



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**PPGBiotec**

**GETÚLIO FREITAS BOMFIM**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS  
ISOLADOS DE CUPINZEIROS DA REGIÃO DA MATA DE CIPÓ,  
BAHIA**

Feira de Santana, BA  
2010

**GETÚLIO FREITAS BOMFIM**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS  
ISOLADOS DE CUPINZEIROS DA REGIÃO DA MATA DE CIPÓ,  
BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro (UESC)

Co-orientador: Prof. Dr. Eraldo Medeiros Costa Neto (UEFS)

Feira de Santana, BA  
2010

### Ficha Catalográfica Biblioteca Central Julieta Carteado

Bomfim, Getúlio Freitas

M683a Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da Mata de Cipó, Bahia./ Getúlio Freitas Bomfim. – Feira de Santana, 2010.  
67f.: il.

Orientador: Ana Paula Trovatti Uetanabaro

Co-orientador: Eraldo Medeiros Costa Neto

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

1.Microrganismos. 2.Atividade antimicrobiana. 3.Actinobactérias.  
4.*Bacillus*. 5.Cupinzeiros. I.Uetanabaro, Ana Paula Trovatti. II.Costa Neto, Eraldo Medeiros. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

**CDU: 504.72**

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro (Orientadora)  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

---

Profª. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

---

Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida  
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

Aprovado em 26 de fevereiro de 2010.

A meus pais,

**José Bomfim e Consuêlo.**

Pelo carinho, dedicação, compreensão e amor.

**DEDICO**

À minha orientadora,

**Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro.**

Pela colaboração, dedicação e confiança.

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Durante essa jornada, diversas pessoas passaram por minha vida, muitas delas marcaram, pois contribuíram em muito para minha formação. Quero nesse momento dividir com todas essas pessoas o mérito desse trabalho.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me concedeu essa oportunidade de construir um futuro promissor. Por sua presença constante ao meu lado, por ser o meu refúgio, por sua incomparável e inconfundível bondade. E por sempre compreender meus anseios, me dando força e coragem para atingir meus objetivos.

Aos meus pais pelo amor e dedicação, vocês sempre estiveram presentes (mesmo distante às vezes) incentivando-me e amparando-me em momentos difíceis. Pela dedicação depositada em mim para que eu pudesse caminhar em frente sem desistir dos meus sonhos. Obrigado pela colaboração e influência em minha educação, isso foi primordial para mais esta vitória.

A minha orientadora, a Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro, pela excelência profissional, pela contribuição, por seus ensinamentos, que contribuíram e muito, para minha formação acadêmica, pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho, pelo apoio constante, não medindo qualquer esforço, estando sempre presente e disponível para me auxiliar em momentos adversos. Sua orientação foi essencial para a construção desse trabalho e finalização dessa etapa.

Ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Eraldo Medeiros Costa-Neto, pela sugestão do trabalho, pelas contribuições pertinentes, conversas norteadoras, pelo incentivo, pela confiança e por demonstrar a sua preocupação com o andamento do trabalho, sempre me orientando e auxiliando.

Ao meu irmão Horácio, que me suportou em muitos momentos de estresse, pela colaboração e ajuda em duas coletas de campo (coletor de cupins), pelos momentos de descontração e por estar sempre presente, mesmo porque, estamos longe de casa. Obrigado por torcer e acreditar em mim.

Aos meus irmãos de Feira de Santana, Joca e Danilo por todo incentivo, amizade e pelos diversos momentos de descontração, que me ajudaram a elevar a auto-estima em momentos difíceis. Obrigado por tudo.

As minhas avós, Virgínia e Géssima, pelo incentivo, amor e carinho. Obrigado por suas orações, elas foram muito importantes nessa jornada.

Aos meus padrinhos, Almir e Zelinha, e à Camila por acreditarem e torcerem em mais esse momento.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisas em Microbiologia da UEFS (LAPEM), por todo apoio concedido. Em especial ao Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto e ao Prof. Dr. Hélio Mitoshi

Kamida, e aos demais: Suzana, Cissa, Carla, Cleber (grande amigo e companheiro de coletas, obrigado por todo auxílio na primeira coleta e pelo processamento do material coletado, enfim, por tudo), Jacqueline Miranda, João Ronaldo (pelas fotografias dos testes realizados no Laboratório), Taiana, Isabella (pela colaboração especial na realização dos MICs), Gisele, Gorete e Alice (pela amizade). Obrigado por tudo galera!

Ao pessoal da Biologia Molecular do LAPEM (BIOMOL), por toda ajuda e colaboração não posso esquecer vocês: Carol, Rita, Bruno Andrade e em especial a Catinha pela colaboração na análise das sequências da região 16S do rDNA dos microrganismos estudados.

Aos companheiros do MIC, Matheus e Aline, pela companhia e colaboração.

Aos colegas e amigos do Mestrado em especial a Jacqueline Miranda, minha monitora do MIC, uma pessoa pura e de grande coração, uma amiga que levarei lembranças por toda minha vida. À Ingrid, Jaqueline Fagundes, Luciana, Dayse, pessoas especiais.

À Profa. Dra. Ana Cerilza Santana Mélo (LENT – UEFS) pela identificação dos espécimes de cupins coletados.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão, Alysson e a Loíse pelo auxílio nos microcultivos e fotografias microscópicas dos microrganismos estudados.

À Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini (CPQBA-UNICAMP) pela atenciosa recepção no seu laboratório em Campinas – SP. Agradeço também a sua orientanda de Doutorado, Cláudia pelo acompanhamento do trabalho e toda a equipe do CPQBA pela atenção.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao PPGBiotec – UEFS/FIOCRUZ, por todo apoio durante esse período e em especial ao secretário Helton pela excelência profissional.

À UEFS pela logística e divulgação do trabalho.

A toda minha família e amigos que por muitas vezes estiveram distantes, mas sempre torceram por este momento.

Enfim, a todos aqueles que em atitudes, pensamentos e palavras contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”

Fernando Pessoa



## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	07
	<b>ABSTRACT</b>	08
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	09
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	10
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
2	<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
3.1	CUPINS	15
3.2	ACTINOBACTÉRIAS	17
3.3	GÊNERO <i>BACILLUS</i>	18
3.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ACTINOBACTÉRIAS <i>EBACILLUS</i>	19
3.5	ETNOFARMACOLOGIA	20
3.6	CUPINS E CUPINZEIROS NA MEDICINA TRADICIONAL	21
3.7	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	22
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
4.1	ÁREA DE ESTUDO	24
4.2	COLETA DA TERRA DE CUPINZEIROS E CUPINS	27
4.3	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	27
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	28
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	30
4.6	PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	32
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	33
5.1	COLETA DA TERRA EM CUPINZEIROS	33
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS CUPINS	34
5.3	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	34
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
5.5	CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS	47
6	<b>CONCLUSÕES</b>	53
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54

## RESUMO

Na medicina tradicional, os cupins são bastante utilizados para o tratamento de diferentes enfermidades em várias partes do mundo. O uso disseminado de remédios feitos à base de cupins e/ou de seus ninhos e o relato testemunhal de seus usuários quanto a sua eficácia permitem supor que muito provavelmente esta eficácia deva ser atribuída aos compostos bioativos produzidos pelas actinobactérias e espécies do gênero *Bacillus*, visto que, estudos apontam para a presença destas bactérias na microbiota associada a espécies de cupins. As actinobactérias e algumas espécies de *Bacillus* têm sido especialmente úteis na indústria farmacêutica por possuírem capacidade ilimitada de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. A procura de novas espécies de actinobactérias e *Bacillus* constitui um componente essencial para a descoberta de novas drogas farmacêuticas. por isso, este trabalho teve por objetivo isolar microrganismos presentes em terras de cupinzeiros da região da mata de Cipó, nos municípios de Lafaiete Coutinho, Feira de Santana e Morro do Chapéu – BA, visando verificar o potencial antimicrobiano destes. Foram isolados 145 microrganismos nas três localidades amostradas. Destes, 43 (29,65%) no município de Lafaiete Coutinho, 55 (37,93%) no município de Morro do Chapéu e 47 (32,42%) no município de Feira de Santana – BA. A atividade antimicrobiana avaliada em meio sólido foi detectada em 38 (26,20%) isolados do total. No município de Lafaiete Coutinho foi verificada em 14 (9,65%), em Morro do Chapéu 12 (8,27%) e em Feira de Santana 12 (8,27%). Os resultados obtidos apontam para 22,75% antagônicas a *S. aureus* CCMB 262; 20% a *S. aureus* CCMB 263; 14,48% a *S. aureus* CCMB 285; 2,06% a *E. coli* 284; 3,44% a *E. coli* 261, 9,65% a *S. choleraesuis* CCMB 281, 8,96% a *C. albicans* CCMB 266; 12,41% a *C. albicans* CCMB 286 e 10,34% a *C. parapsilosis*. Nenhum dos isolados foi capaz de inibir *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268 no teste em meio sólido. Os 11 isolados que apresentaram os melhores resultados no primeiro teste foram selecionados para caracterização da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dentre estes, nove, apresentaram Concentração Inibitória Mínima em meio ágar amido-caseína. E desses, 3 conseguiram inibir *P. aeruginosa* CCMB 268. O sequenciamento da região 16S do rDNA mostrou que os 11 isolados seqüenciados são pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Bacillus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Actinobactérias, *Bacillus*, Cupinzeiros, Etnofarmacologia, Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The actinobacterias and *Bacillus* have been especially useful in the pharmaceutical industry for its ability to produce unlimited secondary metabolites with different chemical structures and biological activities. The search for new species of actinobacteria and species of genus *Bacillus* is an essential component to the discovery of new drugs. In traditional medicine, the termites are quite used for the treatment of various diseases in various parts of the world. The widespread use of drugs made based on termites and/or their nests and witness reports from its users about its effectiveness allow assume that most probably this effectiveness should be given to bioactive compounds produced by actinobacterias, since studies point to the presence of these bacteria associated with the microbial species of termites. This project aims to isolate microorganisms present in termite nest land of the region of the Cipó forest in the municipality of Lafaiete Coutinho, Feira de Santana e Morro do Chapéu - BA, aiming to check the antimicrobial potential of microorganisms. Were isolated 145microorganisms in the three localities sampled. Of these, 43 (29.65%) in municipality Lafaiete Coutinho, 55 (37.93%) in Morro do Chapéu and 47 (32.42%) in the municipality of Feira de Santana - BA. The antimicrobial activity evaluated solid medium was detected in 38 (26.20%) of total. In the city of Lafaiete Coutinho was observed in 14 (9.65%) in Morro do Chapéu 12 (8.27%) and Feira de Santana 12 (8.27%). Which, were antagonistic for *S. aureus* CCMB 262 (22.75%), for *S. aureus* CCMB 263 (20%), for *S. aureus* CCMB 285 (14,48%), for *E. coli* 284 (2,06%), for *E. coli* CCMB 261 (3,44%), 9.65% for *S. choleraesuis* CCMB 281 (9,65%), for *C. albicans* CCMB 266 (8,96%), for *C. albicans* CCMB 286 (12,41%) and for *C. parapsilosis* (10,34%). The 11 strains showing the best results in the first test were selected for characterization of the minimal inhibitory concentration (MIC). Of these, nine showed minimal inhibitory concentration in starch-casein agar. And of those, three were able to inhibit *P. aeruginosa* CCMB 268. Sequencing of 16S rDNA showed that the 11 sequenced isolates belong to the genus *Streptomyces* and *Bacillus*.

**KEYWORDS:** Actinobacteria, *Bacillus*, Termite nest, Etnopharmacology, Potential antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização dos municípios onde foram feitas as coletas dos materiais estudados. 25
- Figura 2.** Vista geral dos três pontos de coleta: (A) Morro do Chapéu – BA; 26  
(B) Lafaiete Coutinho – BA e (C) Feira de Santana – BA
- Figura 3.** Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em 36  
ágar do isolado LC 10 contra (A) *Staphylococcus aureus* CCMB 285 e  
contra (B) *Candida albicans* CCMB 266.
- Figura 4.** Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em 38  
ágar (A) do isolado FS 36 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e (B)  
do isolado FS 37 contra *Candida parapsilosis* CCMB 288
- Figura 5.** Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em 40  
ágar (A) do isolado MC 50 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e (B)  
do isolado MC 46 contra *Candida parapsilosis* CCMB 288.
- Figura 6.** Fotos mostrando características morfológicas macroscópicas das 49  
colônias dos isolados MC 36, LC 10, LC 17, FS 41, FS 43, incubados em  
meio CAA a 30° C por 11 dias.
- Figura 7.** Fotos em microscópio óptico (400 x) dos isolados LC 07, LC 10, 50  
LC 17, FS 41, FS 43, MC 30, MC 36, MC 48 crescidos em microcultivo.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Microrganismos-teste utilizados nos ensaios de detecção de 28  
atividade antimicrobiana.

**Tabela 2.** Dados cartográficos dos locais de coleta da terra dos cupinzeiros 33  
e dos cupins em diferentes localidades do Estado da Bahia

**Tabela 3.** Número e porcentagem de isolados, segundo o local de coleta e 34  
meios de cultivos utilizados

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar 37  
apresentada pelas microrganismos isolados de cupinzeiros no município de  
Lafaiete Coutinho – BA.

**Tabela 5.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar 39  
apresentada pelos microrganismos isolados de cupinzeiros no município de  
Feira de Santana – BA.

**Tabela 6.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar 41  
apresentada pelos microrganismos isolados de cupinzeiros no município de  
Morro do Chapéu – BA.

**Tabela 7.** Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima 46  
(mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos aquosos dos microrganismos isolados de cupinzeiros

**Tabela 8.** Características macro e micromorfológicas dos microrganismos 48  
isolados dos cupinzeiros

**Tabela 9.** Similaridade das sequências do rDNA 16S obtidas para os 51  
isolados selecionados com sequências de organismos relacionados presentes  
na base de dados GenBank.

## 1. INTRODUÇÃO

Os cupins são pequenos insetos da ordem Isoptera e ocorrem nas áreas tropicais e temperadas, entre os paralelos 45°-48° N e 45° S. Estes insetos fazem parte, juntamente com os Hymenoptera (formigas, abelhas e vespas), de um grupo de invertebrados que mantém uma organização social com divisão de castas morfológicamente separadas e com funções diferentes na sociedade, contudo funcionalmente independentes, sendo chamados de insetos sociais (LIMA-RIBEIRO et al, 2006). São descritos cerca de 281 gêneros e 2.600 espécies de cupins. Para o Brasil, estão registradas em torno de 290 espécies. Vários autores concordam que certamente este número deve aumentar com a aplicação de estudos termitofaunísticos no país. A riqueza local de espécies está relacionada com características ambientais, como altitude, temperatura, pluviosidade, tipo e estrutura da vegetação (FLORÊNCIO e DIEHL, 2006).

Os cupins são importantes para a manutenção da dinâmica dos processos de decomposição da necromassa vegetal e para fluxos de nutrientes nas florestas tropicais, devido principalmente à variedade de seus hábitos alimentares e abundância de suas populações. Esses insetos possuem o comportamento construtor e isso causa modificações na estrutura dos solos, promovendo um aumento de porosidade e do transporte de partículas minerais para a superfície e vice-versa (VASCONCELLOS et al., 2005).

Dentre os principais componentes da microbiota de diversas espécies de cupins estão bactérias da Classe Actinobactéria e do gênero *Bacillus*, as quais estão presentes tanto no interior do intestino dos cupins como na superfície de seus corpos (BIGNELL et al., 1979; PASTI et al., 1990; WENZEL et al., 2002; KÖNIG, 2005). Actinobactéria é uma classe de bactérias Gram-positivas também conhecidas como “actinomicetos”. Estas bactérias têm organização filamentosa, muitas vezes ramificada. Dada sua semelhança com fungos, as actinobactérias são, com frequência, erroneamente classificadas como tais (STACKEBRANDT et al., 1997). Estes microrganismos estão largamente distribuídos no solo, água e outros ambientes naturais (GARCIA, 2006). O gênero *Bacillus* é caracterizado como bactéria Gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, em formato de bacilo formação de esporos. São comumente encontrados no solo (MELO, 2005).

As actinobactérias são importantes para a indústria, pois produzem muitos compostos bioativos, tais como agentes cardiovasculares (KILLHAM, 1994), vitaminas, enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores e, principalmente antibióticos (MANIVASAGAN et al., 2009). Os *Bacillus* também são um atrativo para a indústria, pois, possuem diversas características vantajosas, como por exemplo, alta taxa de crescimento e sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular (LISBÔA, 2006). Além de produzirem diversos antibióticos caracterizados como dipeptídeos ou peptídeos cíclicos com baixo peso molecular (MELO, 2005). Por isso, a procura de

novas espécies de actinobactérias e *Bacillus* constitui um componente essencial para a descoberta de novas drogas farmacêuticas. Até o momento, na literatura científica, não foi descrito nenhum trabalho envolvendo o isolamento e verificação da atividade antimicrobiana de microrganismos da terra de cupinzeiros.

Na medicina tradicional, os cupins são utilizados para o tratamento de diferentes enfermidades em várias partes do mundo (COSTA NETO, 2006). O uso disseminado de remédios feitos à base de cupins e/ou de seus ninhos e o relato testemunhal de seus usuários quanto à sua eficácia permitem supor que, provavelmente, esta eficácia possa ser atribuída aos compostos bioativos produzidos pelas actinobactérias e pelos *Bacillus* presentes no ninho dos cupins.

Sendo assim, o presente trabalho visou verificar o potencial antimicrobiano de actinobactérias e *Bacillus* isoladas de cupinzeiros de três diferentes localidades inseridas no Semi-árido baiano.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo isolar microrganismos presentes em terras de cupinzeiros da Mata de Cipó, nos municípios de Lafaiete Coutinho, Feira de Santana e Morro do Chapéu - BA, bem como verificar o potencial antimicrobiano destes microrganismos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar isolados de actinobactérias e bactérias do gênero *Bacillus* associadas a cupinzeiros;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados através da metodologia de Difusão em Ágar (bloco de ágar);
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos microrganismos selecionados através do ensaio em meio sólido;
- Identificar os isolados que apresentaram melhores resultados no ensaio em meio sólido através da taxonomia clássica e molecular;
- Identificar as espécies de cupins estudadas;
- Depositar os microrganismos identificados na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB/UEFS) para que possam estar disponíveis para estudos futuros.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CUPINS

Segundo Lima-Ribeiro et al. (2006), os cupins são pequenos insetos da ordem Isoptera e fazem parte, junto com os Hymenoptera (formigas, abelhas e vespas), de um grupo de invertebrados com comportamento diferenciado, os quais mantêm uma organização social com divisão de castas morfológicamente separadas e com funções diferentes na sociedade, porém funcionalmente interdependentes, chamados de insetos sociais.

Normalmente, a colônia de cupins é composta por três castas: reprodutores (rainha e rei), operários e soldados. A rainha é o maior indivíduo da colônia e em conjunto com o rei, são os únicos indivíduos férteis e responsáveis pela reprodução. Os operários são responsáveis pela construção e manutenção da colônia (limpeza e coleta de alimentos) e os soldados, com suas fortes mandíbulas e/ou substâncias químicas, servem para a defesa (THORNE, 1996).

Os cupins ocupam a posição de consumidores primários ou decompositores (herbívoros e detritívoros) nos ecossistemas naturais, atuando na reciclagem de nutrientes por meio da trituração, decomposição, humificação e mineralização de uma variedade de recursos celulósicos. Geralmente assume-se que todos os cupins são consumidores de madeira (xilófagos), porém uma grande diversidade de material orgânico, em vários estágios de decomposição, pode servir de alimento para esses insetos, incluindo madeira (viva ou morta), gramíneas, plantas herbáceas, serapilheira, fungos, ninhos construídos por outras espécies de cupins, excrementos e carcaças de animais, líquens e até mesmo material orgânico presente no solo (LEE, WOOD 1971; LIMA, COSTA-LEONARDO, 2007).

Estes insetos ocorrem nas áreas tropicais e temperadas, entre os paralelos 45°- 48°N e 45°S (WOOD; SANDS, 1978). Atualmente, há 2.858 espécies descritas, sendo que a região neotropical engloba 537 espécies (CONSTANTINO, 2007). Existem sete famílias de Isoptera: Mastotermitidae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae e Termitidae (GRASSÉ 1986). Para o Brasil, ainda há discrepâncias quanto à diversidade, estando registradas em torno de 250 espécies por Fontes e Araujo (1999); 280 por Canello e Schlemmermeyer (1999) e cerca de 290 por Constantino (1999), que se distribuem entre as famílias Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae (CONSTANTINO, 1999). Porém, todos estes autores concordam que certamente estes números devem se elevar com a aplicação dos estudos termitofaunísticos no país.

A riqueza local de espécies está relacionada com características ambientais como altitude, temperatura, pluviosidade, tipo e estrutura da vegetação, de modo que a frequência de ocorrência

dos térmitas reflete a disponibilidade de recursos e suas relações intra e interespecíficas (EGGLETON, 2000).

### **3.1.1 Ninhos**

Os cupins normalmente constroem ninhos que apresentam formas e características diferenciadas de acordo com a espécie, oferecendo-lhes proteção, além de manter a coesão da sociedade. O ninho é um sistema de cavidades e galerias interligadas entre si, constituindo um ambiente fechado e isolado que possui microclima mais ou menos distinto do meio circundante (com temperatura, umidade e atmosfera interna controladas). Ele pode ser construído em diferentes ambientes, com métodos variados, por meio de escavação no solo e/ou madeira. Algumas espécies constroem seus ninhos sobre a superfície do solo (epígeos), enquanto outras preferem a subsuperfície (hipógeos), troncos e galhos de árvores como suporte (arborícolas) ou madeira para construção das galerias, utilizando diferentes combinações de materiais (solo, matéria orgânica vegetal e até a própria saliva e fezes) como matéria prima (NOIROT, 1970; FONTES, 1979).

### **3.1.2 Importância dos cupins**

Para Vasconcellos et al (2005), os cupins são organismos importantes para a manutenção da dinâmica dos processos de decomposição da necromassa vegetal e para os fluxos de nutrientes nas florestas tropicais, devido principalmente à variedade de seus hábitos alimentares e abundância de suas populações (MATSUMOTO, 1976; BIGNELL e EGGLETON, 2000). Além disso, o comportamento construtor dos cupins causa modificações na estrutura dos solos, promovendo um aumento de porosidade e do transporte de partículas minerais para a superfície e vice-versa (LEE e WOOD, 1971; WOOD e SANDS, 1978). Assim, cupins são importantes agentes de manutenção da vitalidade do solo dos ambientes naturais e de beneficiamento e regeneração dos solos degradados e compactados das pastagens e cultivos. As alterações na estrutura dos ecossistemas, causadas pela atividade dos cupins, podem influenciar a disponibilidade de recursos para outros organismos de categorias tróficas diferentes. Por isso, esses insetos são considerados como "engenheiros" de ecossistemas (LAVELLE et al., 1997).

### 3.2 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias compreendem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias Gram-positivas com alto teor de guanina e citosina. Sua característica principal é a formação de filamentos ramificados ou hifas em algum ponto do ciclo de vida em diversos taxa, persistindo como um micélio estável ou fragmentando-se em bacilos ou cocos (GOODFELLOW, 1989; HOLT et al., 1994).

Esses microrganismos estão taxonomicamente classificados dentro do domínio Bacteria, na divisão Actinobacteria, classe Actinobacteria e ordem Actinomycetales (GARRITY; BELL; LILBURN, 2003).

Ocorrem em uma grande variedade de habitats e são capazes de crescer em uma vasta diversidade de substratos, sendo comumente encontradas no solo (MCCARTHY; WILLIAMS, 1990). Existem, inclusive, diversos estudos a respeito desses microrganismos em diferentes locais, como em desertos (TAKAHASHI et al., 1996; OKORO et al., 2009), em esponjas marinhas (JIANG et al., 2007; ELARDO, 2008; ZHANG et al., 2008), no trato intestinal de cupins (BIGNELL et al., 1979; PASTI et al., 1990; SCHIMITH-WAGNER et al., 2003), em diversas plantas (MATSUURA, 2004; UETANABARO, 2004; SILVA, 2006; VASCONCELLOS, 2008; KHAMNA et al., 2009), em praias e dunas (ANTONY-BABU; GOODFELLOW, 2008), em salamandras (LAUER et al., 2008), em formigas (FAVARIN, 2005), em rios (LEIVA et al., 2004), da Terra Preta Antropogênica da Amazônia (GARCIA, 2006), e também de amostras de solo da floresta amazônica (SOUZA; MORIYA; SOUZA, 2009).

Metabólitos de microrganismos produzidos no meio em que crescem são conhecidos há muito tempo (YARBROUGH et al., 1993). A função desses produtos pode ser ecológica-antagônica, inibindo o crescimento ou desenvolvimento de competidores a exemplo dos antibióticos produzidos por bactérias (KEEL et al., 1990) ou mesmo promovendo associações com outros microrganismos, plantas superiores com fungos micorrízicos (HALLMAN e SIKORA, 1996). A indústria tem explorado comercialmente substâncias metabólicas produzidas por fungos e bactérias. Com finalidades médicas e/ou industriais essas substâncias, produzidas *in vitro* e/ou *in vivo*, têm sido estudadas no sentido de verificar supressão de patógenos de seres vivos e plantas (NARDO e CAPALBO, 1998).

As actinobactérias produzem antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos de interesse industrial (WILLIAMS e VICKENS, 1988). Elas são especialmente úteis na indústria farmacêutica por sua capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas, sendo muitos deles utilizados para tratamento de doenças humanas (WANG et al., 1999). Os metabólitos produzidos pelas actinobactérias correspondem a aproximadamente

dois terços dos antibióticos naturais descobertos, incluindo muitos das seguintes classes: aminoglicosídeos, antraciclina,  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e tetraciclina (OKAMI e HOTA, 1988). Dentre estes, a estreptomicina, cloranfenicol, neomicina, gentamicina, eritromicina, entre outros.

### 3.3 GÊNERO *BACILLUS*

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é extremamente heterogêneo, tanto geneticamente (a quantidade de G + C das diversas espécies variam de 32 a 69%) quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede etc). Os estudos do DNAr 16S e 23S confirmaram essa heterogeneidade e mostraram que o gênero *Bacillus* pode ser dividido em muitos gêneros (ASH et al., 1991; RIVA et al., 1991). As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 X 1,2  $\mu$ m até 2,5 x 10  $\mu$ m), esporulados, Gram-positivos, geralmente móveis graças aos flagelos peritríquios (CLAUS e FRITZE, 1989; FORSYTH, 1998).

O cultivo desses microrganismos pode ser difícil, visto que algumas espécies podem exigir inúmeros fatores de crescimento e o aspecto colonial no ágar é variável e o fenômeno de dissociação são frequentes (CLAUS e FRITZE, 1989). O *B. subtilis* produz colônias irregulares (contorno ondulado ou filamentoso), consistência cremosa e de diâmetro entre 2 e 4 mm. Nos cultivos mais velhos, as colônias apresentam um aspecto seco rugoso e se incrustam no ágar. As colônias das outras espécies isoladas na bacteriologia médica (*B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*) não representam características particulares. As espécies do gênero *Bacillus* esporulam logo que as condições não são favoráveis (um só esporo por célula vegetativa); frequentemente são muito resistentes no meio ambiente. O fenômeno de esporulação, ao contrário que acontece pelas espécies do gênero *Clostridium*, não é inibido pelo oxigênio. A esporulação depende das condições de cultivo “*in vitro*” e algumas espécies não esporulam em meios especiais (CLAUS e FRITZE, 1989; FORSYTH, 1998).

O gênero *Bacillus* é composto de microrganismos ambientais cujo habitat principal é o solo onde possuem um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio. A resistência dos esporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas fazem com que sejam considerados ubíquos, podendo ser isolados do solo, d’água do mar da d’água doce e gêneros alimentícios (CLAUS e FRITZE, 1989; FORSYTH, 1998).

Espécies do gênero *Bacillus* são bem conhecidos como produtores de antibióticos com atividade contra fungos e bactérias patogênicas (LOEFFLER et al., 1986; KREBS, 1998).

### 3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ACTINOBACTÉRIAS E *BACILLUS*

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para a geração de energia. Essas reações fazem parte do metabolismo primário. Existem outras rotas metabólicas que possibilitam os organismos produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário, ou seja, seus produtos não são essenciais para a vida do organismo, e normalmente, são produzidos na fase estacionária do indivíduo. Mas também podem ser sintetizados durante o crescimento (VINING, 1986; HECK, 2007).

Diversos reinos produzem metabólitos secundários, as plantas, por exemplo, os produzem para a proteção a predadores e pigmentos importantes para a reprodução. Os insetos produzem metabólitos para comunicação ou proteção; e ainda entre os eucariotos, os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários com diversos tipos de enzimas e até mesmo antibióticos. Dentre as bactérias, o destaque fica para as actinobactérias, que sintetizam enzimas, e a maioria dos antibióticos conhecidos (VINING, 1986; HECK, 2007).

Os fatores que desencadeiam a produção de metabólitos secundários geralmente estão ligados à escassez de algum nutriente essencial como carbono, nitrogênio ou fosfato (VINING, 1986; OCHI, 2007; HECK, 2007).

Ainda não se sabe a função de muitos produtos do metabolismo secundário. Além disso, cada organismo responde de uma maneira diferente à depleção de um ou de outro nutriente. Portanto, quando há interesse em produzir algum metabólito secundário, é necessário estudar cada espécie em particular, pois uma mudança nas condições de cultivo pode inibir a produção ou ainda levar a produção de outros compostos que não o esperado (HECK, 2007).

As actinobactérias representam a maior fonte de metabólitos secundários com atividade anticelular (GARCIA, 2006). Desde a descoberta do primeiro antibiótico de uma actinobactéria do solo, em 1940, por Selman Waksman (CHATER, 2006), milhares de novas moléculas e microrganismos já foram estudados. As actinobactérias são utilizadas principalmente pela indústria farmacêutica por sua capacidade de produção de metabólitos secundários (VAKULENKO e MOBASHERY, 2003).

Existem cepas de uma mesma espécie de actinobactérias que produzem antibióticos diferentes, e cepas de espécies diferentes que produzem o mesmo antibiótico (OKAMI e HOTTA, 1988). Ou seja, a produção de antibióticos é cepa-específica e não espécie-específica (PADILHA, 1998).

Um único gênero de actinobactéria, *Streptomyces* é capaz de sintetizar vários compostos não relacionados estruturalmente, entretanto, outros gêneros também são capazes de produzir compostos

relacionados. Os gêneros *Micromonospora*, *Nocardia* e *Saccharopolyspora*, por exemplo, também produzem aminoglicosídeos; *Aeromicrobium*, *Micromonospora* e *Saccharopolyspora* produzem também antibióticos da classe dos macrolídeos; e ansamicinas são produzidas por cepas de *Amycolatopsis* (EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994).

Espécies do gênero *Bacillus* são bem conhecidos como produtores de antibióticos com atividade antagônica contra fungos e bactérias patogênicas (LOEFFLER et al., 1986; KREBS, et al., 1998). Eles formam esporos que podem ser facilmente formulados, e tem alta viabilidade comparada com células vegetativas (BOCHOW et al., 1995). A atividade antagônica tem sido frequentemente associada com produção de metabólitos secundários e com propriedades antibióticas (SILO-SUH et al., 1994; STABB et al., 1994; ASAKA e SHODA, 1996).

A maioria dos antibióticos produzida por *Bacillus* spp. tem sido caracterizada como dipeptídeos ou peptídeos cíclicos com baixo peso molecular (LOEFFLER et al., 1986; NAKANO; ZUBER, 1990). Em 1977, já haviam sido descritos 167 peptídeos antimicrobianos produzidos por membros do gênero *Bacillus*. Peptídeos cíclicos como as gramicidinas S, tirocidinas e bacitracinas, e lipopeptídeos como as iturinas, bacilomicinas e fengicinas são metabólitos secundários isolados característicos de bactérias do gênero *Bacillus* (LISBÔA, 2006).

### 3.5 ETNOFARMACOLOGIA

A Etnofarmacologia é uma divisão da Etnobiologia, sendo uma disciplina que visa ao estudo do complexo conjunto de relações de plantas e animais com sociedades humanas (BERLIN, 1992). Bruhn e Holmstedt (1982) definem a Etnofarmacologia como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem”.

Os homens vêm usando os insetos e alguns produtos dele há muito tempo, como recursos terapêuticos em várias partes do mundo (COSTA NETO, 2006). Para Carrera (2006), o uso terapêutico de insetos ou de produtos e substâncias produzidas por eles é denominado como entomoterapia.

Costa Neto (2006) expõe alguns exemplos muito antigos sobre a utilização medicinal de insetos, tais como: a utilização do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) na medicina tradicional chinesa se dá há mais de três mil anos; o Papiro de Ebers, datado de 16 a.C., contém registro de medicamentos obtidos de insetos e aranhas; no período das Cruzadas, o mel de *Apis mellifera* era usado para tratar várias enfermidades e o percevejo da cama (*Cimex lectularius*) para tratar obstruções urinárias.

O número de trabalhos científicos relacionados com a utilização medicinal de insetos (entomoterapia) tem aumentado (COSTA NETO e PACHECO, 2005). Assim, a seleção etnofarmacológica de animais, em especial, os insetos para pesquisa e desenvolvimento, baseada no relato feito por seres humanos de um dado efeito terapêutico, pode ser um valioso atalho para a descoberta de fármacos. Nesse contexto, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica (ELISABETSKY, 2003; COSTA NETO, 2005; COSTA NETO, 2006).

### 3.6 CUPINS E CUPINZEIROS NA MEDICINA TRADICIONAL

Os insetos e alguns produtos extraídos deles têm sido usados desde muito tempo para fins terapêuticos. No entanto, eles têm recebido pouca atenção, e os estudos sobre entomoterapia são ainda bastante escassos (COSTA NETO, 2006).

Os representantes da Ordem Isoptera também são muito utilizados para a cura de várias doenças e condições debilitantes, como bronquites, feridas, gripes e resfriados, hemorragias, mordida de cachorro, bócio, picada de cobra e escorpiões, prisão de ventre, pneumonia, asma, reumatismo, sarampo (COSTA NETO, 2006).

Segundo Costa Neto (2006), o uso de cupins e cupinzeiros como fonte de medicamentos foi registrado em 11 estados brasileiros por diversos autores. Segundo este autor, os cupins ou cupinzeiros são recomendados para a cura dessas doenças utilizando-se, chá desses insetos esmagados, chá feito com os túneis pretos dos cupinzeiros, cupinzeiros com água fervente, cupinzeiros com água e açúcar ou a inalação do cupinzeiro incinerado (COSTA NETO e PACHECO, 2005; COSTA NETO, 2006).

Nomura (2006) relata a utilização de cupins e cupinzeiros em duas cidades do Brasil. Em Pirassununga-SP são utilizados para tratar umbigo saltado; em Betim-MG para tratamento de quebra-dura (hérnia, rendidura). Os moradores do povoado de Pedra Branca, município de Santa Terezinha-BA usam partes dos cupinzeiros para tratarem gripes e umbigo grande (COSTA NETO e PACHECO, 2005). Costa Neto (2000) cita a utilização do cupim cabeça-de-estaca (*Syntermes molestus*) em Alagoas no tratamento de puxado (asma). Para o tratamento de asma, Branch e Silva (1983) citam o uso do chá feito com indivíduos de *Microcerotermes exigus* (Hagen).

Lenko e Papavero (1996) citam que os cupins e suas moradias são diretamente empregados na cura de várias doenças. Como por exemplo, a utilização do chá dos túneis pretos que se encontram dentro dos cupinzeiros para a cura da bronquite; “chá de cupim” para coqueluche e sarampo; colocar cinzas de cupinzeiros em feridas para não deixar cicatrizes; inalação da fumaça

dos túneis pretos de cupins para combater gripes e resfriados; mel de cupim para cessar hemorragias; cozinhar cupim com açúcar e beber para curar pneumonia.

Bignell et al. (1979) e Pasti et al. (1990) evidenciaram a presença de bactérias da Classe Actinobactéria na microbiota associada a espécies de cupins. Como já dito anteriormente, as actinobactérias possuem um grande potencial na produção de compostos bioativos e, em alguns casos, pode ser que elas estejam envolvidas no processo da cura de muitas doenças, quando os cupins são utilizados como “remédios” pelas populações.

Segundo Costa Neto (2006), visto a enorme utilização dos cupins na medicina tradicional para a cura de diversas doenças, é necessário implementar mais investigações farmacológicas e bioquímicas para identificar a verdadeira eficiência desses. O descobrimento de novos compostos bioativos em artrópodes tem se concentrado principalmente nos insetos sociais, uma vez que eles são muito suscetíveis a diferentes tipos de patógenos, daí necessitarem produzir antibióticos e fungicidas para se defenderem (PEMBERTON, 1999).

### 3.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Existem diferentes métodos que visam demonstrar atividade antibacteriana e antifúngica de produtos naturais. Esses métodos não são igualmente sensíveis ou baseados sob o mesmo princípio, como consequência os resultados obtidos também passam a ser profundamente influenciados não somente pelo método selecionado, mas também pelos microrganismos usados para fazer o teste e pelas características de solubilidade de cada substância em estudo (VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991; VALGAS, 2002).

Crucial para uma investigação de produtos naturais com atividades biológicas é a escolha de bioensaios apropriados para o monitoramento dos efeitos requeridos. Além disso, esses bioensaios devem ser projetados para o uso simultâneo de várias amostras de produtos naturais para facilitar o trabalho de triagem. Os sistemas-teste devem idealmente ser simples, rápidos, reprodutíveis e baratos. A complexidade dos bioensaios tem que ser planejada em função das instalações, recursos naturais, e disponibilidade de pessoal (HOSTETTMANN et al., 1997; VALGAS, 2002).

Os métodos de triagem atualmente disponíveis para detectar atividade antibacteriana de produtos naturais se enquadram dentro de três grupos:

- 1) métodos de difusão;
- 2) métodos bioautográficos e
- 3) métodos de diluição.



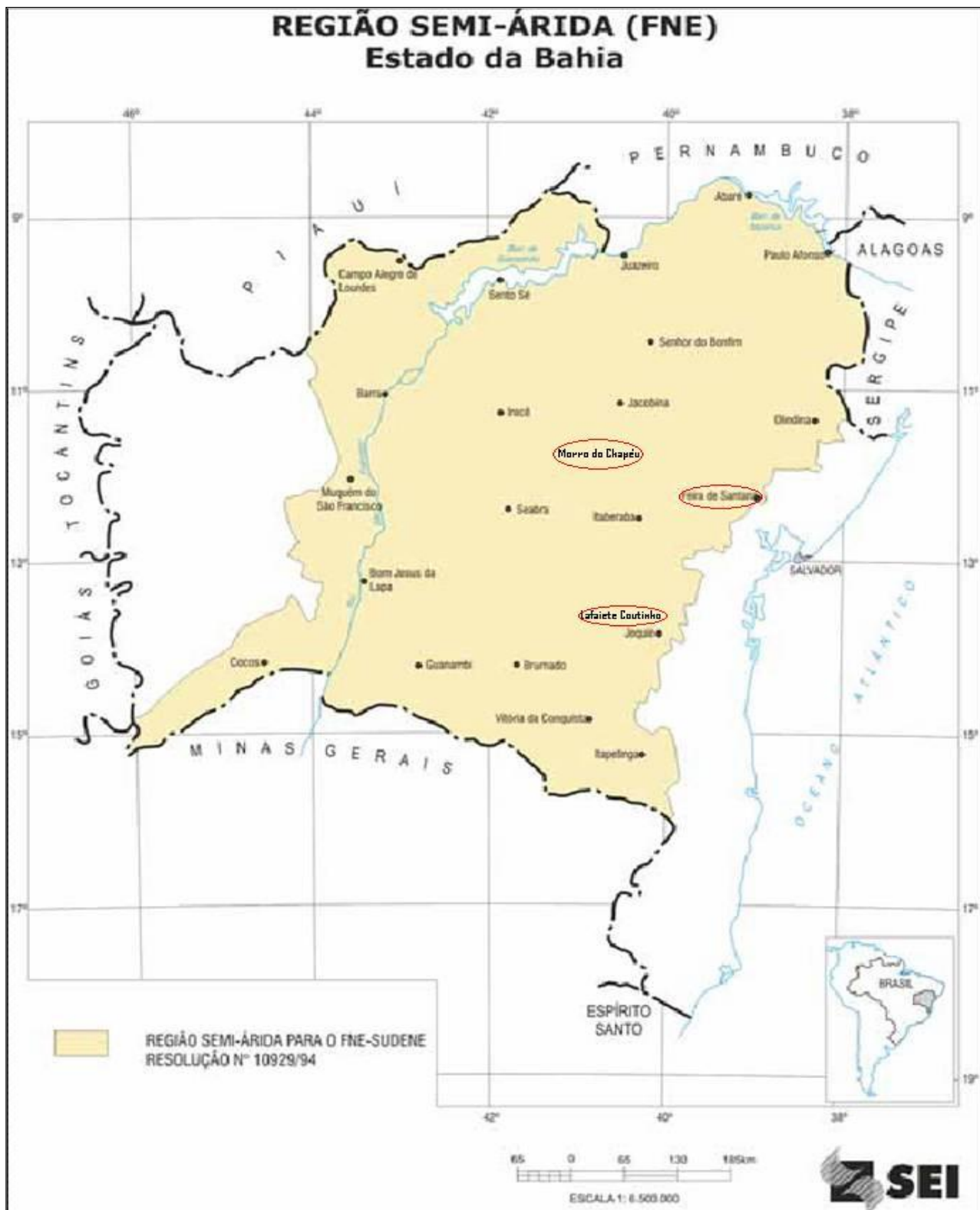
Os ensaios de difusão e bioautográficos são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibacteriana nos produtos naturais. Um exemplo de teste de difusão é o método Disco-Placa, onde um pequeno disco de papelão ou papel filme contendo uma quantidade conhecida da amostra a ser testada é aplicado sobre o meio de cultura inoculado com um microrganismo-teste. O teste é bastante simples e prático, sendo possível testar várias amostras simultaneamente em uma única placa de Petri (BICALHO, 2003). Outro método de difusão em ágar é o método do Bloco de “Gelose”, que consiste na aplicação de blocos de ágar (com microrganismos) sobre um meio de cultura inoculado previamente com um microrganismo-teste, a fim de verificar se o microrganismo do bloco de ágar produz ou não antibiose sobre o microrganismos-teste (ICHIKAWA, ISHIKURA e OZAKI, 1971). Os métodos de diluição podem ser considerados semiquantitativos ou quantitativos. Quando são testadas poucas concentrações do produto natural (geralmente 3 diluições) com a finalidade de detectar seu efeito antibacteriano, o método é dito semiquantitativo. Os testes quantitativos, por sua vez, referem-se aqueles onde se executam diluições seriadas do produto natural e determina-se para este, a concentração inibitória ou bactericida mínima. Um exemplo bastante comum é o teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é aplicado para a avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. Testa o comportamento dos microrganismos-teste frente a concentrações decrescentes dos compostos antimicrobianos em meio líquido. A menor concentração capaz de inibir a multiplicação dos microrganismos-teste é denominada de CIM (BICALHO, 2003). Todos esses métodos possuem sensibilidades diferentes e adaptações de cada um deles são usadas. Para facilitar a interpretação dos resultados é importante que as adaptações sejam padronizadas (VALGAS, 2002).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ÁREAS DE ESTUDO

As coletas das amostras de terra e dos insetos para este estudo foram realizadas em áreas de Mata de Cipó no município de Lafaiete Coutinho-BA, situado no Sudoeste baiano, que ocupa uma área de 352,66 km<sup>2</sup> com altitude de 355 m. Tal município estende-se por uma zona de transição entre a Floresta Estacional e a Caatinga, com clima semi-árido e subúmido a seco. A Mata de Cipó apresenta árvores relativamente baixas, raramente ultrapassando 10 m a 12 m de altura, com manchas de grande densidade de árvores por unidade de área, com diâmetros que variam de pequeno a médio porte onde ocorre grande quantidade de cipós e lianas, formando um emaranhado que dificulta a penetração e o caminhar dentro da formação (BRASIL, 1981).

Além dessa área, foram realizadas coletas no município de Feira de Santana-BA, localizado na região Paraguaçu, com uma área de 1362,88 km<sup>2</sup> e altitude de 234 m. A vegetação predominante no município é a Floresta Estacional com contato com a Caatinga e a Floresta Estacional Decidual, o clima é o subúmido a seco. Idênticos procedimentos foram desenvolvidos em Morro do Chapéu-BA, município inserido na região Piemonte da Diamantina, ocupando uma área de 5531,85 km<sup>2</sup> com altitude de 1011 m. Apresenta a Floresta Estacional com contato com a Caatinga e a Floresta Estacional Semidecidual como vegetação e o clima predominante é o subúmido a seco (BAHIA, 2007).



**Figura 1.** Localização dos municípios onde foram feitas as coletas dos materiais estudados.  
Fonte: Disponível em [www.sei.ba.gov.br](http://www.sei.ba.gov.br)



**Figura 2.** Vista geral dos três pontos de coleta: (A) Morro do Chapéu – BA; (B) Lafaiete Coutinho – BA e (C) Feira de Santana – BA. **Fotos:** Getúlio Bomfim

## 4.2 COLETA DE TERRA EM CUPINZEIROS E CUPINS

A escolha dos cupinzeiros para coleta aconteceu de forma aleatória, em um total de cinco cupinzeiros em cada área/município. As coletas foram realizadas com o auxílio de uma enxada e as amostras de terra foram colhidas com espátula desinfetada com álcool 70%, sendo as amostras dos cupinzeiros acondicionadas em tubos plásticos esterilizados. Após coletadas amostras da terra das partes superior, média e inferior do cupinzeiro foram coletadas e armazenadas em recipientes próprios (frascos esterilizados), as amostras foram transportadas até o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana-BA e o plaqueamento foi realizado até 24h depois da coleta. Espécimes de cupins também foram coletados, conservados em álcool 70% e enviados a especialista para identificação taxonômica.

## 4.3 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Para isolamento dos microrganismos, amostras dos cupinzeiros trazidas ao laboratório foram pesadas até perfazer 10 g de terra por cupinzeiro; em seguida, foram ressuspensas em 90 mL (diluição 1:10) de água destilada estéril e homogêneas com agitação manual por 2 minutos. As amostras foram submetidas a uma diluição seriada em solução salina ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), seguindo a inoculação de 0,1 mL da amostra de solo diluída sobre os meios de cultivos utilizados, sendo espalhados com alça de Drigalski. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada meio (ARAUJO et al., 1998). Após o processo de isolamento em meios de cultivo ISP2A (Amido, 10,0 g; Extrato de levedura, 4,0 g; Extrato de malte, 10,0 g; Dextrose, 4,0 g; Agar, 20,0 g; Água destilada, 1000 mL), CAA (Amido, 10,0 g; Caseína, 0,3 g; Nitrato de potássio, 2,0 g; Cloreto de sódio, 2,0 g; Fosfato hidrogeno dipotássico, 2,0 g; Sulfato de magnésio, 0,05 g; Carbonato de cálcio, 0,02 g; Sulfato ferroso, 0,01 g; Agar, 25,0 g; Água destilada, 1000 mL) e ISP3 (Farinha de aveia, 20,0 g; Solução de traços de sais, 1,0 mL; Agar, 18,0 g; Água destilada, 1000 mL), todos contendo 50 µg/mL do antifúngico cicloheximida (durante 30 dias, a 30°C), as colônias foram purificadas através de estrias compostas, utilizando-se o mesmo meio e condições de cultivo do isolamento (MELO et al., 2006).

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 4.4.1 Microrganismos-teste

Foi testada a atividade antimicrobiana contra 10 microrganismos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Microrganismos-teste utilizados nos ensaios de detecção de atividade antimicrobiana.

<b>Microrganismos-teste</b>	
<b>Bactérias Gram-positivas</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 285
	<i>S. aureus</i> CCMB 262 (resistente à estreptomicina e dihidroestreptomicina)
	<i>S. aureus</i> CCMB 263 (resistente à novobiocina)
<b>Bactérias Gram-negativas</b>	<i>Escherichia coli</i> CCMB 284
	<i>E. coli</i> CCMB 261 (sensível à trimetoprima e resistente à sulfonamida)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCMB 268
	<i>Salmonella choleraesuis</i> CCMB 281
<b>Leveduras</b>	<i>Candida albicans</i> CCMB 266
	<i>C. albicans</i> CCMB 286 (resistente a anfotericina B e fluconazol)
	<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288 (resistente a anfotericina-B e fluconazol)

Os microrganismos foram cultivados em meio Ágar Müeller-Hinton (AMH) e Ágar Sabouraud (AS) e cultivados a 37°C, quando bactérias, e a 28°C, quando leveduras, por 24 e 48 horas, respectivamente. As cepas testes foram fornecidas pela Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB/UEFS, Feira de Santana/BA).

### 4.4.2 Ensaio em meio sólido

Para os ensaios em meio sólido, o teste de atividade antimicrobiana foi realizado segundo a metodologia descrita por Ichikawa, Ishikura & Ozaki (1971), que acontece pela difusão do composto bioativo em ágar. Essa metodologia é conhecida também como “Método do Bloco de Gelose”. Em nosso estudo, o procedimento consistiu inicialmente no cultivo do microrganismo isolado em meio de cultura CAA na placa de Petri. Após dez dias de incubação a 30° C, blocos de

ágar circulares de 6 mm de diâmetro foram transferidos para as placas contendo AMH e AS, previamente inoculadas com os microrganismos teste. Foi utilizada uma suspensão de células padronizadas dos microrganismos-teste na concentração aproximada de  $1,2 \times 10^8$  UFC/mL e  $5 \times 10^5$  UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente. O teste foi realizado em triplicata para todas as linhagens isoladas. As placas foram incubadas respeitando-se as características fisiológicas de cada microrganismo-teste, conforme descrito anteriormente. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição de cada bloco foram medidos (em mm), efetuada uma média aritmética e desvio padrão dos resultados e utilizou-se a escala sugerida por Matsuura (2004) para a classificação dos resultados. O controle do meio de cultivo foi realizado inoculando-se somente blocos de ágar do meio de cultura CAA (sem os microrganismos isolados) sobre os microrganismos teste.

#### **4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os isolados que apresentaram melhor atividade antimicrobiana através do ensaio em meio sólido previamente descrito foram testados para a determinação de concentração mínima inibitória sobre os microrganismos teste. Para a determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição, foi utilizado o material liofilizado do caldo de cultivo onde o microrganismo isolado foi crescido. Para este cultivo, cinco plugues de meio CAA com a cultura crescida do microrganismo foram inoculados em 300 mL de caldo CAA e incubado a 30°C por 10 dias. Após este período, o material foi filtrado com gaze e submetido à liofilização e, em seguida, mantido a 4°C até a sua utilização. Para os ensaios de MIC, o extrato liofilizado foi ressuscitado em 2,0 mL de água ultra pura e filtrado em membrana de 0,22 µm e foram seguidas as recomendações do manual da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2002 e 2003 - <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.htm>), com modificações. Os testes foram realizados em Caldo Müeller-Hinton (CMH) para as bactérias. Foram preparadas diluições geométricas de 200 mg/mL a 1,5625 mg/mL dos liofilizados em placas de microtitulação estéreis de 96 poços. Em seguida, cada poço recebeu 10 µL da suspensão do microrganismo-teste. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias e 28°C, por 48 horas, para leveduras. Foi realizada uma verificação da pureza da suspensão de inóculo por meio de uma subcultura de uma alíquota, correspondente à citada acima, em placa de AMH para incubação simultânea. Após o tempo de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina e 50 µL de cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio, na concentração final de 1,250 mg/poço (para bactérias e leveduras respectivamente), para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio e

determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Diluições dos antibióticos, cloranfenicol e nistatina (concentração inicial de 10 mg/mL e 20 mg/mL para cada um respectivamente), foram utilizadas como controles para fins de comparação de dados entre experimentos independentes e como indicadores para avaliação relativa do nível de inibição das amostras testadas. Também foram realizados controles de viabilidade dos microrganismos testados e da esterilidade do meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

### 4.5.1 Estudos Morfológicos

#### 4.5.1.1 Micromorfologia

A determinação da micromorfologia foi realizada nos isolados que apresentaram os melhores resultados através da metodologia em meio sólido, de acordo com a metodologia descrita em Shirling e Gottlieb (1966), com modificações. Os isolados foram repicados com alça de repique sobre “plugs” de ágar CAA. Lamínulas estéreis foram acopladas aos “plugs”. As culturas foram então incubadas a 30° C, por até 21 dias em câmara úmida. Depois de sete, 14 e 21 dias, as lamínulas foram retiradas com ajuda de uma pinça esterilizada, colocadas sobre lâminas identificadas previamente. Depois foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico para observação da micromorfologia de cada isolado.

### 4.5.2 Estudos moleculares

#### 4.5.2.1 Extração do DNA genômico

Os isolados preservados foram reativados em 10 mL meio caldo CAA e incubados a 30 °C por 120h com agitação (150 rpm). As células foram coletadas por centrifugação a 12.000 rpm por 2 min para extração de DNA genômico em pequena escala, segundo o método descrito por Pospiech, Neumann (1995) e Pitcher, Saunders e Owen (1989), modificado. O DNA genômico obtido foi quantificado através da comparação do DNA do fago  $\lambda$  em diferentes concentrações e mantidos a temperatura de 4 °C.



#### 4.5.2.2 Amplificação da região 16S rDNA

Fragmentos do rDNA 16S foram amplificados a partir do DNA genômico, utilizando os *primers* p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e p1401r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAGG-3'). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita em um volume de 50 µL contendo 1 mM tampão 10X, 0,2 µM dNTP's (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 0,4 µM de cada primer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 U de Taq Polimerase (Invitrogen), e 50-100 ng de DNA, nas seguintes condições: desnaturação 95 °C / 5 min; 30 ciclos de desnaturação 94°C / 1 min, anelamento 55°C / 1 min, extensão 72°C / 3 min; extensão final 72°C / 3 min, em termociclador *BIORAD* iCycler (Biorad®). O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1,2% usando um marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb para confirmar o tamanho do fragmento e o DNA do fago λ em diferentes concentrações para quantificação.

#### 4.5.2.3 Purificação dos produtos de PCR

O produto amplificado foi purificado usando mini-coluna GFX (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetido ao sequenciamento. As reações de sequenciamento (10 µL) contendo 1 a 5 µL de DNA (concentração mínima de 200 ng/µL); 3,2 pmoles.µL<sup>-1</sup> de primer e 4 µL do kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle* (GE Healthcare), foram submetidas ao programa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação a 95°C / 20 s, anelamento 50°C / 15 s e extensão de 60°C / 1 min. em termociclador *BIORAD* iCycler (Biorad®).

#### 4.5.2.4 Sequenciamento dos produtos do PCR de 16S rDNA e análise filogenética das sequências obtidas

Os *primers* utilizados na reação sequenciamento foram: 28f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'); 1100r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3') (LANE, 1991); 765f (5' ATT AGA TAC CCT GGT AG 3') (STACKEBRANDT; CHARFREITAG, 1990); 782r (5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3') (CHUN, 1995). O sequenciamento foi realizado pela MACROGEN (EUA).

As sequências obtidas no sequenciamento foram, então, processadas no programa phred/Phrap/CONSED versão Linux (EWING et al., 1998; GODON et al., 1997) para a montagem dos *contigs*. A sequência com aproximadamente 1000 pb foi submetida à comparação nos bancos de dados, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e Ribosomal Data Project II 9.0 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). As sequências recuperadas dos bancos de dados foram

alinhas no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997), editadas no BIOEDIT (HALL, 1999).

#### 4.6 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Repiques de culturas puras foram transferidos para tubos contendo 5 mL do meio CAA inclinado. Depois da formação dos esporos (cultivo por 10 dias a 30°C), foram adicionados 1000 µL de água destilada estéril e procedeu-se a homogeneização. Logo após, foram retirados 330 µL da água contendo as estruturas de esporos em suspensão das actinobactérias, sendo preservados em criotubos contendo previamente 10% de glicerol estéril que, em seguida, foram congelados e mantidos em ultrafreezer a – 85°C, conforme modificação do método descrito por Zipel e Neigenfind (1988). Desta forma, ficam assegurados para estudos futuros e, para tanto, estão sendo depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB/UEFS).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COLETA DA TERRA EM CUPINZEIROS

Foram realizadas as três coletas: a primeira no município de Morro do Chapéu/BA, que aconteceu em 09 de outubro de 2008; a segunda foi realizada no dia 28 de dezembro de 2008 no município de Lafaiete Coutinho/BA, e a última coleta aconteceu no município de Feira de Santana/BA, em 05 de fevereiro de 2009. Os dados dos locais amostrados foram georreferenciados com GPS e encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Dados cartográficos dos locais de coleta da terra dos cupinzeiros e dos cupins em diferentes localidades do Estado da Bahia

MORRO DO CHAPÉU				
Cupinzeiro 1	Cupinzeiro 2	Cupinzeiro 3	Cupinzeiro 4	Cupinzeiro 5
S 11° 34' 01,1"	S 11° 34' 02,9"	S 11° 35' 10,8"	S 11° 35' 12,4"	S 11° 35' 11,3"
W 041° 09' 57,6"	W 041° 10' 00,0"	W 041° 11' 50,2"	W 041° 12' 31,7"	W 041° 12' 30,6"
Altitude: 1062m	Altitude: 1065m	Altitude: 1126m	Altitude: 1218m	Altitude: 1215m
LAFAIETE COUTINHO				
Cupinzeiro 1	Cupinzeiro 2	Cupinzeiro 3	Cupinzeiro 4	Cupinzeiro 5
S 13° 38' 58,4"	S 13° 38' 58,0"	S 13° 38' 56,8"	S 13° 38' 51,3"	S 13° 38' 48,3"
W 040° 12' 50,4"	W 040° 12' 48,9"	W 040° 12' 48,9"	W 040° 12' 47,7"	W 040° 12' 42,6"
Altitude: 576m	Altitude: 579m	Altitude: 581m	Altitude: 594m	Altitude: 614m
FEIRA DE SANTANA				
Cupinzeiro 1	Cupinzeiro 2	Cupinzeiro 3	Cupinzeiro 4	Cupinzeiro 5
S 12° 09' 06,2"	S 12° 09' 06,4"	S 12° 09' 07,0"	S 12° 09' 06,7"	S 12° 09' 07,2"
W 038° 58' 56,8"	W 038° 58' 57,4"	W 038° 58' 57,7"	W 038° 58' 58,3"	W 038° 58' 58,8"
Altitude: 237m	Altitude: 238m	Altitude: 238m	Altitude: 238m	Altitude: 239m

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CUPINS

Os 20 indivíduos coletados em cada cupinzeiro foram identificados pela Dra. Ana Cerilza Santana Mélo, do Laboratório de Entomologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (LENT/UEFS).

Da coleta em Lafaiete Coutinho, os indivíduos do cupinzeiro 1 e 4 foram identificados como *Nasutitermes* sp.1, já os coletados nos cupinzeiros 2, 3 e 5 foram *Cornitermes* sp. (Tabela 4). Os cupins coletados em Feira de Santana foram classificados como *Nasutitermes* sp.2 (Tabela 5). Todos os indivíduos coletados nos cinco cupinzeiros Morro do Chapéu foram classificados como *Constrictotermes* sp. (Tabela 6).

## 5.3 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Um total de 145 microrganismos foi isolado das três localidades estudadas (Morro do Chapéu, Lafaiete Coutinho e Feira de Santana/BA). O número e porcentagem de isolados, segundo o local de coleta e meios de cultivos utilizados são mostrados na Tabela 3.

Este número muito provavelmente subestima a população total de actinobactérias e *Bacillus* em termos de diversidade, uma vez que foram somente isolados os microrganismos capazes de se desenvolver nos meios de cultura utilizados neste estudo. Tais limitações aplicam-se à maioria dos estudos baseados em métodos de plaqueamento, isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório, embora eles forneçam indicações relativas da estrutura da população microbiana, uma vez que apenas 0,1% ou no máximo 10% da população microbiana são cultiváveis pelo uso de técnicas microbiológicas convencionais (TORSIVIK et al., 1990; AMANN et al., 1995; RANJARD et al., 2000; TEIXEIRA; MELO; VIEIRA, 2005; GARCIA, 2006).

**Tabela 3.** Número e porcentagem de isolados, segundo o local de coleta e meios de cultivos utilizados

MEIOS DE CULTIVO	LOCAIS DA COLETA			TOTAL DE ISOLADOS
	Morro do Chapéu	Lafaiete Coutinho	Feira de Santana	
CAA	21 (38,18%)	16 (37,20%)	14 (29,78%)	51 (35,18%)
ISP2 A	16 (29,10%)	14 (32,55%)	14 (29,78%)	44 (30,34%)
ISP3	18 (32,72%)	13 (30,25%)	19 (40,42%)	50 (34,48%)
<b>TOTAL</b>	<b>55 (100%)</b>	<b>43 (100%)</b>	<b>47 (100%)</b>	<b>145 (100%)</b>

De acordo com os dados acima apresentados, verificou-se praticamente o mesmo número de isolados nos meios CAA (51 isolados; 35,18%) e ISP-3 (50 isolados, 34,48%), enquanto que no meio ISP2 o número de isolados foi de 44 (30,34%). No trabalho de Holt et al. (1994) foi observado que os meios de cultivos que continham amido na sua formulação foram os mais eficientes no isolamento de actinobactérias em geral, o que também foi observado no presente trabalho, já que os meios CAA que contêm amido em sua composição, foi o que apresentou maior número de isolados (51).

Das localidades estudadas, o município de Morro de Chapéu foi o que obteve um maior número de isolados com 55 (37,93%), seguido por Feira de Santana com 47 (32,42%) e Lafaiete Coutinho com 43 (29,65%).

## 5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.4.1 Teste de antagonismo em meio sólido

No presente trabalho, convencionou-se a classificação da atividade antimicrobiana de acordo com Matsuura (2004) como:

- Ausente ( - ): ausência de halo de inibição;
- Baixa ( + ): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 10 mm;
- Moderada ( ++ ): diâmetro do halo de inibição entre 11 a 14 mm;
- Alta ( +++ ): diâmetro do halo de inibição superior a 14 mm.

A atividade antimicrobiana dos 145 microrganismos isolados foi testada e as Tabelas 4, 5 e 6 mostram os resultados somente daquelas que apresentaram atividade antimicrobiana para algum dos microrganismos-teste utilizados, com exceção de *P. aeruginosa* CCMB 268, pois esta bactéria não foi inibida por nenhum dos isolados de actinobactéria do presente trabalho. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, que além da estrutura de peptidoglicano na parede celular, apresenta uma membrana externa que confere a ela uma efetiva barreira de permeabilidade, restringindo a penetração de alguns compostos antimicrobianos (TEGOS, 2002; CARVALHAL e ALTERTHUM, 2004; NOBRE, 2008). A mesma também possui muitos fatores de virulência incluindo constituintes estruturais, toxinas e enzimas que podem agir de forma multifatorial para apresentar resistência a diversos compostos (PAUL et al., 1997; MURRAY et al., 2004).

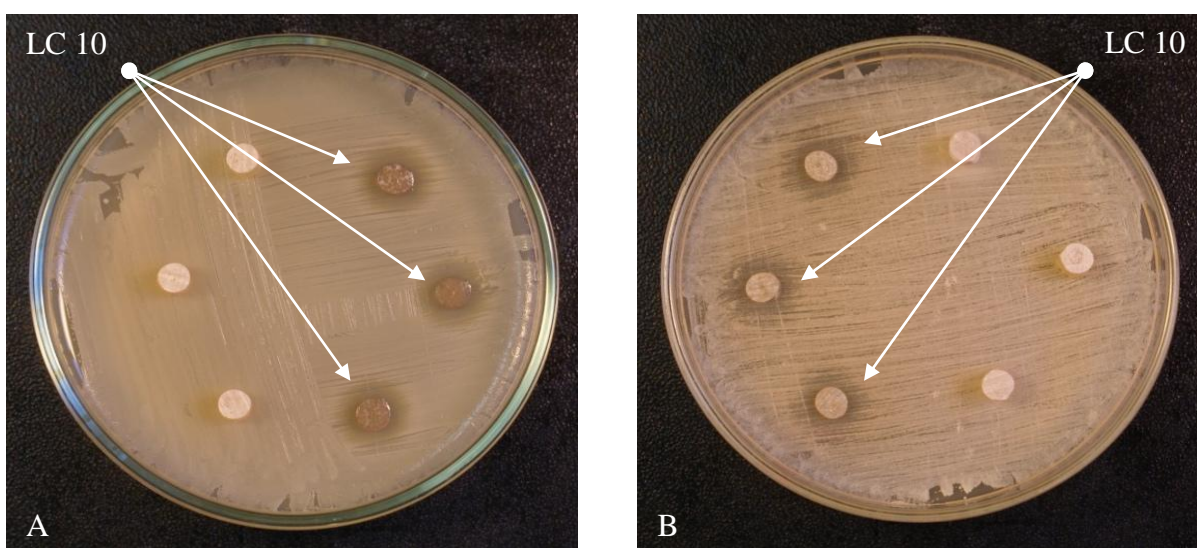
No geral, o espectro de ação dos isolados dos cupinzeiros que apresentaram atividade antimicrobiana foi bastante amplo, inibindo o crescimento tanto de bactérias quanto de leveduras, indicando o grande potencial destas bactérias como produtoras de substâncias antimicrobianas.

Segundo Currie et al. (1999), existem actinobactérias presentes no corpo das formigas da tribo Attini, pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Estas atuam como uma barreira, protegendo o formigueiro de microrganismos patógenos, e em troca, as formigas dispersariam a actinobactéria, fornecendo algum tipo de alimento e condições favoráveis para seu crescimento (BARBOSA, 2004; FAVARIN, 2005).

Este é o primeiro trabalho na literatura científica a estudar a ação antimicrobiana de actinobactérias e *Bacillus* isolados de cupinzeiros.

#### 5.4.1.1 Isolados do município de Lafaiete Coutinho

Dos 43 isolados do município de Lafaiete Coutinho/BA, 14 (32,55%) mostraram atividade antimicrobiana contra microrganismos-teste utilizados, dos quais dois (14,28%) mostraram atividade contra *Escherichia coli* CCMB 284, quatro (28,57%) contra *E. coli* CCMB 261, três (21,42%) contra *Salmonella choleraesuis* CCMB 281, quatro (28,57%) contra *Staphylococcus aureus* CCMB 285 (sendo um deles mostrado na Figura 3 A), nove (64,28%) contra *S. aureus* CCMB 262, onze (78,57%) contra *S. aureus* CCMB 263, dois (14,28%) contra *Candida albicans* CCMB 266 (sendo um deles mostrado na Figura 3 B), três (21,42%) contra *C. albicans* CCMB 286 e quatro (28,57%) contra *Candida parapsilosis* CCMB 288. Estes resultados estão mostrados na Tabela 4.



**Figura 3.** Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em ágar do isolado LC 10 contra (A) *Staphylococcus aureus* CCMB 285 e contra (B) *Candida albicans* CCMB 266. Fotos: João Ronaldo Vasconcelos Neto..

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar apresentada pelos microrganismos isolados de cupinzeiros no município de Lafaiete Coutinho – BA.

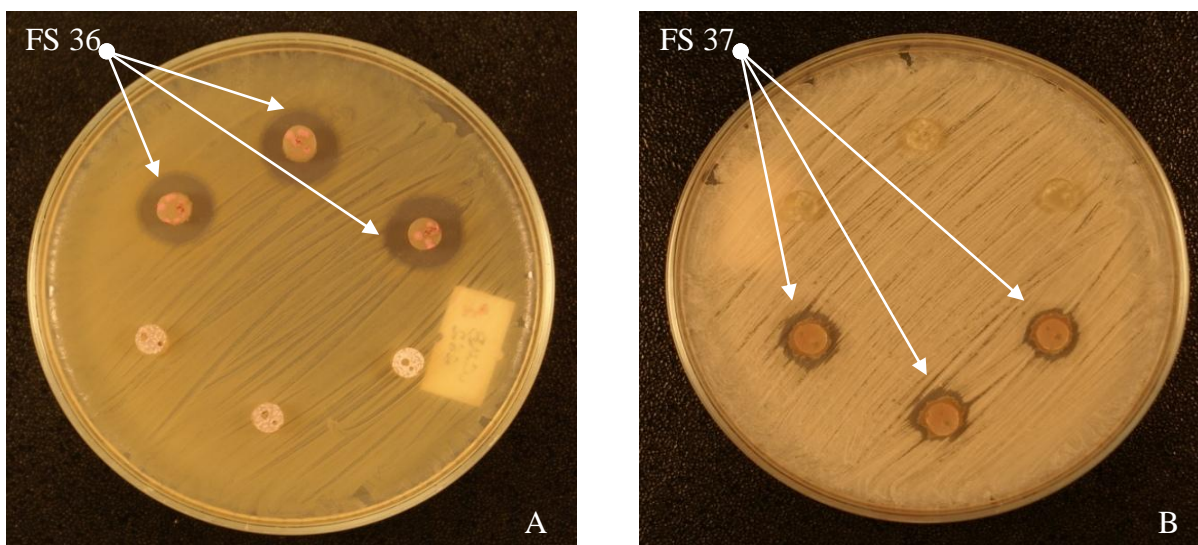
CÓDIGO DO ISOLADO	ESPÉCIES DE CUPINS	CUPINZEIRO (Nº)	MICRORGANISMOS									
			<i>E. coli</i> CCMB284	<i>E. coli</i> CCMB 261	<i>S. choleraesuis</i> CCMB 281	<i>S. aureus</i> CCMB 285	<i>S. aureus</i> CCMB 262	<i>S. aureus</i> CCMB 263	<i>C. albicans</i> CCMB 266	<i>C. albicans</i> CCMB 286	<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	
LC 7	<i>Cornitermes</i> sp.	2	-	-	-	+	+	+++	+	+	++	
LC 9	<i>Cornitermes</i> sp.	2	-	+	-	-	++	+	-	-	+	
LC 10	<i>Cornitermes</i> sp.	2	-	-	+	++	+	+++	+	++	+++	
LC 16	<i>Cornitermes</i> sp.	3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
LC 17	<i>Cornitermes</i> sp.	3	+	+	++	+	+	+	-	-	-	
LC 20	<i>Cornitermes</i> sp.	3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
LC 21	<i>Cornitermes</i> sp.	3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	
LC 22	<i>Cornitermes</i> sp.	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
LC 23	<i>Cornitermes</i> sp.	3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
LC 27	<i>Cornitermes</i> sp.	3	-	-	-	-	+++	+	-	-	-	
LC 32	<i>Nasutitermes</i> sp.1	4	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
LC 35	<i>Nasutitermes</i> sp.1	4	-	-	-	-	-	++	-	-	-	
LC 36	<i>Nasutitermes</i> sp.1	4	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	
LC 40	<i>Cornitermes</i> sp.	5	-	+	-	-	++	++	-	+	+	

Para a ação antimicrobiana dos microrganismos isolados dessa localidade foi observado que as cepas mais sensíveis foram o *S. aureus* CCMB 262 e o *S. aureus* CCMB 263 (Tabela 4), pois nove (64,28%) e 11 (78,57%) isolados apresentaram atividade antagonista para com esses microrganismos-teste, respectivamente. O isolado LC 10 apresentou um amplo espectro de ação, não sendo capaz de inibir apenas as duas cepas de *E. coli* testadas.

Houve diferença na atividade antimicrobiana entre os isolados de uma mesma localidade. Sete deles (LC 16, LC 20, LC 22, LC 27, LC 32, LC 35 e LC 36) inibiram pelo menos uma das bactérias Gram-positivas. Já LC 07 inibiu bactérias Gram-positivas e leveduras. Os isolados LC 17, LC 21 e LC 23 apresentaram antagonismos frente apenas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Enquanto que os isolados LC 09, LC 10 e LC 40 apresentaram amplo espectro de ação, inibindo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras (Tabela 4).

#### 5.4.1.2 Isolados do município de Feira de Santana

Dos 47 isolados do município de Feira de Santana/BA, 12 (25,54%) mostraram atividade antimicrobiana contra os microrganismos-teste utilizados (Tabela 5), dos quais apenas um (8,33%) mostrou atividade contra *Escherichia coli* CCMB 284, outro (8,33%) contra *E. coli* CCMB 261, oito (66,67%) contra *Salmonella choleraesuis* CCMB 281, dez (83,33%) contra *Staphylococcus aureus* CCMB 285, todos os doze (100%) contra *S. aureus* CCMB 262 (Figura 4 A), nove (75%) contra *S. aureus* CCMB 263, seis (50%) contra *Candida albicans* CCMB 266, sete (58,33%) contra *C. albicans* CCMB 286 e sete (58,33%) contra *Candida parapsilosis* CCMB 288 (Figura 4 B).



**Figura 4.** Ensaios de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em ágar (A) do isolado FS 36 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e (B) do isolado FS 37 contra *Candida parapsilosis* CCMB 288. Fotos: João Ronaldo Vasconcelos Neto.



**Tabela 5.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar apresentada pelos microrganismos isolados de cupinzeiros no município de Feira de Santana – BA.

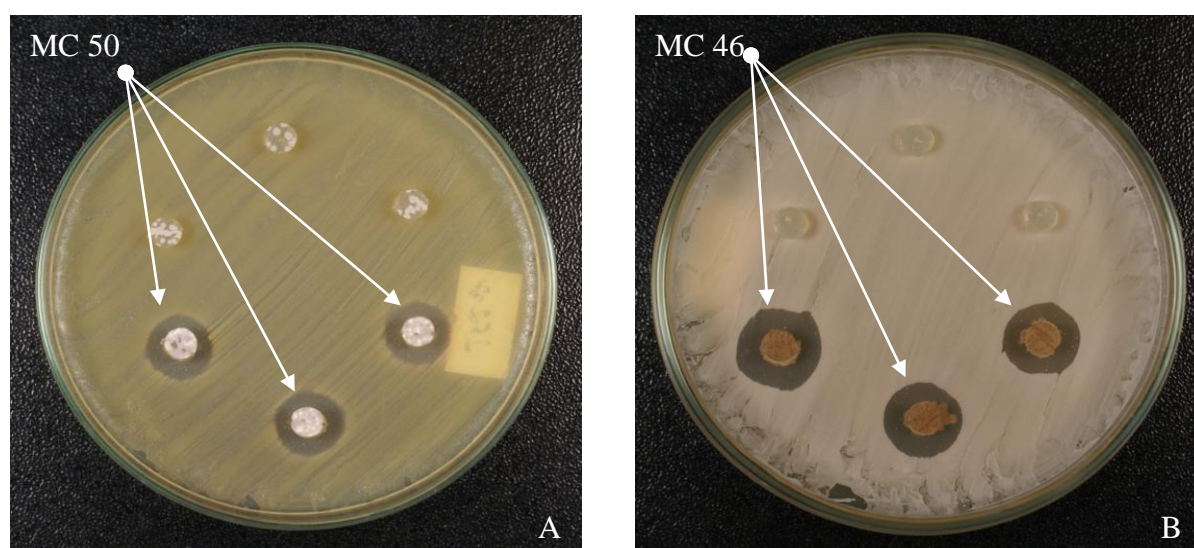
CÓDIGO DO ISOLADO	ESPÉCIE DE CUPIM	CUPINZEIRO (Nº)	MICRORGANISMOS									
			<i>E. coli</i> CCMB 284	<i>E. coli</i> CCMB 261	<i>S. choleraesuis</i> CCMB 281	<i>S. aureus</i> CCMB 285	<i>S. aureus</i> CCMB 262	<i>S. aureus</i> CCMB 263	<i>C. albicans</i> CCMB 266	<i>C. albicans</i> CCMB 286	<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	
FS 3	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	1	-	-	+	+	++	+	-	-	-	
FS 9	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
FS 21	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
FS 32	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	4	-	-	-	+++	++	-	+	+	+	
FS 36	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	+	++	++	+++	+	+	+	
FS 37	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	+	+	+++	++	+	++	+	
FS 39	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
FS 40	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	++	++	+	-	+	++	+	
FS 41	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	+	+	+++	++	++	+++	-	+	+	
FS 42	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	-	++	++	+	-	-	-	
FS 43	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	++	++	+	+	+++	+++	+++	
FS 46	<i>Nasutitermes</i> sp. 2	5	-	-	+	+	+	+	+++	+++	+++	

Os microrganismos mais sensíveis foram as cepas de *S. aureus* CCMB 262 e *S. aureus* CCMB 285, pois todos os isolados apresentaram atividade antagonista contra a cepa *S. aureus* CCMB 262 e 10 contra *S. aureus* CCMB 285. O isolado FS 41 apresentou um amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Este isolado não apresentou atividade apenas contra a cepa de *C. albicans* CCMB 266. Os microrganismos FS 09, FS 39 e FS 42 inibiram apenas cepas de *S. aureus*. Dois isolados (FS 03 e FS 21), inibiram todas as três cepas de *S. aureus* testadas e *S. choleraesuis* CCMB 281. O isolado FS 32 inibiu *S. aureus* e leveduras. Enquanto as outras (FS 36, FS 37, FS 40, FS 41, FS 43 e FS 46) inibiram todas as classes de microrganismos-teste analisados nesse estudo, mostrando seu amplo espectro de ação (Tabela 5).

### 5.3.1.3 Isolados do município de Morro do Chapéu

Dos 55 isolados do município de Morro do Chapéu/BA, doze (21,81%) mostraram atividade antimicrobiana contra os microrganismos-teste utilizados (Tabela 6), dos quais três (25%) contra *Salmonella choleraesuis* CCMB 281, sete (58,33%) contra *Staphylococcus aureus* CCMB 285, todos os doze (100%) contra *S. aureus* CCMB 262 (um deles mostrado na Figura 5 A), nove (75%) contra *S. aureus* CCMB 263, cinco (41,66%) contra *Candida albicans* CCMB 266, oito (66,66%) contra *C. albicans* CCMB 286 e quatro (33,33%) contra *Candida parapsilosis* CCMB 288 (um deles mostrado na Figura 5 B).

Os microrganismos-testes mais sensíveis foram as cepas de *S. aureus* CCMB 262 e *S. aureus* CCMB 263 (Tabela 6), pois todos os isolados apresentaram atividade antagonista contra o primeiro e nove para o segundo microrganismo.



**Figura 5.** Ensaios de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em ágar (A) do isolado MC 50 contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e (B) do isolado MC 46 contra *Candida parapsilosis* CCMB 288. Fotos: João Ronaldo Vasconcelos Neto.

**Tabela 6.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar apresentada pelos microrganismos isolados de cupinzeiros no município de Morro do Chapéu – BA.

CÓDIGO DO ISOLADO	ESPÉCIE DE CUPIM	CUPINZEIRO (Nº)	MICROORGANISMOS							
			<i>S. choleraesuis</i> CCMB 281	<i>S. aureus</i> CCMB 285	<i>S. aureus</i> CCMB 262	<i>S. aureus</i> CCMB 263	<i>C. albicans</i> CCMB 266	<i>C. albicans</i> CCMB 286	<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	
MC 1	<i>Constrictotermes</i> sp.	1	-	+	+	+	-	+	-	
MC 4	<i>Constrictotermes</i> sp.	2	-	+	+	+	-	-	-	
MC 28	<i>Constrictotermes</i> sp.	4	-	-	+	+	-	-	-	
MC 30	<i>Constrictotermes</i> sp.	4	-	-	+	-	+	+	+	
MC 36	<i>Constrictotermes</i> sp.	4	+	++	+	++	+	+	+	
MC 39	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	-	-	+	-	-	+	-	
MC 41	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	-	-	+	+	+	+	-	
MC 44	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	+	+	+	+	++	+	-	
MC 46	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	+	+	+	+	++	++	++	
MC 48	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	-	+	+	+	-	+	+	
MC 50	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	-	+	++	-	-	-	-	
MC 55	<i>Constrictotermes</i> sp.	5	-	-	+	+	-	-	-	

Os isolados MC 36 e MC 46 apresentaram um amplo espectro de ação, inibindo todos os microrganismos estudados. Os microrganismos MC 04, MC 28, MC 50 e MC 55 inibiram apenas bactérias Gram-positivas. Os isolados MC 01, MC 30, MC 39, MC 41 e MC 48 inibiram bactérias Gram-positivas e leveduras. Além de *P. aeruginosa*, desta localidade nenhum dos isolados apresentou atividade contra *E. coli* (Tabela 6).

Na Tabela 6 pode ser observado que as cepas de microrganismos que se demonstraram ser mais sensíveis foram as de *Staphylococcus aureus* (CCMB 262 e CCMB 263). Os microrganismos-teste mais resistentes foram as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* (CCMB 261), *E. coli* (CCMB 284) e *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB 268).

No geral, através da técnica de difusão em ágar, os isolados LC 10, FS 41, MC 36 e MC 46, oriundos de diferentes localidades, apresentaram amplo espectro de ação, já que produziram metabólitos que inibiram bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Por isso, assim como no exemplo das formigas Attini (CURRIE et al., 1999; BARBOSA, 2004; FAVARIN, 2005), sugerimos que as actinobactérias e os *Bacillus* presentes nos ninhos dos cupins também produzam compostos antimicrobianos para proteger as colônias.

Alguns trabalhos com a metodologia para prospecção de atividade antimicrobiana por difusão em ágar, já demonstraram essa habilidade em actinobactérias e diversas espécies de *Bacillus*. Laide et al. (2008) e Atta (2009) citam boa atividade antimicrobiana de duas linhagens do gênero *Streptomyces* isoladas de solo Egípcio frente aos microrganismos-teste selecionados. No primeiro trabalho houve atividade contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, já no segundo trabalho, houve atividade antifúngica contra *C. albicans*. Outros autores apresentaram resultados da atividade de actinobactérias isoladas de amostras de sedimento marinho na Baía de Bengal na Índia, os mesmos foram testados contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* e também apresentaram bons resultados (SUTHINDHIRAN; KANNABIRAN, 2009). No trabalho de Parungao et al. (2007), actinobactérias isoladas de dunas nas Filipinas também mostraram maior atividade contra *S. aureus* do que contra *E. coli*. Actinobactérias isoladas de diferentes localidades em Cuba foram ativas contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, demonstrando um amplo espectro de atividade antifúngica e antibacteriana (IZNAGA et al., 2004). Para atividade antimicrobiana do gênero *Bacillus*, Lisbôa (2006) e Hong Cao (2009) apresentam resultados positivos frente a duas linhagens de *E. coli* para o primeiro e *S. aureus* para os dois trabalhos. No primeiro trabalho o isolado foi obtido do solo, já no segundo, de um alimento tradicional do Japão (Natto).

Estudos anteriores usando testes de difusão em ágar demonstram que isolados de actinobactérias apresentam maior atividade contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Em um desses trabalhos, 18 de 60 isolados demonstraram antagonismo contra bactérias Gram-positivas e somente sete contra Gram-negativas (SAADOUN e GHARAIBEH, 2003). Outro estudo

com 337 isolados (GONZÁLES et al. 2005) mostrou que 27% dos isolados apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que a atividade mais frequentemente encontrada foi contra bactérias Gram-positivas (23%), depois contra *C. albicans* (10,7%) e o menor antagonismo foi contra Gram-negativas. Zitouni et al. (2005) demonstraram que todas as 86 actinobactérias por eles isolados apresentaram forte atividade contra bactérias Gram-positivas, moderada contra leveduras e fraca a moderada contra Gram-negativas. Heck (2007) mostrou que das 24 actinobactérias testadas, 10 apresentaram atividade, 7 contra Gram-positivas e 3 contra Gram-negativas e também Gram-positivas, no entanto a inibição foi de baixa intensidade. Pode-se perceber em nosso trabalho que a atividade antimicrobiana foi maior contra as bactérias Gram-positivas, isso acontece porque as bactérias Gram-negativas possuem em sua estrutura uma membrana externa que confere a este grupo uma efetiva barreira de permeabilidade, restringindo a penetração de alguns compostos. Além de alguns antibióticos penetrarem lentamente por esta membrana, e isto contribui para a resistência dessas bactérias. (TEGOS, 2002; CARVALHAL e ALTERTHUM, 2004; NOBRE, 2008).

O fato das outras 107 linhagens isoladas não apresentarem atividade antimicrobiana detectável em meio sólido, não significa que estas sejam incapazes de produzir antibióticos. Novos ensaios utilizando outros meios de cultivo para o crescimento dos isolados, novas metodologias e outros microrganismos-teste poderão ser utilizados, visando melhorar a detecção de antibiose (Matsuura, 2004).

Houve diferença na atividade dos isolados de cupinzeiros das diferentes localidades estudadas. Os isolados do município de Feira de Santana mostraram uma maior inibição (nove microrganismos inibidos, com uma alta atividade para bactérias Gram-positivas, moderada a alta para leveduras e uma baixa atividade para bactérias Gram-negativas) dos microrganismos-teste em relação aos outros isolados dos outros municípios, pelo ensaio em meio sólido. Os resultados obtidos indicam o potencial desses microrganismos isolados da terra dos cupinzeiros como produtores de substâncias antimicrobianas.

### 5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A Tabela 7 apresenta os resultados da Concentração Inibitória Mínima dos extratos aquosos dos isolados que inicialmente apresentaram atividade antimicrobiana pela técnica da difusão em disco frente aos microrganismos-teste utilizados nesse trabalho.

Na determinação da concentração inibitória mínima, observou-se que dos 11 isolados selecionados no ensaio anterior, nove apresentaram atividade antagonista, apontando a concentração mínima para tal (Tabela 7).

Para Pandey et al. (2004), a CIM não é uma constante para um determinado agente, pois é influenciado por uma série de fatores. Esses fatores incluem a natureza do microrganismo-teste utilizado, o tamanho do inóculo, bem como a composição do meio de cultura, o tempo de incubação, e aeração. Em geral, os resultados obtidos pela metodologia da CIM são mais sensíveis quando comparados com os de difusão em disco (PANDEY, 2004), o que não ocorreu no presente trabalho. Alguns microrganismos são capazes de produzir metabólitos que contribuem para o crescimento de outros, tais como as vitaminas tiamina e riboflavina, flavoproteínas, vitamina B<sub>12</sub>, várias porfirinas-like, compostos contendo ferro e coenzima A (SANTOS et al., 1976; UETANABARO, 2004). Nossos resultados também podem ter sofrido influência do meio de cultivo utilizado para o cultivo das actinobactérias e *Bacillus* spp. (Caldo CAA) que pode ter sido aproveitado pelos microrganismos-teste para seu crescimento.

Pode-se observar que três extratos de isolados (LC 07, FS 40 e FS 46) foram capazes de inibir *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB 268) (CIM de 200; 100 e 200 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Em contrapartida, os isolados FS 41 e MC 46, não inibiu nenhum dos microrganismos testados através da CIM. Os isolados FS 37, FS 43, FS 46 e MC 30 inibiram apenas leveduras, tendo sido o melhor resultado de CIM o do isolado FS 43 contra o microrganismo-teste *Candida albicans* CCMB 286, com o valor de 0,78125 mg.mL<sup>-1</sup>. Os isolados FS 43 e FS 46 também apresentaram efeito antimicrobiano sobre *C. parapsilosis* CCMB 288 (3,125 e 6,25 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

Nessa técnica o microrganismo-teste mais sensível foi *C. albicans* CCMB 286 (81,2%), enquanto que o mais resistente foi *Staphylococcus aureus* CCMB 285 (18,2%).

O isolado FS 40 inibiu 90% dos microrganismos-testes, inclusive a *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, que não foi inibida no ensaio em meio sólido por nenhum dos isolados das três localidades estudadas. Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho da molécula bioativa produzida por este isolado, pois sendo esta uma molécula grande, a difusão em meio sólido é dificultada, o que não acontece num teste realizado em meio líquido, possibilitando a ação dessa molécula contra o microrganismo-teste (Rios et al., 1988). Por isso, estes mesmo autores propuseram o uso de métodos de difusão para o estudo de compostos polares com moléculas de tamanho pequeno ou médio.

Os resultados da avaliação da concentração inibitória mínima sugerem que a composição do meio líquido utilizado (Caldo CAA) não tenha estimulado a biossíntese dos metabólitos secundários (antibióticos) ou que não houve produção de esporos para alguns isolados, já que esta é uma condição importante para produção de compostos bioativos, visto que, segundo Matsuura (2004), determinados antibióticos são produzidos somente quando o microrganismo está em fase de esporulação, a qual é mais difícil ocorrer em meio líquido.

Outra possibilidade que sugerimos é que o meio de cultivo liofilizado utilizado para o crescimento das actinobactérias e *Bacillus* spp. tenha sido aproveitado pelos microrganismos-teste, o que poderia ter contribuído para o crescimento e uma maior resistência deles.

Observou-se que a maioria dos isolados produziu compostos bioativos com atividade antifúngica, esta observação pode estar relacionada ao fato das actinobactérias e *Bacillus* spp. proporcionarem proteção aos ninhos dos cupins. Muito provavelmente os valores de CIM obtidos no presente estudo estão subestimados, devido à possível contribuição do meio de cultivo das actinobactérias sobre os microrganismos-teste.

Diversos trabalhos na literatura científica que determinaram a concentração inibitória mínima demonstram resultados parecidos com os do presente trabalho com relação a inibição de microrganismos patogênicos, como o de Sultan et al. (2002) que relatam a inibição de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, por extrato de uma actinobactéria isolada de uma amostra de solo em Bangladesh. O mesmo ocorreu num trabalho realizado com uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* isolada da Baía de Bengal na Índia, que mostrou inibição frente a *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, com valores de CIM de 10 µg/mL, 28 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente (MANIVASAGAN et al., 2009). Outro trabalho relata a inibição de *E. coli* por uma actinobactéria isolada do mar da Península Indiana (SUTHINDHIRAN e KANNABIRAN, 2009). Martins et al. (2006) verificaram uma CIM de 150 a 450 µg/mL nos extratos de *Streptomyces* sp. T8, isolado das folhas de *Symphytum officinale* contra *C. albicans*. Já Cunha (2009) evidenciou o CIM entre 25 – 50 µg/mL para *S. aureus* por uma actinobactéria do gênero *Streptomyces*, isolada de *Conyza banariensis*. Cahan et al. (2008), encontraram os valores de CIM para Cyt1Aa isolado de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* de 1,25 e 5 µg.mL<sup>-1</sup> para *E. coli* e *S. aureus* respectivamente.

**Tabela 7.** Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) dos extratos aquosos dos microrganismos isolados de cupinzeiros.

ISOLADOS	ESPÉCIES DE CUPINS	<i>E. coli</i> CCMB 261	<i>S. aureus</i> CCMB 262	<i>S. aureus</i> CCMB 263	<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	<i>S. choleraesuis</i> CCMB 281	<i>E. coli</i> CCMB 284	<i>S. aureus</i> CCMB 285	<i>C. albicans</i> CCMB 266	<i>C. albicans</i> CCMB 286	<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288
LC 07	<i>Cornitermes</i> sp.	50	-	50	200	100	100	-	200	200	-
LC 10	<i>Cornitermes</i> sp.	25	-	-	-	25	-	-	50	200	-
LC 17	<i>Cornitermes</i> sp.	25	12,5	12,5	-	-	-	25	100	200	-
FS 37	<i>Nasutitermes</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	200	200	-
FS 40	<i>Nasutitermes</i> sp.2	200	200	12,5	100	100	200	-	50	200	200
FS 41	<i>Nasutitermes</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FS 43*	<i>Nasutitermes</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,78125	3,125
FS 46	<i>Nasutitermes</i> sp.2	-	-	-	200	-	-	-	-	6,25	6,25
MC 30	<i>Constrictotermes</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	100	200	-
MC 36*	<i>Constrictotermes</i> sp.	-	100	100	-	-	-	-	50	100	100
MC 46	<i>Constrictotermes</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	N/A	2,5	2,5	0,078125	0,3125	2,5	2,5	0,3125	N/A	N/A	N/A
Nistatina	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0,15625	0,15625	0,15625

(\* ) Concentração inicial de  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$

( - ) Não houve inibição do microrganismo teste

(N/A) Não se aplica



## 5.3 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

### 5.3.1 Taxonomia clássica

Para caracterização dos isolados determinou-se a cor da colônia, a produção de pigmentos em meio CAA e a caracterização micromorfológica dos 11 isolados que apresentaram os melhores resultados na atividade antimicrobiana na metodologia de difusão em ágar. Estes resultados são apresentados na Tabela 8.

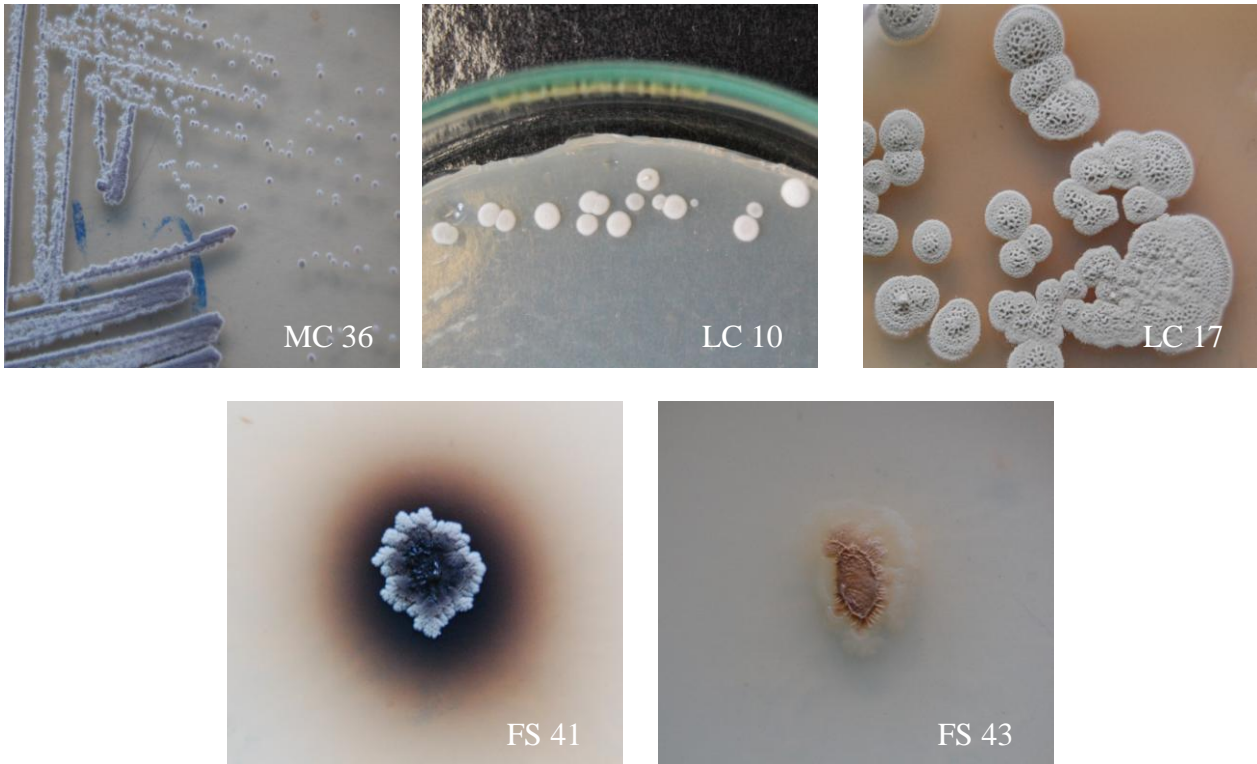
Apenas duas linhagens (FS 41 e MC 46) apresentaram produção de pigmentos melanóides no meio CAA.

A caracterização da micromorfologia, acompanhando o cultivo durante 14 dias, mostrou diversos tipos de estruturas microscópicas (Figura 7). Das linhagens observadas, cinco apresentaram micélio aéreo ramificado, o micélio aéreo apresentou esporóforos espiralados (LC 07), enlaçados (MC 36), retos (MC 30) e flexíveis (LC 17), o que as caracteriza como actinobactérias. Já os isolados FS 37, FS 40, FS 41, FS 43, FS 46 e MC 46 não apresentaram tais características. Para a identificação dos isolados foi realizado o sequenciamento da região rDNA 16S.

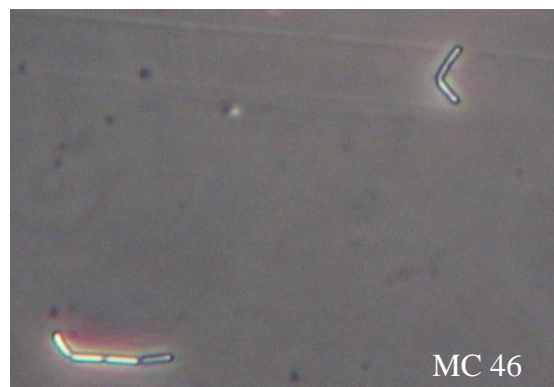
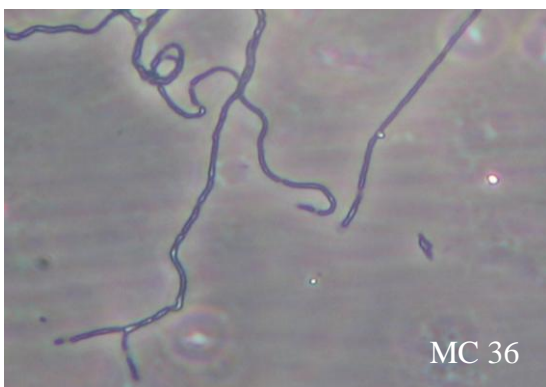
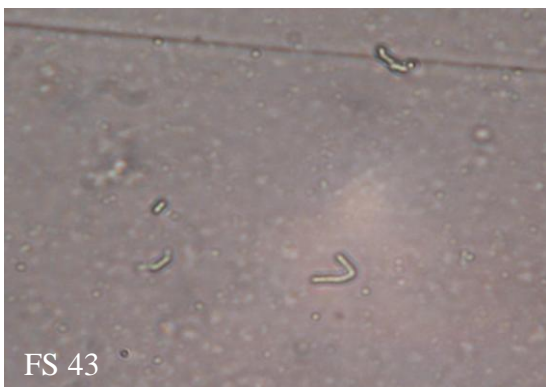
**Tabela 8.** Características macro e micromorfológicas dos microrganismos isolados dos cupinzeiros

Isolado	Espécies dos Cupins	Coloração da Colônia	Produção de Pigmentos Melanóides	Estruturas Microscópicas*
LC 07	<i>Cornitermes</i> sp.	Cinza	Ausente	S
LC 10	<i>Cornitermes</i> sp.	Branco	Ausente	RA
LC 17	<i>Cornitermes</i> sp.	Verde	Ausente	F
FS 37	<i>Nasutitermes</i> sp.	Bege	Ausente	B
FS 40	<i>Nasutitermes</i> sp.	Bege	Ausente	B
FS 41	<i>Nasutitermes</i> sp.	Marrom	Presente	B
FS 43	<i>Nasutitermes</i> sp.	Bege	Ausente	B
FS 46	<i>Nasutitermes</i> sp.	Bege	Ausente	B
MC 30	<i>Constrictotermes</i> sp.	Branco acinzentado	Ausente	R
MC 36	<i>Constrictotermes</i> sp.	Cinza	Ausente	RA
MC 46	<i>Constrictotermes</i> sp.	Marrom escuro	Presente	B

(\*) F (*Flexibilis*) = flexível; R (*Rectus*) = reto; RA (*Retinaculum-Apertum*) = enlaçado; S (*Spira*) = espiral; B = Bacilo.



**Figura 6.** Fotos mostrando características morfológicas macroscópicas das colônias dos isolados MC 36, LC 10, LC 17, FS 41, FS 43, incubados em meio CAA a 30° C por 11 dias. Fotos: Joca Moreira.



**Figura 7.** Fotos em microscópio óptico (400 x) dos isolados LC 07, LC 10, LC 17, FS 41, FS 43, MC 30, MC 36, MC 48 crescidos em microcultivo. Fotos: Getúlio Bomfim.

### 5.3.2 Sequenciamento do rDNA 16S

Foram selecionados 11 isolados (melhores resultados para a metodologia em meio sólido), para o sequenciamento do rDNA 16S. Foram obtidas sequências de aproximadamente 1000 pb. A similaridade destas sequências com as depositadas em bancos de dados são apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Similaridade das sequências do rDNA 16S obtidas para os isolados selecionados com sequências de organismos relacionados presentes na base de dados GenBank.

Isolado	Espécies dos Cupins	Sequências de rDNA 16S relacionadas	Similaridade (%)
LC 07	<i>Cornitermes</i> sp.	<i>Streptomyces chattanoogensis</i> linhagem L10	97%
		<i>Streptomyces albulus</i> linhagem KT372-940	97%
		<i>Streptomyces</i> sp. 32(2)	97%
		<i>Streptomyces</i> sp. 111	97%
		<i>Streptomyces argenteolus</i> subsp. <i>toyonakensis</i>	97%
LC 10	<i>Cornitermes</i> sp.	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> linhagem NRRL B-1511T	98%
		<i>Streptomyces</i> sp. linhagem Chy2-3	98%
		<i>Streptomyces akiyoshiensis</i> linhagem xsd08166	98%
		<i>Streptomyces</i> sp. C15	98%
		<i>Streptomyces ambofaciens</i> linhagem HBUM82592	98%
LC 17	<i>Cornitermes</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. M4032	84%
		<i>Streptomyces</i> sp. M4042	84%
		<i>Streptomyces</i> sp. M4033	84%
		<i>Streptomyces</i> sp. 1043	84%
		<i>Streptomyces</i> sp. 1A01646	84%
FS 37	<i>Nasutitermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. Tianjin P2	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem 1369	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3130	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3175	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem BS11	99%
FS 40	<i>Nasutitermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. 5LF 16P	100%
FS 41	<i>Nasutitermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. Tianjin P2	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem 1369	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3130	99%
			99%

**Tabela 9.** Continuação.

Isolado	Espécies dos Cupins	Sequências de rDNA 16S relacionadas	Similaridade (%)
FS 43	<i>Nasutitermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. Tianjin P2	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem 1369	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3130	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3175	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem BS11	99%
FS 46	<i>Nasutitermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. Tianjin P2	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem 1369	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3130	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3175	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem BS11	99%
MC 30	<i>Constrictotermes</i> sp.	<i>Streptomyces chattanoogensis</i> linhagem L10	99%
		<i>Streptomyces albulus</i> linhagem KT372- 940	99%
		<i>Streptomyces natalensis</i>	99%
		<i>Streptomyces argenteolus</i> subsp. <i>toyonakensis</i>	99%
		<i>Streptomyces</i> sp. 32(2)	99%
MC 36	<i>Constrictotermes</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. 213101	99%
		<i>Streptomyces floridae</i> strain NRRL 2423	99%
		<i>Streptomyces</i> sp. L102	99%
		<i>Streptomyces microflavus</i> strain 173397	99%
		<i>Streptomyces</i> sp. AR17	99%
MC 46	<i>Constrictotermes</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. Tianjin P2	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem 1369	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3130	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem SB 3175	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> linhagem BS11	99%

## 6. CONCLUSÕES

- O protocolo de isolamento seletivo utilizado nesse trabalho foi bem sucedido, pois permitiu o isolamento de 145 isolados nas três localidades.
- Os ninhos de cupins das três localidades amostradas possuem actinobactérias e *Bacillus* com potencial antimicrobiano.
- 38 isolados demonstraram atividade antimicrobiana. Estes inibiram tanto leveduras, como bactérias.
- Os resultados dos testes de antagonismo foram melhores na difusão em meio sólido do que pela CIM, provavelmente devido à utilização de meio de cultivo no liofilizado dos isolados.
- Os 11 isolados que foram sequenciados, foram classificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces* e *Bacillus*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHNEIDER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169: 1995.
- ANTONY-BABU, S.; GOODFELLOW, M. Biosystematics of alkaliphilic streptomycetes isolated from seven locations across a beach and dune sand system. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:581-591: 2008.
- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S. de, AZEVEDO, J. L. (Ed). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. p. 352-367. 1998.
- ASAKA, O; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 405 – 415, 1996.
- ASH, C. et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 202-206, 1991.
- ATTA, H. M. An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514. **World Applied Sciences Journal** 6 (11): 1495-1505: 2009.
- BAHIA, Superintendência de estudos Econômicos e Sociais da Bahia. **SEI**. World Web electronic publication. Disponível em [www.sei.ba.gov.br](http://www.sei.ba.gov.br). Acesso em 12/11/20007.
- BARBOSA, V. S. **Efeito da fragmentação florestal na taxa de parasitismo de fungos associados ao jardim da formiga cortadeira *Atta laevigata***. Dissertação (Mestre em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- BERLIN, B. On the making of a comparative ethnobiology. In: **Ethnobiological Classification: principles of categorization of plants and animals in traditional societies**. Princenton, Princenton University, 1992.



BICALHO, B. **Prospecção de antibióticos e biocatalisadores (haloperoxidases e Baeyer-Villiger monooxigenases) em microrganismos.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2003.

BIGNELL, D. E. et al. Association of Actinomycete-Like Bacteria with Soil-Feeding Termites (Termitidae, Termitinae). **Applied and Environmental Microbiology.** Vol. 37, no. 2. p. 339-342: 1979.

BIGNELL, D. E.; EGGLETON, P. Termites in ecosystems. *In:* ABE, T.; HIGASHI, M. & BIGNELL, D. E. eds. **Termites: Evolution, sociality, symbiosis, ecology.** Dordrecht, Kluwer Academic Publications. p.363-387: 2000.

BOCHOW, H. Mode os action and practical use of the *Bacillus subtilis* as complex acting bioproduct. *In:* MANKA, M. (Ed.). **Enviromental biotic factors in integrated plant disease control.** Poznan: The Polish Phytopathological Society, 97 – 104. 1995.

BRANCH, L. C.; SILVA, M. F. Folk Medicine of Alter do Chão, Pará, Brazil. **Acta Amazonica** 13 (5-6): 737-797. 1983.

BRASIL, Ministério das Minas e Energia. Secretaria Geral. **Projeto RADAMBRASIL.** Folha SC. 22. Bahia: Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro. 524 p. 1981.

BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. **Ethnopharmacology, objectives, principles and perspectives.** *In:* **Natural products as medicinal agents.** Stuttgart: Hippokrates, 1982.

CAHAN, R. et al. Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Microbiology**, 154, 3529 – 3536, 2008.

CANCELLO, E. M.; SCHLEMMERMEYER, T. Isoptera, p. 82–91. *In:* C. R. F. Brandão & E. M. Canello (orgs.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX. Invertebrados Terrestres.** São Paulo, FAPESP, Vol. 5, 279 p. 1999.

CARRERA, M. Terapéutica entomológica. **Revista Brasileira de Entomologia**, 37 (1): 193-198. 1993.

CARVALHAL, M.L; ALTERTHUMF. Morfologia e estrutura da célula bacteriana In: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 7-19,: 2004.

CHATER, K. F. Streptomyces inside-out: a new perspective on the bactéria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of th Royal Society B**. v 361, p 761-798: 2006.

CHUN, J. Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. PhD (Thesis) Departmente of Microbiology, The Medical School, Newcastle, England. 1995.

CLAUS, D.; FRITZE, D. Taxonomy of *Bacillus*. In : *Bacillus*, Colin R. HARWOOD Editor, Plenum Publishing Corporation, 1989.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada - Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta, Isoptera) que ocorrem no Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia** 40(25):387-448: 1999.

CONSTANTINO, R. 2007. **On-Line Termites Database**. (Disponível em: <http://www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.html>). Acesso em: 4. jan. 2007.

COSTA-NETO, E. M. **Conhecimento e usos tradicionais de recursos faunísticos por uma comunidade Afro-Brasileira. Resultados preliminares.** *Interciencia*, **25**(9):423-431: 2000.

COSTA-NETO, E. M. **Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources.** *An Acad Bras Cienc*, **77**(1):33-43: 2005.

COSTA NETO, E. M.; PACHECO, J. M. Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Teresina, Bahia, Brasil. **Biotemas**, 18(1): 113-133: 2005.

COSTA NETO, E.M. et al. Los Insectos Medicinales de Brasil: Primeros Resultados. **Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa**. n. 1 38: 395-414: 2006.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungusgrowing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999a.

EGGLETON, P. Global patterns of termite diversity, p. 25–51. *In*: T. Abe; D. E. Bignell & M. Higashi (eds.). **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 466p. 2000.

ELARDO, S. M. P. **Novel anti-infective secondary metabolites and biosynthetic gene clusters from actinomycetes associated with marine sponges.** Dissertation towards a Doctoral Degree – Graduate School of Life Sciences Julius-Maximilians – University Würzburg. Würzburg, 2008.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia.** Ciência e Cultura. v55, n3, São Paulo, 2003.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematic of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**. V 48, p 257-289: 1994.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185: 1998.

FAVARIN, E. C. **Streptomyces associados a formigas da Tribo Attini e seus efeitos sobre os fungos *Escovopsis weberi* e outros microrganismos.** Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.

FLORENCIO, D. F.; DIEHL, E. Termitofauna (Insecta, Isoptera) em Remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual em São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. entomol.**, vol.50, no.4, p.505-511: 2006.

FONTES, L. R.. *Atlantitermes*, novo gênero de cupim, com duas novas espécies do Brasil (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **Revista Brasileira de Entomologia** 23(4):219-227: 1979.

FONTES, L. R.; ARAUJO, R. L. **Os cupins.** Piracicaba: Fundação Escola de Agricultura Luiz Queiroz FEALQ, 460 p. 1999.

FORSYTH, G. et al. Revue taxonomique du genre *Bacillus*. **Bull. Soc. Fr. Microbiol.**, v. 13, p. 114-129, 1998.

GARCIA, C. E. **Isolamento e identificação de actinobactérias em solos de terra preta antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e sequenciamento do gene 16S rRNA.** Tese de Doutorado. Unicamp, 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2 ed. New York: Springer-Verlag, 2003.

GONZÁLES, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiol Ecol** 54: 401–415: 2005.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216: 1983.

GOODFELLOW, M.. The Actinomycetes I. Supragenetic Classification of actinomycetes. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E. and HOLT, J. G. Eds.), 4: 2333-2339: 1989.

GRASSÉ, P.P. 1986. **Termitologia**. Masson, Paris, Tomo 3.

HALL, T. **BioEdit** v5.0.9, Copyright © 1997-2001, North Carolina State University. 2001.

HALLMAN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology** 102:155-162. 1996.

HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S**. (Dissertação: Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica**, v. 63, p. 2-10: 1997

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, 16: 218-224: 1971.

IZNAGA, Y. **Antifungal Activity of Actinomycetes from Cuban Soils**. *Phytother. Res.* **18**, 494–496: 2004.

JIANG, S. et al.. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. **Antonie van Leeuwenhoek**. **92**:405–416: 2007.

KEEL, C. et al. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: Role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. **Symbiosis** 9, 327-341. 1990.

KHAMNA, S. et al. Antifungal activity of Streptomyces spp. Isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. **International Journal of Integrative Biology**. Vol. 6, n. 3, p. 146-147: 2004.

KILLHAM, K. The soil biota. *In: Soil ecology*. Cambridge University Press. 1994.

KÖNING, H. *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, 102, 620 – 627, 2006.

KREBS, B. et al. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. **Journal of Plant Disease and Protection**, 105, 18 – 87, 1998.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons, pp. 115-175: 1991.

LAIDI, R. F. et al. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 2235-2241: 2008.

LAUER, A. et al. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. **The ISME Journal** 2: 145-157: 2008.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LAPAGE, M. Soil function in changing world: the role of invertebrate ecosystems engineers. **European Journal Soil Biology** 33(4):159-193: 1997.

LEE, K. E.; WOOD, T. G. **Termites and soils**. London, Academic. 251p. 1971.

LEIVA, P. S. **Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. Rev Méd Chile**132: 151-159: 2004.

LENKO, K.; PAPAVERO, N. **Insetos no folclore**. 2. Ed. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 1996.

LIMA, J.T.; COSTA-LEONARDO, A.M. 2007. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota neotropical**, vol.7, n. 2, p. 243-250: 2007.

LIMA-RIBEIRO, M. de S. *et al.* Associação de *Constrictotermes cyphergaster* Silvestri (Isoptera: Termitidae) com espécies arbóreas do Cerrado brasileiro. **Neotrop. Entomol.**, vol.35, no.1, p.49-55: 2006.

LISBÔA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo**. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). UFRS, Porto Alegre, 2006.

LOEFFLER, W. *et al.* Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparason with activities of other *Bacillus* antibióticas. *Journal of Phytopathology*, 115, 204 – 213, 1986.

MANIVASAGAN, P.; *et al.* **Antimicrobial and Cytotoxic Activities of an Actinobacteria (*Streptomyces* Sp. PM-32) Isolated from an Offshore Sediments of the Bay of Bengal in Tamilnadu**. *Advances in Biological Research* 3 (5-6): 231-236, 2009.

MARTINS, L. B.; BATISTA, J. H.; LOPES, M. A. Avaliação do potencial de uso do extrato bruto da fermentação por *Streptomyces* sp. T8. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** V. 8, n. 2, p. 36-42, 2006.

MATSUMOTO, T. The role of termites in an equatorial rain forest ecosystem of west Malaysia: population density, biomass, carbon, nitrogen and calorific content and respiration rate. **Oecologia** 22:153-178: 1976.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.)** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2004.

McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: GRIGOROVA, R.; NORRIS, J. R. **Methods in Microbiology: Techniques in microbial ecology**. v. 22. London: Academic, 1990.

MELO, F. M. P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelos endófitos da mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. Dissertação (Mestrado). ESALQ – USP, Piracicaba, SP. 2005.

MELO, F. M. P. *et al.* Diversidade de Actinobactérias da Rizosfera de Milho (*Zea mays* L.) e Potencial de Controle Biológico de *Fusarium moniliforme* e *Pythium aphanidermatum*. In: **Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente**. 25-28, 2006.

MURRAY, P. P. et al. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NAKANO, M. M., ZUBER, P. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, 10, 223 -240, 1990.

NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. O processo de avaliação de risco do uso de agentes microbianos de controle: testes ecotoxicológicos sobre organismos não visados. **Arquivos do Instituto Biológico** 59:63-68. 1998.

NOBRE, I. K. C. **Atividade antimicrobiana de extratos de plantas pertencentes ao gênero *Hyptis* Jacq. Coletadas no semi-árido baiano.** (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana. 2008.

NOIROT, C. The nests of termites, p.73-125. In K. Krishna & F.R. Weesner (eds.), **Biology of termites**. V. II. New York, Academic press, 643p. 1970.

NOMURA, H. **Entomologia pitoresca I – Os insetos nas crenças, superstições e medicina popular. Análise bibliográfica.** *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 6 (2): 145-158. 2006.



OCHI, K. From microbial differentiation to ribosome engineering. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. v 71, p 1383-1386: 2007.

OKAMI Y, HOTTA K. Search and discovery of new antibiotic *In*: Goodfellow ST, Williams MM (eds) **Actinomycetes in Biotechnology**, Academic Press, London, p. 37-67, 1988.

OKORO, et al. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek** **95**: 121-133: 2009.

PADILHA, G. Biologia molecular de Streptomyces e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**, Jaguariúma: EMBRAPACNPMA, 1998. cap. 13, p. 327-350.

PANDEY, B.; GHIMIRE, P.; AGARWAL, V.P. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. **J. Biol. Sci.**, 23: 44-53: 2004.

PARUNGAO, M. M.; MACEDA, E. B. G.; VILLANO, M. A. F. Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Philippines. **Journal of Research in Science, Computing, and Engineering** **4**:3, pp. 29-38: 2007.

PASTI, M. B. et al. Lignin-Solubilizing Ability of Actinomycetes Isolated from Termite (Termitidae) Gut. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 56, no. 7. p. 2213-2218. 1990.

PAUL, S., BEZBARUAH, R. L., ROY, M. K. Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters Appl. Microbiol.**, v.24, p.169-171, 1997.

PEMBERTON, R. W. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 65: 207-216. 1999.

PITCHER, D. G., SAUNDERS, N. A. OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, 8: 151-156. 1989.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends Genet** **11**, 217-218. 1995.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 167-177, 2000.

RIOS, J.L. RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J. of Ethnopharmacol.** v. 23, p.127-149, 1988.

RIVA, O.N. et al. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1361-1371, 2001.

SAADOUN I, GHARAIBEH R. The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **J. Arid Environ.** 53: 365 – 371: 2003.

SANTOS, P. S.; et al. Vitamin B<sub>12</sub> and antibiotic activities of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. **Phillip Journal of Science**, 103: 208-220, 1976.

SCHMITT-WAGNER, D., M. W. FRIEDRICH, B. WAGNER, AND A. BRUNE. 2003. Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). **Appl. Environ. Microbiol.** **69**:6007-6017: 2003.

SHIRLING, E. B., GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 16(3): 313-340, 1966.

SILO-SUH, L. A. et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* VW85. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 2023 – 2030, 1994.

SILVA, R. E. A. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Fungos e Actinobactérias Endofíticos Isolados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (rabo-de-raposa). **Rev. Biol. Neotrop.** 3(2): 181-182. 2006

SOUZA, J. V. B.; MORIYA, R. Y.; ÉRICA S. SOUZA, E. S. Bioprospecção De Substâncias Anti-Fúngicas Produzidas Por Actinomyces Isolados Da Região Amazônica. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol. VI (3), 94 - 102, 2009

STABB, E. V. Producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 60 4404 – 4412, 1994.

STACKEBRANDT, E. et al. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47: 479-491. 1997.

SULTAN, M. Z. *In vitro* Antibacterial Activity of an Active Metabolite Isolated from *Streptomyces* Species. **Biotechnology**, Volume 1 Number 2-4: 100-106, 2002

SUTHINDHIRAN, K.; KANNABIRAN, K. Cytotoxic and Antimicrobial Potential of Actinomycete Species *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 Isolated from the Bay of Bengal Coast of India. **American Journal of Infectious Diseases** 5 (2): 90-98, 2009

TAKAHASHI Y, MATSUMOTO A, SEINO A, IWAI Y, OMURA S. Rare actinomycetes isolated from desert soils. **Actinomycetologica**. 10:91–97: 1996.

TEGOS, G.; STERMITZ, F.R.; LOMOVSKAYA, O. et AL., Multidrug pump inhibitor uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p.3133-3141, 2002.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S. de; VIEIRA, R.F.; COSTA, F.E. de C.; HAKAKAVA, R. Microorganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.43-49, 2007.

THORNE, B.L. **Termite terminology**. *Sociobiology* 28:253-263: 1996.

TORSVIK, V; GOKSØ YR, J. & DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-787, 1990.

UETANABARO, A. P. T. **Taxonomia e triagem da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch.) K. Shun.** 2004. 130 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VALGAS, C. **Avaliação de métodos de triage para determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais.** Dissertação (Mestre em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In DEY, P. M. and HARBONE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**, p. 47-69, London: Academic Press, 1991

VASCONCELLOS, R. L. F. **Actinobactérias da risosfera de *Araucaria angustifolia* com potencial biotecnológico.** (Dissertação – Mestre em Agronomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

VASCONCELLOS, A. *et al.* Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. **Itheringia, Sér. Zool.**, vol.95, no.2, p.127-131, 2005

VINING, L. C. Secondary metabolism. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes.** V 4, p19-38: 1986.

WANG, Y. et al. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforest of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 23: 178 - 187. 1999.

WAKSMAN, S. A., WOODDRUFF, H. B. Actinomyces antibioticus a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Journal of Bacteriology**, 42: 231-249, 1941.

WENZEL M, et al. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **J Appl Microbiol.**;92(1):32-40. 2002.

WILLIAMS, S.T.; VICKENS, J.C. Detection of actinomycetes in the natural environment-problems and perspectives. In: Okani, Y., Bepper, T. & Ogawara, H. (Eds.) **Biology of the Actinomycetes** 88. Tokyo, pp.265-270. 1988.

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

YARBROUGH, G. G. et al. Screening of microbial metabolites for new drugs. **J. Antib.**, 46: 535 – 544: 1993.

ZHANG H, ZHANG W, JIN Y, JIN M, YU X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. **Antonie van Leeuwenhoek.**93:241–248: 2008.

ZIPEL, M.; NEIGENFIND, M. Preservation of streptomycetes. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 34, p. 7-14, 1988.

ZITOUNI, A., H. BOUDJELLA, L. LAMARI, B. BADJI, F. MATHIEU, A. LEBRIHI, AND N. SABAOU. *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Res. Microbiol.** 156:984-993: 2005.

