.M., Rushton S.P., Shirley M.D. & Crawford J.W.** (2007) Visualization, modeling and prediction in soil microbiology. *Nature Reviews*, 5: 689-699.

- Ohkuma M. & Kudo T.** (1995) Phylogenetic Diversity of the Intestinal Bacterial Community in the Termite *Reticulitermes speratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 461-468.
- Ohkuma M., Noda S., Hongoh Y. & Kudo T.** (2001) Coevolution of symbiotic systems of termites and their gut microorganisms. *RIKEN Review*, 41.
- Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J. & Pace N.R.** (1986) Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology* , 40:337-365.
- Pandey P., Kang S.C. & Maheshwari D.K.** (2005) Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science*, 89: 177-180.
- Pazinato J.M., Paulo E.N., Mendes L.W., Vazoller R.F. & Tsai S.M.** (2010) Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. *Diversity*, 2:1026-1047.
- Pernthaler A., Dekas A.E, Brown C.T., Goffredi S.K., Embaye T. & Orphan V.J.** (2008) Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105:7052-7057.
- Pontes DS, Lima-Bittencourt CI, Chartone-Souza E, Nascimento AMA.** (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34: 463-473.
- Preisig O., Zufferey R. & Hennecke H.** (1996) The Bradyrhizobium japonicum fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase. *Archives of Microbiology*, 165:297–305.

- Provorov N.A., Vorobyov N.I. & Andronov E.E.** (2008) Macro- and Microevolution of Bacteria in Symbiotic Systems. *Russian Journal of Genetics* 44: 6-20.
- Rappé M.S. & Giovannoni, S.J.** (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57:369-394.
- Ruby E.G.** (2008) Symbiotic conversations are revealed under genetic interrogation. *Nature Reviews*, 6: 752-762.
- Rückamp D., Amelung W., Theisz N., Bandeira A.G., Martius C.** (2010) Phosphorus forms in Brazilian termite nests and soils: relevance of feeding guild and ecosystems. *Geoderma*, 155:269–279
- Saitou N & Nei M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Sanger F., Micklen S. & Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74: 5463-5467.
- Schleifer KH.** (2004). Microbial diversity: facts, problems and prospects. *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 3-9.
- Schloss P.D. & Handelsman J.** (2005) Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1501–1506.
- Schmitt-Wagner D., Friedrich M.W., Wagner B. & Brune A.** (2003) Phylogenetic Diversity, Abundance, and Axial Distribution of Bacteria in the Intestinal Tract of Two Soil-Feeding Termites (*Cubitermes* spp.). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10): 6007-6017.
- Shapiro J.A. & Dworkin M.** (1997). *Bacteria as Multicellular Organisms*. Oxford University Press, First Edition. New York, USA.

- Shinzato N., Muramatsu M., Matsui T. & Watanabe Y.** (2005) Molecular phylogenetic diversity of the bacterial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69: 1145-1155.
- Shinzato N., Muramatsu M., Matsui T. & Watanabe Y.** (2007) Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71: 906-915.
- Tagliaferro A.C.** (2005) Análise molecular da diversidade bacteriana de solos do Cerrado utilizando bibliotecas de rDNA 16S – Uma perspectiva biotecnológica. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Brasília.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Timonen S. & Bomberg M.** (2009) Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry reviews*, 8: 505-518.
- Thongaram T., Hongoh Y., Kosono S., Ohkuma M., Trakulnaleamsai S., Noparatnaraporn N. & Kudo T.** (2005) Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. *Extremophiles*, 9:229-238.
- Tourova T.P.** (2003) Copy Number of Ribosomal Operons in Prokaryotes and Its Effect on Phylogenetic Analyses. *Microbiology*, 72:389–402.
- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.-P. & Schleper C.** (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7:1985–1995.

- Tringe S.G. & Hugenholtz P.** (2008) A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, 11:442–446
- Xu J.** (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*. 15: 1713-1731.
- Woese, C. R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221–271.
- Wu Q.S., Xia R.X. & Zou Y.N.** (2008) Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*, 44:122-128.
- Zhang L. & Xu Z.** (2008) Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 8: 379–388.

7 – ANEXOS

7.1 - Meios de cultura

7.1.1 – SOC

Água – 100 ml

Triptona - 2 g

Extrato de levedura - 0,5 g

Cloreto de sódio – 10 mM

Cloreto de potássio - 2,5 mM

Cloreto de magnésio – 10 mM

Sulfeto de magnésio – 10 mM

Glicose – 20 mM

7.1.2 – 2xYT

Água – 1000 ml

Triptona - 16 g

Extrato de levedura - 10 g

Cloreto de sódio – 5 g

7.1.3 – Caldo Luria-broth (LB)

Água – 1000 ml

Triptona - 10 g

Extrato de levedura - 5 g

Cloreto de sódio – 5 g

7.1.4 - Luria-broth (LB) sólido

Água – 1000 ml

Triptona - 10 g

Extrato de levedura - 5 g

Cloreto de sódio – 5 g

Agar – 15 g

7.2 – Soluções

7.2.1 – Solução cloreto de sódio 5M

Água – 100 ml

Cloreto de sódio – 29,2 g

7.2.2 – Solução STE

EDTA 0,5M - 200 µl

Tris-HCl 0,2M – 5 ml

Cloreto de sódio – 0,87 g

7.3 - Protocolo de preparação de células eletrocompetentes

- 1 – Crescimento da linhagem *Escherichia coli* XL1 Blue em 100 ml de 2 xYT (inóculo de 100 µl de cultura fresca). Colocar o inóculo no shaker overnight a 37°C;
- 2 – Retirar 10 ml da cultura e a inocular em 1000 ml de 2 xYT. Cresça até a OD alcançar 0,2 a 0,25 (não pode exceder esse limite);
- 3 – Colocar o erlemeyer contendo a cultura no gelo por 30 minutos. Depois dividir em 4 garrafas (apropriadas para a centrifuga utilizada), contendo 400 ml de cultura cada;
- 4 – Centrifugar as células a 10.000 rpm por 10 minutos em um rotor SLA 3000 a 4°C (centrifuga Sorval);
- 5 – Descartar o sobrenadante e ressuspender cada sedimento com 150 ml de glicerol 10% frio e estéril, manter as garrafas no gelo o tempo todo, juntar duas garrafas para dar o volume final de 300 ml em cada garrafa.
- 6 – Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
- 7 – Descartar o sobrenadante e ressuspender cada pellet em 300 ml de glicerol frio e estéril;
- 8 – Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
- 9 – Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 300 ml de glicerol frio e estéril;
- 10 – Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C;

- 11 – Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 150 ml de glicerol frio e estéril e juntar os volumes em apenas uma garrafa;
- 12 – Centrifugar por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
- 13 – Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 ml de glicerol frio e estéril. Retirar 25 µl da suspensão e adicionar a 10 ml de glicerol 10% frio e estéril, determinar a OD que precisa estar 0,15, se não estiver acrescentar mais glicerol até alcançar a OD desejada;
- 14 – Fazer alíquotas da suspensão celular (50 µl) utilizando gelo seco acrescido de etanol para um rápido congelamento. Estocar a – 70°C;

7.4 - Transformação por eletroporação

- 1 – Dez minutos antes de transformar as células eletrocompetentes, retirar as células do freezer -70°C e colocá-las em cubetas no gelo para esfriar;
- 2 – Acrescentar no tubo contendo 50 µl de células eletrocompetentes 1 µl da ligação;
- 3 – Transferir a suspensão contendo as células e a ligação para a cubeta gelada e eletroporar (prestar atenção se a cubeta é de 1 mm ou 2 mm pois a voltagem utilizada é 1800 e 2500V, respectivamente);
- 4 – Acrescentar 950 µl de meio SOC e transferir a suspensão para um tubo de 1,5 ml; Incubar por 1 hora a 37°C;
- 5 – Plaquear 100 µl da cultura em uma placa contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (100 µg/ml); Incubar as placas a 37°C por aproximadamente 18 horas.