



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO  
MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO**

**MARIA DO SOCORRO LACERDA ROLIM**

**BACTÉRIAS INTESTINAIS EM CUPINS: VARIAÇÃO NA BETA DIVERSIDADE E  
O EFEITO NA SOBREVIVÊNCIA DO HOSPEDEIRO**

**CAMPINA GRANDE - PB  
2022**

MARIA DO SOCORRO LACERDA ROLIM

**BACTÉRIAS INTESTINAIS EM CUPINS: VARIAÇÃO NA BETA DIVERSIDADE E O EFEITO NA SOBREVIVÊNCIA DO HOSPEDEIRO**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

**Área de concentração:** Biodiversidade e Conservação em Ecossistemas Terrestres e Aquáticos.

**Orientador (a):** Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Avany Bezerra Gusmão

**Coorientador:** Prof. Dr. Alberto José Arab Olavarrieta (PPG – EvoDiv/ UFABC)

**CAMPINA GRANDE - PB  
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R748b Rolim, Maria do Socorro Lacerda.  
Bactérias intestinais em cupins [manuscrito] : variação na beta diversidade e o efeito na sobrevivência do hospedeiro / Maria do Socorro Lacerda Rolim. - 2022.  
66 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Maria Avany Bezerra Gusmão, Departamento de Biologia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. Alberto José Arab Olavarrieta, UFABC - Universidade Federal do ABC"

1. Térmitas. 2. Diversidade bacteriana. 3. Patógenos bacterianos. I. Título

21. ed. CDD 570

MARIA DO SOCORRO LACERDA ROLIM

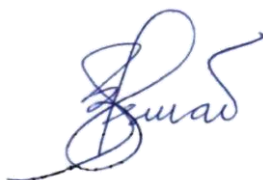
BACTÉRIAS INTESTINAIS EM CUPINS: VARIAÇÃO NA BETA DIVERSIDADE E O EFEITO NA SOBREVIVÊNCIA DO HOSPEDEIRO

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Área de concentração:  
Biodiversidade e Conservação em Ecossistemas Terrestres e Aquáticos.


Aprovada em: 15/02/2022.

**BANCA EXAMINADORA**




---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Avany Bezerra Gusmão (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Documento assinado digitalmente  
 ALEXANDRE VASCONCELLOS  
Data: 17/02/2022 09:59:56-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Alexandre Vasconcellos  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente  
 Ana Paula Albano Araujo  
Data: 16/02/2022 18:48:46-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Albano Araújo  
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que me fez compreender na prática o que estava selado apenas em meu coração, "Minha graça é suficiente a você, pois o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza". Nunca pensei que 2 anos passariam tão depressa, e que eu viveria tantas coisas. Mas, jamais esquecerei, que nos momentos mais difíceis, foi a Tua palavra que vivificou a minha alma.

Aos meus pais, Manoel Lacerda Rolim e Maria da Penha da Silva, os responsáveis por minha dedicação ávida. Sou quem sou, pois tenho me referenciado na força de vontade deles. A minha irmã Raquel Emanuelle e minha sobrinha Anna Letícia, vocês representam a pupila dos meus olhos, a parte mais sensível, mas que traz clareza.

A minha orientadora Maria Avany B. Gusmão. Estamos fechando um ciclo de 5 anos, e eu sou grata por todos os seus ensinamentos. Tenho hoje uma base, que sem dúvidas me fortalecerá nos novos caminhos. Jamais me arrependerei da conversa "corredor da uepb". Foi naquele momento que conheci uma das pesquisadoras mais fantásticas que eu pude ter a honra de aprender junto. Você se tornou uma amiga e parceira, além de desenvolvermos um sentimento materno, de mãe para filha científica. Obrigada por me guiar, mas principalmente, por me deixar caminhar com os meus próprios pés. Era necessário para o meu crescimento! Ao meu coorientador Alberto José Arab Olavarrieta. Por toda parceria, desafios e confiança depositada em meu trabalho. Há muito ainda a ser estudado "about Microbial Ecology". Suas contribuições foram fundamentais para me tirar da zona de conforto.

Aos meus colegas de laboratório: Igor Eloi e Marllon Rinaldo, é muito prazeroso dividir a bancada com vocês; Em especial, Mário Herculano, que esteve comigo em longas jornadas de UEPB, até que as piadas perdessem o sentido, pois o cansaço físico ultrapassava o nosso entendimento humorístico naquele momento. Estamos mantendo uma relação firme de amizade e parceria científica; Ao Derick Mello, por suas contribuições e amizade. Você foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. É bom saber que temos com quem contar, assim como "contar" os ínfimos cupins.

A minha amiga Luana Araújo que me acompanha desde a graduação. Quem já chorou, sorriu e surtou comigo. Mas, quem também me fez confiar e acreditar que

por mais pedregoso que o caminho seja, tudo ocorre no momento correto. Além disso, e apesar de não ser conclusivo, mas certamente já podemos remeter que Bentos e Cupins interagem muito bem! Obrigada “Termbento”.

Ao meu grande amigo e irmão Antônio Marques. A vida adulta nem sempre nos permite a presença física constante. No entanto, isso jamais será um subterfúgio para que o nosso vínculo seja enfraquecido. Tenho muito orgulho de quem tens buscado ser, e posso aprender com você nas mínimas coisas. Obrigada por não desistir do meu humor!

Ao Wesley Ferreira, encontrei um amigo e parceiro. Alguém que me ensina diariamente, apenas por ser quem é. Obrigada por me fazer sentir a tenuidade da vida, e por embarcar comigo na trajetória. Propósitos unidos são bem mais fortes que apenas relacionamentos.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, o conhecimento perpassado por vocês foi o adubo necessário para o meu crescimento. Ao Júlio César, por seu esmero e cuidado com todas as atividades referentes ao PPGEC e por sua dedicação ávida em atender todas as demandas, das quais as minhas foram bem intensas ao longo desses 2 anos (prometo que não vou pedir tanto mais).

A Prof<sup>a</sup>. Érica Lambais (INSA), por toda dedicação e parceria microbiológica. Por agarrar a nossa mão nessa missão! Ao prof Etham Lucena, que nos permitiu usar as instalações de seu laboratório, o LEAq - UEPB, além de agradecer em especial Patrícia Silva Cruz e Daniely de Lucena Silva, por toda disposição em nos ajudar no uso dos equipamentos e disponibilidade de tempo.

Aos membros integrantes da banca de qualificação, Prof. Dr. Ives Haifig (UFABC) e Dr<sup>a</sup>. Juliana Severiano (IFPB), por suas enormes contribuições no aperfeiçoamento deste trabalho, além do compromisso, responsabilidade e gentileza quanto a todos os prazos que nos foram acordados.

Ao prof. Alexandre Vasconcellos (UFPB) e a Profa. Ana Paulo Araújo (UFS), pelo aceite de nosso convite. É muito prazeroso ter a oportunidade de tê-los contribuindo na configuração deste trabalho, assim como nos ensinamentos que certamente me serão passados com suas arguições e contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Pós-Graduação. Á todos, o meu muito obrigada!

“O papel dos infinitivamente pequenos é infinitivamente grande”  
Louis Pasteur.

## RESUMO GERAL

A microbiota intestinal bacteriana de cupins promove a regulação do metabolismo e digestão eficiente, além de contribuir no mutualismo defensivo, que reflete na suscetibilidade do hospedeiro. Todavia, fatores associados à modulação da microbiota incluem a dieta e a casta. No presente estudo avaliamos a influência do hábito alimentar e da casta de cupins na diversidade bacteriana intestinal em espécies da família Termitidae e a sobrevivência de *Constrictotermes cyphergaster* após exposição ao bacilo intestinal *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Os resultados demonstraram mudanças na diversidade, com variações na estrutura e na composição dos simbiontes, havendo diferença significativa entre os operários e guildas alimentares (Ceifadores e intermediários) das espécies estudadas. Essas mudanças foram associadas a dieta, assim como as funções desempenhadas pelas castas. Embora diferentes, somam-se ao processo de trofalaxia que contribui no compartilhamento de simbiontes intestinais. Quanto a sobrevivência de *C. cyphergaster*, os resultados demonstraram que *Bt* parece não afetar a sobrevivência desse cupim, diferentemente do que ocorreu nos indivíduos expostos a bactéria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*). Fatores como virulência, condição intestinal do hospedeiro e virulência da cepa bacteriana podem permear os resultados encontrados. Além disso, a mudança fisiológica e comportamental dos indivíduos foi elucidada através de letargia, diminuição corporal e alimentar após a exposição aos patógenos bacterianos. Apesar de já ser conhecido fatores que alteram a microbiota intestinal, a dinâmica populacional associada aos papéis funcionais desempenhados por esses simbiontes em cupins requer abordagens multidisciplinares, uma vez que reflete um campo pouco explorado, o que poderá conferir insights sobre o processo de coevolução entre cupins e patógenos bacterianos.

**Palavras-Chave:** Térmitas. Diversidade. Patógenos bacterianos. Sobrevivência.



## ABSTRACT

The bacterial gut microbiota of termites promotes the regulation of metabolism and efficient digestion and contributes to defensive mutualism, which reflects on host susceptibility. However, factors associated with microbiota modulation include diet and caste. In the present study, we evaluated the influence of feeding habits and caste of termites on gut bacterial diversity in species of the family Termitidae and the survival of *Constrictotermes cyphergaster* after exposure to the gut *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). The results showed changes in diversity, with variations in the structure and composition of symbionts, with significant differences between the workers and feeding guilds (Reapers and intermediates) of the species studied. These changes were associated with diet, as well as the functions performed by the castes. Although different, add up to the trophallaxis process that contributes to the sharing of gut symbionts. As for the survival of *C. cyphergaster*, the results showed that *Bt* does not seem to affect the survival of this termite, unlike what occurred in individuals exposed to the opportunistic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*). Factors such as virulence, intestinal condition of the host, and virulence of the bacterial strain may permeate the results found. In addition, the physiological and behavioral change of the individuals was elucidated through lethargy, body and feeding decrease after exposure to the bacterial pathogens. Although factors that alter the gut microbiota are already known, the population dynamics associated with the functional roles played by these symbionts in termites requires multidisciplinary approaches, since it reflects an under-explored field, which may confer insights into the process of coevolution between termites and bacterial pathogens.

**Keywords:** Termites. Diversity. Bacterial pathogens. Survival.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - A.</b> Forrageio em trilhas expostas de <i>Constrictotermes cyphergaster</i> . <b>B.</b> Ninho arborícola de <i>C. cyphergaster</i> . .....	18
<b>Figura 2 -</b> Localização do município de São João do Cariri, PB - Brasil. ....	19

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1 -</b> Diversidade bacteriana em intestino de operário e soldado de cupins Termitidae.....	25
<b>Figura 1.2 -</b> Diversidade de filos bacterianos nas espécies de cupins <i>Patawatermes</i> sp e <i>Ruptitermes</i> spp.....	28
<b>Figura 1.3 -</b> Partição da diversidade beta de bactérias intestinais de cupins nos componentes aninhamento e substituição de espécies. A) Partição observada entre os operários das diferentes espécies de cupins. B) Partição observada entre as guildas de cupins avaliados.....	30
<b>Figura 1.4 -</b> A) Contribuição local (LCBD) e B) dos simbioses intestinais (SCBD) da beta diversidade entre as espécies de cupins avaliadas. O tamanho dos círculos indica a abundância (reads) relativa dos simbioses intestinais.....	31

### Capítulo 2

<b>Figura 2.1 -</b> TMM dos operários de <i>Constrictotermes cyphergaster</i> após exposição aos entomopatógenos <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por 168 h (7 dias). Letras diferentes possuem significância estatística na comparação de médias entre os grupos. No boxplot, a mediana, quartis e bigodes indicam o valor mais alto e mais baixo dentro da faixa interquartil de 1,5. O IC (Intervalo de confiança) corresponde a 95%.....	44
<b>Figura 2.3 -</b> Contraprova de infecção para operários de <i>Constrictotermes cyphergaster</i> após exposição ao consumo de papel filtro impregnado por entomopatógenos <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por 168 h (7 dias). Letras diferentes possuem significância estatística na comparação de médias entre os grupos.....	45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1AP** - Identificação molecular de bactérias simbiontes do papo e segmento P3 do tubo digestivo de *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae) por meio de porcentagem de similaridade (SIML) usando pesquisa de *Blastn*. I - operário papo; II - soldado papo; III - operário P3; IV - soldado P3.....61

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2 LOCAL DE ESTUDO</b> .....	19
<b>3 ARTIGO 1 - CAPÍTULO 1: A INFLUÊNCIA DO HÁBITO ALIMENTAR E DA CASTA DE CUPINS NA DIVERSIDADE BACTERIANA INTESTINAL EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA TERMITIDAE</b>	
<b>3.1 Introdução</b> .....	21
<b>3.2 Metodologia</b> .....	23
<b>3.3 Resultados</b> .....	25
<b>3.4 Discussão</b> .....	29
<b>3.5 Conclusão</b> .....	33
<b>4 ARTIGO 2 - CAPÍTULO 2: A INFECÇÃO POR <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> NÃO AFETA A SOBREVIVÊNCIA DE <i>CONSTRICTOTERMES CYPHERGASTER</i></b>	
<b>4.1 Introdução</b> .....	36
<b>4.2 Metodologia</b> .....	38
<b>4.3 Resultados</b> .....	43
<b>4.4 Discussão</b> .....	41
<b>4.5 Conclusão</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### Interações com microrganismos

Os microrganismos formam comunidades complexas, altamente diversificadas e dinâmicas (JOHNSON et al., 2015). Essas comunidades são representadas por diferentes tipos de bactérias, arqueias, protistas e fungos, todos com características específicas de metabolismo, fisiologia e morfologia celular. Adicionalmente, os microrganismos apresentam diferenças em suas distribuições e atividades ecológicas, além de estrutura genômica, expressão e evolução (DUNLAP et al., 2001; PROSSER et al., 2007). Tais organismos podem estar associados a diferentes hospedeiros, incluindo os insetos, os quais se diversificaram e obtiveram grande sucesso evolutivo através de suas inúmeras relações com esses microrganismos (JANSON et al., 2008; ENGEL e MORAN, 2013).

O estudo das interações entre insetos e microrganismos simbiotes vem sendo considerado como uma forma de cruzar as fronteiras disciplinares tradicionais, que abrangem áreas multidisciplinares como a microbiologia, ecologia, evolução, biologia molecular e fisiologia, bem como a entomologia (DOUGLAS, 2015; PARK et al., 2017).

As associações com microrganismos podem ocorrer de forma permanente ou transitória, sendo ainda benéficas ou prejudiciais ao fitness dos insetos (KAUFMAN et al., 2000; FELDHAAR, 2011; HAMMER et al., 2017). Além disso, nessas relações os microrganismos podem estar associados interna ou externamente ao seu hospedeiro, denominados de endossimbiontes ou ectossimbiontes (BREZNAK, 2004). Endossimbiontes normalmente correlacionam-se às funções vitais para o organismo, a exemplo dos afídeos sociais, que se tornaram imunes a parasitoides quando associados a bactérias *Hamiltonella* (OLIVER et al., 2008). O mesmo acontece nos gafanhotos axênicos (livres de germes), que em associação a bactéria intestinal *Pantoea agglomerans* tornam-se protegidos pelos fenóis liberados (DILLON e CHARNLEY, 1995). Mais recentemente, aliado aos seus papéis nutricionais, pesquisas revelaram que micróbios intestinais de cupins auxiliam na digestão e no fornecimento de nutrientes (OHKUMA e BRUNE, 2011) e na imunidade do hospedeiro (ROSENGAUS et al., 2014; PETERSON e SCHARF, 2016). Além disso, os microrganismos presentes nos ninhos podem produzir compostos antimicrobianos, fornecendo proteção adicional aos cupins contra entomopatógenos (CHOUVENC et al., 2013).

## Cupins

Os cupins (Blattodea: Isoptera) são insetos eussociais com cerca de 3.105 espécies agrupadas em 12 famílias (KRISHNA et al., 2013). No Brasil, estudos destacaram nossa termitofauna como uma das mais diversas, com cerca de 300 espécies registradas (CONSTANTINO & ACIOLI, 2008). Esses insetos estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (EGGLETON, 2000), sendo que a maior diversidade deles é encontrada nas florestas tropicais (BIGNELL e EGGLETON, 2000).

As colônias dos cupins são compostas por castas, responsáveis por atividades específicas e mutuamente dependentes entre si (GRASSÉ, 1982). De forma geral, as castas de cupins compreendem reprodutores, soldados e operários (WATANABE et al., 2014). Em geral, os operários realizam a busca do alimento, a manutenção da estrutura física dos ninhos e o cuidado da ninhada, além de transferir o alimento pré-digerido e os simbioses intestinais para as outras castas (HONGOHO, 2010; NALEPA, 2015). Já os soldados são responsáveis pela defesa da colônia, enquanto os reprodutores respondem pela produção de novos indivíduos (EGGLETON, 2011).

Esses insetos são considerados “Engenheiros do Ecosistema”, pois desempenham importantes funções ecológicas no ambiente, as quais estão relacionadas ao seu comportamento alimentar e de nidificação, exercendo grande influência nos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes, na estrutura física e composição química dos solos, e na disponibilidade de nitrogênio presente no ambiente (LEE e WOOD, 1971; HOLT e LAPAGE, 2000; JOUQUET et al., 2011; GRIFFITHS et al., 2021).

A combinação da sociabilidade dos cupins com sua capacidade de digerir eficientemente a lignocelulose proporcionou sucesso evolutivo de destaque a esse grupo (BRUNE, 2014). No entanto, por mais que os cupins secretem suas próprias celulasas e hemicelulasas no intestino anterior e médio (WATANABE e TOKUDA, 2001), esses indivíduos contêm simbioses intestinais que contribuem para digestão da lignocelulose e também para a fixação de nitrogênio (BRUNE e DIETRICH, 2015; OHKUMA, 2003). As espécies mais basais incluem consumidores de madeira e apresentam protozoários lignocelulolíticos no trato digestivo e, enquanto que os Termitidae, espécies mais derivadas, são capazes de explorar diferentes tipos de substratos lignocelulósicos e apresentam bactérias simbioses. Durante a evolução

dos cupins, a perda dos protozoários flagelados nos cupins (Não-Termitidae) representa a inovação evolutiva mais importante para os cupins desde o surgimento da eussocialidade (CHOUVENC et al., 2021).

A perda dos protozoários e aquisição de bactérias permitiu a ampliação da diversidade alimentar em Termitidae, promovendo sua diversificação e dominância ecológica (BRUNE, 2014; BIGNELL, 2016). Os Termitidae são a linhagem mais diversa, constituindo mais de 70% de todas as espécies de cupins (KRISHNA et al. 2013). Apresentam uma enorme capacidade de exploração de diferentes substratos lignocelulósicos formando guildas alimentares, tais como I - consumidores de madeira morta e grama, II - consumidores de madeira morta, grama, serapilheira e micro epífitas, III - consumidores das camadas superiores orgânicas do solo e IV - os verdadeiros consumidores do solo, ingerindo solo aparentemente mineral (DONOVAN, EGGLETON, BIGNELL, 2001).

Ainda, em função de dieta, vários autores fizeram diferentes tentativas para classificar as espécies de cupins em grupos tróficos, de acordo com a sua utilização dos recursos (MATHEWS, 1977; BANDEIRA & MACAMBIRA, 1988; CONSTANTINO, 1992; EGGLETON et al., 1995). Entretanto, não há consenso entre os especialistas (DONOVAN et al., 2001).

Nos cupins não-Termitidae, essencialmente xilófagos, os simbioses transmitidos pelos parentes (ENGEL & MORAN, 2013) conferiram a capacidade digestória inicial para as ninfas, que antes disso são livres de simbioses e nutridos apenas com saliva (GRASSÉ, 1982). Esta situação de completa dependência é tida como um dos fatores que predispõem à vida social nesse grupo (THORNE, 1997). Cupins apresentam um ecossistema microbiano intestinal que representa um dos exemplos mais fascinantes de simbiose (HONGO et al., 2010).

### Nidificação

Os ninhos são construídos em uma diversidade de formas (EMERSON, 1938), podendo ser subterrâneos (inserida no interior do solo), epígeos (parte do ninho fica inserida no solo e parte fica visível sobre o solo) ou arborícolas (construídos sobre árvores) (NOIROT e DARLINGTON, 2000). Estes hábitos contribuem nos três estilos de vida em cupins, I- *one-piece*, aqueles que consomem e nidificam no próprio recurso (madeira), II- os intermediários, que, além de madeira usada para consumo e

nidificação, utilizam solo e exploram outros recursos de celulose, e III - os mais derivados, que têm ninhos separados do próprio recurso, e constroem galerias para consumir material vegetal morto fora do ninho (ABE, 1987).

As condições homeostáticas internas dos ninhos são controladas pelos os indivíduos da colônia (WOOD e SANDS, 1978) e, por serem naturalmente ambientes ricos em matéria orgânica são favoráveis ao crescimento de uma variedade de microrganismos (SUJADA; SUNGTHONG; LUMYONG, 2014). Muitos desses microrganismos são capazes de fornecer funções auxiliares para os cupins, como ciclagem e troca de nutrientes, e também os protegem de patógenos invasores (MATSUI et al., 2012; CHOUVENC et al., 2013).

#### Cupins & Microrganismos - Diversidade

Ao longo da vida do hospedeiro, fatores ecológicos e ambientais (filtragem ambiental) como dieta, habitat e filtro biótico, afetam a composição e a estabilidade (ou seja, variação individual e taxas de rotatividade) da microbiota (BOURGUIGNON et al., 2018; SOUKUP et al., 2021). Em cupins, esses fatores já são bem conhecidos, a exemplo da dieta (MIKAELIAN et al., 2015; HU et al., 2019), a heterogeneidade do lúmen intestinal (YANG et al., 2005; BRUNE, 2010; ROSSMASSLER et al., 2015; MIKAELIAN; MEUSER; BRUNE, 2016), a história evolutiva do hospedeiro e a divisão de tarefas dentro da colônia (BOURGUIGNON et al., 2018; OTANI et al., 2019), constituem como elementos que contribuem na estruturação das comunidades microbianas associadas a esses insetos.

Dentre estes fatores, os hábitos de nidificação e alimentação influenciam a composição microbiana da colônia, bem como o grau de exposição ao patógeno (ROSENGAUS et al., 2003). Assim, os cupins que forrageiam fora do ninho estão mais vulneráveis e frequentemente mais expostos a patógenos presentes no ambiente, permitindo encontrar uma maior diversidade e carga de micróbios nesses indivíduos quando comparados aos indivíduos que se alimentam apenas dentro do ninho (CHOUVENC et al., 2013). Assim, o forrageio externo ao ninho exerceu uma forte pressão seletiva durante a evolução dos cupins, levando ao desenvolvimento de uma série de mecanismos de defesa contra patógenos (ROSENGAUS et al., 2011; MANJULA et al., 2014). No nível individual, esses indivíduos lutam contra os patógenos por meio de sistemas fisiológicos e bioquímicos inatos, como imunidade



celular e humoral (ROSENGAUS et al., 1998; HAMILTON e BULMER, 2012). Já em nível da colônia, eles empregam imunidade comportamental e social, incluindo allogrooming, trofalaxia, isolamento e canibalismo (CREMER et al., 2007; DAVIS et al., 2018; CREMER et al., 2019).

Por outro lado, tem-se sugerido que os microrganismos adquiridos do ambiente podem também estabelecer associações simbióticas potenciais, atuando na defesa colonial (ROSENGAUS et al., 1998). Dentre os potenciais simbiontes que atuam na defesa colonial estão bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria e Firmicutes (MATHEWS et al., 2012; CHOUVENC et al., 2013), as quais já foram encontradas tanto no material fecal das paredes dos ninhos dos cupins, como também no seu trato digestivo (CHOUVENC et al., 2013; MANJULA et al., 2014; MOREIRA et al., 2018). Algumas espécies de *Streptomyces* (Actinobacteria) foram destacadas como mutualistas defensivos por proteger as colônias de *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae) contra microrganismos patogênicos (CHOUVENC et al., 2013). Representantes de Firmicutes também foram registrados atuando de forma antagônica a patógenos, através da produção de toxinas que são ativadas apenas no trato digestivo de insetos (GARDENER, 2004; CHAURASIA et al., 2005), inclusive de cupins (BRUNE et al., 2014; MIKAELIAN et al., 2015).

## Bactérias Entomopatogênicas

### *Bacillus thuringiensis* (Bt) - Bacillaceae

A associação com microrganismos bacterianos pode ser considerada um mutualismo que contribui com diferentes funções no ecossistema hospedeiro como melhoramento das dietas pobres em nutrientes, digestão de componentes alimentares recalcitrantes, proteção contra predadores, parasitas e patógenos, além de governar os sistemas de acasalamento e reprodução (ENGEL e MORAN, 2013). Muitas dessas associações podem também ser patogênicas. Esta diversidade de interações muitas vezes requer um alto grau de especialização e contato íntimo com o hospedeiro, visto que muitos mecanismos moleculares usados por patógenos bacterianos e mutualistas são semelhantes (SANCHEZ-CONTRERAS e VLISIDOU, 2008).

Dentre as bactérias entomopatogênicas comumente estudadas no controle biológico está o *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essa bactéria possui forma de bastonete,

além de formar esporos e ser capaz de produzir inclusões cristalinas responsáveis por sua atividade tóxica (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000). Suas cepas possuem comprovada atividade entomopatogênica contra diferentes ordens de insetos, como em Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (WANG; HENDERSON, 2013; ZORZETTI et al., 2017), e seu efeito na redução da sobrevivência de cupins é bem conhecido (CASTILHOS-FORTES et al., 2002; SINGHA; SINGHA; DUTTA, 2010; PUJIASTUTI et al., 2018).

Todavia, a ecologia de *Bt* ainda é um enigma, haja visto que se trata de um microrganismo ubíquo do solo, mas que também é encontrado na filosfera e no sistema intestinal hospedeiro do inseto (JENSEN et al., 2003), conforme descrito para o trato intestinal dos cupins *Coptotermes formosanus*, *Odontotermes formosanus* (MATHEW et al., 2011; 2012) e *Constrictotermes cyphergaster*. No entanto, ainda é pouco elucidada a relação que essa bactéria mantém com essas espécies de cupins.

#### *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadaceae)

As *Pseudomonas* spp estão presentes nos ambientes terrestres, aquáticos e atmosféricos, exibindo uma grande variedade de funções ecológicas (FLURY et al., 2016). Dentre os seus representantes, encontra-se *P. aeruginosa*, uma bactéria comum do solo, patógeno oportunista em diversos hospedeiros, incluindo mamíferos (STEVENS et al., 1994), insetos (MACIEL-VERGARA; JENSEN, EILENBERG, 2018), nematoides (TAN et al., 1999) e plantas (RAHME et al., 1995). Essa bactéria apresenta-se em baixo número, sem causar doenças, mas pode se tornar patogênica sob certas condições de estresse para os insetos e/ou quando os insetos têm um sistema imunológico enfraquecido (SIKOROWSKI e LAWRENCE, 1994; MACIEL-VERGARA; JENSEN, EILENBERG, 2018). Acredita-se que o responsável pelo o potencial entomopatogênico dessa bactéria esteja relacionada ao cianeto de hidrogênio (CASTRIC, 1975), produzido como metabólito secundário pelo patógeno (BLUMER e HAAS, 2000).

Para os cupins, há diferentes relatos de ação para essa bactéria. Em *C. formosanus*, por exemplo, as cepas de *P. aeruginosa* causaram redução na atividade de escavação de túneis, consumo de madeira e aumento na mortalidade (CHIN et al., 2020). Apesar disso, contribuíram na resposta imunológica de *Reticulitermes flavipes*, através da produção de proteínas antimicrobianas na hemolinfa destes indivíduos

(ZENG et al., 2018). Ninfas de *Zootermopsis angusticollis* obtiveram uma sobrevivência significativamente maior do que os controles estudados, sendo sugerido uma resposta positiva a exposição prévia ao patógeno, o que confere aos cupins um grau de proteção durante um encontro subsequente com o mesmo patógeno (ROSENGAUS et al., 1999).

### *Constrictotermes cyphergaster*

*Constrictotermes cyphergaster* é um cupim Neotropical, amplamente encontrado em ambientes áridos do Cerrado e Caatinga no Brasil, e em algumas regiões da Argentina, do Paraguai e Uruguai (MÉLO; BANDEIRA, 2004; TORALES et al., 2005). Essa espécie tem sido vista como um modelo para se entender a ecologia de cupins, especialmente em matas secas. Os estudos a seu respeito desde os últimos 20 anos em ambiente de Caatinga mostraram sua densidade e estrutura populacional ( $59,0 \pm 22,53$  ninhos ativos/ha; 278,2 indivíduos/m<sup>2</sup>, com aproximadamente 0,9 g (peso fresco)/m<sup>2</sup>) (VASCONCELLOS et al., 2007), seu hábito alimentar, incluindo madeira em diferentes estágios de decomposição como principal recurso, bem como o consumo da superfície da casca de árvores vivas e líquens (MOURA et al., 2006b; BARBOSA SILVA et al., 2019; BARBOSA-SILVA & VASCONCELLOS, 2019). Além disso, um pouco de sua história natural mostrou a dinâmica de construção de seus ninhos (BEZERRA-GUSMÃO et al., 2013), apresentando comportamento policálico (BEZERRA-GUSMÃO et al., 2008, 2013). Além disso, registrou-se que a espécie é capaz de ciclar cerca de 44.5 kg de matéria orgânica vegetal/ha-ano, correspondendo a 13% da produção anual de serapilheira (MOURA et al., 2008).

Por apresentar hábitos de forrageamento a céu aberto (MOURA et al., 2006a) (Fig. 1A) e construção de ninhos principalmente arborícolas (Fig. 1B), feitos com partículas do solo, cimentadas com saliva, cuja coloração varia de acordo com a textura do solo (BEZERRA-GUSMAO, 2011), os indivíduos de *C. cyphergaster* estão expostos a uma grande diversidade de microrganismos. Barbosa-Silva et al. (2016) descreveram a presença de 10 espécies de ascomicetos em seus ninhos. O material analisado por esses autores correspondeu a uma massa negra acumulada dentro dos ninhos, que combina uma mistura de fezes do construtor e solo (KOGISO et al., 2007). Aqueles autores sugeriam que esporos fúngicos podem se aderir à cutícula desse

cupim durante o seu forrageio, ou serem ingeridos junto com os recursos coletados, um fator que pode refletir no aumento da suscetibilidade da colônia a infecções. Todavia, ainda é incerto qual é o efeito dos patógenos na resposta imunológica desse cupim, além do papel da microbiota na suscetibilidade das colônias às infecções microbianas.

**Figura 1 - A.** Forrageio em trilhas expostas de *Constrictotermes cyphergaster*. **B.** Ninho arborícola de *C. cyphergaster*

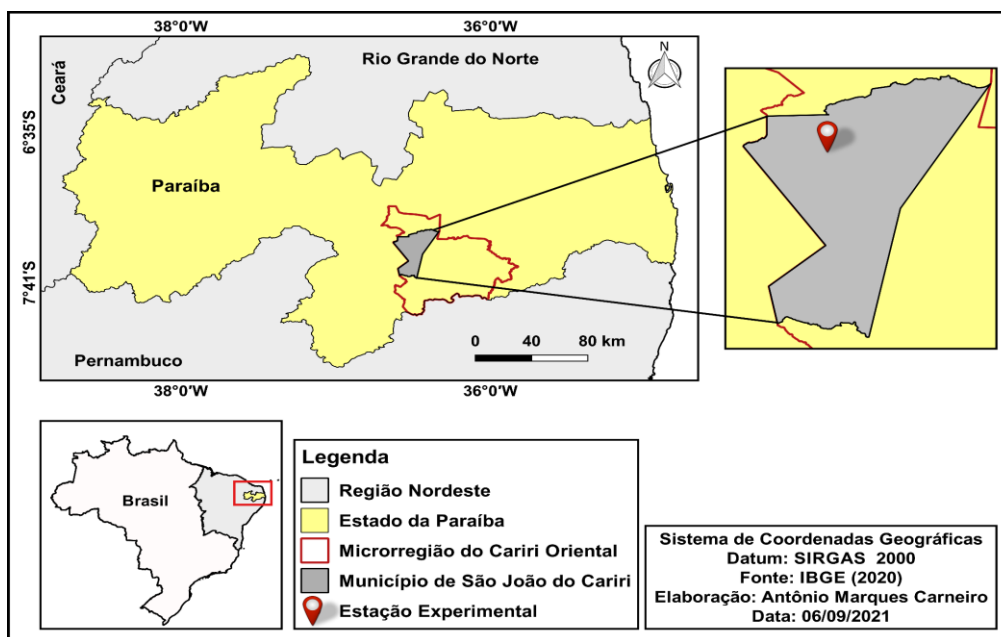


Fonte: Autor.

## 2 LOCAL DE ESTUDO

Os cupins Termitidae do capítulo de diversidade bacteriana (*Cornitermes cumulans*, *Procornitermes araujoi*, *Silvestritermes euamignathus*, *Syntermes dirus* e *Velocitermes heteropterus*, *Ruptitermes xanthochiton*, *R. reconditus* e *Patawatermes sp*) foram coletadas nos municípios de Campinas (22 ° 54 ' 3 "S; 47 ° 03 ' 26 " W) e Rio Claro (22 ° 24 ' 41 " S; 47 ° 43 ' 31 "W), no estado de São Paulo. Por outro lado, *C. cyphergaster* para o estudo de sobrevivência foram realizadas na Estação Experimental de São João do Cariri (Fig. 2) (EESJC) ((7° 20' S, 36° 31' O) (SOUZA et al., 2009). A área possui vegetação de Caatinga, um tipo de Floresta Tropical Sazonalmente Seca (SDTF) da América do Sul, no domínio semiárido do Nordeste do Brasil, apresentando uma mistura de indivíduos caducifólios, arbustos e árvores. Entre as espécies predominantes da área estão representantes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.), *Croton blanchetianus* Baill., *Combretum leprosum* Mart, *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill., *Aspidosperma pyrifolium* Mart. e *Tacinga palmadora* (Britton & Rose) (BARBOSA et al., 2007). A região onde se localiza a EESJC está a 500 metros de altitude, apresentando relevo suave e ondulado (De SOUZA; MACÊDO, SILVA, 2015), com temperatura variando entre 24 e 29°C (BARBOSA et al., 2007; SOUZA et al., 2009).

**Figura 2** - Localização do município de São João do Cariri, PB - Brasil.



Fonte:Autor.

# ARTIGO 1 - CAPÍTULO 1

## A INFLUÊNCIA DO HÁBITO ALIMENTAR E DA CASTA NA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CUPINS TERMITIDAE

Maria do Socorro Lacerda Rolim<sup>1</sup>  
Alberto José Arab Olavarrieta<sup>2</sup>  
Maria Avany Bezerra Gusmão<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação – PPGEC, Campina Grande - PB, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Evolução e Diversidade - EvoDiv, São Bernardo do Campo - SP, Brasil

**RESUMO** - Em Termitidae, a comunidade bacteriana intestinal, que atua na degradação de lignocelulose, pode variar de acordo com o tipo de dieta e da casta dos cupins. Este estudo teve por objetivo descrever a microbiota intestinal das castas operários e soldados de cupins Termitidae com hábitos alimentares distintos. A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada através das suas sequências gênicas. Os principais grupos microbianos detectados foram Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, Synergistetes, Actinobacteria, Fibrobacteres, Planctomycetes, Candidate\_phylum\_TG3 e Lentisphaerae. Com exceção de *Cornitermes cumulans* e *Velocitermes heteropterus*, houve predomínio do filo Firmicutes para as espécies amostradas. A diversidade beta mostrou diferença significativa entre os operários e guildas dos cupins de diferentes espécies, mas não entre as castas de uma mesma espécie. Essas mudanças de composição nas guildas alimentares foram relacionadas ao processo de substituição de espécies bacterianas. A partição da beta diversidade mostrou que os operários dos *Apicotermittinae*, de *Syntermes dirus* e de uma colônia de *Velocitermes heteropterus* foram as espécies que mais contribuíram nas diferenças de composição da comunidade, mas tal resultado foi relacionado a um baixo número de simbiontes bacterianos. A diferença de unidades taxonômicas operacionais entre as castas pode ser atribuída às funções distintas desempenhadas por estes indivíduos na colônia. Por outro lado, a diferença não significativa em relação a composição pode estar atrelada ao compartilhamento de simbiontes via trofalaxia. Embora os resultados do presente trabalho mostrem a importância da dieta na composição intestinal em cupins, fatores como a história evolutiva do hospedeiro devem ser consideradas. Torna-se necessário a inserção

desses fatores em sinergia, como forma de afunilar o conhecimento sobre a dinâmica na estruturação dessa comunidade bacteriana intestinal.

**Palavras-chave:** Microbiota intestinal. Hábito alimentar. Térmita. Simbiontes.

## 1 Introdução

As associações mutualísticas entre insetos e bactérias intestinais são importantes na regulação do metabolismo do hospedeiro e na promoção de uma digestão eficiente (KAUFMAN e KLUG, 1991). Nos cupins, a associação inteiramente procariótica é conhecida apenas para os Termitidae, ao contrário do observado para as outras famílias que abrigam simbiontes intestinais como protozoários flagelados e arqueas, além das bactérias (NI e TOKUDA, 2013; KRISHNA et al., 2013). A família Termitidae também se destaca pela diversificação do hábito alimentar (EGGLETON e TAYASU, 2001), cujos simbiontes incluem, além das bactérias, protozoários flagelados e arqueas.

A diversidade alimentar encontrada em cupins tem sido o interesse de variados estudos (MATHEWS, 1977; BANDEIRA & MACAMBIRA, 1988; CONSTANTINO, 1992; EGGLETON et al., 1995), os quais buscaram classificar esses indivíduos em diferentes grupos tróficos. No entanto, não houve concordância entre os especialistas (DONOVAN et al., 2001). Em classificação mais recente, utilizando espécie de cupins do Cerrado, Constantino (2015) descreveu a seguinte classificação trófica: Xilófagos, Ceifadores, Humívoros e/ou Geófagos, Intermediários, Especializados e Cultivadores de fungos.

A composição da comunidade bacteriana que abriga os intestinos dos cupins pode variar de acordo com a dieta utilizada (MIKAELIAN et al., 2015; MOREIRA et al., 2018; HU et al., 2019), assim como com o tipo de casta e a idade dos indivíduos (HONGO et al., 2006). Recentemente, Otani et al. (2019) mostraram que apesar da troca contínua de simbiontes via trofalaxia, um subconjunto de bactérias se proliferam de forma diferente entre soldados e operários de *Macrotermes natalensis* e *Odontotermes* spp (EGGLETON, 2011), além da história evolutiva e adaptações de nicho dos hospedeiros (DIETRICH et al., 2014; OTANI et al., 2019).

A dieta do hospedeiro é um importante fator exógeno na mudança da estrutura dessa comunidade e de suas capacidades metabólicas (BOLNICK et al., 2014).

Diferenças nas composições bacterianas para determinados grupos de cupins submetidos a diferentes dietas têm mostrado predominância de alguns táxons bacterianos relacionados a especificidade nutricional (MIKAELIAN et al., 2015; WAIDELE et al., 2017), como o visto para cupins que se alimentam de fungos, em que Bacteroidetes é o filo predominante em seus intestinos (OTANI et al., 2016). Essas mudanças nas comunidades microbianas intestinais podem ser refletidas em alterações na composição (presença ou ausência de taxa microbiana) ou na estrutura (abundância relativa de taxa microbiana), que alteram o perfil funcional da comunidade (NG et al., 2018).

Recentes estudos envolvendo a microbiota intestinal tem lançado mão de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, o que nos permite explorar microrganismos exclusivos do trato digestivo de cupins (KUDO, 2009). No entanto, para a região Neotropical apenas alguns trabalhos são conhecidos (MOREIRA et al., 2018; CAMPANINI et al., 2021; VIKRAM et al., 2021), havendo raras informações acerca da diversidade bacteriana que envolvem a análise conjunta entre dieta e casta de cupins Termitidae. Neste sentido, o objetivo do nosso trabalho foi descrever a diversidade intestinal bacteriana entre espécies de cupins Termitidae com diferentes hábitos alimentares, e entre as castas de soldados e operários. De acordo com as informações relatadas anteriormente, a hipótese testada foi que a variação da composição microbiana entre as guildas alimentares de cupins é mediada pela substituição de espécies de bactérias, enquanto que a variação da composição entre as castas é mediada pelo ganho ou perda de espécies.



## 2 Metodologia

### 2.1 Amostragem

Todas as amostras estudadas de cupins Termitidae foram coletadas nos municípios de Campinas (22 ° 54 ' 3 "S; 47 ° 03 ' 26 " W) e Rio Claro (22 ° 24 ' 41 " S; 47 ° 43 ' 31 "W), no estado de São Paulo. As espécies foram *Cornitermes cumulans* (Ceifador), *Procornitermes araujoi* (Intermediário), *Silvestritermes euamignathus* (Intermediário), *Syntermes dirus* (Ceifador), *Velocitermes heteropterus* (Ceifador), *Patawatermes* sp (comedor de solo), *Ruptitermes reconditus* (Ceifador) e *R. xanthochiton* (Ceifador). Todas as espécies de cupins foram amostradas em áreas que eram originalmente florestas semidecíduas, mas o desenvolvimento agrícola fragmentou a vegetação, resultando em uma paisagem amplamente desmatada com pastagens intercaladas com fragmentos de floresta nativa. O clima é moderadamente úmido; a temperatura média anual e pluviosidade são 23 °C e 1513 mm, respectivamente, com altitude variando de 720 a 1350 m (MENEZES et al., 2017; MOREIRA et al., 2018). Para a classificação dos grupos funcionais foi adotada a nomenclatura proposta por Constantino (2015).

### 2.2 Análises

As sequências gênicas da microbiota intestinal dos cupins foram obtidas da base do European Nucleotide Archive (ENA), através do projeto N° PRJEB17080, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB17080>. As sequências foram mescladas, filtradas e transformadas em Unidade Taxonômica Operacionais (OTUs) através da plataforma USEARCH versão 8.1.1803 utilizando o algoritmo de UPARSE com similaridade de 97%. A riqueza e a diversidade das OTU's bacterianas foram determinadas utilizando a função *plot\_richness* no pacote "phyloseq" (PAUL e HOLMES 2013). A diversidade entre operários e soldados foi realizada apenas nas espécies de cupins que apresentavam soldados nas amostras coletadas (*C. cumulans*, *P. araujoi*, *S. euamignathus*, *S. dirus* e *V. heteropterus*), excetuando-se os apicoterminae. Para verificar as diferenças significativas das estimativas de  $\alpha$ -diversidade, os dados foram submetidos a modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição de erro Poisson, com ajuste para *quasiPoisson*. O modelo incluiu a variação na quantidade de OTUs bacterianas (y-vars) em resposta à espécie\*casta dos cupins (x-vars).

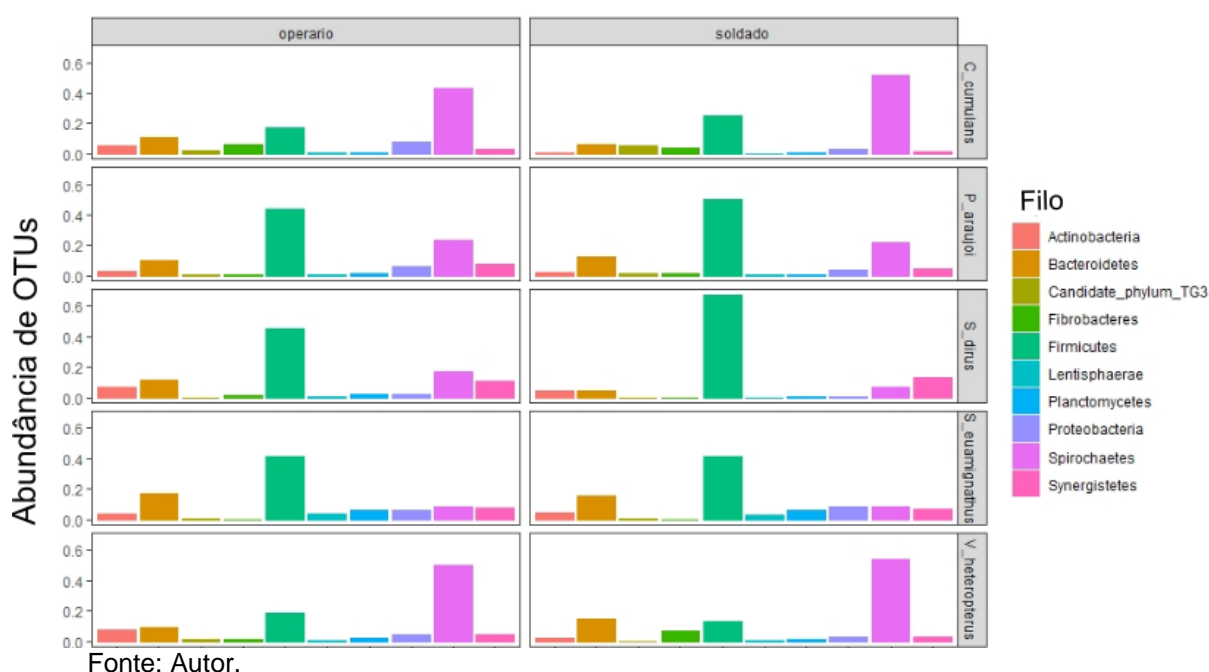
A composição da microbiota entre as espécies de cupins e suas guildas alimentares foi avaliada utilizando uma análise permutacional de variância (PERMANOVA) com 10000 permutações. No caso de significância entre as espécies ou guildas, foi avaliado se essas diferenças foram mediadas por variações da riqueza da microbiota ou por substituição de espécies entre as comunidades (BASELGA, 2010). Por outro lado, para quantificar a contribuição dos simbioses intestinais e das espécies de cupins hospedeiras nas diferenças entre as comunidades microbianas, a beta diversidade também foi particionada em dois componentes de acordo com Legendre e Cáceres (2013), tendo como base a contribuição das espécies de bactérias que compõem a microbiota intestinal (SCBD) e a espécie de cupim hospedeira (LCBD). SCBD indica quanto é a contribuição de cada espécie de bactéria simbiote na diferença entre as microbiotas dos cupins. Por outro lado, LCBD representa a singularidade ecológica de cada espécie de cupim hospedeira no contexto da beta diversidade total. Valores maiores de SCBD e LCBD indicam a importância do cupim hospedeiro ou da espécie de bactéria simbiote nas diferenças observadas na comunidade de cupins e seus simbioses intestinais. Os valores de SCBD e LCBD e da participação da beta diversidade nos componentes riqueza e substituição foram calculados através da função *beta.div* e *beta.div.comp* do pacote *adespatial*, respectivamente (DRAY et al., 2021). A PERMANOVA foi realizada através da função *adonis2* do pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2020). Os gráficos foram construídos através dos pacotes 'ggplot2' (WICKHAM, 2016), "RColorBrewer" (NEUWIRTH, 2014) e "phyloseq" segundo o roteiro disponível em <https://bioconductor.org/help/coursematerials/2017/BioC2017/Day1/Workshops/Microbiome/MicrobiomeWorkflowII.html>. Todas as análises foram realizadas usando o software R (versão 4.1.1) (R CORE TEAM, 2021).

### 3 Resultados

#### 3.1 Diversidade alfa

Os principais filos microbianos detectados no nosso estudo foram Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, Synergistetes, Actinobacteria, Fibrobacteres, Planctomycetes, Candidate\_phylum\_TG3 e Lentisphaerae (Fig. 1.1). Os primeiros cinco filos supracitados foram os mesmos para todas as amostras de cupins, com apenas pequenas diferenças nas abundâncias relativas. Um exemplo foi Firmicutes, que predominou em todas as espécies (incluindo as castas) amostradas neste estudo, com exceção de *C. cumulans* e *V. heteropterus*.

**Figura 1.1** - Diversidade bacteriana em intestino de operário e soldado de cupins Termitidae.



Para os cupins consumidores de serrapilheira e grama, como *C. cumulans*, dominou o filo Spirochaetes (abundância média de ~44% para operários e ~52% para soldados), seguido de Firmicutes (17% para operários e ~25% para soldados) e Bacteroidetes (~11% e ~6% para soldados) (Fig. 1.1); em *S. dirus*, consumidores de grama, Firmicutes foi o filo predominante (~46% para operários e ~68% para soldados), seguido por Synergistetes (~11% nos para operários e ~14% para soldados), Spirochaetes (~17% para operários e ~7% para soldados), Bacteroidetes (~11% para operários e ~4.3% para soldados) e Actinobacteria (~7.2 para operários e ~4.3% para soldados) (Fig. 1.1). Já para *V. heteropterus*, consumidores de

serapilheira, os filos predominantes foram Spirochaetes (~50% para operários e ~60% para soldados), Firmicutes (~19% para operários e ~13% para soldados), Bacteroidetes (~9.2 para operários e ~15% para soldados) e Fibrobacteres (~6.7%). Em contrapartida, a actinobacteria esteve presente em menor abundância nos soldados dessa espécie (~2%) quando comparado aos operários, em que o filo actinobacteria também predominou (~7.5%).

Nos consumidores de madeira/serapilheira, representados por *P. araujoi*, Firmicutes foi predominante (44% para operários e 50% para soldados), seguido por Spirochaetes (~24% para operários e 22% para soldados), Bacteroidetes (~11% para operários ~13% para soldados), Synergistetes (~8% para operários e ~4.3% para soldados) e Proteobacteria (~6% para operários e ~3.6% para soldados). Para os consumidores de madeira/solo, a exemplo de *S. euamignathus*, Firmicutes também predominou (~42% para operários e soldados). No entanto, Bacteroidetes foi o segundo filo que predominou (~17% para operários e ~16% para soldados), seguido por Proteobacteria e Spirochaetes (ambos com ~9%), Synergistes (~7%) e Planctomycetes (~6%) registrados para os soldados. Nos seus operários, houve predominância de Spirochaetes (~8.5%), Synergistes (~7.6%), Proteobacteria (~6.4%) e Planctomycetes (~6.3%) (Fig.1.1).

Já *Patawatermes* sp, consumidor de solo, observamos que houve predominância do filo Firmicutes (~35%), seguido por Bacteroidetes (~17%) e proteobacteria (~13%) (Fig. 1.2). Para os Apicotermitinae consumidores de serrapilheira, também descritos pela 1ª vez, representado por *R. reconditus*, predominou os filos Firmicutes (~40%), Synergistetes (~17%), Bacteroidetes (~11%), Planctomycetes (~7%) e Proteobacteria (~5,7%). Para *R. xanthochiton*, houve predomínio de Firmicutes (35%), Synergistetes (~20%), Bacteroidetes (~21%), Proteobacteria e Planctomycetes (~6%). Destaca-se que *Ruptitermes* spp apresentaram aumento na abundância de OTUs referentes ao filo Synergistes em comparação com as demais espécies de cupins amostradas no estudo (Fig. 1.2).

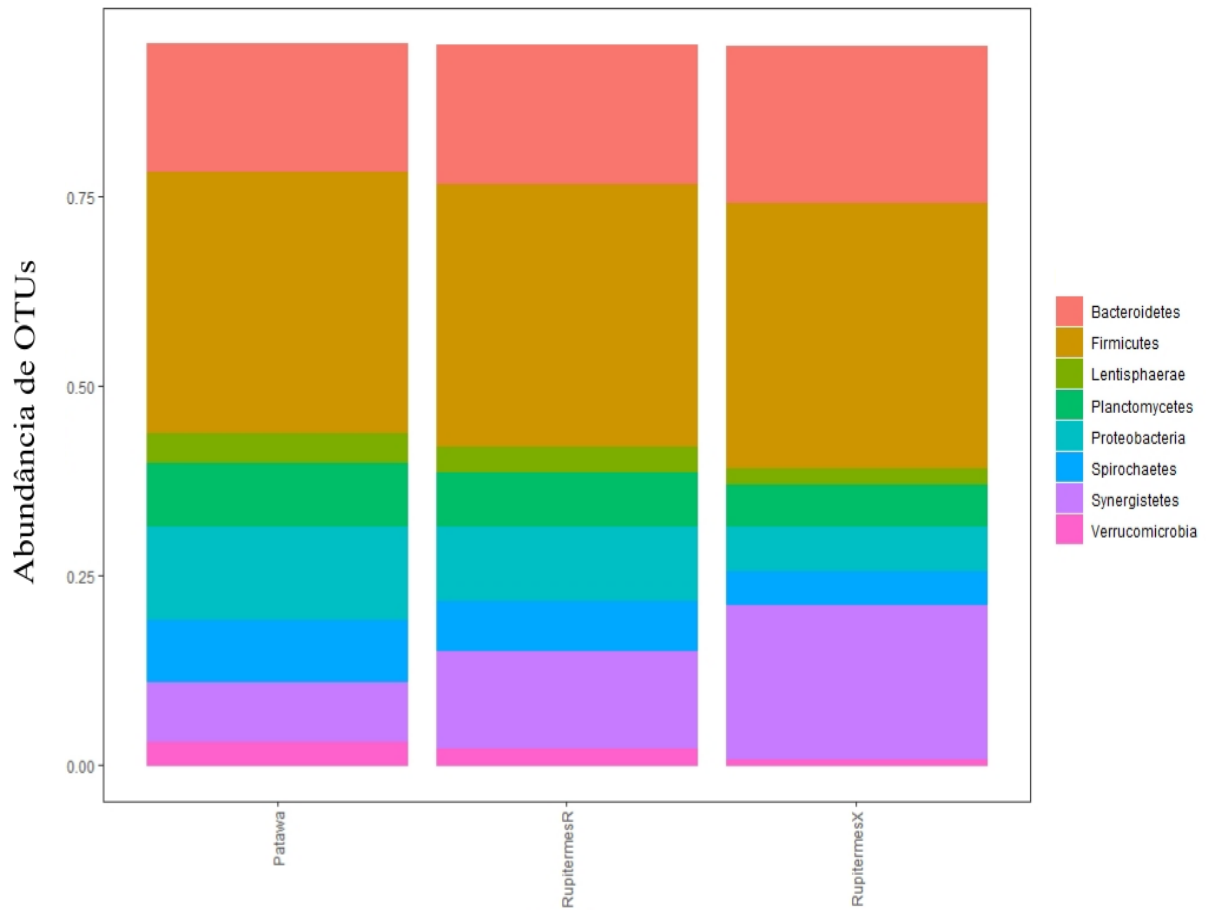
A distribuição das OTUs bacterianas apresentou diferença significativa em relação a espécie ( $F= 6.54$ ,  $p<0.001$ ) e as castas dos cupins ( $F= 4.53$ ,  $p<0.001$ ) (Fig 1.3), bem como na interação entre essas variáveis ( $F= 5.81$ ,  $p<0.001$ ).

### 3.2 Diversidade beta

A composição microbiana das espécies de cupins avaliadas neste estudo mostrou diferença significativa entre os operários ( $F= 3,34$ ,  $p= 0,001$ ; PERMANOVA) e as guildas ( $F= 4,68$ ,  $p= 0,001$ ; PERMANOVA). Não foram observadas diferenças significativas da composição da microbiota intestinal entre as castas de operários e soldados ( $F= 0,10$ ,  $p= 0,75$ ; PERMANOVA). As diferenças observadas na composição da microbiota intestinal foram ocasionadas tanto por variações da riqueza de simbiontes entre as espécies de cupins avaliadas, como também pela substituição de algumas espécies desses simbiontes (Fig. 1.4A). No entanto, as diferenças observadas entre as guildas de cupins (ceifadores e intermediários) foram explicadas principalmente pela substituição de espécies de simbiontes entre os grupos alimentares desses cupins (Fig. 1.4).

A partição da beta diversidade mostrou que os operários dos Apicotermatinae, *S. dirus* e de uma colônia de *V. heteropterus*, apresentaram os maiores valores de LCBD, indicando que as diferenças encontradas entre as microbiotas são mediadas em parte pela diversidade microbiana do trato digestivo desses cupins (Fig. 1.5A). Os maiores valores de LCBD estão correlacionados com baixos valores de riqueza ( $r= -0.89$ ;  $p< 0,001$ ; Correlação de Pearson), indicando que as diferenças observadas na microbiota entre as espécies de cupins avaliadas são ocasionadas por um baixo número de bactérias simbiontes. Os simbiontes que mais contribuíram para as diferenças observadas entre a microbiota dos cupins foram OTU\_3 (Firmicutes; não identificado), OTU\_31 (Synergistetes; Termite\_cockroach\_cluster) e o OTU\_1 (Spirochaetes; *Treponema*) (Fig 1.5B).

**Figura 1.2** - Diversidade de filós bacterianos nas espécies de cupins *Patawatermes* sp e *Rupititermes* spp.



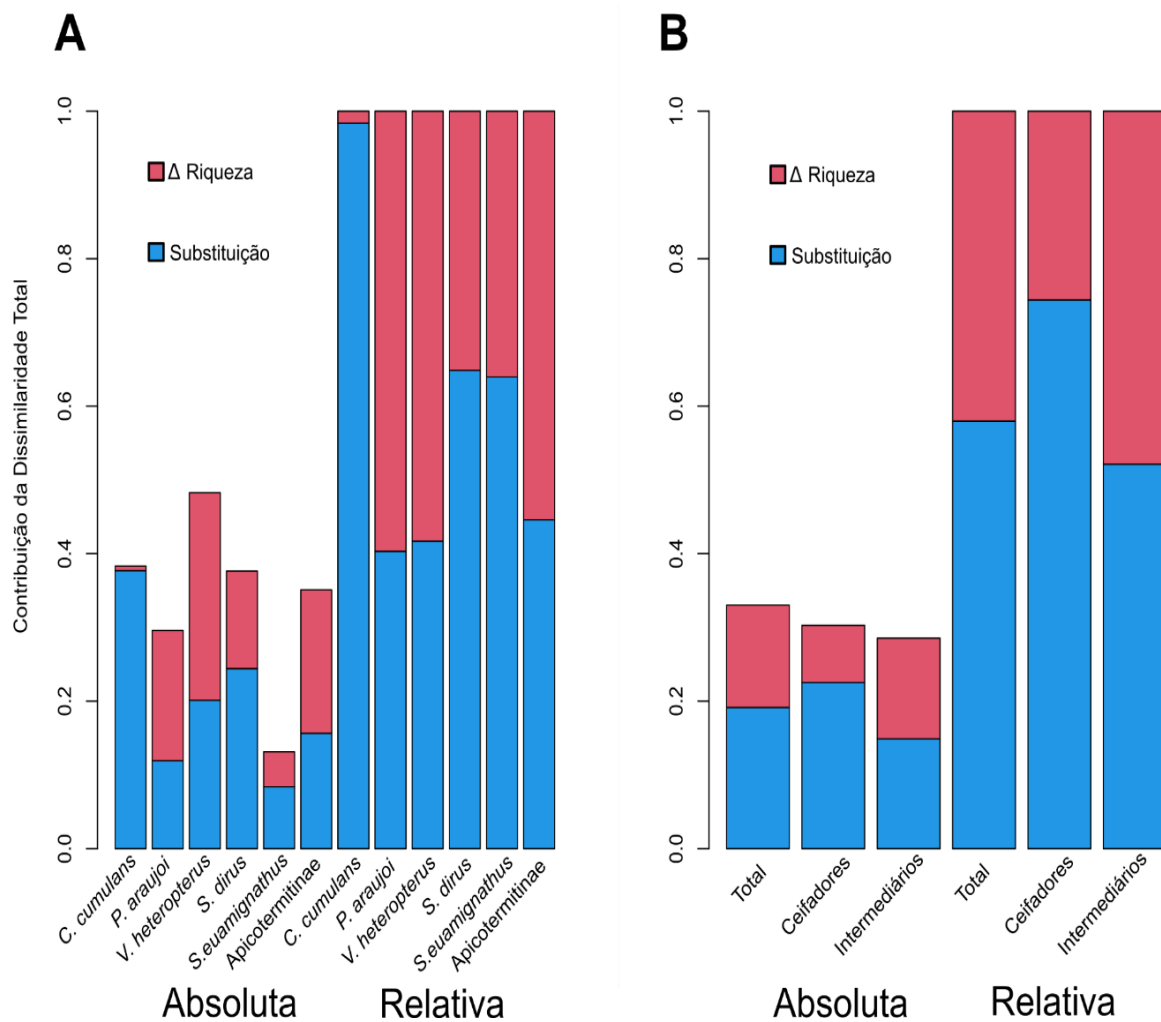
Fonte: Autor.

#### 4 Discussão

Os filos de bactérias representados neste estudo são relatados como promotores da degradação da celulose (HONGO et al., 2006). O predomínio de *Spirochaetes* em *C. cumulans* e *V. heteropterus* corrobora resultados em que há dominância desse filo no intestino de cupins superiores da América do Sul, que se alimentam de grama e serapilheira (MIKAELYAM et al., 2015; GRIECO et al., 2013; VIKRAM et al., 2021).

A predominância de Firmicutes em *P. araujoi* e *S. euamignathus*, ambas as espécies xilófagas, mostra a composição de sua comunidade diferente de outros cupins xilófagos. Victorica et al. (2020) registraram *Spirochaetes* predominando o intestino de *Cortaritermes fulviceps* e *Nasutitermes aquilinus* (Nasutitermitinae), ambos consumidores de madeira. Vale ressaltar, no entanto, que *P. araujoi* e *S. euamignathus* (Syntermitinae) são capazes de explorar mais de um recurso, essa mudança na abundância dos táxons bacterianos pode estar relacionada ao fato de que, insetos com dietas amplas, como onívoros e detritívoros, têm comunidades intestinais que são diversas, com centenas de táxons bacterianos associados (TINKER e OTTESEN, 2016; NG et al., 2018). Este comportamento pode estar associado a necessidade de degradação das diversas moléculas ingeridas nos diversos itens alimentares (AUER et al., 2017).

**Figura 1.3** - Partição da beta diversidade nos componentes riqueza e substituição de espécies nos cupins avaliados. A) Partição observada entre os operários das diferentes espécies de cupins. B) Partição observada entre as guildas de cupins avaliadas.

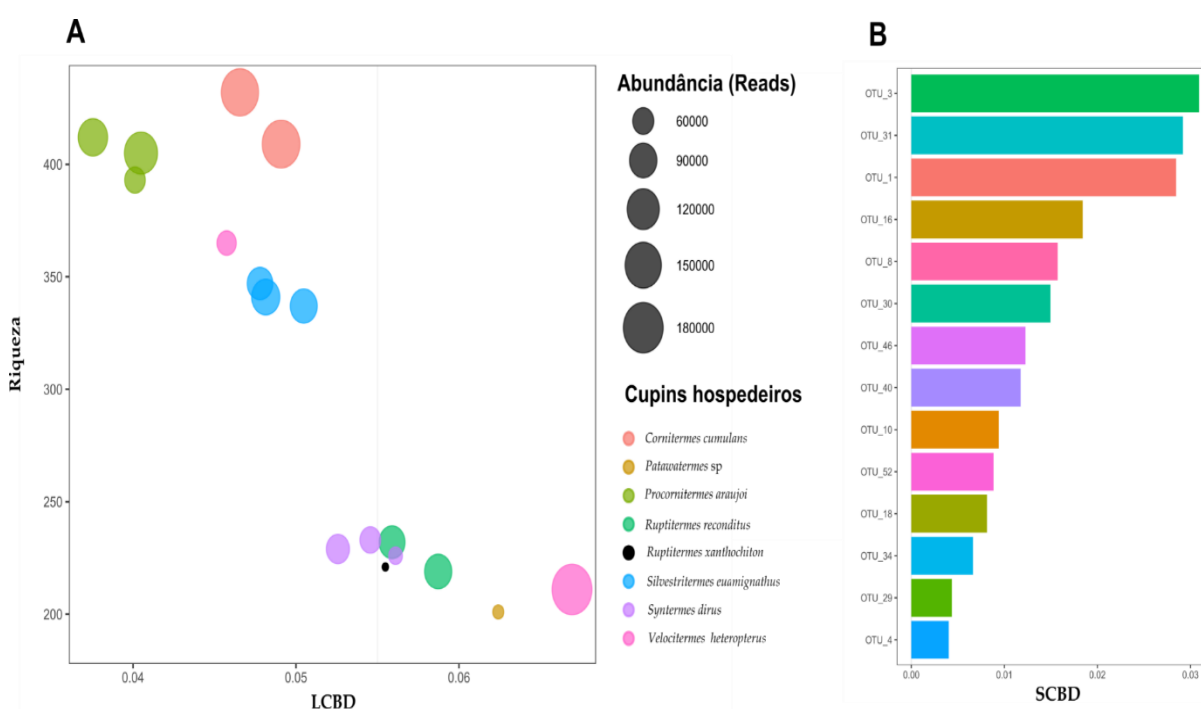


Fonte: Autor,



A predominância de Firmicutes também já foi registrada para *C. cumulans*, *Termes hospes* e *Neocapritermes taracua*, espécies consumidoras de serapilheira e húmus (ROSSMASSLER et al., 2015; MOREIRA et al., 2018; GRIECO et al., 2019; MARYNOWSKA et al., 2020). Para os cupins que apresentam o solo como item alimentar (*S. euamignathus* e *P. turricola*), a abundância alta de Bacteroidetes era esperada, visto que há uma forte conexão entre as comunidades bacterianas associadas ao solo com os representantes desse filo (THOMAS et al., 2011). Embora em menor abundância, também era esperada a presença de Planctomycetes, sendo relatada em *Cubitermes* spp, consumidoras de solo (KOHLENER et al., 2008).

**Figura 1.4** - A) Contribuição local (LCBD) e B) dos simbiontes intestinais (SCBD) da beta diversidade entre as espécies de cupins avaliadas. O tamanho dos círculos indica a abundância (reads) relativa dos simbiontes intestinais.



A diferença na abundância de OTUs bacterianas entre as castas pode estar associada ao fato de que, embora operários alimentem os soldados via trofalaxia, as necessidades nutricionais são distintas em função dos papéis que cada casta desempenha na colônia, e isto acaba sendo refletido em modificações na estrutura dessa microbiota (HONGOHO et al., 2010; OTANI et al., 2019). No entanto, a diferença não significativa na composição dos táxons bacterianos pode estar associada também

ao fato de que os soldados não podem se alimentar sozinhos e dependem dos operários que fornecem alimentos digeridos ou semi-digeridos.

A dieta também é um dos principais fatores que contribuem na modulação da microbiota (MIKAELIAN et al., 2015), refletindo em mudanças na composição de táxons bacterianos. No entanto, a diferença significativa na composição dessa microbiota vista entre as diferentes espécies de cupins deste estudo pode ser explicado essencialmente pela substituição das espécies, contribuindo para elucidar que, apesar da importância da dieta, outros fatores estão relacionados a composição dessa comunidade, como por exemplo, a história evolutiva do hospedeiro, uma vez que há processos de co-evolução nas associações entre micróbios e hospedeiros (BOURGUIGNON et al., 2018; CHOUVENC et al., 2021). Nossos resultados nos fazem refletir sobre o que foi descrito por Bourguignon et al. (2018), que mostraram que as histórias evolutivas dos micróbios do intestino dos cupins são moldadas por transmissão de modo misto. Ou seja, fatores externos, a exemplo da dieta, assim como a história da filogenia do hospedeiro influencia em mudanças na composição da microbiota.

## 5 Conclusão

Apesar da dieta e da casta serem fatores moduladores importantes na estruturação e composição da comunidade bacteriana intestinal há outras variáveis que não foram consideradas, como a história evolutiva do hospedeiro ou heterogeneidade ambiental presente no intestino desses insetos, mas que possuem relação e já tem sido relatada.

Aqui, considerando a dieta e a casta e verificamos diferença significativa na abundância de OTUs bacterianas entre soldados e operários de cupins. No entanto, para a diversidade beta, a diferença de composição dos táxons bacterianos não foi significativa entre as castas, havendo diferença significativa somente para os operários das espécies. Os resultados evidenciam a sinergia de fatores que podem modular a diversidade microbiota intestinal em cupins. Assim, apesar de reconhecer que a microbiota intestinal de cupins é considerada a força motriz na Biologia desses insetos, a forma que essa dinâmica simbiótica acontece tem sido explorada em pequenos passos. Nesse sentido, outras abordagens são necessárias, o que permitirá contribuições em diferentes perspectivas, além de lançar luz no entendimento desse microecossistema intestinal, que tem servido até de fonte para a indústria biotecnológica.

## ARTIGO 2 - CAPÍTULO II

### A INFECÇÃO POR *BACILLUS THURINGIENSIS* NÃO AFETA A SOBREVIVÊNCIA DE *CONSTRUCTOTERMES CYPHERGASTER*

Maria do Socorro Lacerda Rolim<sup>1</sup>

Alberto José Arab Olavarrieta<sup>2</sup>

Liziane Maria de Lima<sup>3</sup>

Érica Olandini Lambais<sup>4</sup>

Maria Avany Bezerra Gusmão<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação – PPGEC, Campina Grande - PB, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Evolução e Diversidade - EvoDiv, São Bernardo do Campo - SP, Brasil

<sup>3</sup> Embrapa Algodão, Campina Grande - PB, Brasil.

<sup>4</sup> Instituto Nacional do Semiárido - MCTI, Campina Grande - PB, Brasil.

**RESUMO** - As bactérias associadas aos cupins desempenham importantes funções, como o mutualismo defensivo, contribuindo em mudanças comportamentais, fisiológicas e bioquímicas no hospedeiro. Este estudo teve por objetivo entender o efeito da bactéria *Bacillus thuringiensis* na sobrevivência de *Constrictotermes cyphergaster*. Foram isoladas 26 cepas bacterianas entre os segmentos do papo e P3 do tubo digestivo dos soldados e operários desse cupim, predominando o gênero *Bacillus*. O bioensaio de sobrevivência mostrou diferenças significativas do tempo médio de morte dos operários (tmm) de *C. cyphergaster* no tratamento envolvendo *Pseudomonas aeruginosa*. Em contrapartida, não houve diferença significativa para os tratamentos *B. thuringiensis* e controle (H<sub>2</sub>O). Tal fato pode estar relacionado a diferentes fatores, compreendendo imunidade individual e coletiva, condições intestinais (pH) e a virulência do patógeno. Para os indivíduos contaminados com *P. aeruginosa* que apresentaram menor tempo de sobrevivência, o modo de ação e/ou mecanismo de virulência, a memória imune, e as condições laboratoriais, que alteram o comportamento do hospedeiro, podem ter contribuído, uma vez que essa bactéria é oportunista e não foi isolada de *C. cyphergaster*. Além disso, verificou-se a influência significativa do tratamento envolvendo *B. thuringiensis*, havendo diminuição na ingestão do recurso (papel-filtro), enquanto que no controle, os indivíduos de *C. cyphergaster* não diminuíram o consumo. Essa diminuição de consumo pode ser

explicada pela fisiologia bacteriana, uma vez que no estabelecimento da doença há diminuição ou interrupção da alimentação do hospedeiro. Embora a relação entre cupins e micróbios seja conhecida, com a proteção contra patógenos e o auxílio nutricional sendo descrita, pouco se sabe até que ponto essa associação passa a ser prejudicial. Neste sentido, o presente trabalho traz contribuições que lançam luz nesse entendimento, uma vez que *B. thuringiensis* não afetou a sobrevivência de *C. cyphergaster*. Todavia, contribuições nas áreas da fisiologia e imunologia ainda são dignos de exploração.

**Palavras-chave:** Interações. Patogenicidade. Bactéria. Térmita.

## 1 Introdução

As interações com patógenos constituem um importante mecanismo seletivo das adaptações comportamentais, bioquímicas e/ou fisiológicas do hospedeiro no combate à doença (ROSENGAUS e TRANIELLO, 1993, ROSENGAUS et al., 1998; MORAN et al. 2008; ROSENGAUS et al., 2011). Nos insetos eusociais, as altas densidades de indivíduos, o alto nível de parentesco entre eles e a estrutura dos ninhos favorecem a transmissão de patógenos e a vulnerabilidade da colônia a doenças (AGUERO; EYER; VARGO, 2020).

Em formigas e vespas a atividade protetora é mediada pela produção de metabólitos secundários antimicrobianos (KALTENPOTH et al., 2012; ENGL et al., 2018). Em algumas formigas, a glândula metapleurálica, produz compostos com atividade antimicrobiana (BROWN, 1967; ORTIUS-LECHNER et al., 2000) que permitem que estes indivíduos se desinfetem continuamente, bem como às suas companheiras e a estrutura do ninho (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006). No entanto, a exclusão competitiva e o priming imunológico realizada por estes indivíduos também podem desempenhar um papel importante no aumento da proteção (KALTENPOTH e ENGL, 2013).

Outros insetos eusociais também desenvolveram estratégias higiênicas coletivas e comportamentos altruístas a fim de evadir, controlar ou eliminar infecções parasitárias (WILSON-RICH et al., 2009), bem como associações microbianas benéficas que contribuem para o aumento das defesas imunológicas integrais (KALTENPOTH et al., 2005). Em cupins, os mecanismos de proteção também são diversos, e incluem os comportamentos coletivos de allogrooming, canibalismo e vibração (CREMER et al., 2019). Soma-se isso aos mecanismos de proteção individual, através da produção de substâncias químicas que apresentam atividade contra microrganismos patogênicos (MITAKA et al., 2017) e a imunidade celular e humoral que melhora significativamente sua resistência aos patógenos (ROSENGAUS et al., 1998; CREMER et al., 2019).

Os microrganismos patogênicos de cupins podem ser fúngicos ou bacterianos (BACH e MCOMIE, 1939). Quando bacterianas, as infecções podem acarretar uma série de sintomas nos indivíduos contaminados, como a perda de apetite e mobilidade, escurecimento do corpo, perda do turgor e odor saprogênico (JURAT-FUENTES e JACKSON, 2012). Knowles (1993) descreve ainda inúmeras alterações fisiológicas,

devido à lise celular e ruptura da membrana basal no intestino do hospedeiro após o estabelecimento da infecção, que incluem a paralisia do intestino médio e a mudança no pH intestinal.

Dentre os principais patógenos bacterianos de insetos encontra-se a família Bacillaceae, em que *Bacillus thuringiensis* é um dos seus representantes mais bem estudados, devido sua efetiva atividade de controle contra indivíduos de diferentes ordens de insetos - Lepidoptera, Coleoptera, Diptera (WANG; HENDERSON, 2013; ZORZETTI et al., 2017; PLATA-RUEDA et al., 2020), e Isoptera. Nesses últimos, estudos mostraram aumento da mortalidade de indivíduos de *Microtermes obesi*, *M. beelsoni* (SINGHA et al., 2010), *Nasutitermes ehrhardti* (Termitidae) (CASTILHOS-FORTES, 2002) e *Coptotermes curvignathus* (Rhinotermitidae) (PUJASTUTI et al., 2018) após a exposição a esse entomopatógeno. Por outro lado, as cepas de *Bt* foram isoladas como fauna simbiótica do intestino de operários de *Odontotermes formosanus* (Termitidae) (MATHEW et al., 2012). É intrigante o fato de um organismo que, ao mesmo tempo em que se comporta como patógeno de cupins Termitidae, possa também estar associado ao trato digestivo de outras espécies da mesma família, como em *Constrictotermes cyphergaster*. Mas, pouco se sabe sobre como os cupins que possuem essa associação simbiótica podem reagir ao contato externo com *B. thuringiensis*.

*Constrictotermes cyphergaster* é cupim Neotropical pertencente à família Termitidae, com distribuição restrita à América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai) (MATHEWS, 1977; KRISHNA et al., 2013). Essa espécie constrói ninhos principalmente arborícolas, embora as rochas também sejam usadas como anexos para construção desses (MOURA et al., 2006a; VASCONCELLOS et al., 2007). Seus ninhos são construídos com partículas do solo, cimentadas com saliva e os indivíduos forrageiam a céu aberto, o que favorece a exposição desses insetos a microrganismos patogênicos no ambiente (MOURA et al., 2006a). Barbosa-Silva et al. (2016) sugeriram que esporos fúngicos podem aderir à cutícula desse cupim durante o seu forrageio, ou serem ingeridos junto com os recursos coletados, favorecendo a suscetibilidade da colônia a infecções patogênicas.

Neste sentido, alguns microrganismos podem desempenhar tantos papéis antagônicos quanto benéficos na aptidão do hospedeiro, a exemplo de populações de bactérias bacilares (KONIG, 2006; PETERSON e SCHARF, 2016). Assim, neste

estudo buscou-se avaliar o efeito da bactéria *B. thuringiensis*, simbiote intestinal de *C. cyphergaster* na sobrevivência desse cupim. Testou-se a hipótese de que a sobrevivência desse cupim não é afetada negativamente pela exposição a *Bt*.

## 2 Metodologia

### 2.1 Local de estudo e amostragem dos cupins

Cinco colônias foram coletadas entre 2016-2018, as quais foram usadas para caracterização da microbiota *C. cyphergaster*, e outras oito colônias (2020-2021) que foram usadas para a realização dos bioensaios de sobrevivência desse cupim. As colônias foram coletadas na Bacia Experimental de São João do Cariri (EESCJ), Estado da Paraíba (7° 20' S, 36° 31' O) - Brasil (SOUZA et al., 2009). Os ninhos foram retirados das árvores hospedeiras e transportados em sacos plásticos até o Laboratório de Ecologia de Térmitas (LET) na Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, *Campus I*. Operários foram separados dos ninhos para os bioensaios de sobrevivência no mesmo dia da coleta. Indivíduos que demonstravam movimentos lentos não foram utilizados nos bioensaios.

### 2.2 Isolamento e cultura de bactérias do trato digestivo

Um total de 100 cupins (50 soldados e 50 operários) foram selecionados aleatoriamente (N = 500) das colônias. As cutículas dos indivíduos foram esterilizadas por imersão em EtOH 70%, seguido de enxágue em água destilada esterilizada (SDW); cada um durante cinco minutos. Os cupins foram então dissecados em placas de Petri usando uma pinça esterilizada, removendo o tegumento e expondo o intestino. O papo e as porções P3 do tubo digestivo foram cuidadosamente seccionadas (NOIROT, 2001). Para a separação do papo foi seccionada a área antes deste e depois da moela. O P3 foi seccionado antes da válvula entérica (P2) e após o esfíncter P3 (BIGNELL e ANDERSON, 1980), para evitar contaminação.

O conteúdo dos cortes foi macerado e diluído em série com 9 mL de água destilada estéril (1:10) em diferentes concentrações e agitado manualmente por 2 min (Fig. APN1). Amostras (100 µL-1) das soluções de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> mL foram espalhadas em placas de Petri (Ø = 10 cm), as quais eram compostas de água e meio de cultura Broth, e incubadas a 31 °C. Esses procedimentos foram realizados em triplicata.



### 2.2.1 Extração e amplificação do gene 16s rRNA

O DNA genômico das bactérias foi extraído usando o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) com as modificações descritas por Doyle e Doyle (1987) e foi analisado em gel de agarose a 0,8% e fotodocumentado usando um transiluminador eletrônico de UV.

Os ensaios de 16S rRNA-PCR foram realizados em um volume total de 25  $\mu\text{L}$ -1 contendo 20 ng-1 de DNA genômico, 2  $\mu\text{L}$ -1 dos primers 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1389R (ACGGGCGGTGTGTACAAG) (10  $\mu\text{M}$ -1), 0,5  $\mu\text{L}$ -1 de mistura de dNTP (10 mM), 1,4  $\mu\text{L}$ -1 de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\times$  tampão de ensaio de PCR e 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotechnology Ltda). As amplificações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ Research PTC-200 Applied Biosystem, com desnaturação inicial a 95 ° C / 5 min seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 ° C / 1 min, anelamento a 55 ° C / 2 min e extensão a 72 ° C / 2 min. Uma etapa de extensão final foi adicionada a 72 ° C / 10 min. Os amplicons (~ 1,5 pb) foram separados em gel de agarose (0,8%) e posteriormente fotodocumentados.

Os produtos de PCR foram sequenciados automaticamente usando um ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) na Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT 01B) CpqGM / Fiocruz, Salvador, BA, Brasil. As sequências dos fragmentos do gene 16S rRNA obtidos foram analisadas por meio da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Escolhemos apenas amostras com identidades de confiança acima de 90%, e cada uma das sequências identificadas foi atribuída a um táxon bacteriano (gêneros e espécies).

### 2.3 Bioensaios de sobrevivência

O efeito do *Bt* nos operários de *C. cyphergaster* foi avaliado através de bioensaios de sobrevivência utilizando-se a cepa isolada previamente do seu trato digestivo e confirmada por sequenciamento genético (Tabela 1, Acesso - CP003752.1). Seu crescimento ocorreu em meio diferencial com Penicilina (SILVA; DIAS; MONNERAT, 2002). As amostras foram armazenadas posteriormente em meio de cultura Nutriente Ágar, sob refrigeração, no LET, UEPB.

Para a execução dos bioensaios foram preparadas diluições seriadas da cepa de *Bt* em solução salina 0,9% e cultura de *Bt* em meio BHI (Brain Heart Infusion). Após a homogeneização das amostras, foram retiradas duas alíquotas das diluições de  $10^5$

a  $10^{10}$ , em que a primeira alíquota (100 ul) foi plaqueada pelo método de espalhamento com alça de Drigalski, em meio de cultura Nutriente Ágar. As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37 °C por 48 horas. A segunda alíquota (10 ul) foi aplicada sob a Câmara de Neubauer para a contagem de células com o auxílio de microscópio óptico para confirmação das concentrações (BARRETO et al., 1999).

Para a contaminação oral dos cupins foi utilizado papel-filtro estéril (55 mm de diâmetro) inoculado com *Bt* nas concentrações  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> de suspensão bacteriana. O uso do papel serviu para contaminação e posteriormente, a análise de seu consumo serviu como contraprova para verificação da infecção do cupim com *Bt*. Os bioensaios foram conduzidos em placas de Petri de vidro estéril (55 mm de diâmetro × 15 mm de altura) em condições controladas no laboratório. Isso permitiu que as bactérias fossem distribuídas uniformemente no papel-filtro (CHIN et al., 2020). Após umedecer o papel filtro com a suspensão bacteriana, esses foram transferidos para uma nova placa de Petri de vidro estéril de mesmo tamanho e deixados secar ao ar por 10 min em capela estéril de bancada. Em seguida, 40 operários foram distribuídos nas placas (n=20 placas/colônia). Todos os tratamentos foram replicados quatro vezes (incluindo o controle negativo), totalizando um n= 800. Para o controle negativo, o papel de filtro foi umedecido apenas com água destilada.

A montagem dos ensaios de sobrevivência foi dividida em duas etapas. A primeira consistiu no controle negativo (água destilada) + tratamentos (concentrações de *Bt*), conforme descrito anteriormente. Adicionalmente, foi feito um controle positivo, totalizando 25 placas por colônia (n=4). Esse ensaio foi realizado utilizando-se a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), reconhecida por sua mortalidade significativa contra insetos (OSBORN et al., 2002, ZANG et al., 2021). A amostra de *Pa* foi concedida pelo Instituto Nacional de Pesquisa no Semiárido (INSA). Esta bactéria não foi isolada do trato digestivo de *C. cyphergaster* e foi utilizada apenas como parâmetro para inferir o efeito do tratamento com *Bt* na sobrevivência desse cupim.

O preparo da suspensão com *Pa* foi realizado seguindo o mesmo protocolo descrito para *Bt*. Utilizaram-se 40 operários de *C. cyphergaster* por placa (n=25 placas/colônia), com concentrações iguais a de *Bt* ( $10^4$  a  $10^8$ ). Os tratamentos foram replicados cinco vezes (incluindo o controle negativo) + inserção do controle positivo (*Pa*) (N=1000). O projeto experimental está resumido nas Figuras APN2 e APN3. Em

todos os casos, a mortalidade dos cupins foi registrada diariamente até o sétimo dia após o início do experimento, retirando-se os operários mortos a cada observação para evitar contaminação e canibalismo (CAMPANINI et al., 2012).

#### 2.4 Infecção bacteriana - Contraprova

A comprovação da infecção por *Bt* e *Pa* foi avaliada a partir da ingestão do recurso (papel-filtro) pelos operários de *C. cyphergaster* impregnado pelas concentrações-tratamento, uma vez que durante o processo de patogênese por infecção bacteriana, os indivíduos infectados apresentam uma diminuição ou inibição da ingestão do alimento. Os papéis foram previamente umedecidos com os tratamentos bacterianos descritos anteriormente, e então calculada a porcentagem de papel consumido (ingerido) pelos os cupins. Este percentual foi analisado através de imagem dos papéis filtro usados nos bioensaios, as quais foram carregadas e analisadas no ImageJ versão 1.8.0., usando a função “set scale”. Para a realização do teste, inicialmente as imagens foram configuradas com os argumentos “known.distance = 10” e “Unit of length= mm” (Figura 3ap). A proporção de pixels em cada parte da imagem segmentada foi utilizada na determinação da área total do papel, assim como a área consumida pelos operários de *C. cyphergaster* (Figura 2AP - B, C e D). Por fim, os valores obtidos em cada medição foram inseridos no seguinte cálculo (área total - somatório das áreas consumidas) para se determinar a taxa de consumo final (Fig. APN4). Estes valores foram posteriormente utilizados nas análises estatísticas.

#### 2.5 Análises estatísticas

Para verificar se a sobrevivência dos operários de *C. cyphergaster* é afetada pelas bactérias entomopatogênicas, o tempo médio de morte dos indivíduos (TMM) para cada placa de cada tratamento e em cada colônia foi avaliado através de análise de sobrevivência com distribuição de Weibull, usando a função *survreg* do pacote survival (THERNEAU, 2021). Uma análise censurada foi utilizada porque nem todos os indivíduos morreram durante o período de avaliação (7 dias). Foi criado um vetor indicativo de censura de dados, onde o valor 1 indicou que o operário de *C. cyphergaster* morreu e 0 que o indivíduo permaneceu vivo após a última observação (7º dia). O modelo incluiu a variação no TMM (*y-vars*) em resposta aos diferentes

tratamentos que *C. cyphergaster* foi exposto (*x-vars*), ambos como fatores fixos, enquanto que a colônia foi utilizada como fator aleatório. A análise de contraste foi realizada para comparação entre as médias obtidas dos tratamentos pelo método de quadrados mínimos, utilizando o pacote *emmeans* (LENTH, 2021).

Os valores obtidos na taxa de consumo foram utilizados para avaliar a variação do consumo (*y-vars*) em resposta aos diferentes tratamentos (*x-vars*) e com estes dados foi construído um GLMM através da função *glmer* do pacote *lme4* (BATES et al., 2015). A área consumida em função do tratamento foi utilizada como fator fixo do modelo, enquanto a área total dos papéis de filtro foi utilizada como fator aleatório. Após isso, os dados de TMM e do consumo foram submetidos a uma análise de desvio, através da função *Anova*, do pacote *car* (FOX e WEISBERG, 2019). Todas as análises foram realizadas no programa R (versão 4.1.1) (R CORE TEAM, 2021).

### 3 Resultados

#### 3.1 Isolamento bacteriano

Foram isoladas 26 cepas bacterianas entre os segmentos do papo e P3 do tubo digestivo dos indivíduos de *C. cyphergaster* amostrados. Todos os isolados encontrados em nosso estudo foram atribuídos aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. O gênero *Bacillus* foi predominante. As amostras referentes a *B. thuringiensis* estavam presentes em soldados e operários (Tabela 1AP).

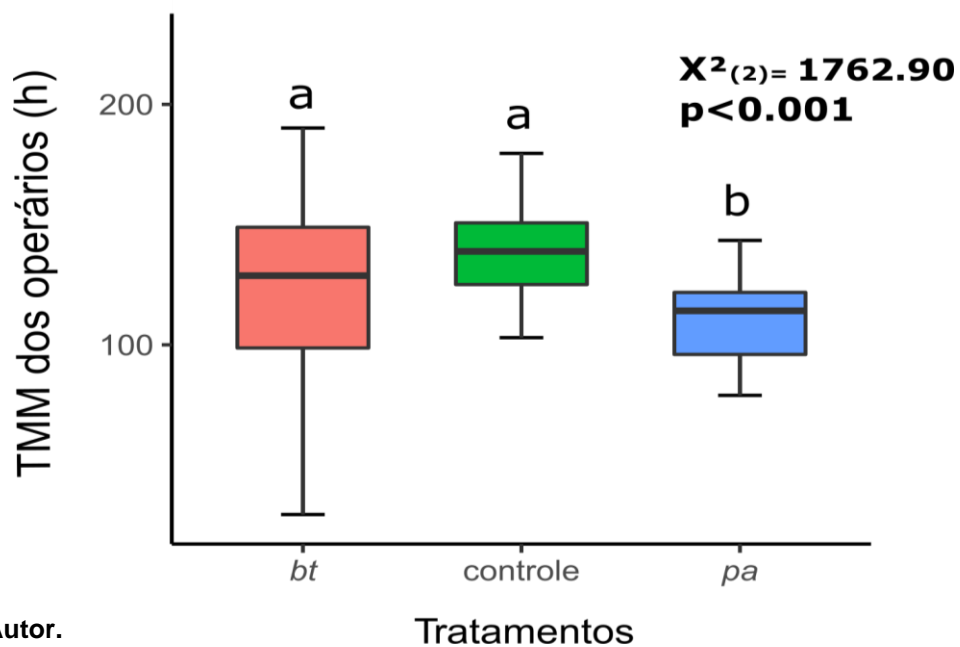
#### 3.2 Bioensaios de sobrevivência

O bioensaio de sobrevivência mostrou diferenças significativas do tempo médio de morte dos operários de *C. cyphergaster* entre os tratamentos avaliados ( $X^2_{(2)}=1762.90$ ,  $P= 0.004$ ). Todavia, os resultados indicaram que a exposição ao *Bt* não afetou significativamente o tempo médio de morte dos operários em relação ao controle ( $t^{(175)}=-0,92$ ,  $p=0,691$ ). No entanto, a exposição dos cupins ao tratamento com *Pa* diminuiu significativamente o TMM dos operários ( $t^{(175)}=3,47$ ;  $p=0,001$ ) (Figura 2.1). O TMM entre os indivíduos tratados com *Pa* e *Bt* também foram significativamente diferentes ( $t^{(175)}=2,30$ ;  $p=0,05$ ).

#### 3.3 Contraprova para infecção dos cupins

Os papéis-filtro foram significativamente consumidos ( $X^2_{(2)}= 16.98$ ,  $p<0.0001$ ), verificando-se diferença significativa do controle em relação aos tratamentos com *Bt* ( $t^{(94)}=-4.122$ ,  $p=0.0002$ , Figura 2.3). Não houve diferença significativa no teste contra prova para os indivíduos expostos aos tratamentos com *Pa* em relação aos tratamentos com *Bt* ( $t^{(94)}=-1.241$ ,  $p=0.4321$ ). Os tratamentos envolvendo *Pa* não diferiram em relação ao controle ( $t^{(94)}= 2.226$ ,  $p=0.0720$ ). Os operários de *C. cyphergaster* consumiram menos os papéis filtro quando expostos *Bt* (Figura 2.2).

**Figura 2.1** - TMM dos operários de *Constrictotermes cyphergaster* após exposição aos entomopatógenos *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas aeruginosa* por 168 h (7 dias). Letras diferentes possuem significância estatística na comparação de médias entre os grupos. No boxplot, a mediana, quartis e bigodes indicam o valor mais alto e mais baixo dentro da faixa interquartil de 1,5. O IC (Intervalo de confiança) corresponde a 95%.



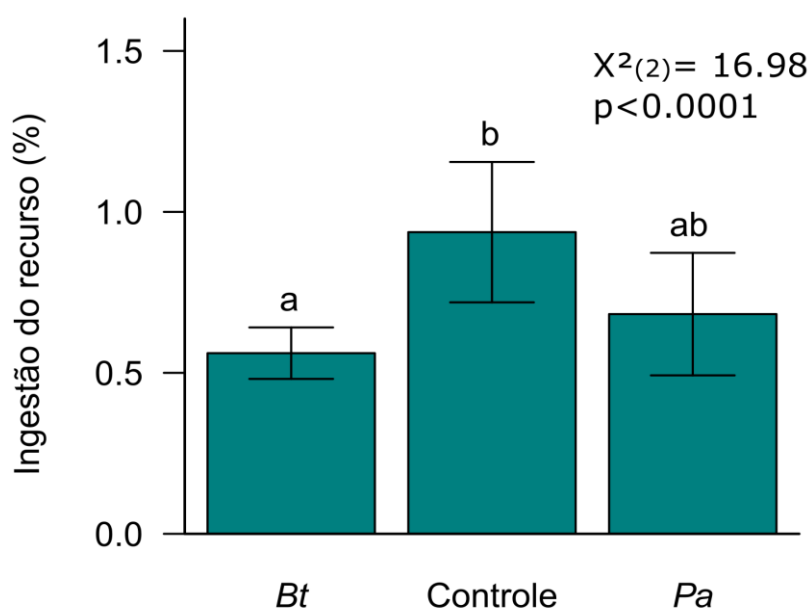
Fonte: Autor.

#### 4 Discussão

As bactérias encontradas no intestino de *C. cyphergaster*, foram representadas principalmente por cepas de *Bacillus* spp (n=22, tabela 1), um gênero comum no ambiente e com requisitos de nicho muito flexíveis (KONIG, 2006). Além disso, essas bactérias são comumente descritas compondo a microbiota intestinal de diferentes espécies de cupins (MIKAELIAN et al., 2015, BRUNE, 2014; MOREIRA et al., 2018). Dentre os seus representantes, registramos cepas de *B. thuringiensis* (*Bt*), uma bactéria já observada nos intestinos dos cupins *C. formosanus* e *O. formosanus* (MATHEW et al., 2011; 2012).

A sobrevivência dos indivíduos de *C. cyphergaster* não foi afetada negativamente pela exposição a *Bt*. Alguns fatores podem fundamentar este resultado, como a virulência da cepa utilizada. Castilhos-Fortes et al. (2012) ao testarem o efeito de 55 cepas de *Bt* sobre *Nasutitermes ehrhardti* (Isoptera, Termitidae) destacaram apenas cinco delas que afetaram negativamente a taxa de sobrevivência desse cupim, com variações no tempo de infecção no hospedeiro.

**Figura 2.3** - Contraprova de infecção para operários de *Constrictotermes cyphergaster* após exposição ao consumo de papel filtro impregnado por entomopatógenos *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas aeruginosa* por 168 h (7 dias). Letras diferentes possuem significância estatística na comparação de médias entre os grupos.



Todavia, apesar de *Bt* ser considerada um entomopatógeno presente no intestino de *C. cyphergaster*, a condição intestinal desse cupim pode não estar favorecendo condições ótimas para o desenvolvimento da patogênese bacteriana, já que o trato digestivo dos cupins apresenta condições físico e químicas diversas (BRUNE, 2010).

Para os representantes do gênero *Bacillus*, a interação com os cupins é do tipo endossimbióticas, auxiliando nos processos metabólicos da digestão, uma vez que representantes desse gênero podem ser encontradas predominando o trato digestivo de diferentes espécies de cupins que se alimentam de lignocelulose (HU et al., 2019, MARYNOWSKA et al., 2020), assim como o solo adjacente às suas colônias (FALL et al., 2007). E há relatos evidenciando o papel de *Bacillus* no controle de microrganismos patogênicos de ninhos (MATHEWS et al., 2012). No entanto, pouco sabemos sobre a relação de proteção que a bactéria bacilar (*Bt*) pode desempenhar em indivíduos de *C. cyphergaster*.

A menor sobrevivência encontrada para os indivíduos de *C. cyphergaster* expostos à bactéria *P. aeruginosa* em relação a *Bt* pode estar relacionada à diferença no modo de ação e/ou mecanismo de virulência utilizada pelos microrganismos (ARGÔLO-FILHO & LOGUERCIO, 2014; CASTAGNOLA e STOCK, 2014). *Pa* é uma bactéria oportunista, que atua principalmente quando os indivíduos estão sob certas condições de estresse e/ ou quando têm um sistema imunológico enfraquecido (SIKOROWSKI e LAWRENCE, 1994). No presente estudo, os indivíduos de *C. cyphergaster* foram expostos aos tratamentos bacterianos em condições laboratoriais e externas aos ninhos, o que pode acarretar em mudanças em sua sobrevivência e comportamento (FERREIRA et al., 2019).

Por outro lado, uma vez infectados, a memória imune do hospedeiro atua na montagem mais rápida ou demorada do sistema imunológico frente a uma infecção nova e/ou subsequente por um patógeno (COOPER e ELEFThERIANOS, 2017). Isso pode explicar a diferença significativa da sobrevivência de *Pa* em relação a *Bt*, uma vez que a cepa de *Pa* utilizada em nosso estudo não possui relação direta com *C. cyphergaster*, pois não foi isolada de seu trato digestivo.

A diferença significativa no teste contraprova (consumo dos papéis) entre os tratamentos bacterianos pode ser explicada pela fisiologia bacteriana uma vez que após a entrada da bactéria e o estabelecimento da doença, os sintomas que indicam o início da bacteriose incluem interrupção da alimentação, paralisia, diarreia ou



vômitos do indivíduo, devido a um desequilíbrio osmótico que causa morte e lise celular, em que seu intestino fica paralisado (ADAMO et al., 2010; JURAT-FUENTES e JACKSON, 2012). Quando infectados, a redução da alimentação (ou seja, anorexia induzida por doença) e/ou a procura por outras fontes alimentares também tem sido descrita para insetos (ADAMO, 2006).

Embora o TMM dos operários de *C. cyphergaster* expostos a *Bt* não tenham diferido em relação ao controle. Nós observamos que após a exposição com *Bt*, os operários de *C. cyphergaster* apresentavam-se letárgicos e com diminuição corporal evidente. Essa mudança comportamental e de tamanho ou textura já foi descrita para cupins contaminados com microrganismos patogênicos (PUJIASTUTI et al., 2018).

Portanto, apesar do teste contraprova (consumo do papel) nos tratamentos com bactéria ter diferido em relação ao controle, como uma provável resposta da infecção bacteriana, ainda assim, não ocorreu o mesmo em relação ao TMM entre *Pa* e *Bt* (Figura 2.1), tornando-se fundamental o desenvolvimento de outros estudos que abordem vertentes em diferentes áreas, sejam comportamentais, fisiológicas, bioquímicas e/ou moleculares, para afunilar o conhecimento acerca da interação entre *C. cyphergaster* e *Bt*, assim como a relação dos cupins e outros microrganismos patogênicos isolados do trato intestinal.

## 5 Conclusão

Apesar de a relação entre cupins e microrganismos ser conhecida, observando-se benéficos para os hospedeiros, como a proteção contra patógenos e o auxílio nutricional, pouco se sabe até que ponto essa associação passa a ser prejudicial, seja para o micróbio ou para o cupim. Nosso trabalho traz contribuições que lançam luz nesse entendimento, uma vez que *B. thuringiensis* não afetou significativamente a sobrevivência do seu hospedeiro, mesmo em altas concentrações, embora o consumo do recurso alimentar tenha sido afetado. Essa mudança no consumo pode a longo prazo contribuir em uma resposta distinta na sobrevivência desses insetos.

## REFERÊNCIAS

- ABE, T. Evolution of life types in termites. **Evolution and coadaptation in biotic communities**, 1987.
- ANDERSON, M. J. et al. Navigating the multiple meanings of  $\beta$  diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecology Letters*, v. 14, p. 19–28, 2011.
- ACIOLI, A. N. S., CONSTANTINO, R. A taxonomic revision of the neotropical termite genus *Diversitermes* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), **Zootaxa**, v. 4032, n. 5, p. 451–492, 2015.
- ADAMO, S. A., BARTLETT, A., LE, J., et al. "Illness-induced anorexia may reduce trade-offs between digestion and immune function", **Animal Behaviour**, v. 79, n. 1, p. 3–10, 2010.
- ADAMO, S. A. "Comparative Psychoneuroimmunology Evidence From the Insects", **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 5, n. 3, p. 128–140, 2006.
- AGUERO, C. M., EYER, P. A., VARGO, E. L. Increased genetic diversity from colony merging in termites does not improve survival against a fungal pathogen, **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- ARGÔLO-FILHO, R. ., LOGUERCIO, L. L. "*Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and Host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches", **Insects**, v. 5, p. 62–91, 2014.
- BANDEIRA, A. G. & MACAMBIRA, M. L. J. Térmitas da Carajás, Estado do Pará, Brasil: composição faunística, distribuição e hábito alimentar. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Zoologia**, 4:2:175-190. 1988.
- BASELGA, A. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, p. 134–143, 2010.
- BARBOSA-SILVA, A.M.; SILVA, A.C.; PEREIRA, E.C.; BURIL, M.L.L.; SILVA, N.H, CÁRCERES, M.E.S.; APTROOT, A.; & BEZERRA-GUSMAO, M.A. Richness of Lichens Consumed by *Constrictotermes cyphergaster* in the Semi-arid Region of Brazil. **Sociobiology**, 66:154- 160. 2019.
- BARBOSA-SILVA, A. M., VASCONCELLOS, A. "Consumption Rate of Lichens by *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera): Effects of C, N and P Contents and Ratios", *Insects*, v. 10, n. 23, p. 1–11, 2019.
- BARBOSA-SILVA, A. M., FARIAS, M. A. A., MELLO, A. P. de, et al. Lignocellulosic fungi in nests and food content of *Constrictotermes cyphergaster* and *Inquilinitermes fur* (Isoptera, Termitidae) from the semiarid region of Brazil, **Fungal Ecology**, v. 20, n. April 2016, p. 75–78, 2016.

BARBOSA, M.; LIMA, I.; CUNHA, J.; AGRA, M. ; THOMAS, W. Vegetação e flora no cariri paraibano. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p.313-322, 2007.

BACH, P. ., MCOMIE, W. . New Diseases of Termites caused by Bacteria, **Annals of the Entomological Society of America**, v. XXXII, p. 137–146, 1939.

BARRETO, M. R., LOGUERCIO, L. L., VALICENTE, F. H., et al. "Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae", **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 4, p. 675–685, 1999.

BATES, D.; MARCHLER, M.; BOLKER, B. et al. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n. 1, p. 1-48, 2015.

BEZERRA-GUSMÃO, M. A., MARINHO, R. A., KOGISO, K. A., et al. Nest dynamics of *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae) and its association with the supporting vegetation in a semiarid area, northeast, Brazil, **Journal of Arid Environments**, v. 91, n. April, p. 1–6, 2013.

BEZERRA-GUSMAO, M. A.; KOGISO, K. A.; HONORATO, T. O.; MELO, T. X.; BARBOSA, J. R. C.; BANDEIRA, A. G. Polycalic nest systems and levels of aggression of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) in the Semi-Arid region of Brazil. **Sociobiology**, v.53, p.101–111, 2008.

BEZERRA-GUSMÃO, M. A., BARBOSA, J. R. C., BARBOSA, M. R. de V., et al. Are nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae) important in the C cycle in the driest area of semiarid caatinga in northeast Brazil?, **Applied Soil Ecology**, p. 1–5, 2011.

BIGNELL, D. E., "Symbionts and the rise of termites to ecological dominance in the tropics". **The Mechanistic Benefits of Microbial Symbionts, Advances in Environmental Microbiology**, Springer, p. 121–172. 2016.

BIGNELL, E., EGGLETON, P., Termites in Ecosystems. In T. Abe, Bignell D.E., Higashi M. (Eds.), **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 363-387. 2000.

BIGNELL, D.E.; ANDERSON, J.M. . Determination of pH and oxygen status in the guts of lower and higher termites. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, p. 183–188. 1980.

BLUMER, C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 170–177, 2000.

BRAUMAN, A.; D. E. BIGNELL, & I. TAYASU. Soil-feeding termites: biology, microbial associations and digestive mechanisms, p. 233– 259. In: T. Abe; D. E. Bignell & M. Higashi (eds.). **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000. 466 p.

- BOLNICK, D. I., SNOWBERG, L. K., HIRSCH, P. E., et al. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota Daniel, **Nature Communications**, v. 5, n. 4500, p. 1–13, 2014.
- BOURGUIGNON, T., LO, N., DIETRICH, C., et al. Rampant Host Switching Shaped the Termite Gut Microbiome, **Current Biology**, v. 28, p. 649–654, 2018.
- BREZNAK, J. A. Invertebrates-Insects. In A. T. Bull (Ed.), **Microbial Diversity and Bioprospecting**, Washington, D.C: ASM Press. p. 191–203, 2004.
- BREZNAK, J. A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual review of entomology**. Vol. 39, v. 39, p. 453–487, 1994.
- BRUNE, A.; DIETRICH, C. The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 145–166, 2015.
- BRUNE, A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p.168-180, 2014.
- BRUNE, A. Methanogens in the digestive tract of termites. In J. H. P. Hackstein (Ed.), In (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea Heidelberg, Germany: **Springer**. p. 81-100, 2010.
- BROWN, W. L. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants, **The American Society of Naturalists**, p. 188–191, 1967.
- BRUNE, A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p.168-180, 2014.
- BURNUM, K. E., CALLISTER, S. J., NICORA, C. D., et al. Proteome insights into the symbiotic relationship between a captive colony of *Nasutitermes corniger* and its hindgut microbiome, **ISME Journal**, v. 5, n. 1, p. 161–164, 2011.
- CAMPANINI, E. B., DAVOLOS, C. C., ALVES, E. C. da C., et al. "Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura", **Bragantia**, v. 71, n. 3, p. 362–369, 2012.
- CASTAGNOLA, A., STOCK, P. Common Virulence Factors and Tissue Targets of Entomopathogenic Bacteria for Biological Control of Lepidopteran Pests, **Insects**, v. 5, p. 139–166, 2014.
- CASTILHOS-FORTES, R. DE et al. Susceptibility of *Nasutitermes ehrhardti* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 219–222, 2002.
- CASTRIC, P. A. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 613–618, 1975.

- COOPER, D., ELEFHERIANOS, I. Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges, **frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–6, 2017.
- CHAURASIA, B. et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 75–81, 2005.
- CHIN, K. L., H'NG, P. S., WONG, W. Z., et al. "Septicaemia of subterranean termites *Coptotermes curvignathus* caused by disturbance of bacteria isolated from termite gut and its foraging pathways: Septicemia of *Coptotermes curvignathus*", **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 8, 2020.
- CHOUVENC, T., ŠOBOTNÍK, J., ENGEL, M. S., et al. "Termite evolution: mutualistic associations, key innovations, and the rise of Termitidae", **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 2749–2769, 2021.
- CHOUVENC, T., EFSTATHION, C. A., ELLIOTT, M. L., et al. Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite, **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1770, 2013.
- CONSTANTINO, R. **Cupins do Cerrado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2015. 167p
- CONSTANTINO, R. & ACIOLI, A.S.N. Diversidade de cupins (Insecta: Isoptera) no Brasil. In: **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros** (MOREIRA, F.A.; SIQUEIRA, J. O. & BRUSSAARD, L.; Orgs.) Lavras, Editora UFLA: 277-297. 2008.
- CONSTANTINO, R. Abundance and Diversity of Termites (Insecta: Isoptera) in Two Sites of Primary Rain Forest in Brazilian Amazonia. **Biotropica**, v. 24, n. 3, p. 420, 1992.
- CREMER, S., KUTZER, M. A. M. Social immunity, **Encyclopedia of Animal Behavior**, p. 747–755, 2019.
- CREMER, S., ARMITAGE, S. A. O., SCHMID-HEMPEL, P. Social Immunity, **Current Biology**, v. 17, n. 16, p. 693–702, 2007.
- DAVIS, H. E., MECONCELLI, S., RADEK, R., et al. Termites shape their collective behavioural response based on stage of infection, **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- DAZA, R. C., KORB, J. Phylogenetic Community Structure and Niche Differentiation in Termites of the Tropical Dry Forests of Colombia, **Insects**, v. 10, n. 103, p. 1–26, 2019.
- DE SOUZA, B. I., MACÊDO, M. L. A., SILVA, G. J. F. Temperatura dos solos e suas influências na regeneração natural da caatinga nos cariris velhos - PB, **RA'E GA - O Espaço Geográfico em Análise**, v. 35, p. 261–287, 2015.

- DILLON, R. ., CHARNLEY, A. . Chemical Barriers to Gut infection in the Desert Locust: In vivo Production of Antimicrobial Phenols Associated with the Bacterium *Pantoea agglomerans*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, p. 72–75, 1995.
- DIETRICH, C.; KÖHLER, T.; BRUNE, A. The cockroach origin of the termite gut microbiota: Patterns in bacterial community structure reflect major evolutionary events. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2261–2269, 2014.
- DRAY, S; BAUMAN, D; BLANCHET, G et al. adespatial: Multivariate Multiscale Spatial Analysis. R package version 0.3-14. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=adespatial>
- DONOVAN, S. E., EGGLETON, P., BIGNELL, D. E. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites, **Ecological Entomology**, v. 26, n. 4, p. 356–366, 2001.
- DOUGLAS, A. . Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 17–34, 2015.
- DUNLAP, P. V. Microbial Diversity, **Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition**, v. 4, p. 280–291, 2001.
- DOYLE, J.J.; & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15. 1987.
- EGGLETON, P. An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. In: Bignell, D., Roisin, Y., and Lo, N. (eds). *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. **Springer**: Dordrecht. p. 349-373, 2011.
- EGGLETON, P. Global patterns of termite diversity. In T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi (Eds.), **Termites: Evolution, sociality, symbioses, ecology**. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publications. p. 25-51, 2000.
- EGGLETON, P.; BIGNELL, D. E.; SANDS, W. A.; WAITE, B.; WOOD, T. G.; LAWTON, J. H. The species richness of termites (isoptera) under differing levels of forest disturbance in the mbalmayo forest reserve, southern cameroon. **Journal of Tropical Ecology**, v. 11, n. 1, p. 85–98, 1995.
- EMERSON, A. E. "Termite Nests-A Study of the Phylogeny of Behavior", **Ecological Monographs**, v. 8, n. 2, p. 247–284, 1938.
- ENGEL, P., MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.
- ENGEL, M.S, KRISHNA, K. Family-group names for termites (Isoptera). **American Museum Novitates**, v. 3432: p. 1-9. 2004.
- FALL, S., HAMELIN, K., NDIAYE, F., et al. "Differences between Bacterial Communities in the Gut of a Soil-Feeding Termite (*Cubitermes niokoloensis*) and Its

Mounds", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5199–5208, 2007.

FELDHAAR. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts, **Ecological Entomology**, v. 36, p. 533–543, 2011.

FERREIRA, D. V.; CRUZ, J. S.; SACRAMENTO, J. J. M.; ROCHA, M. L. C.; CRISTALDO, P. F.; ARAÚJO, A. P. A. Effect of temperature and substrate moisture on group survival of *Constrictotermes* sp. (Isoptera: Termitidae) under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 63, n. 1, p. 9–11, 2019.

FLURY, P. et al. Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. **International Society for Microbial Ecology**, v. 10, p. 2527–2542, 2016.

FOX, J; WEISHBERG, S. An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. 2019.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H., ZIMMERMAN, J. K., REHNER, S. A., et al. "Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection", **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1594, p. 1689–1695, 2006.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems, **Phytopathology**, v. 94, p. 1252–1258, 2004.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350p.

GRASSÉ, P.P Termitologia: **Anatomie, Physiologie, Reproduction des Termites**. Masson, Paris, 1982. 676p.

GRIFFITHS, H. ., ASHTON, L. ., PARR, C. ., et al. The impact of invertebrate decomposers on plants and soil., **New Phytologia**, v. 231, p. 2142–2149, 2021.

GRIECO, M. B., CAVALCANTE, J. J. V., CARDOSO, A. M., et al. Microbial Community Diversity in the Gut of the South American Termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae), **Microbial Ecology**, v. 65, n. 197, p. 197–204, 2013.

HAMILTON, C., BULMER, M. S. Molecular antifungal defenses in subterranean termites: RNA interference reveals in vivo roles of termicins and GNBP against a naturally encountered pathogen, **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, n. 2, p. 372–377, 2012.

HOLT, J.A; LEPAGE, M. Termites and Soil Properties. In: **Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology** (ABE, T.; HIGASHI, M. e BIGNELL, D.E.; Orgs.) Kluwer Academic Publications, Dordrecht. p. 389 - 407, 2000.

HAMMER, T. J., JANZEN, D. H., HALLWACHS, W., et al. Caterpillars lack a resident gut microbiome, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 36, p. 9641–9646, 2017.



HONGO, Y. Diversity and Genomes of Uncultured Microbial Symbionts in the Termite Gut, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 6, p. 1145–1151, 2010.

HONGO, Y.; DEEVONG, P.; HATTORI, S. et al. Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum Fibrobacteres, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6780–6788, 2006.

HU, H.; COSTA, R. . DA; PILGAARD, B.; SCHIØTT, M.; LANGE, L.; POULSEN, M. Fungiculture in Termites is associated with a mycolytic gut bacterial community. **American Society for Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2019.

JANSON, E. M., STIREMAN LLL, J. O., SINGER, M. S., et al. Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification, **The society for the study of Evolution**, v. 62, n. 5, p. 997–1012, 2008.

JENSEN, G. ., HANSER, B. ., EILENBERG, J., et al. "The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives", **Environmental Entomology**, v. 5, n. 8, p. 631–640, 2003.

JOHNSON, D. R., HELBLING, D. E., LEE, T. K., et al. Association of biodiversity with the rates of micropollutant biotransformations among full-scale wastewater treatment plant communities, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 666–675, 2015.

JONES, D.T; EGGLETON, P. Global Biogeography of Termites: A Compilation of Sources. In *Biology of Termites: a Modern Synthesis* (Bignell, D. E., Roisin, Y. & Lo, N., ed.), **Springer Netherlands**, Germany, p.477-498, 2011.

JOUQUET, P.; TRAORÉ, S.; CHOOSAI, C.; HARTMANN, C.; BIGNELL, D. Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided by termites. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 4, p. 215–222, 2011.

JURAT-FUENTES, J. L., JACKSON, T. A., Bacterial entomopathogens. In: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), **Insect Pathology**, second ed. Academic Press, San Diego, p. 265–349. 2012.

KAUFMAN, M. G., KLUG, M. J. The contribution of hindgut bacteria to dietary carbohydrate utilization by crickets (Orthoptera: Gryllidae), **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 117–123, 1991.

KALTENPOTH, M., ENGL, T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera, **Functional Ecology**, v. 28, n. 2, p. 315–327, 2013.

KALTENPOTH, M., YILDIRIM, E., GÜRBÜZ, M. F., et al. Refining the roots of the beewolf-*streptomyces* symbiosis: Antennal symbionts in the rare genus *Philanthinus* (Hymenoptera, Crabronidae), **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 822–827, 2012.

- KALTENPOTH, M.; GOTTLER, W.; HERZNER, G.; STROHM, E. Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae Fungal Infestation. **Current Biology**, v. 15, p. 475–479, 2005.
- KAUFMAN, M. G., WALKER, E. D., ODELSON, D. A., et al. Microbial community ecology & insect nutrition, **American Entomologist**, v. 46, n. 3, p. 173–185, 2000.
- KOGISO, K. A.; GUSMÃO, M. A. B.; GARCIA, H. E. M. Macro and microscopic gut content analysis of the *Inquilinitermes fur* (Isoptera, Termitidae) In the Paraiba Caatinga. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE (CSBMM), 21, 2007, Rio de Janeiro. Anais [...], Rio de Janeiro, 2007.
- KÖHLER, T.; DIETRICH, C.; SCHEFFRAHN, R. H.; BRUNE, A. High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4691–4701, 2012.
- KÖHLER, T.; STINGL, U.; MEUSER, K.; BRUNE, A. Novel lineages of Planctomycetes densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1260–1270, 2008.
- KÖNIG, H. "*Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates", **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 620–627, 2006.
- KRISHNA, K; GRIMALDI, D.A., KRISHNA, V.; ENGEL, M.S. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 377, p. 1-2704, 2013.
- KRISHNA, K; GRIMALDI, D.A., KRISHNA, V.; ENGEL, M.S. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 377, p. 1-2704, 2013.
- KUDO, T. Termite-Microbe Symbiotic System and Its Efficient Degradation of Lignocellulose, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2561–2567, 2009.
- LEE, K. E; WOOD, T. G. **Termites and Soils**. London: Academic Press, 1971. p. 251.
- LEGENDRE, P.; CÁCERES, M. DE. Beta diversity as the variance of community data: Dissimilarity coefficients and partitioning. **Ecology Letters**, v. 16, n. 8, p. 951–963, 2013.
- LENTH, RV.. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.7.1-1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>. 2021
- MACIEL-VERGARA, G.; JENSEN, A. ; EILENBERG, J. Cannibalism as a possible entry route for opportunistic pathogenic bacteria to insect hosts, exemplified by *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogen of the giant mealworm *Zophobas morio*. **Insects**, v. 9, n. 88, p. 1–15, 2018.

MANJULA, A., SATHYAVATHI, S., PUSHPANATHAN, M., et al. Microbial diversity in termite nest, **Current Science**, v. 106, n. 10, p. 1430–1434, 2014.

MARYNOWSKA, M., GOUX, X., SILLAM-DUSSÈS, D., et al. "Compositional and functional characterisation of biomass-degrading microbial communities in guts of plant fibre- And soil-feeding higher termites", *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2020.

MATHEWS, A.G. Studies on Termites from the Mato Grosso State, Brazil. **Academia Brasileira de Ciências**, 1977, 267p.

MATHEW, G. M., JU, Y. M., LAI, C. Y., et al. "Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: The implication of *Bacillus* as mutualists", **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 2, p. 504–517, 2012.

MATHEW, G. M. et al. DGGE detection and screening of lignocellulolytic bacteria from the termite gut of *Coptotermes formosanus*. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 201–209, 2011.

MATSUI, T., TANAKA, J., NAMIHIRA, T., et al. "Antibiotics production by an actinomycete isolated from the termite gut", **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 731–735, 2012.

MÉLO, A. C; BANDEIRA, A. G. A qualitative and quantitative survey of térmites (Isoptera) in an Open Shrubby Caatinga in Northeast Brazil. **Sociobiology**, v. 44, n. 3, p. 707-716. 2004.

MIKAELIAN, A.; MEUSER, K.; BRUNE, A. Microenvironmental heterogeneity of gut compartments drives bacterial community structure in wood-and humus-feeding higher termites. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, p. 1–11, 2016.

MIKAELIAN, A., DIETRICH, C., KÖHLER, T., et al. Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites, **Molecular Ecology**, v. 24, n. 20, p. 5284–5295, 2015.

MITAKA, Y., MORI, N., MATSUURA, K. Multi-functional roles of a soldier-specific volatile as a worker arrestant, primer pheromone and an antimicrobial agent in a termite, **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1859, 2017.

MORAN, N. A., MCCUTCHEON, J. P., NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts, **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 165–190, 2008.

MOREIRA, E. A., ALVAREZ, T. M., PERSINOTI, G. F., et al. Microbial Communities of the Gut and Nest of the Humus- and Litter-Feeding Termite *Procornitermes araujo* (Syntermitinae), **Current Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 1609–1618, 2018.

MORI, A. S.; ISBELL, F.; SEIDL, R.  $\beta$ -Diversity, Community Assembly, and Ecosystem Functioning. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 549–564, 2018.

MOURA, F.M.S, VASCONCELLOS A., ARAÚJO, V.F.P. and BANDEIRA A.G. Consumption of vegetal organic matter by *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera,

Termitidae, Nasutitermitinae) in an area of Caatinga, Northeastern Brazil. **Sociobiology**, v. 51, p. 181-189. 2008.

MOURA, F. M. S. et al. Seasonality in foraging behaviour of *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae) in the Caatinga of Northeastern Brazil. **Insectes Sociaux**, v. 53, n. 4, p. 472–479, 2006a.

MOURA, F. M. S.; VASCONCELLOS, A.; ARAUJO, V. F. P.; BANDEIRA, A. Feeding habitat of *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera, Termitidae) in an area of Caatinga, Northeast Brazil. **Sociobiology**, v.48, p.21–26, 2006b

NALEPA, C. A. Origin of termite eusociality: Trophallaxis integrates the social, nutritional, and microbial environments. **Ecological Entomology**, v. 40, n. 4, p. 323–335, 2015.

NI, J., TOKUDA, G. "Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota", **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 838–850, 2013.

NEUWIRTH, E. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. **R package version 1.1-2**. 2014.

NG, S. H., STAT, M., BUNCE, M., et al. "The influence of diet and environment on the gut microbial community of field crickets", **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 4704–4720, 2018.

NOIROT, C. (2001). The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. II- Higher termites (Termitidae). **Annales de la Société Entomologique de France**, v. 37, p. 431–471. 2001.

NOIROT, C.; DARLINGTON, J.P.E. Termite nests: Architecture, regulation and defense. In: **Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology**. Eds.: Abe, T.; Higashi, M.; Bignell, D.E. Kluwer Academic Publications, Dordrecht, p 121-140. 2000.

OHKUMA, M; BRUNE, A Diversity, structure, and evolution of the termite gut microbial community. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) **Biology of termites: a modern synthesis**. Springer, Dordrecht, p. 413–438, 2011.

OHKUMA, M. "Termite symbiotic systems: Efficient bio-recycling of lignocellulose", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 1–9, 2003.

OKSANEN, J; GUILLAUME BLANCHET, F; ROELAND, M et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

OLIVER, K. M., CAMPOS, J., MORAN, N. A., et al. Population dynamics of defensive symbionts in aphids, **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1632, p. 293–299, 2008.

OSBORN, F., BERLIOZ, L., VITELLI-FLORES, J., et al. "Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae)", **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, n. 1, p. 7–12, 2002.

- OTANI, S., ZHUKOVA, M., KONÉ, N. A., et al. Gut microbial compositions mirror caste-specific diets in a major lineage of social insects, **Environmental Microbiology Reports**, v. 11, n. 2, p. 196–205, 2019.
- ORTIUS-LECHNER, D., MAILE, R., MORGAN, D. . ., et al. "Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance", **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1667–1683, 2000.
- PARK, J. M., YOU, Y. H., BACK, C. G., et al. Fungal load in *Bradysia agrestis*, a phytopathogen-transmitting insect vector, **Symbiosis**, v. 74, n. 2, p. 145–158, 2017.
- PAUL J. M.; SUSAN, H. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data, **PLoS ONE**, v.8, n. 4, p. e61217, 2013.
- PETERSON, B. F., SCHARF, M. E. "Metatranscriptome analysis reveals bacterial symbiont contributions to lower termite physiology and potential immune functions", **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2016.
- PLATA-RUEDA, A., QUINTERO, H. A., SERRÃO, J. E., et al. "Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains on the nettle caterpillar, *euprosterna elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae)", **Insects**, v. 11, n. 5, p. 1–10, 2020.
- PROSSER, J. ., BOHANNAN, J. ., CURTIS, T. ., et al. The role of ecological theory in microbial ecology, **Nature Publishing group**, v. 5, p. 384–392, 2007.
- PUJIASTUTI, Y. "Toxicity *Bacillus thuringiensis*-based Bio Insecticide Enriched with Golden Snail Meat Flour Against Worker and Soldier Castes of *Coptotermes Curvignathus* (Isoptera: Termitidae)", **E3S Web of Conferences**, v. 68, p. 1–7, 2018.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2021.
- RAHME, L. G.; STEVENS, E. J.; WOLFORT, S. F.; SHAO, J.; TOMPKINS, R. G.; AUSUBEL, F. M. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science**, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 1995.
- ROCHA, M. M.; MORALES-CORRÊA E CASTRO, A. C.; CUEZZO, C.; CANCELLO, E. M. Phylogenetic reconstruction of Syntermitinae (Isoptera, Termitidae) based on morphological and molecular data. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–29, 2017.
- ROCHA, M. M., CONSTANTINI, J. P. "Internal ornamentation of the first proctodeal segment of the digestive tube of Syntermitinae (Isoptera, Termitidae)", **Deutsche Entomologische Zeitschrift**, v. 62, n. 1, p. 29–44, 2015.
- ROISIN Y, KORB, J. Social organization and the status of workers in termites. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N (eds) **Biology of termites: a modern synthesis**. Springer, Dordrecht, p 133–164. 2010.
- ROSENGAUS, R. B.; SCHULTHEIS, K. F.; YALONETSKAYA, A.; BULMER, M. S.; DUCOMB, W. S.; BENSON, R. W.; THOTTAM, J. P.; GODOY-CARTER, V.

Symbiont-derived  $\beta$ -1,3-glucanases in a social insect: **Mutualism beyond nutrition**. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. NOV, p. 1–12, 2014.

ROSENGAUS, R. B. et al. Ecology, Behavior and Evolution of Disease Resistance in Termites. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds.). **Biology of Termites: a Modern Synthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 165–191. 2011.

ROSENGAUS, R. B., MOUSTAKAS, J. E., CALLERI, D. V., et al. Nesting ecology and cuticular microbial loads in dampwood (*Zootermopsis angusticollis*) and drywood termites (*Incisitermes minor*, *I. schwarzi*, *Cryptotermes cavifrons*), *Journal of Insect Science*, v. 3, n. 31, p. 1–6, 2003.

ROSENGAUS, R. B.; TRANIELLO, J. F. A.; CHEN, T.; BROWN, J. J.; KARP, R. D. Immunity in a social insect. *Naturwissenschaften*, v. 86, n. 12, p. 588–591, 1999.

ROSENGAUS, R. B., GULDIN, M. R., TRANIELLO, J. F. A. Inhibitory effect of termite fecal pellets on fungal spore germination, *Journal of Chemical Ecology*, v. 24, n. 10, p. 1697–1706, 1998.

ROSSMASSLER, K., DIETRICH, C., THOMPSON, C., et al. Metagenomic analysis of the microbiota in the highly compartmented hindguts of six wood- or soil-feeding higher termites, *Microbiome*, v. 3, n. December, p. 56, 2015.

SANCHEZ-CONTRERAS, M.; VLISIDOU, I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, v. 25, n. 1, p. 203–244, 2008.

SCHNORR, S. L.; HOFMAN, C. A.; NETSHIFHEFHE, S. R.; DUNCAN, F. D.; HONAP, T. P.; LESNIK, J.; LEWIS, C. M. Taxonomic features and comparisons of the gut microbiome from two edible fungus-farming termites (*Macrotermes falciger*, *M. natalensis*) harvested in the Vhembe district of Limpopo, South Africa. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, 2019.

SIDERI, M., TSAKAS, S., MARKOUTSA, E., et al. "Innate immunity in insects: Surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes", *Immunology*, v. 123, n. 4, p. 528–537, 2008.

SIKOROWSKI, P. P., LAWRENCE, A. M. "Microbial Contamination and Insect Rearing", *American Entomologist*, v. 40, n. 4, p. 240–253, 1994.

SILVA, S., DIAS, J., MONNERAT, R. "Comparação entre três métodos de isolamento de bacilos entomopatogênicos", Brasília: **Embrapa**, p. 1–3, 2002.

SINGHA, D.; SINGHA, B.; DUTTA, B. K. In vitro pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against tea termites. *Journal of Biological Control*, v. 24, n. 3, p. 279–281, 2010.

SOUKUP, P., VETROVSKÝ, T., STIBLIK, P., et al. Termites are associated with external species-specific bacterial communities, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 1–13, 2021.

SOUZA, B. I. de, SUERTEGARAY, D. M. A., LIMA, E. R. V. de. "Desertificação E Seus Efeitos Na Vegetação E Solos Do Cariri Paraibano", **Mercator**, v. 8, n. 16, p. 217–232, 2009.

STEVENS, E.; RYAN, C. .; FRIEDBERG, J. .; BARNHILL, R. .; YARMUSH, M. .; TOMPKINS, G. A quantitative model of invasive *Pseudomonas* Infection in Burn Injury. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 15, n. 232–235, 1994.

SUJADA, N.; SUNGTHONG, R.; LUMYONG, S. Termite nests as an abundant source of cultivable actinobacteria for biotechnological purposes. **Microbes environment**, v. 29, n. 2, p. 211–219, 2014.

TAN, M. W.; RAHME, L. G.; STERNBERG, J. A.; TOMPKINS, R. G.; AUSUBEL, F. M. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2408–2413, 1999.

TINKER, K. A., OTTESEN, E. A. "The core gut microbiome of the American cockroach, *Periplaneta americana*, is stable and resilient to dietary shifts", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6603–6610, 2016.

THERNEAUT \_A Package for Survival Analysis in R\_. R package version 3.2-11, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>>. 2021.

THORNE, B. L. Evolution of eusociality in Termites, **Nature Reviews Genetics**, v. 28, p. 27–54, 1997.

THOMAS, F.; HEHEMANN, J. H.; REBUFFET, E.; CZJZEK, M.; MICHEL, G. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAY, p. 1–16, 2011.

TORALES, G. J. et al. Update on taxonomy and distribution of isoptera from Argentina. **Sociobiology**, v. 45, n. 3, p. 853–886, 2005.

VASCONCELLOS, A., ARAÚJO, V. F. P., MOURA, F. M. S., et al. "Biomass and population structure of *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri) (Isoptera: Termitidae) in the dry forest of Caatinga, Northeastern Brazil", **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 693–698, 2007.

VIKRAM, S., ARNEODO, J. D., CALCAGNO, J., et al. "Diversity structure of the microbial communities in the guts of four neotropical termite species", **PeerJ**, p. 1-23, 2021.

WAIDELE, L., KORB, J., VOOLSTRA, C. R., et al. "Differential Ecological Specificity of Protist and Bacterial Microbiomes across a Set of Termite Species", **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2518, 2017.

WANG, C., HENDERSON, G. "Evidence of formosan subterranean termite group size and associated bacteria in the suppression of entomopathogenic bacteria, *bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* and *thuringiensis*", **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, n. 4, p. 454–462, 2013.

WATANABE, D., GOTOH, H., MIURA, T., et al. Social interactions affecting caste development through physiological actions in termites, **frontiers in physiology**, v. 5, p. 1–12, 2014.

WANG, C., HENDERSON, G. "Evidence of formosan subterranean termite group size and associated bacteria in the suppression of entomopathogenic bacteria, *bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* and *thuringiensis*", **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, n. 4, p. 454–462, 2013.

WATANABE, H.; TOKUDA, G. Animal cellulases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 9, p. 1167–1178, 2001.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag New York**, 2016.

WOOD T.G.; SANDS W.A. The role of termites in ecosystems. In: **Production ecology of ants and termites**. Ed.: Brian, M.V. Cambridge University Press, Cambridge, p. 245-292. 1978.

WILSON-RICH, N., SPIVAK, M., FEFFERMAN, N. H., et al. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies, **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 405–423, 2009.

YANG, H., SCHMITT-WAGNER, D., STINGL, U., et al. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*), **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 916–932, 2005

ZENG, Y., HU, X. P., SUH, S. J. "Characterization of antibacterial activities of eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*, against human pathogens", **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–17, 2016.

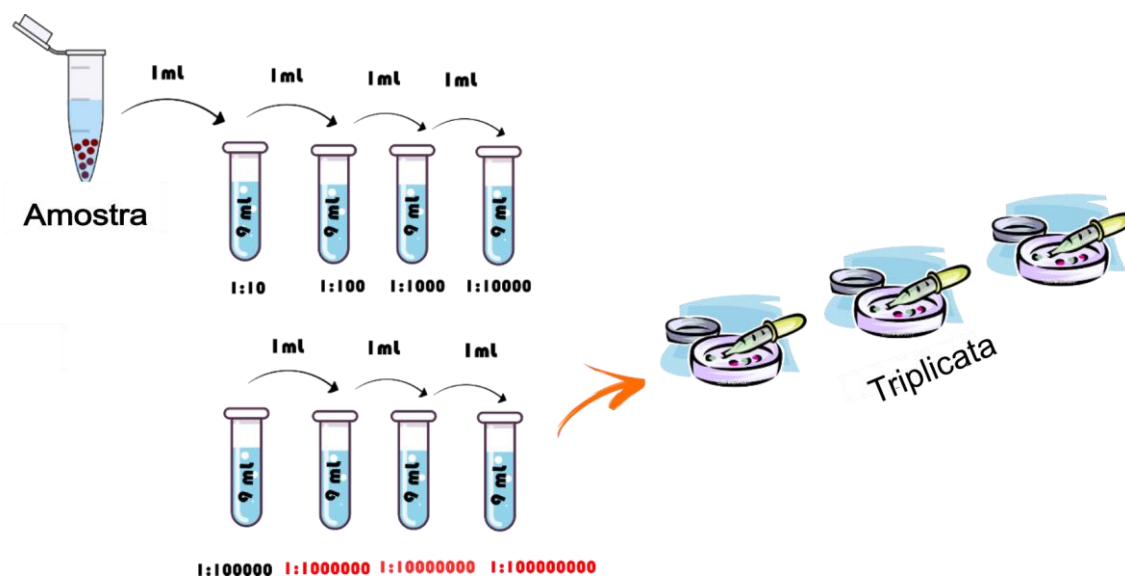
ZHANG, Q., WANG, S., ZHANG, X., et al. "Negative Impact of *Pseudomonas aeruginosa* Y12 on Its Host *Musca domestica*", **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–14, 2021.

ZORZETTI, J., RICCIETTO, A. P. S., FAZION, F. A. P., et al. Seleção e caracterização de linhagens de *Bacillus thuringiensis* ativas contra *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae), **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 417–425, 2017.



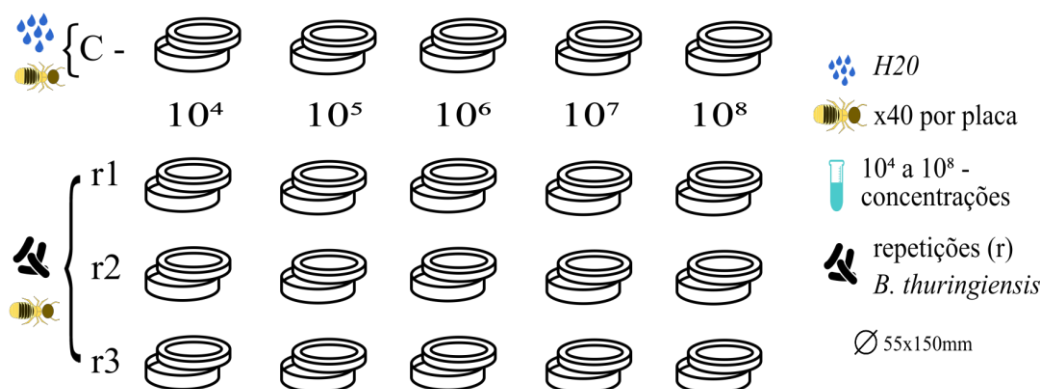
## APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR

**Figura APN1** - Diluição seriada após extração e dissecação do intestino de *Constrictotermes cyphergaster*.



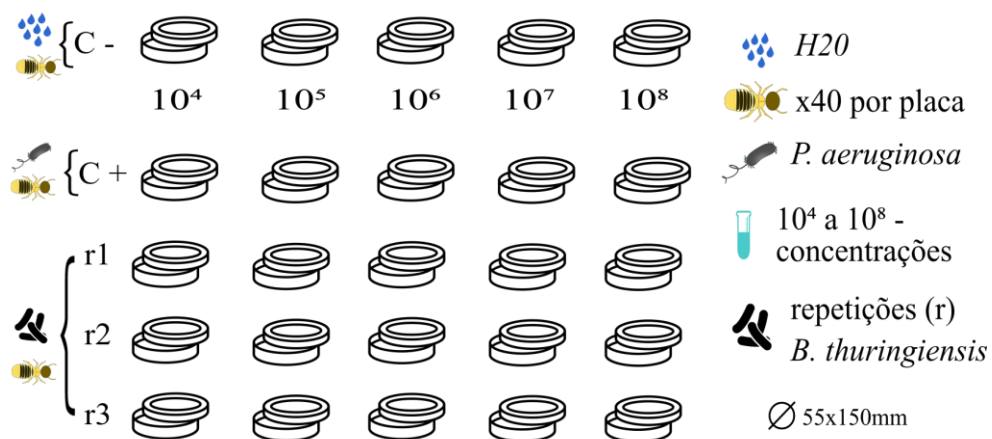
Fonte: Autor.

**Figura APN2** - Esquema experimental do ensaio de sobrevivência (Etapa I) de operários de *Constrictotermes cyphergaster* expostos a *Bacillus thuringiensis*.



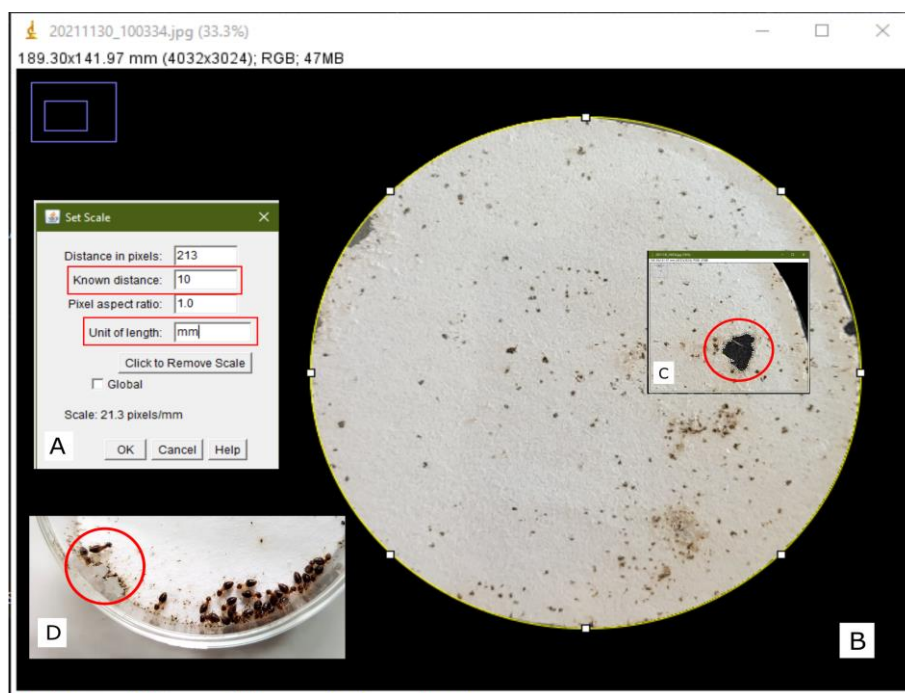
Fonte: Autor.

**Figura APN3-** Esquema experimental do ensaio de sobrevivência (Etapa II) de operários de *Constrictotermes cyphergaster* expostos a *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Autor.

**Figura APN4 -** Determinação da área de consumo dos papéis contaminados nos bioensaios de sobrevivência com operários de *C. cyphergaster* - Teste contra-prova. A) Configuração do *set scale* - as mensurações foram realizadas em mm; B) Determinação da área total do papel; C e D) Determinação da área do papel consumida pelos operários de *C. cyphergaster*.



Fonte: Autor.

**Tabela 1** - Identificação molecular de bactérias simbiotes do papo e segmento P3 do tubo digestivo de *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae) por meio de porcentagem de similaridade (SIML) usando pesquisa de *Blastn*. I - operário papo; II - soldado papo; III - operário P3; IV - soldado P3.

<b>ACESSO</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Similaridade (%)</b>	<b>Secção de amostragem</b>
KR149272.1	<i>Bacillus flexus strain vitij6</i>	97	I
KR077814.1	<i>Bacillus sp. Fjat-25723</i>	97	IV
CP015911.1	<i>Bacillus velezensis strain ls69</i>	96	IV
AB301018.1	<i>Bacillus pumilus gh18</i>	97	I
KY671142.1	<i>Bacillus thuringiensis strain u15_29</i>	97	I
DQ520823.1	<i>Microbacteriaceae bacterium nr172</i>	97	III
KY807037.1	<i>Bacillus siamensis strain fh-1</i>	93	IV
CP003752.1	<i>Bacillus thuringiensis hd-771.</i>	96	IV
MG704147.1	<i>Bacillus sp. Strain t149-19</i>	96	IV
KU597564.1	<i>Bacillus sp. Rd_mopep_06</i>	96	II
CP003687.1	<i>Bacillus thuringiensis mc28</i>	94	III
KT719709.1	<i>Bacillus cereus strain mer_132</i>	96	II
KJ767337.1	<i>Bacillus simplex strain ihb b 7173</i>	96	IV
KX242264.1	<i>Bacillus cereus strain os8.2</i>	96	I
KX129840.1	<i>Bacillus velezensis strain js4s</i>	96	III
NC_023073.1	<i>Bacillus velezensis strain ls69</i>	96	II
EU184084.1	<i>Bacillus sp. Psb7</i>	95	I
MF179866.1	<i>Bacillus sp. (in: bacteria) strain dek9b</i>	98	I

MK039414.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain <i>tm.vt-se.ab03</i>	99	IV
MK039414.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain <i>tm.vt-se.ab03</i>	90	I
KY908413.1	<i>Bacillus</i> sp. Strain <i>krjp</i>	90	III
HQ238891.1	<i>Bacillus cereus</i> strain <i>z2b-73</i>	90	II
MG309328.1	<i>Bacillus</i> sp. ( <i>in: Bacteria</i> ) strain <i>201705cjkop-15</i>	90	IV
EF113689.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain <i>ggds2</i>	93	IV
JQ765577.1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> strain <i>brhs/p91</i>	92	II
MK039414.1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain <i>tm.vt-se.ab03</i>	94	I