

PPG - BIONORTE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA REDE
BIONORTE – PPG BIONORTE

MAYRA F. NETTO PARRO TEIXEIRA

ATIVIDADE XILANÁSICA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO
TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS: POTENCIAL PARA
OBTENÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE
FARELO DE TRIGO

MAYRA F. NETTO PARRO TEIXEIRA

2023

PALMAS-TO 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



ATIVIDADE XILANÁSICA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO
DE INSETOS: POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A
PARTIR DE FARELO DE TRIGO

MAYRA F. NETTO PARRO TEIXEIRA

Palmas - TO

2023

MAYRA F. NETTO PARRO TEIXEIRA

**ATIVIDADE XILANÁSICA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO
DE INSETOS: POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A
PARTIR DE FARELO DE TRIGO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes
Coorientador: Prof. Dr. Alex Fernando
de Almeida

Palmas - TO

Junho/2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Mayra F. Netto Parro

ATIVIDADE XILANÁSICA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO
TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS: POTENCIAL PARA OBTENÇÃO
DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE FARELO DE TRIGO/
Mayra F. Netto Parro Teixeira – Palmas: TO, 2023.

103 f.: il.

Orientadora: Paula Benevides de Moraes
Co-orientador: Alex Fernando de Almeida.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do
Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia – Rede BIONORTE, 2023.

MAYRA F. NETTO PARRO TEIXEIRA

**ATIVIDADE XILANÁSICA DE FUNGOS ASSOCIADOS AO TRATO
DIGESTÓRIO DE INSETOS: POTENCIAL PARA OBTENÇÃO DE
XILOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE FARELO DE TRIGO**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do
Tocantins, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 22/06/2023

Banca examinadora

Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes (Orientadora,
Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado digitalmente
PAULA BENEVIDES DE MORAIS
Data: 14/07/2023 09:39:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Solange Cristina Carreiro
Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado digitalmente
SOLANGE CRISTINA CARREIRO
Data: 11/07/2023 15:56:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda
Universidade Federal do Tocantins



Documento assinado digitalmente
EMERSON ADRIANO GUARDA
Data: 13/07/2023 14:45:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Patricia Melchionna Albuquerque
Universidade do Estado do Amazonas



Documento assinado digitalmente
PATRICIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE
Data: 13/07/2023 14:57:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Taídes Tavares dos Santos
Universidade Federal do Oeste da Bahia



Documento assinado digitalmente
TAIDES TAVARES DOS SANTOS
Data: 13/07/2023 15:22:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Rúllio, por tanto carinho,
paciência e por trazer paz ao longo desses anos. Ao
meu filho Bento, meu bem mais precioso. Aos
meus pais, irmãos e amigos pelo incentivo e apoio
constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por toda força, perseverança e luz para continuar nessa jornada.

Ao meu esposo Rúllio que teve toda paciência e cuidado ao longo desses anos, que com muito carinho e amor para os dias de correria conseguiu me trazer paz e calma. E ao meu filho Bento, que desde o ventre e os seus primeiros meses, me deu força para concluir essa etapa importante em minha vida.

Aos meus pais e irmãos, por todo incentivo. A minha irmã Camila por todo conselho e escuta. À Cíntia Ribeiro de Souza, parceira e amiga, que esteve comigo em toda essa jornada. Caminhamos juntas, sorrimos, choramos, surtamos, mas não desistimos dessa conquista.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Paula Benevides de Moraes por todos ensinamentos e paciência na orientação, pelo apoio e convivência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida por seus ensinamentos, paciência e confiança em meu trabalho.

Aos colegas Dr. Taídes Tavares, Dra. Jéssica Barros e Dra. Eskálath Morganna pela disponibilidade para ajudar e ensinar técnicas e protocolos em laboratório.

As amigas Cristiane Coelho, Márcia Regina Marson e equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LAMBIO. Por toda ajuda, disponibilidade e parceria ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Thiago Lucas de Abreu Lima pelos ensinamentos e pela prática de docência, onde pude vivenciar a rotina de sala de aula.

Ao Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda e a equipe Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e Biocombustíveis - LAPEQ, por ceder seu espaço e equipamentos para análises e em especial à Me. Larissa Gualberto por toda ajuda nos experimentos realizados.

À prof^a Dr^a Liliana Pena Naval por ceder, sempre que necessário, equipamentos do Laboratório de Saneamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto Edital Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia nº 79/2013.

À Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte (PPG-Bionorte) pela oportunidade de pós graduação.

Muito obrigada!

**“Paciência e perseverança tem o efeito
mágico de fazer as dificuldades
desaparecerem e os obstáculos sumirem.”**

John Quincy Adams

TEIXEIRA, Mayra F. N. P. **Atividade xilanásica de fungos associados ao trato digestório de insetos: potencial para obtenção de xilooligossacarídeos a partir de farelo de trigo.** 103f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2023.

RESUMO

Insetos e fungos são grupos muito diversos e coexistem em vários habitats terrestres e aquáticos e interações potenciais podem ocorrer entre espécies desses dois grupos, podendo ser benéficas para ambos os parceiros. O estudo do trato digestório (TD) de insetos como um habitat para microrganismos fúngicos é uma oportunidade para obtenção de linhagens fúngicas com potencial biotecnológico, além de ser importante para a compreensão das relações simbióticas entre esses organismos. Assim, o objetivo desse trabalho foi conhecer a diversidade fúngica do TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) e o potencial biotecnológico para produção de xilanases e obtenção de xilooligossacarídeos (XOS). As larvas foram coletadas em riachos de baixa ordem do Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil. E o TD foi analisado para obtenção de amostras fúngicas, e posteriormente identificação. Na primeira fase, os 49 isolados fúngicos foram testados quanto a produção de xilanase e CMCase, em placas. Na segunda fase, 33 linhagens fúngicas foram testadas em cultivo submerso, utilizando farelo de trigo como substrato lignocelulósico, para a produção simultânea de xilanase e XOS. Posteriormente, foi realizada a imobilização da enzima xilanase. Como resultado, o gênero *Penicillium* foi o mais frequente no TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae). No teste em placas, 78% das linhagens foram produtoras de CMCase e 62% de xilanase nas amostras de Cerrado. Já em Floresta Amazônica, esses resultados foram 35% para CMCase e 71% para xilanase. No teste em cultivo submersos, os isolados *Penicillium rubens* MN737746.1, *Talaromyces palmae* MT521727.1 e *Penicillium paxilli* MN737731.1 apresentaram maior produção de xilanase 5,31 U/mL, 3,12 U/mL e 2,45 U/mL, respectivamente. E a linhagem *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 destacou-se na produção de XOS (16,70 mg/mL). A imobilização da enzima com resina e funcionalizada com Glutaraldeído apresentou 88% de rendimento. Os resultados apontam uma elevada diversidade de espécies fúngicas associadas ao TD de larvas de *Triplectides* tanto em riachos de Floresta Amazônica quanto em Cerrado. Além disso, observou-se que a maioria dos isolados fúngicos apresentam habilidade para produção de enzimas xilanolíticas.

Palavras-chave: *Triplectides*; diversidade fúngica; xilanase; pré-bióticos.

TEIXEIRA, Mayra F. N. P. **Atividade xilanásica de fungos associados ao trato digestório de insetos: potencial para obtenção de xilooligosacarídeos a partir de farelo de trigo.** 2023. 103f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2023.

ABSTRACT

Insects and fungi are very diverse groups and coexist in various terrestrial and aquatic habitats and potential interactions can occur between species of these two groups, which can be beneficial to both partners. The study of the digestive tract (DT) of insects as a habitat for fungal microorganisms is an opportunity to obtain fungal strains with biotechnological potential, in addition to being important for understanding the symbiotic relationships between these organisms. Thus, the objective of this work is to know the fungal diversity of the DT of *Triplectides* larvae (Trichoptera: Leptoceridae) and the biotechnological potential for the production of xylanases and obtaining xylooligosaccharides (XOS). Larvae were collected from low-order streams in the Cerrado and Amazon Forest, Brazil. The DT was analyzed to obtain fungal samples and later identification. In the first phase, the 49 fungal isolates were tested for xylanase and CMCase production, in plates. In the second phase, 33 fungal strains were tested in submerged cultivation, using wheat bran as a lignocellulosic substrate, for the simultaneous production of xylanase and XOS. Subsequently, immobilization of the xylanase enzyme was performed. As a result, the genus *Penicillium* was the most frequent in the DT of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) larvae. In the test on plates, 78% produced CMCase and 62% produced xylanase in specimens from Cerrado. In the Amazon Forest, 35% for CMCase and 71% for xylanase. In the submerged culture test, the isolates *Penicillium rubens* MN737746.1, *Talaromyces palmae* MT521727.1 and *Penicillium paxilli* MN737731.1 had higher xylanase production 5.31 U/mL, 3.12 U/mL and 2.45 U/mL, respectively. And the strain *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 stood out in the production of XOS (16.70 mg/mL). The immobilization of the enzyme with resin and functionalized with Glutaraldehyde showed 88% yield. The results indicate a high diversity of fungal species associated with the DT of *Triplectides* larvae both in streams of the Amazon Forest and in the Cerrado. Furthermore, it was observed that most fungal isolates have the ability to produce xylanolytic enzymes.

Keywords: *Triplectides*; fungal diversity; xylanase; prebiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Larva de <i>Triplectides</i> sp. (Trichoptera: Leptoceridae) com identificação das principais estruturas (Fonte: PES, 2001).	23
Figura 2. Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica. (Magalhães et al., 2019). 25	
Figura 3. Fluxograma metodológico utilizado para desenvolvimento do projeto de tese.....	30
Figura 4. Mapas mostrando pontos de amostragem de <i>Triplectides</i> (Trichoptera: Leptoceridae) dos riachos de baixa ordem no Cerrado (Parque Estadual do Lajeado e arredores, Estado do Tocantins, Brasil) e dos riachos de baixa ordem em Floresta Amazônica (Floresta Nacional de Tapajós, Estado do Pará, Brasil).	60
Figura 5. Porcentagem de isolados fúngicos do TD de <i>Triplectides</i> (Trichoptera: Leptoceridae) nos biomas Cerrado (A) e Floresta Amazônica (B) produtores e não produtores de xilanase (Xyl) e celulase (CMCase).	59
Figura 6. Efeito de T e pH na atividade enzimática de xilanase do extrato bruto. $R^2=0,89$	80
Figura 7. Efeito de T e pH na atividade enzimática de xilanase do extrato imobilizado. $R^2=0,89$	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de fungos do TD de larvas de <i>Triplectides</i> (Trichoptera: Leptoceridae) nos Biomas Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil e seus respectivos índices enzimáticos (IE)	58
Tabela 2. Número de insetos amostrados (n) e riqueza e diversidade de fungos filamentosos do TD de <i>Triplectides</i> (Trichoptera: Leptoceridae) nos Biomas Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil.....	58
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos de riachos amostrados em Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil.	58
Tabela 4. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2 ² para determinação de pH e Temperatura ótimos do extrato bruto e imobilizado.....	77
Tabela 5. Produção de xilanase, xilose e xilobiose por linhagens fúngicas do TD de larvas de <i>Triplectides</i> (Trichoptera: Leptoceridae).....	78
Tabela 6. Cinética da produção de xilanase (U/mL) por <i>Penicillium caseifulvum</i> MT521726.1 e Espécie Fúngica A durante 192 horas de cultivo.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre
CMC	Carboxymethylcellulase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	3.5-dinitrosalicylic acid
DT	Digestive tract
IE	Índice Enzimático
EM	Extrato malte
GLU	Glutaraldeído
ITS	Internal transcribed spacer of the rDNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
BDA	Batata Dextrose Agar
Bp	Pares de bases
T	Temperatura
TD	Trato digestório
XIL	Xilanase
XOS	Xilooligossacarídeos

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho apresenta as atividades desenvolvidas a partir do Projeto de Tese durante o período de março de 2018 a dezembro de 2022 no curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-Bionorte).

Na primeira parte, apresentamos uma breve introdução do tema, objetivos do trabalho, revisão de literatura e um fluxograma da metodologia utilizada em todo o trabalho.

No Capítulo I, **“Diversidade e capacidades enzimáticas de fungos associados ao trato digestivo da fase larval de um inseto triturador em Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil”**, é descrito o isolamento, identificação molecular e perfil xilanolítico e celulolítico de fungos filamentosos associados ao TD de insetos aquáticos fragmentadores, do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae), de riachos de Cerrado e Floresta Amazônica de duas localidades (Estado do Tocantins e do Pará) do Brasil, e discutido sobre os potenciais papéis dessa comunidade fúngica na dieta de seus hospedeiros. Esse capítulo está publicado como artigo na revista *Brazilian Journal of Biology*, volume 82, 27 de abril de 2022.

No Capítulo II, intitulado: **“Produção de enzimas xilanolíticas e xilooligossacarídeos por *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 no TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae)”** apresenta a produção simultânea de xilanase e xilooligossacarídeos das linhagens fúngicas obtidas do TD de larvas do gênero *Triplectides*, em cultivo submerso utilizando farelo de trigo como substrato. Esse capítulo está sendo preparado para submissão em periódico especializado.

Os resultados obtidos, até o momento, mostram a diversidade fúngica associada ao TD de larvas de insetos trituradores aquáticos, bem como contribuições com relação aos aspectos qualitativos e quantitativos sobre produção enzimática dos fungos avaliados.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Interação fungo-inseto	21
3.2 Fungos associados ao trato digestório de insetos	21
3.3 Insetos do gênero <i>Triplectides</i> (Trichoptera: Leptoceridae)	22
3.4 Enzimas de origem fúngica	23
3.5 Biomassa lignocelulósica	24
3.6 Xilanases: produção e aplicações	26
3.7 Xilooligossacarídeos	28
4. FLUXOGRAMA METODOLÓGICO	30
5. REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO I	40
ABSTRACT	58
RESUMO	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Caracterização das áreas de estudo	60
2.2 Isolamento e purificação dos fungos filamentosos	61
2.3 Extração de DNA, Amplificação e sequenciamento	61
2.4 <i>Screening</i> xilanolítico e celulolítico da comunidade fúngica	62
2.5 Análise estatística	62
3. RESULTADOS	62
4. DISCUSSÃO	59
5. AGRADECIMENTOS	64
6. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO II	71
RESUMO	72
ABSTRACT	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 Fonte e identificação dos isolados fúngicos	74

	16
2.2 Produção de xilanase em cultivo submerso	74
2.3 Atividade enzimática	75
2.4 Determinação de xilooligossacarídeos	75
2.5 Cinética da produção de xilanase em cultivos submersos	75
2.6 Imobilização da enzima bruta	76
2.7 Parâmetros de imobilização	76
2.8 Determinação de T e pH ótimos de atividade	77
3. RESULTADOS	77
4. DISCUSSÃO	81
5. CONCLUSÃO	84
6. AGRADECIMENTOS	84
7. REFERÊNCIAS	85
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8.1 REFERÊNCIAS	91
9. ANEXO	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos filamentosos são ubíquos na Biosfera, pois possuem a capacidade de processar diferentes substratos e competir com uma grande variedade de microrganismos (TROIANO et al., 2020). Sua diversidade ainda não é conhecida: aproximadamente 1200 novas espécies de fungos foram descritas em cada ano, ao longo da última década (HIBBETT et al., 2011). Em ambientes aquáticos, os fungos atuam na degradação de matéria vegetal e servem de alimento para insetos que vivem nesses ambientes (KRAUSS et al., 2011). Não somente fungos, mas diversos microrganismos estão envolvidos no processo alimentar de insetos, seja no interior do trato digestório ou colonizando o substrato, mantendo ou não uma relação complexa com o hospedeiro. A maioria dessas relações ecológicas entre microrganismo e insetos é construtiva (HIROSE & PANIZZI, 2009).

Além de ter importância na cadeia alimentar (SONG et al., 2017), os fungos também decompõem matéria vegetal morta e são considerados os principais decompositores de partes duras das plantas, porque utilizam as celulasas, enzimas extracelulares, para decompor as partes que não são digeridas pelos animais (GRAÇA et al., 2016).

Há uma vasta lacuna de conhecimento sobre aspectos básicos da biologia de organismos aquáticos como aspectos ecológicos essenciais e a determinação de grupos funcionais de alimentação de macroinvertebrados aquáticos (GONÇALVES et al., 2012; CENEVIVA-BASTOS et al., 2016). Contudo, os fungos têm sido encontrados frequentemente em trato digestório de insetos que se alimentam de madeira ou detritos e, possivelmente, desempenham um papel na digestão desse material vegetal (ENGEL & MORAN, 2013; LEÓN et al., 2016; SANTOS et al., 2018; BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020). Os insetos (artrópodes) são o grupo animal mais diverso da biosfera, habitando vários ambientes. Alimentam-se de uma extensa variedade de nutrientes, possivelmente devido a seus microrganismos associados como as espécies de fungos (LEÓN et al., 2016).

Os fungos filamentosos possuem capacidade de produção de enzimas extracelulares e têm sido explorados há milênios (TROIANO et al., 2020). Dessa maneira, o trato intestinal desses insetos surge como uma fonte importante para a prospecção de novos microrganismos para produção de enzimas aplicáveis a diversos processos industriais. Sousa et al., (2018) estudaram a fermentação em estado sólido do gênero *Aspergillus* utilizando resíduos de cervejaria e obtiveram uma produção maximizada de celulase e xilanase. Dias et al. (2018) realizaram a produção de celulase e xilanase de cepas de *Aspergillus niger*, em fermentação em estado sólido com biomassa de sorgo e assim obtiveram uma maximização da produção utilizando peptona como fonte de nitrogênio. *Penicillium oxalicum* destacou-se na produção

de enzimas que degradam a parede celular da planta, como celulase e xilanase (YAN et al., 2017). *Trichoderma longibrachiatum* produziu quantidade de xilanase e celulase interessantes, com farelo de trigo como substrato, quando comparado a outras cepas (CHUATANI & SHARMA, 2017).

As enzimas são macromoléculas biológicas produzidas por um organismo vivo, atuantes como catalisadores de reações bioquímicas específicas. Consideradas altamente seletivas, podem acelerar processos biológicos e bioquímicos dentro e fora da célula (GURUNG et al., 2013; SELISTEANU et al., 2014). Importantes em processos industriais devido à sua especificidade, propriedade que lhe permite reconhecer um substrato e catalisam reações entre produtos químicos específicos (PATEL et al., 2017). São utilizadas na fabricação de alimentos, rações animais, na indústria de cosméticos, de fármacos, de detergentes, de celulose e papel, têxtil, na indústria química, de couro, na produção de combustíveis e medicamentos (BINOD et al., 2013; BAJAJ & MAHAJAN, 2019).

O mercado global de enzimas industriais, em 2021, foi avaliado em US \$11,470 bilhões e espera-se um crescimento significativo nos próximos anos (GRAND VIEW RESEARCH, 2022). A tecnologia enzimática está em constante evolução, influenciada pela Biotecnologia e Bioinformática, e novas e melhoradas aplicações enzimáticas estão surgindo no mundo (PATEL et al., 2017). Há o surgimento de processos enzimáticos ecológicos e economicamente viáveis para substituir os processos físico-químicos e mecânicos. As enzimas industriais são classificadas, conforme sua aplicação, como: enzimas na indústria de alimentos, enzimas para auxiliar processos, enzimas como biocatalisadoras industriais, enzimas em engenharia genética e enzimas em cosméticos (BINOD et al., 2013; PATEL et al., 2017).

Grande parte das enzimas industriais é produzida por microrganismos, sendo os maiores produtores oriundos de ambientes naturais (PATEL et al., 2017). A produção por microrganismos é considerada econômica em grande escala, pois os meios de cultura são baratos e os ciclos de fermentação são curtos (SANCHEZ & DEMAINE, 2017). E quando comparadas as enzimas derivadas de plantas e animais, são mais úteis devido à sua grande variedade de atividades catalíticas, rendimento elevado, facilidade na modificação genética do microrganismo e acelerado crescimento microbiano em meios de baixo custo (PATEL et al., 2017). Fungos filamentosos e leveduras têm sido amplamente utilizados para esse fim (OLIVEIRA et al., 2014) e são reconhecidamente produtores de hidrolases, enzimas oxidativas, como celulasas, xilanasas, amilases e pectinases (MARQUES et al., 2018). Muitos fungos filamentosos são produtores de xilanasas. Os níveis de xilanase, a partir de culturas de fungos, são tipicamente maiores do que aqueles a partir de leveduras ou bactérias (MILALA et al., 2013).

As paredes celulares vegetais são compostas de celulose, hemicelulose (principalmente xilano) e lignina, que se ligam por interações covalentes e não covalentes, assim formando estruturas complexas que compreendem diversas configurações de polissacarídeos interligados (GILBERT et al., 2013; WALIA et al., 2017). O xilano é um importante hemicelulose na fibra vegetal, composto de um esqueleto linear D-xilose e ramos de outros açúcares, como arabinose, manose e galactose. Devido sua natureza heterogênea, o xilano requer diversas enzimas xilanolíticas para a hidrólise completa (COLLINS et al., 2005; OKEKE, 2014).

As xilanases (EC 3.2.1.8) pertencem às hidrolases (EC 3.2.1.-), com base nas suas sequências de aminoácidos (CAZydatabase) e fazem parte das famílias GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62, no qual se diferenciam no seu modo de ação, sítio catalítico, características físico-químicas, estrutura e especificidade pelo substrato (WALIA et al., 2017). Xilanases são utilizadas na indústria de fabricação de papel (BINOD et al., 2013), na produção de xilooligossacarídeos para indústrias alimentícias e nutraceuticas (PUROHIT et al., 2017). Portanto, possuem potencial biotecnológico em diversos campos, como alimentos, alimentos para animais, fabricação de cerveja, vinificação, refinação de biomassa, têxtil, celulose e indústrias de papel, bem como na agricultura e lavanderia (PERALTA et al., 2017).

A degradação da hemicelulose requer as enzimas endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), resultando em xilooligossacarídeos e xilose (WALIA et al., 2017). A primeira enzima atua na cadeia principal de homopolímero de ligação $\beta(1,4)$ D-xilopirranose produzindo xilooligossacarídeos (XOS) e a segunda enzima atua sobre estes XOS liberando xilose (NIETO-DOMINGUEZ et al., 2017). Os XOS podem ser obtidos a partir da fração xilano de materiais lignocelulósicos ou por métodos físico-químicos ou enzimáticos (CHAPLA et al., 2012; NIETO-DOMINGUEZ et al., 2017).

Portanto, além do conhecimento sobre a diversidade fúngica do TD de insetos aquáticos e as relações entre fungo e inseto, esse estudo analisa qualitativamente e quantitativamente a capacidade xilanolítica dessas espécies, bem como a produção de xilooligossacarídeos em cultivo submerso com farelo de trigo como substrato. Além disso, foi testada a imobilização da xilanase com resina como suporte.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo selecionar linhagens produtoras de xilanase entre os fungos associados ao trato digestório de larvas de *Triplectides* trituradores de troncos imersos em riachos nos biomas Cerrado e Floresta Amazônica, imobilizar e avaliar a sua aplicabilidade na obtenção de xilooligossacarídeos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os isolados de fungos associados ao trato digestório de larvas de insetos aquáticos (*Triplectides*) trituradores de troncos submersos em riachos do Cerrado e Floresta Amazônica;
- Inventariar as habilidades xilanolítica e celulolítica da comunidade fúngica do TD de larvas de *Triplectides*;
- Avaliar a produção simultânea de xilanase e xilobiose, por meio de cultivos submersos, por isolados fúngicos oriundos desta comunidade;
- Imobilizar xilanase produzida por um ou mais isolados fúngicos nas condições estabelecidas em cultivo submerso;
- Analisar a obtenção de xilooligossacarídeos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Interação fungo-inseto

Insetos e fungos são grupos muito diversos e coexistem em vários habitats terrestres e aquáticos, onde interações potenciais podem ocorrer entre espécies dos dois grupos (BOUCIAS et al., 2012; DOUGLAS, 2015). A evolução dos insetos é baseada em associações com microrganismos que pode ser nutricional, de proteção ou mesmo na maturação hormonal do inseto (CHAKRABORTY et al., 2020; MOHAMMED et al., 2018).

Os insetos alimentam-se de uma extensa variedade de nutrientes, provavelmente devido a seus microrganismos associados, como as espécies de fungos. E essa interação entre fungos e insetos tem sido relatada em diversos estudos (LEON et al., 2016; MASON et al., 2017; BIRKEMOE et al., 2018; SANTOS et al., 2018; YAO et al., 2019; BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020). Os microrganismos podem colonizar os insetos, tanto na superfície corpórea quanto no trato digestório e até no interior de certos tecidos. Sendo esses microrganismos, em geral, benéficos ou exigidos pelos hospedeiros (MOHAMMED et al., 2018).

Há relatos de que a interação inseto-fungo pode influenciar na aquisição de nutrientes e desintoxicação de metabólitos tóxicos (CHAKRABORTY et al., 2020). Fungos foram identificados em intestino de baratas alimentadas com rações ricas em celulose, sugerindo que esse microbioma seja responsável pela degradação da celulose presente na alimentação desses insetos (AYAYEE et al., 2020). Fungos filamentosos pertencentes dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* podem ser essenciais no desenvolvimento larval da abelha sem ferrão (*Meliponini*) e ainda ser fonte de nutrientes (DE PAULA et al., 2021). Em cupins, a relação de simbiose com fungos representa um dos sistemas mais eficientes para a bioconversão de lignocelulose (XIE et al., 2023).

3.2 Fungos associados ao trato digestório de insetos

Os tratos digestórios (TD) de insetos são habitat para o desenvolvimento de uma variedade de microrganismos (GRÜNWALD et al., 2010; DURAND et al., 2015). E como a dieta é diversificada, diversos grupos dependem de nutrientes fornecidos por microrganismos, como os fungos (NASIR & NODA 2003; GIBSON & HUNTER 2010; LEÓN et al., 2016).

Os fungos têm sido encontrados frequentemente em trato digestório de larvas de insetos que se alimentam de madeira ou detritos e, possivelmente, desempenham um papel na digestão desse material vegetal (ENGEL & MORAN, 2013; SANTOS et al., 2018; BELMONT-

MONTEFUSCO et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2022; SOUZA et al., 2022). A literatura aponta que a diversidade da microbiota intestinal está inteiramente ligada à dieta de cada espécie de inseto e ao ciclo de vida (ARIAS-CORDERO et al., 2012; ALVES JR et al., 2019) e que os substratos podem determinar a microbiota intestinal das larvas (MOHAMMED et al., 2018). A alimentação de detritos vegetais envolve a digestão de material lignocelulósico, e a resistência ou detoxificação de toxinas do material vegetal (ERIKSSON et al., 1990), o inseto por si só, não é capaz de fazer satisfatoriamente, assim reforçando esse papel nutricional da associação fungo/inseto.

A composição e diversidade fúngica do TD de larvas de insetos pode esclarecer o papel dos fungos na fisiologia do hospedeiro (GAO et al., 2018) e trazer ao conhecimento, o potencial biotecnológico dessas comunidades fúngicas. Além de fornecer informações sobre o meio ambiente, a diversidade biológica e funcional, e ainda sobre os diferentes ecossistemas (DOI et al., 2018).

3.3 Insetos do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae)

Insetos da ordem Trichoptera (tricho = cerda; pteron = asa) possuem tamanho de 1,5-4,5 mm e as larvas possuem corpo cilíndrico, com a coloração geralmente amarelada a marrom e o aparelho bucal do tipo mastigador (PES et al., 2014). Leptoceridae é a segunda maior família da ordem em número de espécies, cerca de 1.800 (HOLZENTHAL et al., 2007). Até 2020, oito espécies do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) foram registradas para o Brasil (DESIDERIO et al., 2020).

As espécies do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) são trituradores (HAMADA et al., 2014) e em seu estágio larval (Figura 1), geralmente, são encontradas em manchas de folhas localizadas no leito de riachos em poças d'água, podendo utilizar gravetos como abrigo (PES et al., 2014) e são classificadas como grupo trófico de trituradores de folhas (KIFFER et al., 2016).

Insetos trituradores se alimentam de material vegetal senescente (FRIBERG & JACOBSEN 1994; GRAÇA et al., 2001; JABIOL & CHAUVET 2012). E larvas do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) ao se alimentar de substratos, podem ingerir uma variedade de microrganismos que colonizam folhas (FONSECA et al., 2008; MOHAMMED et al., 2018).

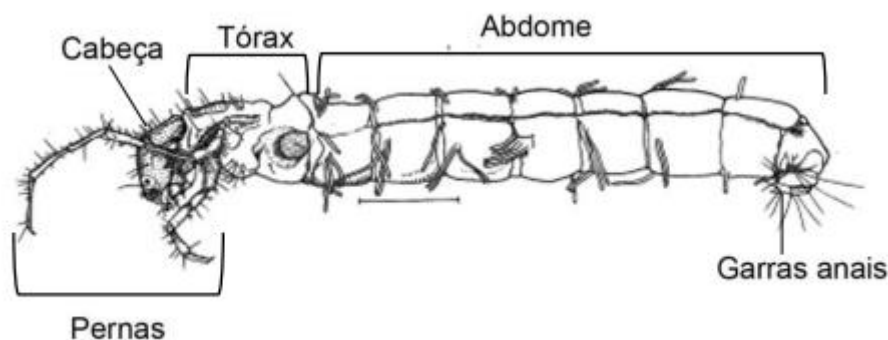


Figura 1. Larva de *Triplectides sp.* (Trichoptera: Leptoceridae) com identificação das principais estruturas (Fonte: PES, 2001).

3.4 Enzimas de origem fúngica

A maioria das enzimas utilizadas em processos industriais e biotecnológicos são de origem microbiana. Algumas vantagens de usar microrganismos para a produção de enzimas são a capacidade de crescimento rápido, maior produtividade e a manipulação genética (PATEL et al., 2017). Em 2021, o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 11,47 bilhões e com uma taxa de crescimento anual composta de 6,5% de 2022 a 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

Os fungos filamentosos possuem a capacidade de produção de enzimas extracelulares (TROIANO et al., 2020) e o trato intestinal de larvas de insetos aquáticos surgem como uma fonte importante para a prospecção de novos microrganismos para produção de enzimas aplicáveis em diversos processos industriais. Os fungos filamentosos foram utilizados como um dos maiores produtores de enzimas industriais nos últimos anos (TYAGI & SHARMA, 2021), sua utilização em bioprocessos tem tido uma relevância devido à sua produção de enzimas com diversas características físico-químicas e com potencial para a aplicação industrial (TROIANO et al., 2020). Além de possuírem uma capacidade de síntese em larga escala, as enzimas oriundas de fungos filamentosos são secretadas com facilidade no meio externo e com condições controladas (SUGIHARTO, 2019).

Os fungos podem crescer em substratos baratos, incluindo biomassa lignocelulósica, assim secretar elevadas quantidades de proteínas (MADHAVAN et al., 2022). Anualmente são produzidas milhões de toneladas de resíduos provenientes do processamento agroindustrial (NASCIMENTO et al., 2019) e muitos são ricos em lignocelulose. Resíduos como a palha de milho, trigo e arroz, talos de tabaco, entre outros (QESHMI et al., 2020) têm sido utilizados por serem de baixo custo, renováveis e abundantes (AMORIM et al., 2019a; MADHAVAN et al., 2022) e ainda, possuem potencial de bioconversão em produtos de alto valor agregado, como

açúcares, ácidos orgânicos, oligossacarídeos e biocombustíveis (QESHMI et al., 2020; OKOLIE et al., 2020).

Diversos trabalhos vêm testando a produção de enzimas por fungos filamentosos com a utilização de resíduo agroindustrial, como a enzima endoglucanase produzida por fungos dos gêneros *Diaporthe* e *Fusarium* utilizando casca de amendoim e serragem (FELBER et al., 2019). Outros estudos com *Penicillium crustosum* produzindo xilanase (BITTERN COURT et al., 2020) e a espécie *Penicillium chrysogenum* secretando celulases (YANG et al., 2018), ambos utilizaram palha de milho como substrato. E espécies do gênero *Aspergillus* produziram enzimas industriais importantes como a xilanase, α -amilase, β -glucosidase e celulase (WAKAI et al., 2018).

As enzimas produzidas por fungos filamentosos podem ser aplicadas em rações, indústria de papel, farmacêutica, biocombustíveis, detergentes e têxteis, além de apresentarem funções em diversos processos de biotransformação (SAINI & SHARMA, 2021; MADHAVAN et al., 2022). As enzimas hidrolíticas representam quase 75% da quantidade total de enzimas comerciais no mundo (TYAGI & SHARMA, 2021), que inclui pectinase, manase, amilase e lipases e algumas das principais enzimas lignocelulósicas que são celulase, xilanase, lacase e lignina peroxidase (KUMAR & RANI, 2019). As enzimas produzidas por fungos têm grande potencial em quebrar recursos lignocelulósicos tornando-os aplicáveis para diferentes fins (MADHAVAN et al., 2022). Os fungos filamentosos possuem alto rendimento, maior estabilidade, viabilidade econômica, rápido crescimento em meios de culturas, entre outros parâmetros (FATH et al., 2015; SHAHRYARI et al., 2019).

3.5 Biomassa lignocelulósica

Anualmente são geradas como resíduos agroindustriais grandes quantidades de biomassa lignocelulósica e muitas vezes sem o descarte adequado, contribuindo para a poluição do meio ambiente (QESHMI et al., 2020), tais como palha de milho, trigo e arroz, talos de tabaco, entre outros. Em 2022/23, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), foram produzidas 610 milhões de toneladas de cana de açúcar, 9,5 milhões de toneladas de trigo, 153,6 milhões de toneladas de soja, 124,88 milhões de toneladas de milho, 3,7 milhões de toneladas de sorgo e 9,94 milhões de toneladas de arroz, gerando, portanto, uma grande quantidade de resíduo lignocelulósico.

O uso dessa biomassa lignocelulósica, como matéria-prima para diversas indústrias, tem sido considerado vantajoso, pois é de baixo custo, renovável e abundante, com isso sendo possível reduzir custos de produção (AMORIM et al., 2019a; MADHAVAN et al., 2022). A

degradação da biomassa vegetal permanece como uma das principais fontes de fornecimento de enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, onde a combinação de diversas enzimas hidrolisa polissacarídeos em açúcares fermentáveis sob condições controladas (TYAGI & SHARMA, 2021). Esses materiais lignocelulósicos têm atraído considerável atenção pelo potencial de bioconversão em produtos de alto valor agregado, como açúcares, ácidos orgânicos, oligossacarídeos e biocombustíveis (QESHMI et al., 2020; OKOLIE et al., 2020).

A lignocelulose consiste em lignina, hemicelulose e celulose, sendo esses dois últimos ligados por camadas de lignina (KUMAR & CHANDRA, 2020; TYAGI & SHARMA, 2021) (Figura 2). Esses componentes variam em proporções dependendo da matéria-prima (QESHMI et al., 2020; MADHAVAN et al., 2022).

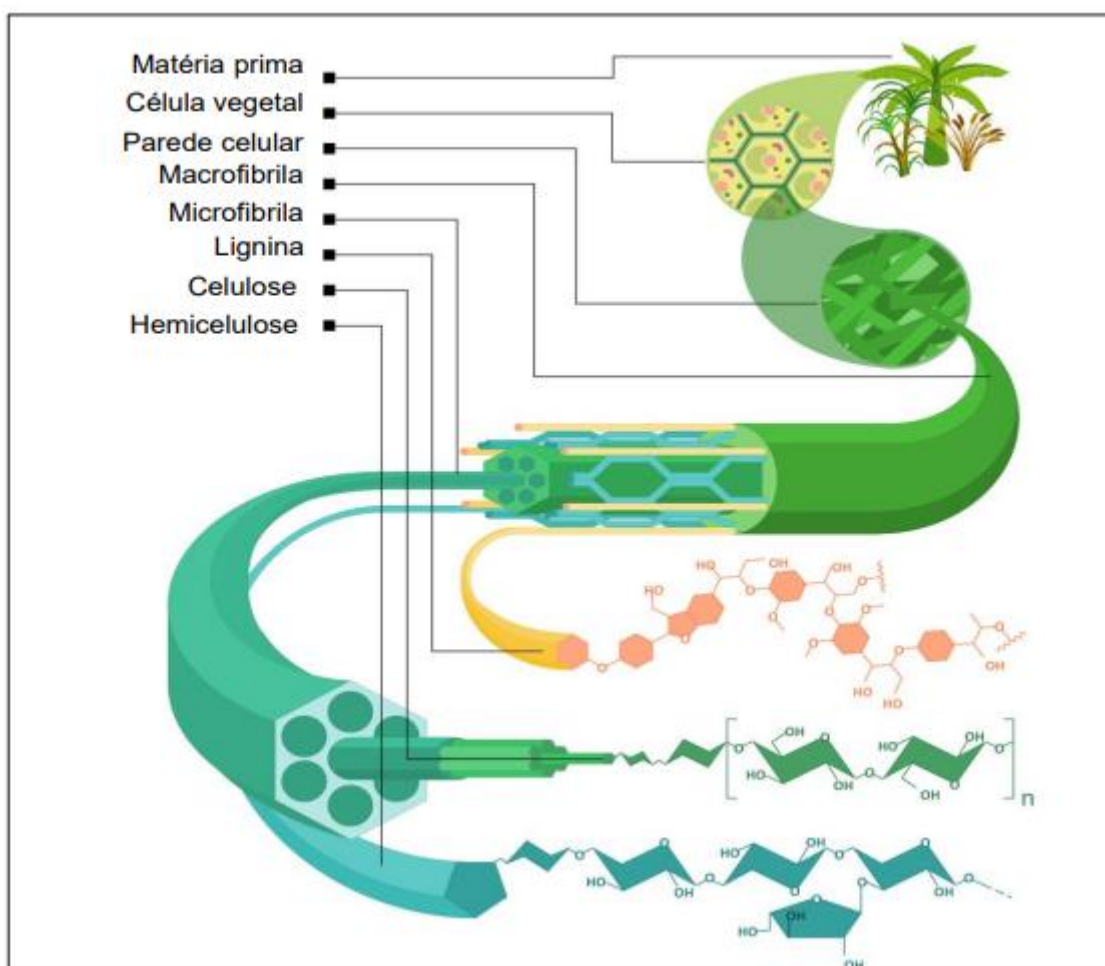


Figura 2. Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica. (Magalhães et al., 2019).

A lignina é um polímero aromático formado por fenilpropanóide derivado de álcool hidroxicinâmico e outros monômeros aromáticos (RALPH et al., 2019; LIU & QU, 2021). Possui ligações químicas mais complexas quando comparadas às ligações encontradas na celulose e hemicelulose, assim tornando a desconstrução enzimática mais difícil (LIU & QU,

2021).

A celulose é um polissacarídeo composto por cadeias lineares de β -1,4-glucano, que formam estruturas cristalinas e amorfas, e a sua degradação requer uma combinação de diferentes tipos de celulasas (KUMAR & RANI, 2019; LIU & QU, 2021; TYAGI & SHARMA, 2021). Celulasas como as endoglucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações glicosídicas gerando oligossacarídeos para ação de exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que clivam oligossacarídeos em celobiose e assim quando hidrolisados por β -glicosidases (EC 3.2.1.21) liberarem glicose (JUTURU & WU, 2014; MARQUES et al., 2018).

O xilano é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza (KUMAR & RANI, 2019), depois da celulose e é o principal componente das hemiceluloses presentes em madeiras (glucoronoxilanos) e resíduos agrícolas (arabinoxilanos) (PUROHIT et al., 2017; SMITH et al., 2017; FARIA et al., 2019; SHAHRYARI et al., 2019). A composição e estrutura da hemicelulose na biomassa vegetal pode variar de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento e o tipo de tecido (LIU & QU, 2021).

O xilano é um composto de subunidades β -(1,4)-D-xilose com cadeias laterais e unidades de α -L-arabinosil e α -D-glucuronosil (TYAGI & SHARMA, 2021). Para a hidrólise completa do xilano é necessária a ação de diversas enzimas xilanolíticas, como a endo-1,4- β -D-xilanase (E.C. 3.2.1.8), que cliva as ligações β -1,4-glicosídicas do xilano (QESHMI et al., 2020). Os microrganismos desenvolveram diferentes sistemas de degradação do xilano devido às suas diferentes estruturas e pode ser convertido em produtos como xilose, xilitol e xilo-oligossacarídeos (LIU et al., 2017; TYAGI & SHARMA, 2021; ZHANG et al., 2021).

3.6 Xilanases: produção e aplicações

As xilanases são um grupo diversificado de biocatalisadores responsáveis pela hidrólise do xilano, principal hemicelulose vegetal (QESHMI et al., 2020; PUCHART et al., 2021). A hidrólise enzimática do xilano requer a ação de enzimas, como a endo- β -1,4-xilanase (β -1,4-D-xilano xilanohidrolase, EC 3.2.1.8), que cliva ligações glicosídicas para produzir xilo-oligossacarídeos e β -1,4-xilosidase (β -1,4-Dxilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37), responsável pela decomposição final de xilo-oligossacarídeos em D-xilose (SCHUSTER & CHINN, 2013; FARIA et al., 2019).

As endo- β -1,4-xilanases são classificadas como hidrolases de glicosídeos (GH), sistema de classificação proposto por Henrissat e Bairoch (1993) que se baseiam em comparações das estruturas primárias e dos sítios catalíticos. Podem diferir no modo de ação e com base na natureza dos resíduos laterais dos tipos de xilana. São classificadas em 13 famílias e as mais

conhecidas e abundantes nos fungos filamentosos são pertencentes às famílias GH10 e GH11 (PUCHART et al., 2021). A família GH10, tem em sua maioria alto peso molecular e GH11 apresenta baixo peso molecular e possui especificidade de substrato contendo xilose e uma preferência por substratos poliméricos insolúveis (BASIT et al., 2020), apresentando diferentes modos de clivagem da cadeia principal (PUCHART et al., 2021).

A enzima xilanase pode ser produzida por fermentação em estado sólido ou submersa. A fermentação em estado sólido utiliza substrato sólido com ausência de água livre, já a fermentação submersa ocorre em meio líquido com caldo nutriente (BALA & SINGH, 2018; TYAGI & SHARMA, 2021). A otimização da produção de xilanase geralmente depende de condições de operação mais adequadas, como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, fonte de carbono, agitação e tempo de duração (QESHMI et al., 2020).

A seleção de um substrato e o meio de cultivo nutritivo é muito importante, pois além de ser fonte de carbono e energia, é uma fonte de compostos indutores para a produção de enzimas (TYAGI & SHARMA, 2021) e é crucial para alto nível de biossíntese de xilanase (YEGIN et al., 2017). Diversos trabalhos relataram a produção de xilanase por fungo filamentoso e substratos lignocelulósicos, como *Aspergillus terreus* e farelo de trigo (AHMED et al., 2016), *Fusarium solani* e xilano (MARTINEZ-PACHECO et al., 2020), *Penicillium crustosum* e palha de milho (BITTENCOURT et al., 2020), *Penicillium subrubescens* e farelo de trigo (LI et al., 2022), *Cladosporium oxysporum* e casca de arroz (MENEZES et al., 2017).

As xilanases são caracterizadas, quanto a pH e temperatura, para rastrear suas funcionalidades e aplicações industriais. Essas enzimas devem ser capazes de suportar as condições adversas, como meio ácido/alcalino, temperaturas elevadas (CHADHA et al., 2019).

As xilanases possuem vasta aplicação nas indústrias de alimentos, rações animais, têxteis, papel e celulose, cerveja, sucos, vinho, refinação de biomassa, bem como na agricultura e lavanderia (COLLINS et al., 2005; PERALTA et al., 2017; SHAHRYARI et al., 2019; BASIT et al., 2020).

A aplicação industrial de xilanase requer uma produção econômica em grande escala. Estima-se que a quota de mercado de xilanase pode chegar a 500 milhões de dólares em 2023 (CHADHA et al., 2019). E muitos processos industriais são realizados em altas temperaturas e pH extremo, necessitando de enzimas termoestáveis, alcalinas ou ácidas estáveis (BASU et al., 2018). Devido a essa alta demanda por xilanases termoestáveis, há uma demanda grande de ferramentas de Bioinformática para modificações moleculares com intuito de aumentar a termoestabilidade e estabilidade dessas enzimas (KUMAR et al., 2018).

Na indústria de rações animais, o uso de xilanase melhora a digestibilidade da ração (CHADHA et al., 2019) e facilita a liberação de nutrientes aprisionado em macromoléculas e,

portanto, melhora o valor nutricional (KUMAR et al., 2018; BASIT et al., 2020). Têm sido utilizadas no biobranqueamento (PURCHART et al., 2021) e no processo de biodestintamento, na indústria de papel e celulose, pois reduzem o teor de lignina e, simultaneamente, o uso de cloro nas etapas de branqueamento químico (KUMAR et al., 2018; BALA & SINGH, 2018), reduzindo a liberação de várias toxinas nessa etapa, além de melhorar as propriedades da celulose, como a retenção de água, evitando danos no papel (TYAGI & SHARMA, 2021).

Na indústria de biocombustíveis, as xilanases possuem um papel importante na etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, que é realizada em alta temperatura e pressão (KUMAR et al., 2018). As xilanases também convertem xilana em produtos, como o xilitol, que é usado em refrigerantes, sorvetes e produtos farmacêuticos (BASIT et al., 2020).

As xilanases são utilizadas na clarificação de sucos (LI et al., 2020) e vinhos, além de melhorar a extração de açúcares fermentáveis e aumentar sabor (NIGAM et al., 2018). Na panificação, melhoram a qualidade do pão, aumentando seu volume e prazo de validade (DAHIYA et al., 2020). As aplicações industriais de xilanases são diversas e a sua produção ainda tem custo elevado, portanto produções mais econômicas são um desafio para as indústrias.

3.7 Xilooligossacarídeos

Os xilooligossacarídeos (XOS) são oligossacarídeos contendo duas a dez moléculas de xilose, ligados por ligações β -(1,4)-xilosídicas, com diferentes grupos laterais formando estruturas ramificadas (AMORIM et al., 2019a). São produzidos pela hidrólise do xilano, segundo maior composto da hemicelulose de material lignocelulósico. Essa reação de clivagem do xilano produz açúcares redutores denominados XOS como xilopentaose, xilotetraose, xilotriose, xilobiose e o monossacarídeo D-xilose (AMORIM et al., 2019a; TYAGI & SHARMA, 2021; ZHANG et al., 2021).

As indústrias estão desenvolvendo diferentes processos para produção de XOS, a fim de obter maior eficiência e rentabilidade, para atender as necessidades do mercado. Contudo, a produção ainda possui custo elevado, quando comparada a outros prebióticos (AMORIM et al., 2019a). Assim, processos ecológicos, utilizando resíduos lignocelulósicos, têm sido estudados para redução do custo de produção (AMORIM et al., 2018; AMORIM et al., 2019b; ZHAO et al., 2021). Resíduos como espiga de milho, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar possuem maiores quantidades de xilana e baixas quantidades de lignina, sendo opções interessantes para produção de XOS (AMORIM et al., 2019a).

Alguns trabalhos têm produzido XOS utilizando fungo filamentoso e substrato

lignocelulósico. Amorim et al. (2019b) que produziram XOS com espécies do gênero *Trichoderma* e diferentes substratos como casca de castanhas, resíduo de cervejaria, casca de laranja e obtiveram concentrações de 1,8 mg/g a 40 mg/g. Terrasan et al. (2016) obtiveram concentração de XOS de 1,29 mg/mL com espécie do gênero *Penicillium* e farelo de trigo.

A produção de xilooligossacarídeos ganhou relevância nos últimos anos, pois podem ser aplicados na indústria de alimentos, como aditivos e alimentos funcionais, bem como na indústria farmacêutica, em formulações de rações, além de aplicações agrícolas (ANARADO et al., 2022). Alguns XOS, como a xilobiose, são prebióticos que estimulam o crescimento de bifidobactérias intestinais humanas, que indicam uma microbiota intestinal saudável (QESHMI et al., 2020) e apresentam outros efeitos benéficos, como adoçante de baixo teor calórico e suplemento dietético com ações anti-inflamatórias (PUCHART et al., 2021), redução do colesterol no sangue e na incidência de câncer colorretal, nos sintomas de doenças como a doença de Crohn, aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta e, assim, estimulação da absorção de cálcio e minerais (MARIM & GABARDO, 2021).

Estudos têm avaliado a inclusão de XOS em alimentos e seus benefícios. Souza et al., (2019) avaliaram a inclusão de XOS em bebida de soro de leite e obtiveram um produto com melhores características funcionais, reológicas e aceitação sensorial. A adição de XOS em queijos melhorou as propriedades físico-químicas e resultou numa formulação de queijo processado mais saudável (FERRÃO et al., 2018).

O mercado global de ingredientes saudáveis é estimado em US\$ 100,5 bilhões em 2022, e espera-se que atinja 146 bilhões em 2027, registrando uma Taxa Composta de Crescimento Anual (CAGR) de 7,8% (MARKETSANDMARKETS™, 2023). Os XOS apresentam grande potencial como ingrediente alimentar saudável, devido à sua competitividade de preço quando comparados com outros prebióticos (AMORIM et al., 2019a).

4. FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

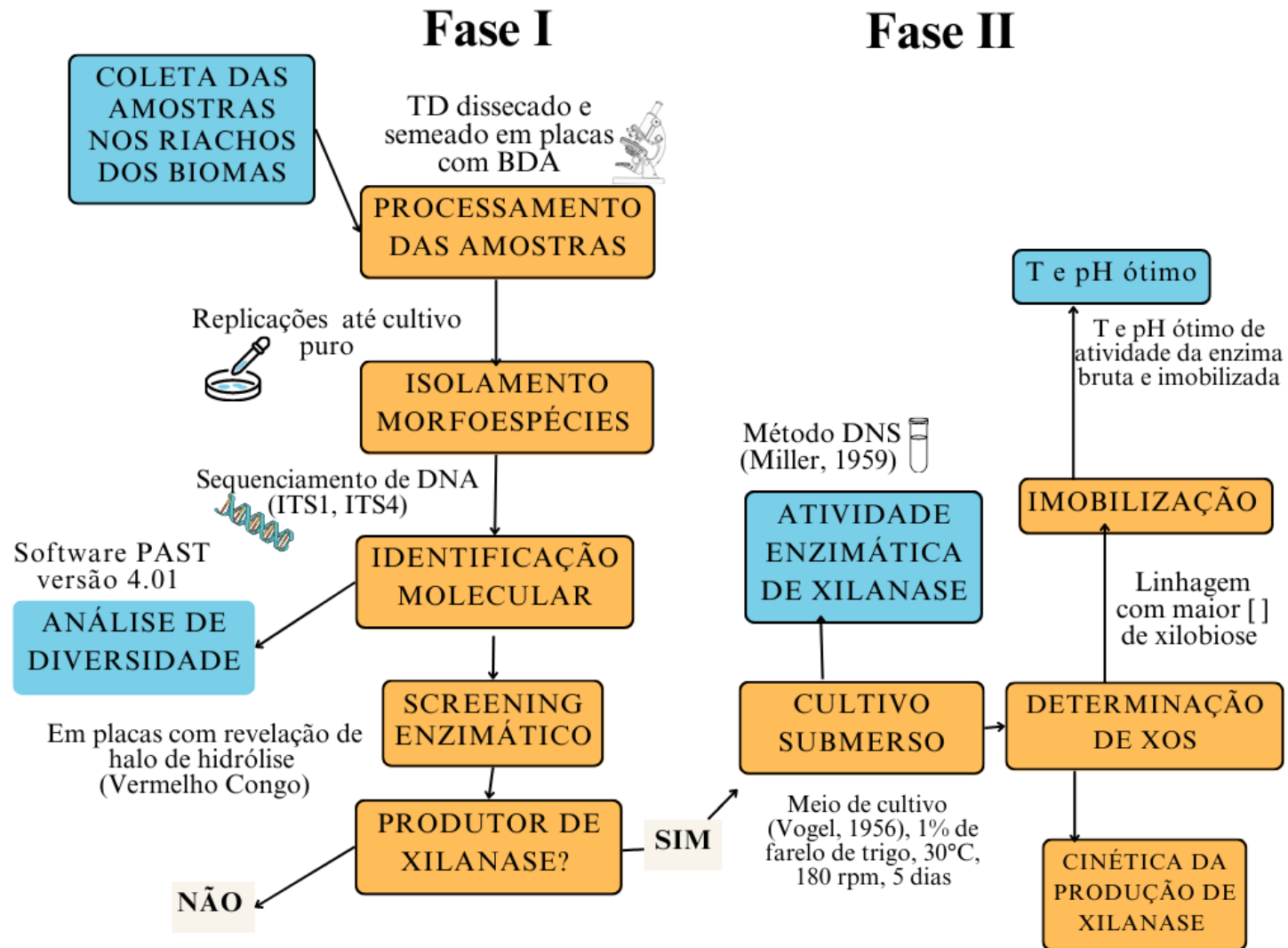


Figura 3. Fluxograma metodológico utilizado para desenvolvimento do projeto de tese.

5. REFERÊNCIAS

- AHMED, S.A., SALEH, S. A. A., MOSTAFAA, F.A., ATYA, A.A.A., AMMAR, H.A.M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.015>
- ALVES JR., S.L., MÜLLER, C., BONATTO, C., SCAPINI, T., CAMARGO, AF., FONGARO, G., TREICHEL, H Bioprospection of enzymes and microorganisms in insects to improve second-generation ethanol production. **Industrial Biotechnology**. 15(6): 336–349.2019. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>
- AMORIM, C., SILVÉRIO, S.C., PRATHER, K. L.J., RODRIGUES, L.R. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**. 37. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>
- AMORIM, C., SILVÉRIO, S.C., RODRIGUES, L.R., One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from Brewer's spent grain employing *Trichoderma* species, **Food Chemistry**. 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.080>
- AMORIM, C., SILVÉRIO, S.C., SILVA, S.P., COELHO, E., COIMBRA, M.A., PRATHER, K.L.J., RODRIGUES, L.R., Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain, **Carbohydrate Polymers**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.>
- ANARADO, C.E., CHUKWUBUEZE, F.M., OBUMSELU, O.F. et al. Production, Properties and Applications of Xylooligosaccharides (XOS): A Review. **Asian Journal Applied Chemistry Research**, vol. 12, no. 2, pp. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.9734/AJACR/2022/v12i2215>
- ARIAS-CORDERO, E., PING, L., REICHWALD, K., DELB, H., PLATZER, M., BOLAND, W Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. **Plos One**.7:12. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051557>
- AYAYEE, P. A., KINNEY, G., YARNES, C., LARSEN, T., CUSTER, G.F.; LINDA, T.A., VAN, D., MUÑOZ-GARCIA, A. Role of the gut microbiome in mediating standard metabolic rate after dietary shifts in the viviparous cockroach, *Diploptera punctata*. **Journal of Experimental Biology** 223, jeb218271. 2020. <https://doi.org/10.1242/jeb.218271>
- BAJAJ, P., & MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2019.
- BALA,A., SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels, **Renewable Energy**. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.09.100>
- BASIT, A., JIANG, W., RAHIM, K.Chapter: Xylanase and Its Industrial Applications. **Biotechnological Applications of Biomass**. 2020 <http://doi.org/10.5772/intechopen.92156>
- BASU, M., KUMAR, V., & SHUKLA, P. Recombinant approaches for microbial xylanases: Recent advances and perspectives. **Current Protein and Peptide Science**. 2018. <https://doi.org/10.1080/10816266.2018.1511111>

[://doi.org/10.2174/1389203718666161122110200](https://doi.org/10.2174/1389203718666161122110200).

BELMONT-MONTEFUSCO, E. L.; OLIVEIRA, J. B.; MAR, H. B.; SANTA-ROSA, P. S.; HAMADA, N.; NUNES-SILVA, C. G.; Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus Kieffer* (Insecta: Diptera: Chironomidae) **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 5, p.28644-28651, may. 2020.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**. Vol. 72, pp. 271-286. 2013.

BIRKEMOE, T., JACOBSEN, R. M., SVERDRUP-THYGESON, A., BIEDERMANN, P. H. W. Chapter 12. Insect-Fungus Interactions in Dead Wood Systems. Saproxylic Insects, In: **Zoological Monographs** 1, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75937-1_12

BITTENCOURT, K.W.F., ARFELLI, V.C., LUNKES, J.C. et al. Biochemical Characteristics of *Penicillium crustosum* FP 11 Xylanase II and an assessment of the properties of xylanases produced by the genus *Penicillium*. **Annual Research & Review in Biology** 35: 64-75. 2020. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2020/v35i730248>

BOUCIAS, DG., LIETZE, VU., TEAL, P. Chemical signals that mediate insect-fungal interactions. **Biocommunication of Fungi**. 305–336. 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4264-2_20

CENEVIVA-BASTOS, M., PRATES, D. B., DE MEI ROMERO, R., BISPO, P. C., & CASATTI, L. Trophic guilds of EPT (Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera) in three basins of the Brazilian Savanna. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, 63, 11–17. 2017.

CHADHA, B.S., KAUR, B., BASOTRA, N., TSNG, A., PANDEY, A. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. **Bioresource Technology** 277. 195–203. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>

CHAKRABORTY A., MODLINGER R., ASHRAF M.Z., SYNEK J., SCHLYTER F., ROY A. Core Mycobiome and Their Ecological Relevance in the Gut of Five Ips Bark Beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Frontiers in Microbiology**. 11:568853. 2020.

CHUTANI, P., SHARMA, K.K. Concomitant production of xylanases and cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* MDU-6 selected for the deinking of paper waste. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2016. 10.1007/s00449-016-1555-3.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** 29, 3–23, 2005.

CONAB <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4971-producao-de-graos-esta-estimada-em-312-5-milhoes-de-toneladas-na-safra-2022-23>

DAHIYA, S., BAJAJ, B.K., KUMAR, A., TIWARI, S.K., SINGH, B. A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making, **Process Biochemistry**, Vol.99, 290-306, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.002>.

DE PAULA, G.T., Menezes, C., PUPO, M.T., ROSA, C.A. Stingless bees and microbial interactions, **Current Opinion in Insect Science**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006>.

DESIDERIO, G. R., PES, A.M., BARCELOS-SILVA, P., HAMADA, N. *Triplectides Kolenati* (Trichoptera: Leptoceridae) from Brazil: A new species, new records and an identification key, **European Journal of Taxonomy**, (677). 2020. <http://dx.doi.org/10.5852/ejt.2020.677>.

DIAS, L. M., DOS SANTOS, B. V., ALBUQUERQUE, C. J. B., BAETA, B. E. L., PASQUINI, D., & BAFFI, M. A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, 124(3), 2018.

DOI, S. A.; PINTO, A. B.; CANALI, M. C.; POLEZEL, D. R.; MERGUIZO, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. F. C. de. Density and Diversity of Filamentous Fungi in the Water and Sediment of Araçá Bay in São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**. 18(1): e20170416. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0416>

DOUGLAS, A.E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology** 60: 17-34. 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>

DURAND, A. A. et al. Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. **Scientific Reports**. 5, 17190. 2015.

ENGEL, P. & MORAN, N.A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**. 37, 5, 699–735.2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>

FARIA, N.T., MARQUES, S., CASTELO, F.F., FONSECA, C., Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces spp.* using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates, **New Biotechnology**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.001>

FATH, M., FAZAEIPOOR, M.H. Production of proteases in a novel trickling tray bioreactor. **Waste and Biomass Valorization**. 2015, 6, 475–480.

FELBER, A.C., SPECIAN, V., ORLANDELLI, R.C., COSTA, A.T., POLONIO, J.C., MOURÃO, K.S.M., PAMPHILE, J.A., Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal** 35, 933-940. 2019 <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v35n3a2019-42403>

FERRÃO, L. L., FERREIRA, M. V. S., CAVALCANTI, R. N. et al., The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 137-147, 2018.

FRIBERG, N. & JACOBSEN, D. Feeding plasticity of two detritivore-shredders. **Freshwater Biology**, 32, 133-142. 1994.

FONSECA, Q. R.; SARQUIS, M. I. M.; HAMADA, N.; ALENCAR, Y. B. Occurrence of filamentous fungi in *Simulium Goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello (*Diptera: Simuliidae*) larvae in central Amazonia, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 39:282-285. 2008

GAO, G., GAO, J., HAO, C., DAI, L., CHEN, H Biodiversity and activity of gut fungal communities across the life history of *Trypophloeus klimeschi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **International Journal of Molecular Sciences**. 19:7. 2018.

<https://doi.org/10.3390/ijms19072010>

GIBSON, C.M. & HUNTER, M.S. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. **Ecology Letters**. 13: 223–234. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01416.x>.

GILBERT, H. J; KNOX, J. P.; BORASTON, A. B. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. **Current Opinion in structural Biology**, v. 23, p. 669–677, 2013.

GONÇALVES, J. F., REZENDE, R. DE S., FRANÇA, J., & CALLISTO, M. Invertebrate colonisation during leaf processing of native, exotic and artificial detritus in a tropical stream. **Marine and Freshwater Research**, 63(5), 428. 2012.

GRAÇA, MAS., CRESSA, C., GESSNER, MO., FEIO, MJ., CALLIES, KA., BARRIACHOS, C Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**. 46(7): 947–957. 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00729.x>

GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size, Share, Global Industry Report, 2022. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>.

GRUNWALD S., PILHOFER, M., HOLL, W. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. **Systematic and Applied Microbiology**, 25–34. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.10.002>

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; V.; RAI, V. Review Article A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**. 2013.

HAMADA, N., NESSIMIAN, J.L., QUERINO, R.B., Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia, Inpa. 2014.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p.781-788, 1993.

HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews** 25, 3 8-4 7, 2011.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. Os simbioses e a nutrição dos insetos. Capítulo 6. **Biotecnologia e nutrição dos insetos: base para manejo integrado de pragas**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. 2009.

HOLZENTHAL, R.W.; BLAHNIK, R.J.; PRATHER, A.L.; KJER, K.M. Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), Caddisflies. **Zootaxa**, 1668: 639-698. 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.568853>

JABIOL, J. & CHAUVET, E. Fungi are involved in the effects of litter mixtures on consumption by shredders. **Freshwater Biology**. 57: 1667–1677. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02829.x>

JUTURU, V., WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**. 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>

KIFFER, WP., MENDES, F., RANGEL, JV., BARBOSA, P., SERPA, K., MORETTI, MDAS Size-mass relationships and the influence of larval and case size on the consumption rates of *Triplectides* sp. (Trichoptera, Leptoceridae). **Fundamental and Applied Limnology / Archiv Für Hydrobiologie**, 188(1):73–81. 2016. <https://doi.org/10.1127/fal/2016/0855>

KRAUSS, G. J.; SOLÉ, M.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D.; WESENBERG, D.; BARLOCHER, F. Fungi in fresh waters: ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS Microbiol Rev** 35, 620–651. 2011.

KUMAR, A. & CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**. Vol. 6. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>.

KUMAR, N.V. & RANI, M.E. Microbial enzymes in paper and pulp industries for bioleaching application. **Research Trends of Microbiology**. MedDocs eBooks2019.

KUMAR, V., DANGI, A.K., SHUKLA, P. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. **Molecular Biotechnology**. 60:226–235. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0059-6>

LEÓN AV-P, SANCHEZ-FLORES A, ROSENBLUETH M, MARTÍNEZ-ROMERO E Fungal community associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. **Front Microbiol** 7:1–15. 2016.

LI, C., KUMAR, A., LUO, X., SHI, H., LIU, Z., WUA, G. Highly alkali-stable and cellulase-free xylanases from *Fusarium* sp. 21 and their application in clarification of orange juice. **International Journal of Biological Macromolecules** 155 572–580. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.249>.

LI, X., KOUZOUNIS, D., KABEL, M.A., VIRIES, R.P. GH10 and GH11 endoxylanases in *Penicillium subrubescens*: Comparative characterization and synergy with GH51, GH54, GH6 α -L-arabinofuranosidases from the same fungus. **New Biotechnology** 70. 84–92. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.05.004>

LIU, G., QU, Y. Integrated engineering of enzymes and microorganisms for improving the efficiency of industrial lignocellulose deconstruction, **Engineering Microbiology**, Vol. 1, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2021.100005>.

LIU, M., HUO, W., XU, X., WENG, X. Recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* xylanase A expressed in *Pichia pastoris* and generation of xylooligosaccharides from xylans and wheat bran. **Int J Biol Macromol**. 105:656–663. 2017.

MADHAVAN, A., ARUN, KB., SINDHU, R., JOSE, A. A., PUGAZHENDHI, A., BINOD, P., SIROHI, R., RESHMY, R., AWASTHI, M.K. Engineering interventions in industrial filamentous fungal cell factories for biomass valorization. **Bioresource Technology**. 344. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126209>

MAGALHAES, A.I., CARVALHO, J.C., PEREIRA, G.V.M. et al. Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioprod. Bioref.** 2019. <https://doi.org/10.1002/bbb.2048>

MARIM, A.V.C., GABARDO, S. Xylooligosaccharides: prebiotic potential from agro-

industrial residue, production strategies and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 37. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102190>

MARKETSANDMARKETS in <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/health-ingredients-market-69194289.html> publicado em fev 2023. Acesso em 24.04.2023.

MARQUES, N.P., PEREIRA, J.C., GOMES, E., et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse, **Industrial Crops and Products**, Vol. 122, 66-75. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>.

MASON, C.J., LONG, D.C., MCCARTHY, E.M., NAGACHAR, N., ROSA, C., SCULLY, E.D., HOOVER, K Within gut physicochemical variation does not correspond to distinct resident fungal and bacterial communities in the tree-killing xylophage, *Anoplophora glabripennis*. **Journal of Insect Physiology**. 102, 27–35. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.003>

MARTÍNEZ-PACHECO, M.M., FLORES-GARCÍA, A., ZAMUDIO-JARAMILLO, M.A., CHÁVEZ-PARGA, M.C., Alvarez-Navarrete, M. Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. **Revista Argentina de Microbiología**. 52(4):328-338. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram>.

MENEZES, B.S., ROSSI, D.M., AYUB, M.A.Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal Microbiol Biotechnol** 33:58. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2226-5>

MILALA, M. A. NOK, A.J. INUWA, H.M., IBRAHIM, S. Isolation, Purification and Characterization of a Xylanase from *Aspergillus Flavus* for Possible use in Paper Industry. **Journal of Science and Technology** Vol. 3, No. 11, 2013.

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

MOHAMMED, W.S., ZIGANSHINA, E.E., SHAGIMARDANOVA, E.I., GOGOLEVA, N.E., ZIGANSHIN, A.M Comparison of intestinal bacterial and fungal communities across various xylophagous beetle larvae (Coleoptera: Cerambycidae). **Scientific Reports**. 8:10073. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27342-z>

NASCIMENTO, A.G.L.C., TORRE, C.L.D., KADOWAKI, M.K. Uma abordagem sobre produção de xilanases pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* utilizando resíduos agroindustriais como indutor. Em: **Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia** 2. 166. 2019. <https://doi.org/10.22533/at.ed.39420220116>

NASIR, H. & NODA, H. Yeast-Like Symbiotes as a Sterol Source in Anobiid Beetles (Coleoptera, Anobiidae): Possible Metabolic Pathways From Fungal Sterols to 7-Dehydrocholesterol. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 52:175–182. 2003. <https://doi.org/10.1002/arch.10079>

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I.; YORK-DURÁN, M. J.; RODRÍGUEZ-COLINAS, B.; PLOU, F. J.; CHENOLL, E.; PARDO, E.; CODOÑER, F.; MARTÍNEZ, M. J. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal

GH11 xylanase. **Food Chemistry**. 2017.

NIGAM D, ASTHANA M, KUMAR A. Chapter 10 - *Penicillium*: A Fungus in the Wine and Beer Industries. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering *Penicillium*. **System Properties and Applications**. 187-200. 2018.

OKEKE, B. C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High β -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochem Biotechnology**. 2014.

OKOLIE, J.A., NANDA, S., DALAI, A.K., KOZINSKI, J.A. Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. **Waste and Biomass Valorization**. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>

OLIVEIRA, A. C. D; FERNANDES, M. L.; MARIANO, A. B. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology** 45, 4, 1503-1511. 2014.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. Chapter 2. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2017.

PERALTA, R. M.; SILVA, B. P.; CÔRREA, R. C. G.; KATO, C.G.; SEIXAS F. A. V.; BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. Chapter 5. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2017.

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

PES, A.M.O., SANTOS, APM., BARCELOS-SILVA, P., CAMARGOS, LM Ordem Trichoptera. In: HAMADA, N., NESSIMIAN, JL., QUERINO, RB. 2014. Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. INPA. 391. 2014.

PUCHART, V., SUCHOV, K., BIELY, P. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview. **Biotechnology Advances** 47. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107704>

PUROHIT, A.; RAI, S.K.; CHOWNK, M.; SANGWAN, R.S.; YADAV, S.K. Xylanase from *Acinetobacter pittii* MASK 25 and developed magnetic cross-linked xylanase aggregate produce predominantly xylopentose and xylohexose from agro biomass. **Bioresour. Technol.** 244, 793–799. 2017.

QESHMI, F.I., HOMAEI, A., FERNANDES, P. et al., Xylanases from marine microorganisms: A brief overview on scope, sources, features and potential applications, **BBA - Proteins and Proteomics**. 1868. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140312>

RALPH, J., LAPIERRE, C., BOERJAN, W., Lignin structure and its engineering. **Curr. Opin. Biotechnol.** 56, 240–249. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>.

SAINI, S., SHARMA, K.K. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research. **International Journal Biological Macromolecules**. 193:2304-2319. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.063>.

SANCHEZ, S.; DEMAİN, A. L. Useful Microbial Enzymes-An Introduction. Chapter 1. In:

Biotechnology of Microbial Enzymes. 2016.

- SANTOS, T.T.; OLIVEIRA, K.A.; VITAL, M.J.S.; COUCEIRO, S.R.M.; MORAIS, P. B. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (*Trichoptera: Calamoceratidae*) in streams of the Brazilian Amazon **Boletim Museu Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 13, n. 3, p. 317-325, set.-dez. 2018.
- SCHUSTER, B.G., CHINN, M.S. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic feedstocks for ethanol fuel production. **Bioenerg Research**. 6:416-435 2013.
- SELISTEANU, D.; TEBBANI, S.; ROMAN, M.; PETRE, E.; GEORGEANU, V. Microbial production of enzymes: Nonlinear state and kinetic reaction rates estimation. **Biochemical Engineering Journal** 91, 23–36. 2014.
- SHAHRYARI, Z., FAZAELIPOOR, M.H., SETOODEH, P., NAIR, R.B., TAHERZADEH, M.J., GHASEMI, Y. Utilization of wheat straw for fungal phytase production. **International Journal of Recycle Organic Waste Agriculture**. 7, 345–355. 2018.
- SMITH PJ, WANG H-T, YORK W.S., PEÑA, M.J., URBANOWICZ, B.R. Designer biomass for next-generation bioreneries: leveraging recent insights into xylan structure and biosynthesis. **Biotechnology for Biofuels**. 2017;10(1):286-299. 2017.
- SONG, P., TANABE, S., YI, R., KAGAMI, M., LIU, X., & BAN, S. Fungal community structure at pelagic and littoral sites in Lake Biwa determined with high-throughput sequencing. **Limnology**, 19(2), 241–251. 2017.
- SOUSA, D., VENÂNCIO, A., BELO, I., & SALGADO, J. M. Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2018.
- SOUZA, F. P., BALTHAZAR, C., GUIMARÃES, J. T. et al., The addition of xyloligoosaccharide in strawberry-flavored whey beverage. **LWT**, v. 109, p. 118-122. 2019.
- SOUZA, C.R., TEIXEIRA, M.F.N.P; MORAIS, P.B. Diversity of cellulolytic and xylanolytic fungi associated with the digestive tract of aquatic insect larvae in streams of the Amazon Forest and Cerrado in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 82, e265681. 2022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.265681>
- SUGIHARTO, S. A review of filamentous fungi in broiler production. **Annals of Agricultural Sciences**, Cairo, v. 64, p. 1-8, 2019.
- TEIXEIRA, M.F.N.P; SOUZA, C.R., MORAIS, P.B. Diversity and enzymatic capabilities of fungi associated with the digestive tract of larval stages of a shredder insect in Cerrado and Amazon Forest, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 82, e260039 2022. | <https://doi.org/10.1590/1519-6984.260039>
- TERRASAN, C.R.F., GUIBAN, J.J., CARMONA, E.C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates, **Electronic Journal of Biotechnology**, Vol 23, 54-62, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.08.001>.
- TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 117, 109472. 2020.

- TYAGI, D. & SHARMA, D. Production and Industrial Applications of Xylanase: A Review. **International Journal of Scientific Research & Engineering Trends** Volume 7, Issue 3. 2021.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42–43, 1956.
- WAKAI, S., NAKASHIMA, N., OGINO, C., TSUTSUMI, H., HATA, Y., KONDO, A. Modified expression of multi-cellulases in a filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Bioresour Technol.** 276:146-153. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.117>.
- WALIA, A.; GULERIA S.; MEHTA P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. 3 **Biotech** 7:11. 2017.
- XIE, R., DONG, C., WANG, S., DANSO, B., DAR, M.A., PANDIT, R.S., PAWAR, K.D., GENG, A., ZHU, D., LI, X., et al. Host-Specific Diversity of Culturable Bacteria in the Gut Systems of Fungus-Growing Termites and Their Potential Functions towards Lignocellulose Bioconversion. **Insects**, 14, 403. 2023. <https://doi.org/10.3390/insects14040403>
- YAN, Y.-S., ZHAO, S., LIAO, L.-S., HE, Q.-P., XIONG, Y.-R., WANG, L., FENG, J.-X. Transcriptomic profiling and genetic analyses reveal novel key regulators of cellulase and xylanase gene expression in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, 10(1). 2017.
- YAO, Z., MA, Q., CAI, Z., RAZA, MF., BAI, S., WANG, Y., ZHANG, H. Similar shift patterns in gut bacterial and fungal communities across the life stages of *Bactrocera minax* larvae from two field populations. **Frontiers in Microbiology**. 10. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02262>
- YANG, Y., YANG, J., WANG, R. et al. Cooperation of hydrolysis modes among xylanases reveals the mechanism of hemicellulose hydrolysis by *Penicillium chrysogenum* P33. **Microb Cell Fact** 18, 159. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1212-z>
- YEGIN, S., BUYUKKILEC, A.O., SARGIN, S., GOKSUNGUR, Y. Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase: Screening, Bioprocess Optimization and Scale Up. **Waste Biomass Valor** 8:999–1010. 2017. <http://doi.org/10.1007/s12649-016-9646-6>
- ZHANG, M., ZHAN, A., YE, Y., LIU, C., HANG, F., LI, K. Molecular modification, structural characterization, and biological activity of xylans. **Carbohydrate Polymers** 269. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118248>
- ZHAO, S., ZHANG, G.L., CHEN, C., YANG, Q., LUO, X.W., WANG, Z.B., WU, A.M., FENG, J.X. A combination of mild chemical pre-treatment and enzymatic hydrolysis efficiently produces xylooligosaccharides from sugarcane bagasse, **Journal of Cleaner Production**, Vol. 291, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125972>.

CAPÍTULO I

Diversity and enzymatic capabilities of fungi associated with the digestive tract of larval stages of a shredder insect in Cerrado and Amazon Forest, Brazil

Artigo publicado em *Brazilian Journal of Biology*, vol 82, 2022

DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.260039>

Diversidade e capacidades enzimáticas de fungos associados ao trato digestório da fase larval de um inseto triturador em Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil

M. F. N. P. Teixeira^a, C. R. Souza^{a,b} e P. B. Morais^{a*}

^aUniversidade Federal do Tocantins – UFT, Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia Ambiental, Palmas, TO, Brasil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins – IFTO, Gurupi, TO, Brasil

Recebido: 13 de Janeiro, 2022 – Aceito: 27 de Abril, 2022

ABSTRACT

Tropical biomes such as Brazilian Cerrado and Amazon Forest have a great diversity of fungi and insects. Interactions between these organisms can be beneficial to both partners. In streams, these interactions contribute to litter decomposition. Studying the digestive tract (DT) of shredder insects as a habitat for fungal microorganisms is an opportunity to obtain fungal strains with biotechnological potential, which may help to understand the symbiotic relationships between these organisms in tropical forests. This study investigated the fungal community in the DT of larvae of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) collected in low-order streams in the Cerrado and Amazon Forest biomes in Brazil. Forty-nine fungal isolates were obtained and identified among 32 species and 12 genera. The genus *Roussoella* was only found in the DT of insects in Amazon Forest streams, while 7 genera only occurred in the DT of insects in Cerrado streams. The genus *Penicillium* (40%) was the most frequent. In the Cerrado, 78% were producers of CMCCase, more than two-fold that in the Amazon Forest (35%). And 62% were producers of xylanase, in the Cerrado and 71% in the Amazon Forest. In this context, the fungal community in the DT of *Triplectides* larvae may play an important role in the insect diet by breaking down lignocellulosic material.

Keywords: *Triplectides*, Trichoptera, xylanase, cellulase.

RESUMO

Biomass tropicais como o Cerrado brasileiro e a Floresta Amazônica apresentam uma grande diversidade de fungos e insetos. As interações entre esses organismos podem ser benéficas para ambos os parceiros. Em riachos, essas interações contribuem para a decomposição da serrapilheira. O estudo do trato digestório (TD) de insetos como um habitat para microrganismos fúngicos é uma oportunidade para obtenção de linhagens fúngicas com potencial biotecnológico, podendo trazer luz para o entendimento das relações simbióticas entre esses organismos em florestas tropicais. Esse estudo investigou a comunidade fúngica do TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) coletados em riachos de baixa ordem nos biomas Cerrado e Floresta Amazônica no Brasil. Foram obtidos 49 isolados fúngicos e identificados entre 32 espécies de 12 gêneros. O gênero *Roussoella* foi encontrado apenas no TD de insetos em riachos da Floresta Amazônica, enquanto sete gêneros ocorreram apenas no TD de insetos em riachos do Cerrado. O gênero *Penicillium* (40%) foi o mais frequente. No Cerrado, 78% foram produtoras de CMCCase, mais que o dobro da Floresta Amazônica (35%). E 62% foram produtoras de xilanase, no Cerrado, e 71% na Floresta Amazônica. Nesse contexto, a comunidade fúngica do TD de larvas *Triplectides* pode desempenhar um papel importante na dieta de insetos por quebrar o material lignocelulósico.

Palavras-chave: *Triplectides*, Trichoptera, xilanase, celulase.

1. INTRODUÇÃO

Os biomas brasileiros, Cerrado e Floresta Amazônica, são considerados *hotspots* de biodiversidade. Essa alta biodiversidade, especialmente nas regiões neotropicais, representa um grande potencial de organismos a serem descobertos (ALMEIDA et al., 2017), bem como suas especificidades. Assim, essas florestas tropicais abrigam grande parte da diversidade de insetos e fungos que coexistem em vários habitats terrestres e aquáticos, onde interações potenciais podem ocorrer entre espécies dos dois grupos (BOUCIAS et al., 2012; Douglas, 2015).

Os insetos são colonizados por microorganismos, em sua superfície corporal, no trato digestivo (TD) e no interior de certos tecidos. Bactérias e fungos prevalecem nos microbiomas dos insetos e são essenciais para a sobrevivência, maturação e funções nutricionais dos hospedeiros entre as abelhas (KWONG e MORAN, 2016; RAYMANN e MORAN, 2018) e também em algumas espécies de mariposas (CHEN et al., 2016). Os papéis dos simbiossiontes nas relações entre fungos e insetos foram considerados nutritivos, para proteção, ou mesmo para a maturação hormonal do inseto (MOHAMMED et al., 2018), visto que os microorganismos recebem proteção e alimento abundante no corpo do inseto. Os fungos contribuem com nutrientes para vários grupos de insetos (GIBSON e HUNTER, 2010), como com besouros de casca (SIX, 2012) e o carmim cochonilha, que os fungos auxiliam no processo de reciclagem do nitrogênio (LEÓN et al., 2016).

Os fungos têm sido frequentemente encontrados no TD de vários insetos que se alimentam de madeira ou detritos e, possivelmente, desempenham um papel na digestão de tal material vegetal (ENGEL e MORAN, 2013; LEÓN et al., 2016; SANTOS et al., 2018; BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020a, BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020b). Insetos trituradores se alimentam de material vegetal senescente em riachos de baixa ordem (GRAÇA et al., 2001; JABIOL e CHAUVET, 2012) onde contribuem para a quebra de matéria orgânica em ecossistemas aquáticos, juntamente com grupos de fungos como Ascomycetos e Hifomicetos (GRAÇA et al., 2016). Espécies de insetos do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) são trituradores durante seu estágio larval aquático, consumindo substratos como folhas e madeira morta (OLIVEIRA e PES, 2014; CORTEZ e GONÇALVES, 2015). A colonização microbiana desses substratos melhora a palatabilidade e aumenta o teor de nitrogênio dos alimentos (GRAÇA et al., 2001). O gênero é altamente diverso em riachos tropicais, onde uma variedade de substratos está disponível para a colonização fúngica que pode ser ingerida por esses insetos junto com os alimentos. Levanta-se a hipótese de que existe uma diversidade de fungos associados ao TD de larvas de insetos do gênero *Triplectides* em riachos de baixa ordem no Cerrado e Floresta Amazônica.

A composição e diversidade fúngica no TD de insetos pode esclarecer o papel dos fungos na fisiologia do hospedeiro (GAO et al., 2018), bem como do papel ecológico da simbiose entre os dois grupos e o potencial biotecnológico dessas comunidades fúngicas. Assim, este estudo teve como objetivo verificar se existe uma possível especificidade de ocorrência de fungos no TD desses insetos e testar o potencial para a produção de xilanases e celulases, o que também evidencia o potencial papel nutricional e na digestão do alimento no TD do inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização das áreas de estudo

O estudo foi realizado em cinco riachos localizados em uma área de conservação e arredores na parte norte do Cerrado brasileiro (Tocantins, Brasil) e em quatro riachos em uma área de Floresta Amazônica (Pará, Brasil) (Figura 4). Foi amostrado um trecho de 200 metros do curso do riacho, com auxílio de uma rede D-frame (malha de 0,500 mm e área de 0,465 m²) em cada riacho selecionado. Larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) foram capturadas em substrato disponível (especialmente folhas) e foram identificadas por especialistas na área com base nas descrições taxonômicas de Hamada *et al.*, (2014). Cada larva individual foi transferida para um tubo estéril contendo 1 mL de solução salina estéril e armazenada por 2 a 4 horas em gelo, até o processamento em laboratório.

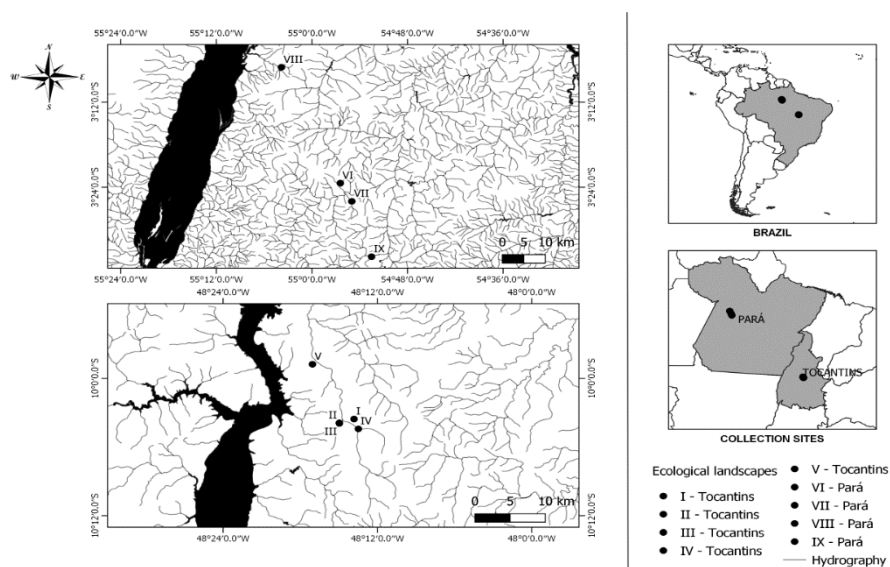


Figura 4. Mapas mostrando pontos de amostragem de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) dos riachos de baixa ordem no Cerrado (Parque Estadual do Lajeado e arredores, Estado do Tocantins, Brasil) e dos riachos de baixa ordem em Floresta Amazônica (Floresta Nacional de Tapajós, Estado do Pará, Brasil).

2.2 Isolamento e purificação dos fungos filamentosos

No laboratório, as larvas individuais foram assepticamente dissecadas usando um microscópio estereoscópico. O trato digestório foi adicionado a 1,0 mL de solução salina estéril em um tubo Eppendorf. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada em uma placa de Petri contendo ágar batata-dextrose (BDA) suplementado com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol, em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C por até 60 dias. Os isolados fúngicos obtidos foram individualmente transferidos para placas de Petri contendo BDA e incubados a 25 °C por sete dias para purificação. As cepas fúngicas foram mantidas em depósito conforme adaptações de Castellani (1939).

2.3 Extração de DNA, Amplificação e sequenciamento

Os isolados fúngicos foram transferidos do Castellani para placas contendo BDA por 24-28h e depois transferidos para caldo EM (Extrato Malte) (3%) para aumento celular por sete dias de crescimento em shaker rotativo (100 rpm) em temperatura ambiente. Foi coletado, aproximadamente, 40 mg de micélio e a extração de DNA foi realizada com o Kit Wizard TM Genomic DNA Purification (Promega, USA), seguindo o protocolo modificado de Burghoorn *et al.* (2002). Após a extração, o DNA foi analisado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Brazil). Os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) foram utilizados para amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) região de rDNA (~600 pb), seguindo as condições de amplificações proposta por Santos *et al.* (2016). Os fragmentos ITS amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo GelRed TM (Biotium Inc., EUA) e visualizados sob luz ultravioleta em um sistema de fotodocumentador (Loccus Biotechnology, Brasil). O DNA Ladder de 1 Kb (Promega, EUA) foi utilizado como marcador de peso molecular.

Os produtos amplificados foram sequenciados em ambas as direções usando os mesmos iniciadores de PCR em um sequenciador automático ABI 3500 XL (Life Technologies, EUA) de acordo com o método Sanger ou de terminação em cadeia (SANGER *et al.*, 1977) usando um kit de sequenciamento BigDye Terminator v3. 1 (Life Technologies, EUA). O sequenciamento foi realizado pela empresa Myleus Biotechnology, localizada em Belo Horizonte –MG, Brasil. Adicionalmente, a amplificação dos genes β -tubulina (Bt2a e Bt2b) foi utilizada para taxa de fungos com baixa variação intraespecífica de acordo com os protocolos estabelecidos por Godinho *et al.* (2013). Todas as sequências foram comparadas com

sequências depositadas no banco de dados GenBank usando um algoritmo de alinhamento local para sequências de nucleotídeos BLAST (*Basic Local Alignment Search*) (Altschul et al., 1990) e no banco de dados CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre*) (<http://www.cbs.knaw.nl>).

2.4 Screening xilanolítico e celulolítico da comunidade fúngica

A comunidade fúngica do trato digestório de *Triplectides* foi testada quanto à produção de xilanases e celulasas por meio de um *screening* em meio sólido contendo xilana ou carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. A produção da enzima é avaliada por meio do crescimento da linhagem em placa e a revelação do halo de hidrólise revelada por corante vermelho Congo (ZHANG et al., 2006). As linhagens foram reativadas em BDA e depois repicadas em triplicatas em meio com xilana (Xylan, Beechwood purified) e carboximetilcelulose (CMC) e elementos traços composto por (g L⁻¹): (C₆H₈O₇ • H₂O 50; ZnSO₄ • 7H₂O 50; Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ • 6H₂O 10; CuSO₄ • 5H₂O 2.5; MnSO₄ • H₂O 0.05; H₃BO₃ 0.05; Na₂MoO₄•2H₂O 0.05; Solução de sais: Na₃C₆H₅O₇ • 5H₂O 150; KH₂PO₄ 250; NH₄NO₃ 100; MgSO₄ • 7H₂O 10; CaCl₂ • 2H₂O 5) e biotina (0.1 mg ml⁻¹) 5 ml; 0.2 ml clorofórmio (VOGEL, 1956).

Após a coloração com vermelho Congo (0,25%) por 30 minutos e lavadas com NaCl (1M), por 15 minutos. Os fungos que apresentaram halo de cor mais clara ao redor da colônia no meio seletivo foram considerados produtores xilanase ou celulase. Foi utilizado um paquímetro digital para medir o diâmetro das colônias e dos halos. O índice enzimático (IE) foi determinado pela divisão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia (NOGUEIRA e CAVALCANTI, 1996).

2.5 Análise estatística

A diversidade foi medida por meio dos índices de Simpson (1-D), Shannon (H'), Margalef e Chao-1, que foram calculados para o número de larvas amostradas de riachos no Cerrado e na Floresta Amazônica. As larvas foram consideradas uma unidade amostral, sendo os biomas, e não os riachos, a variável de interesse. Os índices foram calculados com 95% de confiança usando o software PAST, versão 4.01 (HAMMER et al., 2001).

3. RESULTADOS

Um total de 49 isolados fúngicos foram obtidos de 21 larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceride) e identificados entre 32 espécies de 12 gêneros, além de 2 táxons

com taxonomia inconclusiva (Tabela 1). A média de isolados fúngicos por TD foi de 2,14 UFC/TD em riachos do Cerrado e 1,72 UFC/TD em riachos da Floresta Amazônica.

No Cerrado, foram obtidas 32 linhagens pertencentes a 23 espécies de 11 gêneros enquanto que em Floresta Amazônica foram obtidas 17 linhagens de 11 espécies de 5 gêneros. O gênero *Roussoella* só foi encontrado em TD de insetos em Floresta Amazônica, enquanto que sete gêneros só ocorreram em TD de insetos em riachos de Cerrado. O gênero *Penicillium* foi o mais frequente e teve ocorrência tanto em Cerrado quanto em Floresta Amazônica, com cerca de 20 linhagens (40%) isoladas de diferentes TD. Os gêneros *Cladosporium* (8%), *Talaromyces* (8%) e *Trichoderma* (8%) apresentaram frequência de ocorrência similar. Os gêneros *Aspergillus* e *Clonostachys*, com uma ocorrência cada, foram isolados apenas em Cerrado.

Entre as espécies, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium paxilli* e *Neopestaloptopsis formicarum* ocorreram em TD de larvas de riachos de Cerrado e Floresta Amazônica. Todas as outras espécies ocorreram em TD de larvas de *Triplectides* somente em um dos biomas, ou seja, 20 espécies ocorreram exclusivamente em Cerrado e 8 em Floresta Amazônica. As espécies mais frequentes foram *P. paxilli* em Cerrado, com 4 linhagens, e *T. palmae* em Floresta Amazônica, com 3 linhagens. Vinte e uma espécies, incluindo 4 espécies do gênero *Cladosporium*, 7 espécies de *Penicillium*, 3 espécies de *Trichoderma* e de *Diaporthe*, além de *Aspergillus stellatus*, *Myxospora musae*, *Paraphaeosphaeria areacearum*, *Clonostachys rosea* e *Roussoella mexicana* ocorreram como *singletons*.

Tabela 1. Identificação de fungos do TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) nos Biomas Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil e seus respectivos índices enzimáticos (IE).

Biomass	Código*	Linhagens	Nº de acesso GenBank	Nº. de pb analisados	Query cover (%)	Identidade (%)	Nº de depósito GenBank	IE** (Xilanase)	IE** (Celulase)
CERRADO	T5TA7	<i>Penicillium caseifulvum</i>	NR_163685.1	414	100	100	MT521710.1	1.14±0.04	1.04±0.01
	T5TA9	<i>Cladosporium kenpengii</i>	KY646222.1	399	100	99	MT521711.1	2.97±0.07	1.32±0.04
	T5TB4a	<i>Penicillium paxillii</i>	MH856391.1	380	100	100	MN737735.1	0	1.29±0.11
	T5TB5	<i>Penicillium vancouverense</i> ***	JN606663.1	369	97	97		1.14±0.06	1.08±0.55
	T5TB7	<i>Penicillium paxillii</i>	MH856391.1	499	100	99	MN737736.1	1.15±0.04	1.99±0.43
	T5TB14	<i>Talaromyces stollii</i> ***	JX315633.1	380	99	100		1.59±0.15	1.13±0.03
	T5TC1	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	NR_130679.1	402	100	100	MN737737.1	0	0
	T5TC2	<i>Penicillium mallochii</i>	NR_111674.1	395	99	99	MN737738.1	1.14±0.01	1.85±0.05
	T5TC3	<i>Penicillium mallochii</i>	NR_111674.1	459	100	100	MN737739.1	0	2.01±0.74
	T5TC4	<i>Trichoderma dorotheae</i>	MH863050.1	449	100	100	MN737740.1	0	0
	T5TC5	<i>Diaporthe passifloricola</i> ***	NR_147595.1	478	97	99		1.17±0.03	1.07±0.01
	T5TC6	Fungal species A						1.27±0.01	1.22±0.03
	T6TA1	<i>Trichoderma virens</i> ***	MH857855.1	330	100	100		0	1.06±0.02
	T6TA2	<i>Penicillium exudans</i>	NR_153273.1	340	100	100	MN737741.1	0	1.12±0.05
	T6TA3	<i>Cladosporium subuliforme</i>	MH864124.1	442	100	100	MT521712.1	2.89±0.38	2.12±0.36
	T6TA13	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	NR_145242.1	456	100	97	MT521713.1	0	1,07±0.02
	T6TB2	<i>Penicillium mallochii</i>	NR_111674.1	462	99	100	MN737742.1	1.07±0.01	1.38±0.02
	T6TC2	<i>Penicillium citrinum</i>	NR_121224.1	420	100	100	MN737743.1	1.16±0.05	1.38±0.03
	T6TC5	<i>Tallaromyces stollii</i>	NR_111781.1	475	100	100	MN737744.1	1.25±0.10	0
	T7TA1	<i>Penicillium citrinum</i>	MH856132.1	398	100	100	MN737745.1	0	1.63±0.04
	T7TA4	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	NR_130679.1	488	98	97	MT521714.1	1.33±0.18	0
	T7TB3.2	<i>Aspergillus stellatus</i>	NR_131287.1	399	100	100	MT521715.1	1.79±0.04	0

FLORESTA AMAZÔNICA		T7TB5	<i>Penicillium atrofulvum</i> ***	JN606677.1	318	100	100		0	1.58±0.33
		T7TC2	<i>Penicillium rubens</i>	NR_111815.1	461	100	100	MN737746.1	1.2±0.07	1.27±0.11
	IV	T9TA4	<i>Penicillium paxillii</i>	MH856391.1	468	100	100	MT521716.1	0	
		T9TC3	<i>C. verrucocladosporioides</i> ***	MH863939.1	434	100	100		1.88±0.05	1.34±0.04
		T9TC4	<i>Myxospora musae</i>	NR_155387.1	467	98	100	MN737747.1	0	1.49±0.07
		T10TA5B	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	423	99	100	MN737748.1	1.35±0.17	1.34±0.09
	V	T10TB2	<i>Cladosporium sp.</i> ***	LN834420.1	475	100	100		1.94±0.10	1.57±0.15
		T10TB3	<i>Paraphaeosphaeria areacearum</i>	NR_145166.1	483	98	100	MT521717.1	1.25±0.03	1.19±0.02
		T10TB4	<i>Trichoderma neotropicale</i>	MH865818.1	462	100	100	MT521718.1	0	0
		T10TC2	<i>Clonostachys rosea</i> ***	AF358160.1	274	100	96		1.23±0.04	1.09±0.01
		P2TA3	<i>Diaporthe stewartii</i>	MH855768.1	422	100	98	MT521719.1	0	0
	VI	P2TA6	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	315	100	100	MN737731.1	1.17±0.07	1.6±0.17
		P2TA11	<i>Roussoella soloni</i>	NR_145198.1	465	97	99	MT521720.1	0	0
		P2TA13	<i>Roussoella mexicana</i>	KT950848.1	253	100	100	MN401284	1.17±0.08	0
		P2TA15	<i>Penicillium cairnsense</i> ***	NR_121508.1	385	100	100		1.37±0.02	1.38±0.14
		P2TA18	<i>Roussoella soloni</i>	NR_145198.1	474	100	99	MT521721.1	1.31±0.10	0
		P2TB6	<i>Penicillium maximae</i>	NR_121343.1	463	100	100	MN737732.1	1.55±0.35	1.33±0.01
		P2TC9	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	427	97	100	MT521722.1	0	1.24±0.04
		P2TC12	<i>Diaporthe pterocarpicola</i>	NR_111713.1	379	92	100	MN737733.1	1.15±0.04	0
	VII	P4TA2	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	NR_145242.1	403	96	100	MT521723.1	1.11±0.03	1.04±0.02
	VIII	P6TC2	<i>Penicillium rolfsii</i>	MH856397.1	461	100	100	MN737734.1	0	1.13±0.09
		P6TC6	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i> ***	NR_145242.1	326	96	99		0	0
	IX	P7TB6	<i>Talaromyces palmae</i>	NR_103617.1	471	100	98	MT521724.1	0	0
		P7TB11	<i>Talaromyces palmae</i>	NR_103617.1	417	100	98	MT521725.1	0	1.19±0.08

P7TB15	<i>Penicillium caseifulvum</i>	NR_163685.1	413	100	100	MT521726.1	1.07±0.03	1.14±0.05
P7TC6	<i>Talaromyces palmae</i>	NR_103617.1	515	100	98	MT521727.1	1.27±0.10	0
P7TC7	Fungal species B						1.11±0.02	0

*Codificação fúngica da Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa CCR da Universidade Federal do Tocantins, Brasil; **Média aritmética ± desvio padrão; ***Identificado com β -tubulina e não depositado.

O índice Chao-1 mostrou que, em ambos os biomas, o número amostral ideal não foi alcançado. Devido a supervalorização de espécies consideradas únicas no cálculo de riqueza, o bioma Cerrado (54 espécie de fungos) apresentou uma estimativa de riqueza maior do que a Floresta Amazônica (15 espécies de fungos). O índice de riqueza de Margalef também foi maior em Cerrado, assim como os índices de Simpson e de diversidade de Shannon (Tabela 2).

Tabela 2. Número de insetos amostrados (n) e riqueza e diversidade de fungos filamentosos do TD de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) nos Biomas Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil.

Biomass		Coordenadas Geográficas	Lasvas amostradas (n)	Riqueza (S)	Chao -1	Margalef	Simpson (1 - D)	Shannon (H)
Cerrado	I	(10°03'33.40"S; 48°13'49.30"W)	n=3	10	54	6.5	0.95	3.06
	II	(10°03'53.60"S; 48°14'58.00"W)	n=3	7				
	III	(10°03'55.90"S; 48°14'57.70"W)	n=3	5				
	IV	(10°04'25.00"S; 48°13'29.10"W)	n=2**	3				
	V	(09°58'46.30"S; 48°17'03.20"W)	n=3	5				
		Riqueza	n= 14	23*				
Floresta Amazônica	VI	(03°23'25.2"S; 54°56'26.3"W)	n=3	7	15	3.7	0.90	2.34
	VII	(03°25'59.1"S; 54°54'59.6"W)	n=1**	1				
	VIII	(03°07'04.3"S; 55°03'49.5"W)	n=1**	1				
	IX	(03°33'48.2"S; 54°52'30.90"W)	n=2**	3				
		Riqueza	n= 7	11*				

*Valor total excluindo repetição de táxon. ** O número de amostras coletadas foi menor devido à falta de larvas durante a saída de campo.

Diferenças dos parâmetros físico-químicos da água dos 9 riachos amostrados foram detectadas entre áreas de Cerrado e Floresta Amazônica (Tabela 3). A altitude média dos riachos de Cerrado foi acima dos 400 m enquanto que os de Floresta Amazônica apresentaram altitude média de 99 m, por estarem na planície Amazônica. A temperatura média nos riachos de Cerrado foi mais baixa que nos de Floresta Amazônica, em cerca de 2 graus. As águas dos riachos da Floresta Amazônica apresentaram-se ácidas e com condutividade elétrica e turbidez mais elevadas.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos de riachos amostrados em Cerrado e Floresta

Amazônica, Brasil.

Parâmetros*	Cerrado	Floresta Amazônica
Altitude (m)	452.2 ± 94.16	99 ± 18.67
Temperatura (°C)	23.03 ± 23.03	25.84 ± 0.90
Turbidez	1.91 ± 1.04	2.83 ± 1.68
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	8.72 ± 0.21	8.71 ± 1.46
pH	6.46 ± 0.57	4.02 ± 0.13
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	6.97 ± 4.23	18.74 ± 0.64
Largura (m)	2.19 ± 1.25	3.01 ± 1.60
Profundidade (m)	0.14 ± 0.07	0.20 ± 0.11
Velocidade da correnteza (m s ⁻¹)	0.30 ± 0.10	0.21 ± 0.15

* Média aritmética ± desvio padrão.

Um total de 62% (Figura 5A) da comunidade fúngica do Cerrado apresentou atividade enzimática para xilanase e as linhagens *Cladosporium kenpeggii* MT521711.1 e *Cladosporium subuliforme* MT521712.1 apresentaram maiores valores Índices Enzimáticos (IE) (Tabela 1). E 78% apresentou atividade celulolítica e as linhagens com maiores valores de IE foram *Cladosporium subuliforme* MT521712.1 e *Penicillium mallochii* MN737739.1 (Tabela 1). Em Floresta Amazônica (Figura 5B), 71% das linhagens exibiram atividade xilanásica e 35% exibiram atividade celulolítica. Os maiores valores de IE foram mostrados pelas linhagens *Penicillium maximae* MN737732.1 para xilanase e *Penicillium paxilli* MN737731.1 para celulase (Tabela 1).

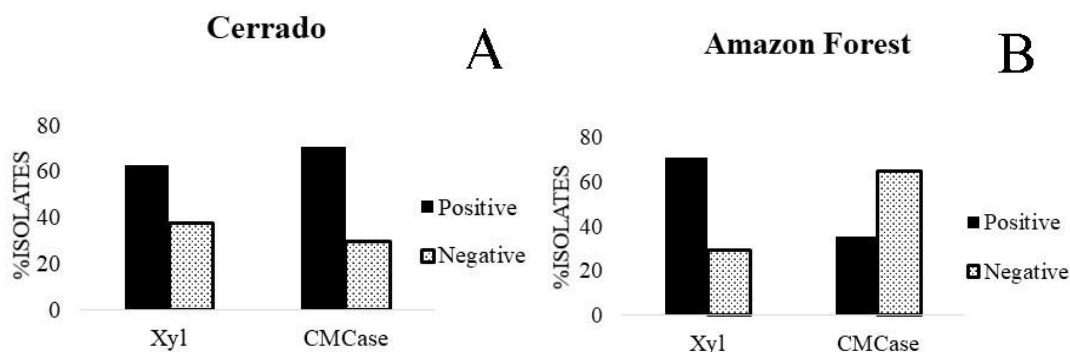


Figura 5. Porcentagem de isolados fúngicos do TD de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) nos biomas Cerrado (A) e Floresta Amazônica (B) produtores e não produtores de xilanase (Xyl) e celulase (CMCase).

4. DISCUSSÃO

O trato digestório de larvas de *Triplectides* encontradas em riachos de Floresta Amazônica e Cerrado abriga uma assembleia diversa de fungos, conforme demonstram os índices de diversidade (Tabela 2). Larvas de *Triplectides* sp. geralmente são encontradas em manchas de folhas localizadas no leito de riachos em poças d'água e são classificadas como grupo trófico

de trituradores de folhas (KIFFER et al., 2016). Portanto, espera-se que, ao alimentar-se de folhas, essas larvas ingerem uma variedade de microrganismos, incluindo fungos colonizadores desses substratos, que podem compor sua microbiota (MOHAMMED et al., 2018). Esse fenômeno é conhecido como condicionamento do material vegetal e pode ocorrer pela colonização fúngica da serrapilheira no ambiente. Esses fungos podem ser originários da própria planta e de solo e água após a abscisão das folhas. A sazonalidade afeta a queda de serrapilheira em biomas tropicais (Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Cerrado), efeito que possivelmente afeta a qualidade e a quantidade de substratos (:). Isso pode refletir na distribuição das espécies em seu microhabitat e também na escolha dos alimentos (ABOS et al., 2006). Como o presente estudo não foi selecionado o tipo de folha onde o inseto foi coletado (idade, senescência, estágio de decomposição, etc.), é possível que as larvas se alimentaram de folhas de diferentes tipos que provavelmente contêm diferentes comunidades microbianas, formando um microbioma diverso.

Outra possível origem da alta diversidade de grupos fúngicos no TD de larvas são as diferenças nas dietas das espécies e ciclos de vida dos insetos. Há fortes evidências de que os substratos determinam a microbiota intestinal das larvas e assim a diversidade da microbiota intestinal é totalmente relacionada com a dieta e os ciclos de vida de cada espécie de inseto (ARIAS-CORDERO et al., 2012; MOHAMMED et al., 2018; ALVES JÚNIOR et al., 2019). Estudos recentes mostram que a microbiotas diferem nos estágios de desenvolvimento larval (CHEN et al., 2016; GAO et al., 2018; YAO et al., 2019), com maior diversidade na fase inicial e maior riqueza na fase adulta (GAO et al., 2018). Uma vez que as larvas coletadas neste trabalho possivelmente estavam em estágios larvais distintos, um microbioma diversificado era esperado. Também a fisiologia e características físico-químicas dos TDs de insetos podem variar entre as espécies e, portanto, diferentes larvas podem hospedar distintas comunidades microbianas (CEJA-NAVARRO et al., 2014; MASON et al., 2017). No campo não é possível distinguir larvas de diferentes espécies de *Triplectides*, principalmente nos dois biomas onde há poucos estudos taxonômicos completos de insetos aquáticos, e a distinção das espécies é realizada pelo exame em fases adultas (PES et al., 2005).

A comunidade fúngica foi composta principalmente por *singletons*, ou seja, com baixa frequência de ocorrência de um grande número de espécies. Uma das possíveis explicações pode estar relacionada com a diversidade de substratos onde as larvas foram coletadas. Isso é apoiado pela literatura, pois a alta frequência de *singletons* pode ser relacionado com a alta diversidade de fungos associados a substratos vegetais (MARTINS et al., 2017; MALTA et al., 2019; FERREIRA et al., 2019). Também reforça as evidências de que as dietas de larvas do mesmo táxon de Trichoptera podem variar devido às diferenças na vegetação ciliar em seus

habitats aquáticos.

Um alto número de morfoespécies de fungos filamentosos por TD ($6,2 \pm 6,4$) de larvas de *Phylloicus* foi contado em riachos da Floresta Amazônica (SANTOS et al., 2018). No presente estudo, o número médio de táxons por TD foi 2,33, muito inferior ao valor relatado por Santos et al., (2018). Isso provavelmente se deve à alta diversidade do inseto gênero *Phylloicus* que apresenta 25 spp descritas para o Brasil (SANTOS et al., 2019). Este estudo, por sua vez, investigou o micobioma de *Triplectides*, que possui cerca de 14 espécies descritas no Brasil (PES et al., 2014). É altamente provável que o conjunto de larvas de *Triplectides* coletadas pertencia a um grupo mais restrito de espécies. Estudos (CLAIR, 1994; PIMENTEL et al., 2020) relatam *Phylloicus* e *Triplectides* pouco seletivos e a disponibilidade de alimentos é a maior influência em sua dieta. *Phylloicus* são detritívoros, sendo trituradores apenas para quebrar folhas para construção de abrigo (PIMENTEL et al., 2020), outra explicação pela maior diversidade de fungos em TD deste gênero em relação aos *Triplectides*.

Os presentes resultados indicaram taxa comuns em ambos os biomas, como é o caso do gênero *Penicillium*, que foi a mais frequente nesta pesquisa (40%) e ocorreu tanto no Cerrado quanto na Floresta Amazônica. O gênero *Penicillium* também foi encontrado no TD de larvas de *Phylloicus* nos mesmos locais dos biomas Cerrado e Floresta Amazônica (SANTOS et al., 2018) como também em larvas de *Triplectides*, *Phylloicus* e insetos aquáticos *Stenochironomus* em riachos amostrados em outro local da Floresta Amazônica no Estado do Amazonas, Brasil, juntamente com *Aspergillus* e *Trichoderma* (BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020a; BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020b). Além disso, a espécie *Paraphaeosphaeria areacearum*, encontrada no TD de *Triplectides* no Cerrado, foi também isolada no TD de *Phylloicus* nos mesmos locais no Cerrado no estudo de Santos et al. (2018). Assim, apesar das diferenças entre os fatores ambientais de cada bioma e ainda dentre as espécies larvais estudadas, tais espécies podem ter um micobioma em comum, formado por fungos ubíquos no ambiente, o que reforça a possibilidade de que esses fungos são importantes para os insetos.

Muitos dos táxons fúngicos encontrados no TD de *Triplectides* são de ampla ocorrência em ambientes aquáticos e terrestres (GUTIÉRREZ et al., 2015; SONG et al., 2018). O gênero *Penicillium* é amplamente encontrado na natureza, no solo e nas plantas, no ar e na vegetação em decomposição (GODINHO et al., 2015; MOHAMMADIAN et al., 2017). O gênero *Cladosporium* é muito diverso, comum e difundido, incluindo espécies endofíticas, patogênicas, fitopatogênicas e saprófitas (BENSACI et al., 2015).

As espécies mais frequentes foram *Penicillium paxilli* em Cerrado e *Talaromyces palmae* em Floresta Amazônica. A espécie *T. palmae* pertence a um grupo endofítico (SETTE et al., 2006), que inclui *P. paxilli* que foi primeiramente isolado de folhas

(RUKACHAISIRIKUL et al., 2007). Baseado nessas descobertas e considerando que a dieta de larvas de insetos é baseada em folhas, pode-se sugerir que alguns dos fungos na dieta dos insetos podem ser de origem endofítica ou epifítica. Os fungos endofíticos são um grupo muito diversificado presentes na maioria das plantas (MARQUES et al., 2018; RAMÍREZ-CAMEJO,) e, de acordo com Peay et al., (2016), a diversidade de fungos endofíticos associados às folhas é maior em florestas tropicais quando comparadas com escalas espaciais maiores. E alguns fungos endofíticos podem ser bons produtores de enzimas, como celulasas e xilanases (AMIRITA et al., 2012; CORRÊA et al., 2014).

A comunidade de fungos associada ao TD de *Triplectides* no Cerrado tem maior riqueza e diversidade do que os da Floresta Amazônica, que podem ser influenciados por vários fatores. Particularidades dos riachos como velocidade da correnteza, largura e profundidade (LANDEIRO et al., 2010) e as características das folhas são importantes e devem ser levadas em consideração em estudos sobre riachos tropicais (LI et al., 2009; LANDEIRO et al., 2010). A velocidade da correnteza também pode influenciar a alimentação de insetos que habitam riachos (BOYERO et al., 2006). Além disso, a taxonomia e a funcionalidade da composição de comunidades de Trichoptera no riachos de Cerrado podem ser determinados por fatores como estrutura física dos riachos e qualidade da água (FERREIRA et al., 2017). Isso pode explicar as diferenças na composição da comunidade fúngica do TD de larvas de *Triplectides* entre estes dois biomas. Os riachos da Floresta Amazônica e do Cerrado, além de possuir características abióticas e fisionomias distintas, podem hospedar diferentes espécies de *Triplectides*, resultando assim em diferentes micobiomas. No Cerrado, uma maior diversidade de espécies de *Triplectides* pode ter sido amostrada, pois catorze insetos foram amostrados no Cerrado, enquanto apenas sete foram coletados na Floresta Amazônica. Além desses, fatores como altitude, que foi diferente nos riachos estudados, pode ter uma influência. Segundo Camacho et al., (2009), a abundância e riqueza de espécies trituradoras variam com a altitude devido à variação de temperatura. De acordo com Casotti et al. (2015), as características das folhas podem induzir o comportamento de trituradores, como *Triplectides*, pois estes organismos são capazes de escolher os alimentos mais palatáveis. A vegetação do Cerrado tem folhas com ceras, cabelo e outras características (FANK-DE-CARVALHO et al., 2010) que os tornam menos saborosos do que a vegetação da floresta (LANDEIRO et al., 2010; REIS et al., 2019). Larvas de *Triplectides* podem se alimentar preferencialmente em folhas fortemente condicionadas por fungos em riachos do Cerrado, explicando a maior diversidade fúngica no Cerrado do que na Floresta Amazônica.

A ocorrência de fungos filamentosos produtores de celulasas e xilanases no TD de larvas de *Triplectides* indica que esses organismos podem desempenhar um papel na quebra da matéria

lignocelulósica ingerida pela larva. A porcentagem de linhagens produtoras de CMCase no Cerrado (78%) foi mais que o dobro da Floresta Amazônica (35%). As diferenças na composição da vegetação podem ter influenciado o perfil enzimático da comunidade fúngica nos biomas estudados, pois diferentes espécies de plantas hospedam diferentes espécies de fungos (FERREIRA et al., 2015). Também a menor palatabilidade de folhas do Cerrado pode explicar as diferenças nas capacidades enzimáticas dos fungos em folhas desses dois biomas. As porcentagens de linhagens que quebraram a xilana no Cerrado (62%) e na Floresta Amazônia (71%) indicam que a comunidade fúngica é mais xilanolítica do que celulolítica. Isso certamente se deve a característica do inseto *Triplectides* que se alimenta tanto de folhas como madeira (OLIVEIRA e PES, 2014; CORTEZ e GONÇALVES, 2015). E, como as paredes celulares das plantas são compostas de celulose, hemicelulose (principalmente xilana) e lignina (WALIA et al., 2017), a xilana requer várias enzimas xilanolíticas para hidrólise completa (OKEKE, 2014).

Neste trabalho, observou-se que alguns táxons são potencialmente maiores produtores de enzimas do que outros. Os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* exibiram os maiores índices enzimáticos para xilanase e celulase, tendo, neste caso, maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al., 2006). As espécies que tiveram os maiores índices foram *Cladosporium kenpeggii*, que é considerada novas espécies e pouco estudadas (MARIN-FELIX et al., 2017), bem como *Cladosporium subuliforme* (RAMOS-GARCÍA et al., 2016) e *Penicillium malochii* (RIVERA et al., 2012). De acordo com literatura, espécies de *Penicillium* podem produzir enzimas capazes de quebrar material lignocelulósico (ANDERSEN et al., 2016; MOHAMMED et al., 2018), bem como espécies de *Cladosporium* (ANDERSEN et al., 2016; MARQUES et al., 2018).

É provável que as larvas adquirem os fungos de suas dietas, que, juntamente com o ambiente onde vivem, impactam a formação do micobioma das larvas (YAO et al., 2019). Nesse caso, os fungos podem representar um item alimentar adicional, pois muitos fungos são considerados uma fonte razoável de aminoácidos e nitrogênio em dietas de insetos (MASON et al., 2017). Além de fazer parte da dieta larval, o papel simbiótico dessa comunidade fúngica pode estar relacionado com a ação de enzimas capazes de deslignificar o material constituído, principalmente, por celulose, hemicelulose (GAO et al., 2018; ALVES JÚNIOR et al., 2019), e xilanos, enriquecendo a dieta do inseto, exercendo assim um efeito nutricional (MOHAMMED et al., 2018). Nossos resultados apontam para a hipótese de que a comunidade fúngica encontrada no TD de larvas de *Triplectides* ajuda no processamento dos alimentos tanto quanto no condicionamento no ecossistema e no TD. A presença de fungos xilanolíticos e celulolíticos no TD de insetos trituradores aquáticos suporta a hipótese de um papel nutricional

dos fungos como um simbiote e reforça a importância dos estudos ecológicos para a descoberta do potencial biotecnológico para a produção de enzimas de novas linhagens de fungos para a ciência.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto Edital Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia nº 79/2013; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a Mayra F. N. P. Teixeira; a equipe do LAMBIO - Universidade Federal do Tocantins pelo suporte técnico; o pessoal do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos – LACIA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, especialmente Dra Neusa Hamada, Jeferson Oliveira da Silva e Dra Gizelle Amora Gusmão pelo trabalho de campo sobre coleta e identificação de larvas de *Triplectides*.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, PZ., PEREIRA, MG., CARVALHO, CC., HEINEN, PR., ZIOTTI, LS., MESSIAS, JM., JORGE, JA., POLIZELI, MLTM. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**. 17(3): e20170337. 2017 <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0337>.
- ALTSCHUL, SF., GISH, W., MILLER, W., MYERS, EW., LIPMAN, DJ. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215:403–410. 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ALVES JR., S.L., MÜLLER, C., BONATTO, C., SCAPINI, T., CAMARGO, AF., FONGARO, G., TREICHEL, H Bioprospection of enzymes and microorganisms in insects to improve second-generation ethanol production. **Industrial Biotechnology**. 15(6): 336–349. 2019. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>
- AMIRITA, A., SINDHU, P., SWETHA, J., VASANTHI, NS., KANNAN, KP Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World Journal of Science and Technology**. 2(2):13-19. 2012.
- ANDERSEN, B., POULSEN, R., HANSEN, GH. Cellulolytic and xylanolytic activities of common indoor fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 107:111–116. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.012>
- ARIAS-CORDERO, E., PING, L., REICHWALD, K., DELB, H., PLATZER, M., BOLAND, W Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, **Melolontha hippocastani**. **Plos One**. 7:12. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051557>

- BELMONT-MONTEFUSCO, EL., NACIF-MARÇAL, L., ASSUNÇÃO, EN., HAMADA, N., NUNES-SILVA, CG Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects. **Acta Amazonica**. 50: 346-354. 2020a. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000902>
- BELMONT-MONTEFUSCO, EL., OLIVEIRA, JB., MAR, HB., SANTA-ROSA, PS., HAMADA, N., NUNES-SILVA, CG Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus* Kieffer (Insecta: Diptera: Chironomidae) **Brazilian Journal of Development**. 6: 28644-28651. 2020b. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-347>
- BENSACI, OA., DAOUD, H., LOMBARKIA, N., ROUABAH, K., CURTIS, MA Formulation of the endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* Berk. isolated from *Euphorbia bupleuroides* subsp. *luteola*, as a new biocontrol tool against the black bean aphid (*Aphis fabae* Scop.). **Journal of Plant Protection Research**. 55(1):80–87. 2015. <https://doi.org/10.1515/jppr-2015-0011>
- BOUCIAS, DG., LIETZE, VU., TEAL, P Chemical signals that mediate insect-fungal interactions. **Biocommunication of Fungi**. 305–336. 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4264-2_20
- BOYERO, L., PEARSON, RG., CAMACHO, R Leaf breakdown in tropical streams: the role of different species in ecosystem functioning. **Archiv Für Hydrobiologie**. 16(4):453 - 466. 2006. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2006/0166-0453>
- BURGHOORN, HP., SOTEROPOULOS, P., PADERU, P., KASHIWAZAKI, R., PERLIN, DS Molecular evaluation of the plasma membrane proton pump from *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46:615-624. 2002. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.615-624.2002>
- CAMACHO, R., BOYERO, L., CORNEJO, A., IBANEZ, A., PEARSON, RG Local variation in shredder distribution can explain their oversight in tropical streams. **Biotropica**. 41(5): 625–632. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2009.00519.x>
- CASOTTI, CG., KIFFER JR., WP., MORETTI, MS Leaf traits induce the feeding preference of a shredder of the genus *Triplectides Kolenati*, 1859 (Trichoptera) in an Atlantic Forest stream, Brazil: a test with native and exotic leaves. **International Journal of Freshwater Entomology**. 36:43-52. 2015. <https://doi.org/10.1080/01650424.2014.1001399>
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 42: 65–72. 1939.
- CEJA-NAVARRO, JA, NGUYEN, NH., KARAOZ, U., GROSS, SR., HERMAN, DJ., ANDERSEN, GL., BRUNS, TD., PETT-RIDGE, J., BLACKWELL, M., BRODIE, EL Compartmentalized microbial composition, oxygen gradients and nitrogen fixation in the gut of *Odontotaenius disjunctus*. **The ISME Journal**. 1–13. 2013. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.134>
- CHEN, B., TEH, B.S., SUN, C., HU, S., LU, X., BOLAND, W., SHAO, Y. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. **Scientific Reports**. 6:1. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep29505>
- CORRÊA, RCG., RHODEN, SA., MOTA, TR., AZEVEDO, JL., PAMPHILE, JA., SOUZA, CGM. et al., Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**. 41:1467–1478. 2014.

<https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>

CORTEZ, VG. and GONÇALVES, RB. Guia da biodiversidade de Palotina. UFPR, 86. 2015.

DOUGLAS, AE Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology** 60: 17-34. 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>

ENGEL, P and MORAN, NA The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**. 37(5), 699–735. 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>

FANK-DE-CARVALHO, SM., GOMES, MRA., SILVA, PIT., BÃO, SN Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. **Biocell**. 34(1): 23-35. 2010. <https://doi.org/10.32604/biocell.2010.34.023>

FERREIRA, EMS., SOUSA, FMP., ROSA, LH, PIMENTA, RS Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. **Extremophiles**. 23:151–159. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1069-9>

FERREIRA, WR., HEPP, LU., LIGEIRO, R., MACEDO, DR., HUGHES, RM., KAUFMANN, PR., CALLISTO, M Partitioning taxonomic diversity of aquatic insect assemblages and functional feeding groups in neotropical savanna headwater streams. **Ecological Indicators**. 72:365–373. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.042>

FERREIRA, WR., LIGEIRO, R., MACEDO, DR., HUGHES, RM., KAUFMANN, PR., OLIVEIRA, LG., CALLISTO, M Is the diet of a typical shredder related to the physical habitat of headwater streams in the Brazilian Cerrado? **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**. 51:115–127. 2015. <https://doi.org/10.1051/limn/2015004>

GAO, G., GAO, J., HAO, C., DAI, L., CHEN, H Biodiversity and activity of gut fungal communities across the life history of *Trypophloeus klimeschi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **International Journal of Molecular Sciences**. 19:7. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19072010>

GIBSON, CM and HUNTER, MS 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. **Ecology Letters**. 13: 223–234. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01416.x>.

GODINHO, VM., FURBINO, LE., SANTIAGO, IF., PELLIZZARI, FM., YOKOYA, NS. et al., Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME Journal**. 7:1434e1451. 2013. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.77>

GODINHO, VM., GONÇALVES, VN., SANTIAGO, IF., FIGUEREDO, HM., VITORELI, GA., SCHAEFER, CEGR., ROSA, LH Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**. 19(3):585–596. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0741-6>

GRAÇA, MAS., CRESSA, C., GESSNER, MO., FEIO, MJ., CALLIES, KA., BARRIACHOS, C Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. **Freshwater Biology**. 46(7): 947–957. 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

[2427.2001.00729.x](#)

GRAÇA, MAS., HYDE, K., CHAUVET, E Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical – subtropical low order streams. **Fungal Ecology**. 19:182–189. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.08.001>

GUTIÉRREZ, MH., GALAND, PE., MOFFAT, C., PANTOJA, S Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. **Environmental Microbiology**. 17(10):3882–3897. 2015. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12872>

HAMADA, N., NESSIMIAN, JL., QUERINO, RB Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. Editora: INPA. 400. 2014.

HAMMER, O., HARPER, DAT., RYAN, PD PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**. 4:1-9. 2001.

JABIOL, J and CHAUVET, E Fungi are involved in the effects of litter mixtures on consumption by shredders. **Freshwater Biology**. 57: 1667–1677. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02829.x>

KWONG, WK., MORAN, NA Gut microbial communities of social bees. **Nature Reviews Microbiology**, 14(6):374–384. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>

KIFFER, WP., MENDES, F., RANGEL, JV., BARBOSA, P., SERPA, K., MORETTI, MDAS Size-mass relationships and the influence of larval and case size on the consumption rates of *Triplectides* sp. (Trichoptera, Leptoceridae). **Fundamental and Applied Limnology / Archiv Für Hydrobiologie**, 188(1):73–81. 2016. <https://doi.org/10.1127/fal/2016/0855>

LANDEIRO, VL., HAMADA, N., GODOY, BS., MELO, AS Effects of litter patch area on macroinvertebrate assemblage structure and leaf breakdown in Central Amazonian streams. **Hydrobiologia**. 649(1):355–363. 2010. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0278-8>

LEÓN, AV-P., SANCHEZ-FLORES, A., ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ-ROMERO, E Fungal community associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. **Front Microbiology**. 7:1–15. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00954>

LI, AOY., NG, LCY., DUDGEON, D Influence of leaf toughness and nitrogen content on litter breakdown and macroinvertebrates in a tropical stream. **Aquatic Sciences** 71: 80–93.2009. <https://doi.org/10.1007/s00027-008-8117-y>

MALTA, CM., FERREIRA, EMS., SILVA, TH., OLIVEIRA, DAB., SILVA, FMP., PIMENTA, RS Isolation of epiphytic yeasts from *Eugenia dysenterica* DC. fruits and evaluation of their antimicrobial activity against phytopathogenic fungi. **Boletim Museu Para. Emílio Goeldi. Ciencias Naturais**.14: 223-231. 2019.

MARIN-FELIX, Y., GROENEWALD, JZ., CAI, L., CHEN, Q., MARINCOWITZ, S et al., Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies In Mycology**. 86: 99–216. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>

MARQUES, NP., PEREIRA, JC., GOMES, E., SILVA, R., ARAÚJO, AR., FERREIRA, H., RODRIGUES, A., DUSSÁN, KJ., BOCCHINI, DA. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic

saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, 122: 66–75. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>

MARTINS, RT., MELO, AS., GONÇALVES JR., JF., CAMPOS, CM., HAMADA, N Effects of climate change on leaf breakdown by microorganisms and the shredder *Phylloicus elektoros* (Trichoptera: Calamoceratidae). **Hydrobiologia**. 789: 31–44. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2689-7>

MASON, CJ., LONG, DC., MCCARTHY, EM., NAGACHAR, N., ROSA, C., SCULLY, ED., HOOVER, K Within gut physicochemical variation does not correspond to distinct resident fungal and bacterial communities in the tree-killing xylophage, *Anoplophora glabripennis*. **Journal of Insect Physiology**. 102, 27–35. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.003>

MOHAMMADIAN, E., BABAI AHARI, A., ARZANLOU, M., OUSTAN, S., KHAZAEI, SH Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. **Chemosphere**. 185:290–296. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.022>

MOHAMMED, WS., ZIGANSHINA, EE., SHAGIMARDANOVA, EI., GOGOLEVA, NE., ZIGANSHIN, AM Comparison of intestinal bacterial and fungal communities across various xylophagous beetle larvae (Coleoptera: Cerambycidae). **Scientific Reports**. 8:10073. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27342-z>

NOGUEIRA, EBS and CAVALCANTI, MAQ Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**. 27:7-9. 1996.

OKEKE, BC Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High β -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 174(4):1581-1598. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1121-x>

OLIVEIRA, AN., OLIVEIRA, LA., ANDRADE, JS., CHAGAS JÚNIOR, AF Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26(4): 853-860. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400022>

OLIVEIRA, VC and PES, AMO Inventário da fauna de insetos aquáticos: coleta, preservação e criação. In: HAMADA, N., NESSIMIAN, JL., QUERINO, RB 2014. Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. INPA. 167. 2014.

OLIVEROS, JC Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Available from :<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> 2007-2015

PEAY, KG., KENNEDY, PG., TALBOT, JM Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**. 14(7):34–447. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>

PES, AMO., HAMADA, N., NESSIMIAN, JL Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera. **Revista Brasileira de Entomologia**. 49(2): 181-204. 2005.

PES, AMO., SANTOS, APM., BARCELOS-SILVA, P., CAMARGOS, LM 2014. Ordem Trichoptera. In: HAMADA, N., NESSIMIAN, JL., QUERINO, RB. Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. INPA. 391. 2014.

PIMENTEL, DR., COUCEIRO, SRM., SALCEDO, AKM. Diet of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) caddisfly larvae in forest streams of western Pará, central Brazilian Amazonia. **Acta Limnologica Brasiliensia**. 32:13. 2020. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X0119>

PRESA ABOS, C., LEPORI, F., MCKIE, BG., MALMQVIST, B. Aggregation among resource patches can promote coexistence in stream-living shredders. **Freshwater Biology**. 51:3. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01509.x>

RAMÍREZ-CAMEJOA, LA. Diversity of culturable endophytic fungi vary through time in *Manihot esculenta* Crantz. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 84, e253156. 2024, <https://doi.org/10.1590/1519-6984.253156>

RAMOS-GARCÍA, B., SHAGARODSKY, T., SANDOVAL-DENIS, M., ORTIZ, Y., MALOSSO, E. et al., Morphology and phylogeny of *Cladosporium subuliforme*, causing yellow leaf spot of pepper in Cuba. **Mycotaxon**. 2016.. 131(3):693–702. <https://doi.org/10.5248/131.693>

RAYMANN, K and MORAN, NA The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. **Current Opinion in Insect Science**. 26:97–104. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>

REIS, DF., MACHADO, MMD., COUTINHO, NP., RANGEL, JV., MORETTI, MS., MORAIS, PB. Feeding preference of the shredder *Phylloicus* sp. for plant leaves of *Chrysophyllum oliviforme* or *Miconia chartacea* after conditioning in streams from different biomes. **Brazilian Journal Biology**, vol. 79, no. 1, pp.22-28. 2019. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.170644>.

RIVERA, KG., DÍAZ, J., CHAVARRÍA-DÍAZ, F., GARCIA, M., URB, M., THORN, RG., SEIFERT, KA. *Penicillium mallochii* and *P. guanacastense*, two new species isolated from Costa Rican caterpillars. **Mycotaxon**. 119(1):315–328. 2012. <https://doi.org/10.5248/119.315>

RUKACHAISIRIKUL, V., KAEOBAMRUNG, J., PANWIRIYARAT,W., SAITAI, P., SUKPONDMA, Y., PHONGPAICHIT, S., SAKAYAROJ, J A new pyrone derivative from the endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 55(9):1383-1384. 2007. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.1383>

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74:5463–5467. 1977

SANTOS, APM., CALOR, AR., DUMAS, L.L., PES, AMO., SOUZA, WRM., HENRIQUES-OLIVEIRA, AL., CAMARGOS, LM Trichoptera in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Available from: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/278> 2019.

SANTOS, TT., LEITE, TS., QUEIROZ, CB., PEREIRA, OL., QUEIROZ, MV High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. 120: 388-401. 2015. <https://doi.org/10.1111/jam.12985>

SANTOS, TT., OLIVEIRA, KA., VITAL, MJS., COUCEIRO, SRM., MORAIS, PB

Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciencias Naturais**. 13: 317-325. 2018.

SETTE, LD., PASSARINI, MRZ., DELARMELINA, C., SALATI, F., DUARTE, MCT Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 22(11):1185–1195. 2006. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2>

SIX, DL Ecological and Evolutionary determinants of bark beetle-fungus symbioses. **Insects**. 3:339–366. 2012 <https://doi.org/10.3390/insects3010339>

SONG, P., TANABE, S., YI, R., KAGAMI, M., LIU, X., BAN, S Fungal community structure at pelagic and littoral sites in Lake Biwa determined with high-throughput sequencing. **Limnology**. 19(2): 241–251. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10201-017-0537-8>

ST CLAIR, RM Diets of some larval Leptoceridae (Trichoptera) in South-eastern Australia. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**. 45:1023–32. 1994. <https://doi.org/10.1071/MF9941023>

TONIN, AM., GONÇALVES, JF., BAMBI, P., COUCEIRO, SRM., FEITOZA, LAM., FONTANA, LE., BOYERO, L Plant litter dynamics in the forest-stream interface: precipitation is a major control across tropical biomes. **Scientific Reports**. 7:1. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10576-8>

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**. 13:42–43. 1956.

WALIA, A., GULERIA, S., MEHTA, P., CHAUHAN, A., PARKASH, J Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. 3 **Biotech**. 7:11 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>

WHITE, TJ., BURNS, TD., LEE, SB., TAYLOR, JW Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, MA., GELFAND, DH., SNINSKY, JJ., WHITE, TJ. PCR Protocols. Academic Press, 315-322. 1990.

YAO, Z., MA, Q., CAI, Z., RAZA, MF., BAI, S., WANG, Y., ZHANG, H Similar shift patterns in gut bacterial and fungal communities across the life stages of *Bactrocera minax* larvae from two field populations. **Frontiers in Microbiology**. 10. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02262>

ZHANG, YHP., HIMMEL, ME., MIELENZ, JR Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. 24: 452–481. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>

CAPÍTULO II

Produção de enzimas xilanolíticas e xilooligossacarídeos por *Penicillium caseifulvum*

MT521726.1 no TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae)

Artigo em preparação para submissão em periódico específico.

Produção de enzimas xilanolíticas e xilooligossacarídeos por *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 isolado do TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae)

Mayra Ferreira Netto Parro Teixeira¹, Cintia Ribeiro de Souza², Alex Fernando de Almeida³, Paula Benevides de Moraes¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa, Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Palmas, Quadra 109 Norte, Av. NS 15, ALCNO 14 s/n, Bloco II, sala 05, Palmas, Tocantins Postal Code: 77001-090, Brasil

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Gurupi, Brasil

³Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, Brasil

Autor correspondente: Paula Benevides de Moraes: moraisspb@uft.edu.br

RESUMO

A degradação da hemicelulose requer as enzimas endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), produzindo açúcares redutores denominados xilooligossacarídeos (XOS), como xilopentaose, xilotetraose, xilotriose, xilobiose e o monossacarídeo xilose. Os XOS são considerados prebióticos e alimentos funcionais, como a xilobiose e tem ganhado muita atenção nos últimos anos devido aos benefícios aos humanos. Este trabalho tem como objetivo descrever a produção simultânea de xilanases e XOS a partir de farelo de trigo e por espécies fúngicas isoladas do trato digestório (TD) de larvas do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae), bem como testar a imobilização de xilanase extracelular de *Penicillium caseifulvum* MT521726.1, pois a eficiência catalítica da enzima é uma característica muito importante para a sua comercialização. Como resultados, mostramos que 81% dessa comunidade fúngica produziu xilanase. Os isolados fúngicos *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 e espécie Fúngica A apresentaram as maiores concentrações de xilobiose 16,8 mg/mL e 16,3 mg/mL, respectivamente. Este é o primeiro relato de *Penicillium caseifulvum* em teste quantitativo para a produção de xilanase e XOS. E *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 mostrou-se uma espécie promissora para estudos futuros que visem a obtenção desses produtos.

Palavras-chave: xilanase; xilooligossacarídeos; fungo filamentoso; cultivo submerso.

ABSTRACT

The degradation of hemicellulose requires the enzymes endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) and 1,4- β -xylosidase (EC 3.2.1.37), producing reducing sugars called xylooligosaccharides (XOS), such as xylopentaose, xylotetraose, xylotriose, xylobiose, and the monosaccharide xylose. XOS are considered prebiotics and health foods such as xylobiose and have gained a lot of attention in recent years due to their benefits to humans. This work aims to describe the simultaneous production of xylanases and XOS from wheat bran and by fungal species that care for the digestive tract (DT) of larvae of the genus *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae), as well as to test the immobilization of extracellular xylanase of *Penicillium caseifulvum* MT521726.1, as the catalytic efficiency of the enzyme is a very important characteristic for its distribution. As results, we showed that 81% of this fungal community produced xylanase. Fungal isolates *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 and Fungal A species showed the highest xylobiose

concentrations of 16.8 mg/mL and 16.3 mg/mL, respectively. This is the first report of *Penicillium caseifulvum* in a quantitative test for xylanase and XOS production. The *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 is a promising species for future studies aimed at obtaining these products.

Keywords: xylanase; xylooligosaccharides; filamentous fungus; submerged cultivation.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da microbiota do trato digestório (TD) de insetos aquáticos é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias e tecnologias para utilização desses microrganismos em processos biotecnológicos. Diversos estudos vêm demonstrando a presença de fungos filamentosos em TD de insetos que se alimentam de madeira ou detritos vegetais (ENGEL & MORAN, 2013; LEÓN et al. 2016; SANTOS et al. 2018; BELMONT-MONTEFUSCO et al., 2020; TEIXEIRA et al 2022; SOUZA et al. 2022). Estudos sobre a diversidade fúngica do TD de insetos podem esclarecer o papel dos fungos na fisiologia do hospedeiro (GAO et al. 2018), como também trazer ao conhecimento o potencial enzimático dessas comunidades fúngicas.

Os fungos filamentosos possuem capacidade de produção de enzimas extracelulares (TROIANO et al. 2020) e têm sido utilizados como um dos maiores produtores de enzimas industriais nos últimos 5 anos (TYAGI & SHARMA, 2021). As xilanases são um grupo diversificado de enzimas responsáveis pela hidrólise do xilano, principal componente da hemicelulose vegetal (IRFAN et al., 2020; QESHMI et al., 2020; PUCHART et al., 2021). As xilanases podem ser aplicadas em diversas áreas como na indústria de alimentos, rações animais, fabricação de cerveja, vinificação, refinação de biomassa, têxtil, celulose e indústrias de papel, bem como na agricultura e lavanderia (COLLINS et al., 2005; PERALTA et al., 2017; BASIT et al., 2020).

A degradação da hemicelulose requer as enzimas endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -xilosidase (EC3.2.1.37), produzindo açúcares redutores denominados xilooligossacarídeos (XOS), como xilopentose, xilotetraose, xilotriose, xilobiose, e o monossacarídeo xilose (WALIA et al., 2017; AMORIM et al 2019b; NASCIMENTO et al. 2019). Os XOS podem ser obtidos a partir da fração do xilano de materiais lignocelulósicos ou por métodos físico-químicos ou enzimáticos (CHAPLA et al., 2012; NIETO-DOMINGUEZ et al., 2017; AMORIM et al. 2019b). Em comparação com outras técnicas para obtenção de XOS, a hidrólise enzimática com xilanases possui algumas

vantagens, como condições mais brandas de reação, especificidades e maior rendimento (GUIDO et al., 2019).

Os XOS são considerados prebióticos e alimentos funcionais, como a xilobiose (QESHMI et al. 2020), e tem ganhado muita atenção nos últimos anos devido aos benefícios aos humanos como manutenção da saúde intestinal (GUIDO et al., 2019), além da estabilidade ao calor e pH, e, ainda, possuir propriedades organolépticas (AMORIM et al., 2019a). A xilobiose é usada, também, como um adoçante e como suplemento dietético com ações anti-inflamatórias (PUCHART et al., 2021)

O uso de biomassa lignocelulósica industrial, tais como a palha de milho, trigo, arroz, talos de tabaco e algas, tem sido bastante explorado como substrato para meio de crescimento para microrganismos, pois possui baixo custo, é renovável e abundante (AMORIM et al. 2019a; QESHMI et al. 2020; MADHAVAN et al. 2022). Esses materiais lignocelulósicos possuem potencial de bioconversão em produtos de alto valor agregado, como açúcares, ácidos orgânicos, oligossacarídeos e biocombustíveis (QESHMI et al. 2020; OKOLIE et al., 2020).

Este trabalho tem como objetivo descrever a produção simultânea de xilanase e XOS a partir de farelo de trigo por espécies fúngicas isoladas do trato digestório (TD) de larvas do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae), bem como testar a imobilização de xilanase extracelular do isolado MT521726.1 de *Penicillium caseifulvum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fonte e identificação dos isolados fúngicos

Os fungos filamentosos apresentados nesse estudo foram isolados do TD de larvas do gênero *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) coletadas em riachos de baixa ordem do bioma Cerrado (Tocantins, Brasil) e em Floresta Amazônica (Pará, Brasil) e a sua identificação molecular foi realizada conforme Teixeira et al. (2022). Esses isolados fúngicos foram mantidos em armazenamento, segundo adaptações de Castellani (1967).

2.2 Produção de xilanase em cultivo submerso

A comunidade fúngica do trato digestório de larva de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) foi testada quanto à produção de xilanases por meio de cultivo submerso contendo 19 mL de meio basal ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 50; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 50; $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 10; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2.5; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05; H_3BO_3 0.05; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05; Solução de sais: $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$ 150; KH_2PO_4 250; NH_4NO_3 100; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5) mg mL⁻¹ e

biotina (0.1 mg ml^{-1}) 5 mL; 0.2 mL clorofórmio (VOGEL 1956) e 1% de farelo de trigo (granulação máxima de 1 mm) como fonte de carbono. A concentração do inóculo foi de 10^3 cel/mL em suspensão em NaCl 1% e 1 mL desta suspensão foi inoculado nos cultivos submersos. O cultivo foi incubado por 5 dias, 30°C e 180 rpm, em triplicata. Após o período de incubação, os extratos foram filtrados em papel filtro com auxílio de funil de Buchner, kitassato e bomba a vácuo.

2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática de xilanase foi detectada pela formação de açúcares redutores a partir do substrato xilana, pelo método do DNS (MILLER, 1959). A mistura da reação foi composta com 0,6 mL de solução de substrato xilana de birchwood 1% (p/v) em tampão McIlvaine, pH 5,0. A reação foi iniciada com a adição de 0,6 mL do extrato enzimático (extrato bruto) e os tubos mantidos em banho maria a 50°C , onde as alíquotas de 0,1 mL foram retiradas nos tempos 0 e 5 minutos e adicionadas a 0,3 mL de DNS, paralisando a reação. As amostras foram fervidas por 5 minutos, resfriadas e em seguida adicionou-se 3 mL de água. O espectrofotômetro foi calibrado com meio reacional sem o extrato enzimático e as leituras foram realizadas a 540 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de xilose por mililitro, a cada minuto de reação. A quantidade de açúcares redutores liberados foi estimada de acordo com a curva padrão da xilose.

2.4 Determinação de xilooligossacarídeos

Os extratos de cultivo obtidos das 33 linhagens fúngicas foram preparados para a etapa de filtragem utilizando filtro de seringa de membrana com $0,22 \mu\text{m}$. Os xilooligossacarídeos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, usando uma coluna e pré coluna Eurokat H, KNALIER, equipamento Agilent Modelo 1260 Infinity II. A temperatura da coluna foi de 60°C , usando água ultrapura com mais 5% de ácido sulfúrico como eluente com o fluxo de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e um detector de índice de refração a 40°C . A concentração de xilooligossacarídeos foi quantificada usando as curvas de calibração de xilose (X) e xilobiose (X2).

2.5 Cinética da produção de xilanase em cultivos submersos

Dois isolados fúngicos, *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 e Espécie fúngica A, que se destacaram na produção de xilobiose, foram testados quanto à produção de xilanase por meio de cultivo submerso nas mesmas condições da produção de xilanase descrita anteriormente,

porém mantidos por 192 horas em rotação, para avaliação da produção em função do tempo. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para realização da atividade enzimática xilanásica.

2.6 Imobilização da enzima bruta

A xilanase extracelular bruta produzida por *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 foi imobilizada de acordo com a adaptação da metodologia de Araújo et al. (2022). Onde 10 g de resina Aniônica Purolite A400 foi mantida em 25 mL de água destilada com pH 5,5, por 24 horas, a 25°C, 100 rpm. Foi realizada a filtração e a secagem em dessecador por 24 h. A funcionalização do suporte se deu com Glutaraldeído (GLU), onde foram utilizados 2 g de resina, 18 mL de GLU, pH 5,5, 25 °C, 18 h, 100 rpm. Após a filtração, foi lavada em água 5 vezes e a secagem foi realizada em dessecador por 24 h. Ensaios de imobilização foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo 1 g de partículas de resina funcionalizada com GLU em 10 mL de extrato enzimático bruto a 25 °C, 125 rpm e pH 7 por 24 h em plataforma rotativa. Ao final da imobilização, as amostras foram filtradas e armazenadas a 4° C e o caldo congelado para ensaios posteriores.

2.7 Parâmetros de imobilização

O rendimento da imobilização (RI) foi calculado de acordo com a Equação (1) medindo as unidades de atividade enzimática no sobrenadante antes e depois dos ensaios de imobilização (ARAÚJO et al., 2022). A porcentagem de atividade recuperada (AR) foi calculada de acordo com Equação (2) depois de determinar a atividade da enzima imobilizada e comparando-a com o número de unidades enzimáticas que desapareceram do sobrenadante (teoricamente imobilizado).

$$RI(\%) = \frac{Ati - Atf}{Ati} \times 100 \quad (1)$$

$$AR(\%) = \frac{AtD}{DA} \times 100 \quad (2)$$

Onde Ati e Atf são a atividade xilanásica (U/mL) do sobrenadante medido antes e depois da imobilização, respectivamente. AtD (U) é a atividade enzimática de xilanase aparente obtida pela medida direta de enzima imobilizada para 1 g de suporte e DA (U) é a atividade desaparecida do sobrenadante, medida antes e depois da imobilização (Ati e Atf) multiplicado pelo volume da solução enzimática (mL) usada para imobilização.

2.8 Determinação de T e pH ótimos de atividade

Para determinação do pH e Temperatura ótimos de atividade do extrato bruto e imobilizado foi realizado um planejamento DCCR 2² utilizando o *software* Statistica® versão 7.0 (StatSoft. Inc. 2007, USA). Para tanto foram utilizadas as duas variáveis pH e Temperatura com valores reais e codificados, expressos na Tabela 4. Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine com pH de 3 a 8. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato enzimático, quanto para a diluição das amostras. A atividade foi determinada nas temperaturas de 20 a 70°C, conforme descrito anteriormente. O teste foi realizado com nível de 5% de significância.

Tabela 4. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2² para determinação de pH e Temperatura ótimos do extrato bruto e imobilizado.

	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3	3,7	5,5	7,3	8
Temperatura °C	20	27	45	63	70

3. RESULTADOS

A fim de explorar o potencial xilanolítico extracelular e a sua aplicação, as linhagens foram cultivadas em meio basal contendo farelo de trigo e os respectivos extratos brutos foram caracterizados quanto a xilanase, xilose e xilobiose. Observa-se que 81% dessa comunidade fúngica produziu xilanase em cultivo submerso (Tabela 5). Os isolados *Penicillium rubens* MN737746.1, *Talaromyces palmae* MT521727.1 e *Penicillium paxilli* MN737731.1 apresentaram maior produção de xilanase 5,31 U/mL, 3,12 U/mL e 2,45 U/mL, respectivamente. Algumas linhagens não apresentaram produção de xilanase, como foi o caso de *Cladosporium kenpeggii* MT521711.1, *Penicillium mallochii* MN737738.1, *Diaporthe passifloricola*, *Byssochlamys spectabilis* MT521714.1, *Penicillium atrofulvum* e *C. verrucocladosporioides*.

Apenas a Espécie Fúngica A apresentou uma concentração de xilose maior que 1 mg/mL. As linhagens *Cladosporium kenpeggii* MT521711.1, *Penicillium paxilli* MN737735.1, *Trichoderma dorotheae* MN737740.1, Espécie Fúngica A, *Penicillium exudans* MN737741.1, *Cladosporium subuliforme* MT521712.1, *Aspergillus stellatus* MT521715.1, *Clonostachys rosea*, *Penicillium paxilli* MN737731.1, *Roussoella mexicana* MN401284, *Diaporthe pterocarpicola* MN737733.1, *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 e Espécie Fúngica B apresentaram concentração de xilobiose maior que 11 mg/mL, destacando-se os

isolados fúngicos *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 e espécie Fúngica A que apresentaram as maiores concentrações de xilobiose 16,8 mg/mL e 16,3 mg/mL, respectivamente.

Tabela 5. Produção de xilanase, xilose e xilobiose por linhagens fúngicas do TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae).

Taxa/ Nº de acesso GenBank	Query cover (%)	Nº de pares de base analisados	Identificaçã o (%)	Código de depósito GenBank	Xilanase (U/ml)	Xilose (mg/ml)	Xilobiose (mg/ml)
<i>Penicillium caseifulvum</i> (NR_163685.1)	100	414	100	MT52171 0.1	1,59	0,15	4,19
<i>Cladosporium kenpeggii</i> (KY646222.1)	100	399	99	MT521711 .1	0	0,28	12,78
<i>Penicillium paxillii</i> (MH856391.1)	100	380	100	MN73773 5.1	1,45	0,53	14,99
<i>Penicillium vancouverense*</i> (JN606663.1)	97	369	97		1,32	0,36	9,91
<i>Talaromyces stollii*</i> (JX315633.1)	99	380	100		0,47	0,41	7,59
<i>Penicillium mallochii</i> (NR_111674.1)	99	395	99	MN73773 8.1	0	0,12	3,29
<i>Trichoderma dorotheae</i> (MH863050.1)	100	449	100	MN73774 0.1	1,32	0,40	11,50
<i>Diaporthe passifloricola*</i> (NR_147595.1)	97	478	99		0	0,20	9,38
<i>Fungal species A**</i>					0,40	1,39	16,26
<i>Trichoderma virens *</i> (MH857855.1)	100	330	100		0,73	0,18	6,11
<i>Penicillium exudans</i> (NR_153273.1)	100	340	100	MN73774 1.1	0,18	0,35	11,36
<i>Cladosporium subuliforme</i> (MH864124.1)	100	442	100	MT52171 2.1	0,12	0,49	11,16
<i>Neopestalotiopsis formicarum</i> (NR_145242.1)	100	456	97	MT52171 3.1	1,11	0,37	9,38
<i>Penicillium citrinum</i> (NR_121224.1)	100	420	100	MN73774 3.1	0,80	0,12	0,01
<i>Byssoschlamys spectabilis</i> (NR_130679.1)	98	488	97	MT52171 4.1	0	0,15	2,22
<i>Aspergillus stellatus</i> (NR_131287.1)	100	399	100	MT52171 5.1	1,76	0,25	13,55
<i>Penicillium atrofulvum*</i> (JN606677.1)	100	318	100		0	0,27	7,53
<i>Penicillium rubens</i> (NR_111815.1)	100	461	100	MN73774 6.1	5,31	0,12	5,19
<i>C. verrucocladosporioides</i>	100	434	100		0	0,20	9,97

* (MH863939.1)

<i>Myxosporea musae</i> (NR_155387.1)	98	467	100	MN73774 7.1	0,01	0,10	3,39
<i>Cladosporium sp.*</i> (LN834420.1)	100	475	100		1,71	0,11	6,75
<i>Paraphaeosphaeria</i> <i>areacearum</i> (NR_145166.1)	98	483	100	MT52171 7.1	0,41	0,14	10,35
<i>Trichoderma</i> <i>neotropicae</i> (MH865818.1)	100	462	100	MT52171 8.1	0,57	0,35	6,66
<i>Clonostachys rosea *</i> (AF358160.1)	100	274	96		0,33	0,20	12,96
<i>Penicillium paxilli</i> (MH856391.1)	100	315	100	MN73773 1.1	2,45	0,20	14,96
<i>Roussoella mexicana</i> (KT950848.1)	100	253	100	MN40128 4	0,15	0,22	12,24
<i>Penicillium cairnsense*</i> (NR_121508.1)	100	385	100		1,09	0,13	7,35
<i>Penicillium maximae</i> (NR_121343.1)	100	463	100	MN73773 2.1	0,06	0,33	10,57
<i>Diaporthe</i> <i>ptero carpicola</i> (NR_111713.1)	92	379	100	MN73773 3.1	0,65	0,22	15,41
<i>Neopestalotiopsis</i> <i>formicarum</i> (NR_145242.1)	96	403	100	MT52172 3.1	1,22	0,12	7,92
<i>Penicillium caseifulvum</i> (NR_163685.1)	100	413	100	MT52172 6.1	0,59	0,53	16,79
<i>Talaromyces palmae</i> (NR_103617.1)	100	515	98	MT52172 7.1	3,12	0,12	9,02
<i>Espécie fúngica B**</i>					0,66	0,45	13,68

*Identificado com β -tubulina e não depositado;**Prováveis novas espécies. A identificação a nível de espécies não foi possível usando os *primers* disponíveis.

Foi realizada uma cinética de produção da enzima com as espécies *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 e Espécie Fúngica A para verificar a produção de xilanase por 192 horas (Tabela 6). A maior produção de xilanase foi obtida após 96 horas para *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 (0,64 U/mL) e para a Espécie Fúngica A após 168 horas (0,61 U/mL).

Tabela 6. Cinética da produção de xilanase (U/mL) por *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 e Espécie Fúngica A durante 192 horas de cultivo.

Tempo (h)	<i>Penicillium caseifulvum</i> MT521726.1	Espécie Fúngica A
0	0,02	0,00
24	0,04	0,05
48	0,11	0,57
72	0,16	0,47

96	0,64	0,57
120	0,42	0,58
144	0,52	0,60
168	0,24	0,61
192	0,10	0,54

Na etapa de imobilização do extrato bruto xilanase de *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 em resina Purolite A400 funcionalizada com glutaraldeído foi obtido um Rendimento de Imobilização (RI) de $88,12 \pm 2,65\%$ e atividade recuperada foi de $40,64 \pm 2,8\%$. A atividade enzima imobilizada foi de $0,21 \pm 0,01$ U/mL.

A atividade xilanásica de *P. caseifulvum* MT521726.1 foi testada em uma ampla faixa de temperatura (20 - 70°C) e pH (3 - 8) em um banho de água controlado termostaticamente sob condições padrão de ensaio. O modelo ajustado ($R^2 = 0,89$) para o extrato bruto de *P. caseifulvum* MT521726.1 é dado pela equação 3, onde Z, X e Y são, respectivamente, Atividade xilanásica, pH e Temperatura. Observa-se que a atividade enzimática do extrato bruto (Figura 6) apresentou maior atividade com temperaturas entre 10 e 30°C e com pH entre 4 e 6. O modelo ajustado ($R^2 = 0,89$) para o extrato imobilizado de *P. caseifulvum* MT521726.1 é dado pela equação 4, onde Z, X e Y são, respectivamente, Atividade xilanásica, pH e Temperatura. E a atividade do extrato imobilizado com resina funcionalizada com glutaraldeído (Figura 7) se mostrou maior em uma faixa de temperatura entre 20 - 60°C e pH 4,5 - 7.

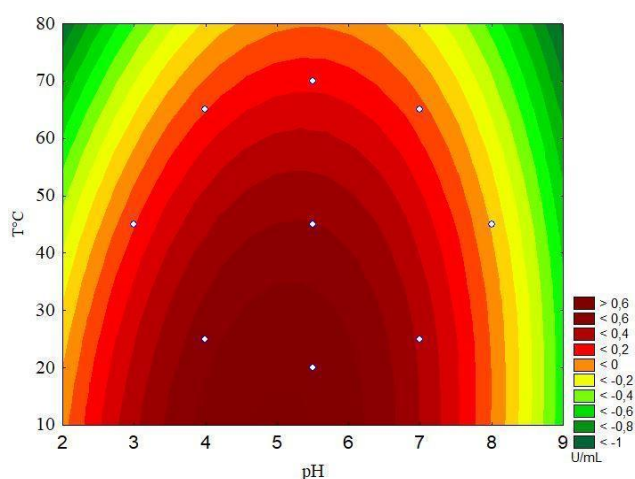


Figura 6. Efeito de T e pH na atividade enzimática de xilanase do extrato bruto. $R^2=0,89$.

$$Z = -1,31 + 0,82x - 0,08x^2 - 0,01y - 0,0001y^2 + 0,001xy \quad (3)$$

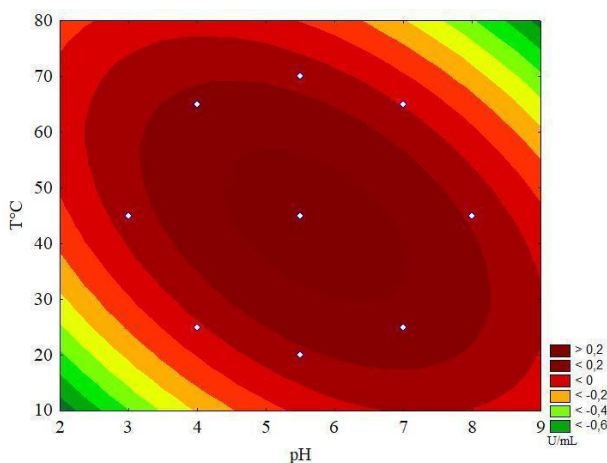


Figura 7. Efeito de T e pH na atividade enzimática de xilanase do extrato imobilizado. $R^2=0,89$.

$$Z = -1,82 + 0,43x - 0,03x^2 + 0,04y - 0,0003y^2 - 0,003xy \quad (4)$$

4. DISCUSSÃO

Teixeira et al. (2022) mostraram que 85% dos 49 isolados fúngicos encontrados no TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) possuem habilidade xilanolítica em teste qualitativo, ou seja, teste em placas com revelação de halo de hidrólise, sem a quantificação da enzima produzida. Dos 33 isolados aqui testados, 81% apresentaram atividade xilanásica em cultivo submerso. Apenas as linhagens *Cladosporium kenpeggii* MT521711.1, *Penicillium mallochii* MN737738.1, *Diaporthe passifloricola*, *Byssoschlamys spectabilis* MT521714.1, *Penicillium atrofulvum* e *C. verrucocladosporioides* não produziram xilanase quando em farelo de trigo, apesar de terem sido detectadas como xilanolíticas em testes de *screening* com xilana de *Birchwood* em placas (TEIXEIRA et al., 2022). É possível que a produção de xilanases seja dependente de condições ambientais encontradas no trato digestório (YUN et al., 2014) e a produção em laboratório exigiria aclimação por parte dos organismos; ou a atuação enzimática depende de interações comunitárias, como demonstram estudos de cultivos mistos (RODRIGUES et al., 2020; WANG et al., 2022).

O TD desses insetos surge como uma fonte importante para a prospecção de novos microrganismos para produção de enzimas aplicáveis em diversos processos industriais, como mostra a Tabela 5. A presença de fungos no TD de insetos parece corroborar para seu papel como componente da dieta (TEIXEIRA et al., 2022), enquanto que a ocorrência frequente de habilidade xilanolítica parece evidenciar seu papel na degradação do alimento vegetal que chega ao TD destas larvas.

Os isolados *Penicillium rubens* NR_111815.1, *Talaromyces palmae* NR_103617.1, *Penicillium paxilli* MH856391.1 produziram, respectivamente, 5,31 U/mL, 3,12 U/mL e 2,45

U/mL. Considerando que o TD de insetos pode sofrer influência de vários fatores como ciclo de vida (ARIAS-CORDERO et al., 2012; ALVES JR et al., 2019), condições bioquímicas das diferentes regiões intestinais, habitat (WANG et al., 2020), pode, então, representar um ambiente diferente das condições do experimento. Assim, a produção enzimática encontrada neste trabalho pode ser considerada significativa, dadas as condições relativamente homogêneas do substrato utilizado.

Algumas espécies do gênero *Penicillium* já foram descritas como produtores-chave de xilanase (BITTENCOURT et al. 2020), porém enzimas nativas de fungos filamentosos de espécies dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, geralmente não são aplicadas na indústria devido aos parâmetros de produção em larga escala que ainda não foram estabelecidos (MENDEZ-LÍTER et al. 2021). Estudo dessa natureza, com a produção de xilanase por fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, em cultivo submerso, são importantes para a indústria e contribuem com o conhecimento desses parâmetros ainda não definidos.

Ullah et al. (2022) produziram xilanase de *Penicillium chrysogenum* (*Penicillium rubens* segundo estudos de Pohl et al., 2020), isolado de solo do Cerrado, e obtiveram 0,80 U/mL utilizando bagaço de cana como substrato, sendo inferior ao obtido neste estudo. Já Bajaj et al. (2011) que produziram xilanase com *Penicillium* sp. isolado de material lenhoso, obtiveram, com farelo de trigo como substrato, concentração de 21,8 U/mL e com farelo de arroz, 20,6 U/mL. Nesse caso, a fonte de isolamento pode ter influenciado essa produção, pois essa espécie já estava vivendo em material rico em xilano, diferentemente desse estudo, onde os isolados fúngicos foram obtidos do TD de inseto aquático. Os fungos filamentosos podem produzir um complexo de diferentes enzimas durante o processo de degradação de materiais lignocelulósicos (TEIXEIRA et al., 2022). Além do que, muitos fungos produzem diferentes xilanases na presença de diferentes substratos lignocelulósicos para a degradação do xilano (YANG et al. 2018; FARIA et al. 2019; BITTENCOURT et al., 2020), pois as linhagens de fungos podem produzir quantidades diferentes de enzimas nos meios de cultura de acordo com a composição nutricional desses substratos (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013).

Alguns isolados dos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Roussoella* e *Diaporthe* produziram XOS em concentrações maiores que 11 mg/mL. Amorim et al. (2019b) produziram XOS com espécies do gênero *Trichoderma* e obtiveram concentrações de 1,8 mg/g a 40 mg/g. Terrasan et al. (2016) obtiveram concentração de XOS de 1,29 mg/mL com espécie do gênero *Penicillium*. No presente trabalho, o isolado *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 produziu 16,79 mg/mL de XOS, tendo produzido 0,64 U/mL de xilanase. Este é o primeiro relato de *Penicillium caseifulvum* em teste quantitativo para a produção de xilanase e XOS. Essa espécie já foi isolada de plantas medicinais e se

mostrou promissora para a produção de xilanases entre outras enzimas hidrolíticas (KHALIL et al., 2021) em testes qualitativos.

A produção simultânea de xilanase e XOS por fungos filamentosos usando farelo de trigo como substrato deriva dos resultados de estudos que mostraram o farelo de trigo como potencial indutor para a produção microbiana de endo- β -1,4-xilanase (KALLEL et al., 2016; YEGIN et al., 2017; KHANAHMADI et al., 2018). Amorim et al. (2018, 2019b) mostraram que a fermentação simultânea com resíduo agroindustrial não pré-tratado para produção de XOS é uma abordagem vantajosa para hidrolisar o grão gasto de cervejaria. A produção industrial de xilanase microbiana possui alto custo devido aos substratos necessários, e uma produção mais econômica pode ser realizada utilizando resíduos agrícolas como fonte de xilana (GAUTÉRIO et al. 2018).

Nossos resultados mostraram uma coprodução de xilanase e XOS com baixo teor de xilose, por *Penicillium caseifulvum* MT521726.1. O baixo teor de xilose pode ser justificado pelos microrganismos terem preferência por açúcares disponíveis, que são consumidos antes da degradação de XOS (AMORIM et al. 2019a). Além do que, a xilose pode inibir a endoxilanase e não pode estar presente em formulações prebióticas (GUIDO et al., 2019). A coprodução de xilanase e XOS contribui com a redução de custo desses compostos, já que não exige a produção ou compra de enzimas, além de possuir um número menor de etapas envolvidas no processo, influenciando beneficemente no potencial do rendimento global da produção.

O tempo necessário para produção de xilanase por *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 foi de 96 horas, quando se obteve a máxima produção nas condições testadas. Esse resultado corrobora com a literatura onde Martínez-Pacheco et al. (2020) obtiveram máxima produção de xilanase de *Fusarium solani* com 84 horas e Pérez-Rodríguez et al. (2019) com 96 horas, conseguiram máxima produção de xilanase de *Sporisorium reilianum*. Já o isolado da Espécie Fúngica A necessita de quase o dobro de tempo para obter a mesma concentração de xilanase.

O caldo fermentado não purificado de xilanase de *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 foi utilizado para a imobilização da enzima. Esse caldo pode conter diversas substâncias interferentes no processo de imobilização, contudo, foi obtido um RI de 88%. Dariff et al. (2021) imobilizaram pectinase utilizando parafina como suporte funcionalizado com GLU e obtiveram rendimento de 50%. Tomotani e Vitolo (2006) imobilizaram invertase com resina aniônica e obtiveram 100% de rendimento. Nesse estudo, foi utilizada uma resina aniônica como suporte funcionalizada com GLU, esse rendimento, então, pode ser atribuído à ligação covalente entre o adsorvido da enzima e o suporte, pois alteram o equilíbrio de adsorção e assim

acelera a imobilização (ARAÚJO et al., 2022). O glutaraldeído reage com o suporte e a enzima por ligação covalente com seus grupos aminos que se ligam aos grupos aldeídos do suporte. A imobilização de enzima é uma técnica utilizada para estabilizar processos enzimáticos (IRFAN et al., 2020), que permite o reaproveitamento do material, a utilização do complexo enzima-suporte em diferentes solventes, pHs e temperaturas e, ainda, pode reduzir o custo de operação. A eficiência catalítica da enzima é uma característica muito importante para a sua comercialização (IRFAN et al., 2020) e a imobilização é uma ferramenta poderosa para o uso eficiente e econômico de enzimas em processos industriais.

O conhecimento sobre a atividade xilanásica, pH ótimo e temperatura, entre outros parâmetros de produção de xilanase, é importante para obter um bom rendimento de XOS e produção em grande escala (GUIDO et al., 2019). Em nosso estudo, a atividade ótima de xilanase do extrato bruto é consistente com relatos da literatura indicando pH ótimo entre 4 e 6 (FARIA et al., 2019; GUIDO et al., 2019; MARTÍNEZ-PACHECO et al., 2020) e a atividade ótima do extrato imobilizado corrobora com o encontrado por Gosh et al. (2019) que foi de pH 6,5. A enzima imobilizada apresentou maior atividade numa faixa de temperatura mais ampla (20-60°C), sendo esse um dado interessante para a indústria, pois essas xilanases podem ser termoestáveis, uma característica que pode contribuir para sua manutenção em condições adversas.

5. CONCLUSÃO

As xilanases desempenham um papel importante na produção de XOS utilizando resíduos agrícolas de baixo custo. Esses resultados demonstraram que o TD de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) pode ser uma fonte de fungos filamentosos produtores de enzimas xilanolíticas e XOS. Isto reforça que a coprodução de xilanase e XOS utilizando farelo de trigo pode reduzir custos e que o isolado *Penicillium caseifulvum* MT521726.1 é uma espécie promissora para estudos futuros que visem a obtenção desses produtos. Assim, os resultados aqui obtidos, como a imobilização e parâmetros físico-químicos (pH e T), confirmam as vantagens da utilização de xilanase de origem fúngica e sua possível utilização em diversas aplicações industriais. Espera-se que o aumento do conhecimento sobre técnicas e métodos para obtenção e otimização de mecanismos que viabilizem a produção de xilanase e XOS, em escala industrial venham a torná-la economicamente viável.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto Edital Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia nº 79/2013; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a Mayra F. N. P. Teixeira; a equipe do LAMBIO - Universidade Federal do Tocantins pelo suporte técnico; a equipe Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e Biocombustíveis – LAPEQ pelas análises realizadas.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES JR., S.L., MÜLLER, C., BONATTO, C., SCAPINI, T., CAMARGO, AF., FONGARO, G., TREICHEL, H 2019. Bioprospection of enzymes and microorganisms in insects to improve second-generation ethanol production. **Industrial Biotechnology**. 15(6): 336–349. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>
- AMORIM, C., SILVÉRIO, S.C., PRATHER, K. L.J., RODRIGUES, L.R.. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. **Biotechnology Advances**. 37. 2019a <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>
- AMORIM, C., SILVÉRIO, S.C., RODRIGUES, L.R., One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from Brewer's spent grain employing *Trichoderma* species, **Food Chemistry**. 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.080>
- AMORIM, C., SILVÉRIO, S.C., SILVA, S.P., COELHO, E., COIMBRA, M.A., PRATHER, K.L.J., RODRIGUES, L.R., Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain, **Carbohydrate Polymers**.2018. <https://doi.org/10.1016/j>
- ARAUJO, I.M., BECALETTE, P.C., SILVA, E.S. et al. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **J Chem Technol Biotechnol**. 2022. <https://doi.org/10.1002/jctb.7255>
- ARIAS-CORDERO, E., PING, L., REICHWALD, K., DELB, H., PLATZER, M., BOLAND, W 2012. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. **Plos One**.7:12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051557>
- BAJAJ, P., & MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2019.
- BASIT, A., JIANG, W., RAHIM, K. Chapter: Xylanase and Its Industrial Applications. **Biotechnological Applications of Biomass**. 2020. <http://doi.org/10.5772/intechopen.92156>
- BELMONT-MONTEFUSCO, EL., NACIF-MARÇAL, L., ASSUNÇÃO, EN., HAMADA, N., NUNES-SILVA, C.. Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects. **Acta Amazonica**. 50: 346-354. 2020. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000902>
- BITTENCOURT, K.W.F., ARFELLI,V.C., LUNKES, J.C. et al. BiochemicalCharacteristics

of *Penicillium crustosum* FP 11 Xylanase II and an assessment of the properties of xylanases produced by the genus *Penicillium*. **Annual Research & Review in Biology** 35: 64-75. 2020. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2020/v35i730248>

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

CHAPLA, D., PANDIT, P., SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresour Technol**. Jul;115:215-21. 2012 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews** 29, 3–23, 2005.

DARIFF, A.P., ORO, E.D., C., GONÇALVES, T., DENTI, A., TRES, B., DALLAGO, R., MIGNONI, M. L. Produção e funcionalização de suporte de parafina para imobilização enzimática. **Revista Perspectiva**, 45(171), 73-83. 2021. <https://doi.org/10.31512/persp.v.45.n.171.202>

ENGEL, P. & MORAN, N.A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**. 37(5), 699–735. 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>

FARIA, N.T., MARQUES, S., CASTELO, F.F., FONSECA, C., Production of xylanolytic enzymes by *Moesziomyces* spp. using xylose, xylan and brewery's spent grain as substrates, **New Biotechnology**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.001>

GAO, G., GAO, J., HAO, C., DAI, L., CHEN, H Biodiversity and activity of gut fungal communities across the life history of *Trypophloeus klimeschi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **International Journal of Molecular Sciences**. 19:7.2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19072010>

GAUTÉRIO, G.V., VIEIRA, M.C., SILVA, L.G.G., HÜBNER, T., SANZO, A.V.L., KALIL, S.J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation, **Industrial Crops and Products**, Vol. 125, 335-345, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.011>.

GHOSH, D., VIR, A. B., GARNIER, G., PATTI, A.F., TANNER, J. Continuous flow production of xylooligosaccharides by enzymatic hydrolysis, **Chemical Engineering Science**, V 244, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2021.116789>.

GUIDO, E. S., SILVEIRA, J. T., KALIL, S.J. Enzymatic production of xylooligosaccharides from beechwood xylan: effect of xylanase preparation on carbohydrate profile of the hydrolysates. **International Food Research Journal** 26(2): 713-721. 2019.

IRFAN, M., KIRAN, J., AYUBI, S., ULLAH, A., RANA, QUA., KHAN, S., HASAN, F., BADSHAH, M., SHAH, A.A. Immobilization of β -1,4-xylanase isolated from *Bacillus licheniformis* S3. **J Basic Microbiol**. Jul;60(7):600-612. 2020. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000077>.

KALLEL, F., DRISSA, D., CHAARIA, F., ZOUARI-ELLOUZIA, S., CHAABOUNIB, M., GHORBELA, R., CHAABOUN, S.E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavenis* UEB-FK: its potential applications. **Biocatalysis Agric**

Biotechnol 5:1–10. 2016.

KHALIL, A.M.A.; HASSAN, S.E.-D.; ALSHARIF, S.M.; EID, A.M.; EWAIS, E.E.-D.; AZAB, E.; GOBOURI, A.A.; ELKELISH, A.; FOUDA, A. Isolation and Characterization of Fungal Endophytes Isolated from Medicinal Plant *Ephedra pachyclada* as Plant Growth-Promoting. **Biomolecules** 11, 140. 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11020140>

KHANAHMADI, M., AREZI, I., AMIRI, M., MIRANZADEH, M. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid-state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatal Agric Biotechnol** 13: 272-283. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocatal.2018.05.005>

LEÓN, AV-P., SANCHEZ-FLORES, A., ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Fungal community associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. **Front Microbiology**. 7:1–15. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00954>

MADHAVAN, A., ARUN, KB., SINDHU, R., JOSE, A. A., PUGAZHENDHI, A., BINOD, P., SIROHI, R., RESHMY, R., AWASTHI, M.K. Engineering interventions in industrial filamentous fungal cell factories for biomass valorization. **Bioresour Technol**. 344. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126209>

MARTÍNEZ-PACHECO, M.M., FLORES-GARCÍA, A., ZAMUDIO-JARAMILLO, M.A., CHÁVEZ-PARGA, M.C., Alvarez-Navarrete, M. Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. **Rev Argent Microbiol**. 52(4):328-338 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2020.03.001>

MÉNDEZ-LÍTER, J.A., DE EUGENIO, L.I., NIETO-DOMÍNGUEZ, M., PRIETO, A., MARTÍNEZ, M.J. Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review. **Bioresour Technol**. 324:124623. 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124623.

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

NASCIMENTO. A.G.L.C., TORRE, C.L.D., KADOWAKI, M.K. Uma abordagem sobre produção de xilanases pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* utilizando resíduos agroindustriais como indutor. Em: Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2. 166. 2019. <https://doi.org/10.22533/at.ed.39420220116>

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I.; YORK-DURÁN, M. J.; RODRÍGUEZ-COLINAS, B.; PLOU, F. J.; CHENOLL, E.; PARDO, E.; CODOÑER, F.; MARTÍNEZ, M. J. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. **Food Chemistry**. 2017.

OKOLIE, J.A., NANDA, S., DALAI, A.K., KOZINSKI, J.A. Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. **Waste and Biomass Valorization** 2020. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>

PERALTA, R. M.; SILVA, B. P.; CÔRREA, R. C. G.; KATO, C.G.; SEIXAS F. A. V.; BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. Chapter 5. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2017.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, J., TÉLLEZ-JURADO, A., ÁLVAREZ-CERVANTES, J., IBARRA, J.A., JARAMILLO-LORANCA, B.E., ANDUCHO-REYES, M.A., MERCADO-FLORES, Y. Study of the intracellular xylanolytic activity of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*, **Mycoscience**, V. 61, Issue 2, Pages 76-84, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.10.005>.

POHL, C., POLLI, F., SCHÜTZE, T., VIGGIANO, A., MÓZSIK, L., JUNG, S., DE VRIES, M., BOVENBERG, R.A.L., MEYER, V., DRIESSEN, A.J.M. A *Penicillium rubens* platform strain for secondary metabolite production. **Sci Rep.** 6;10(1):7630. 2020. doi: 10.1038/s41598-020-64893-6.

PUCHART, V., SUCHOV, K., BIELY, P. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview. **Biotechnology Advances** 47. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107704>

QESHMI, F.I., HOMAEI, A., FERNANDES, P. et al., Xylanases from marine microorganisms: A brief overview on scope, sources, features and potential applications, **BBA - Proteins and Proteomics**. 1868. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140312>

RODRIGUES, P. O.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; et al. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683–2693, 2020.

SANTOS, T.T.; OLIVEIRA, K.A.; VITAL, M.J.S.; COUCEIRO, S.R.M.; MORAIS, P. B. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (*Trichoptera: Calamoceratidae*) in streams of the Brazilian Amazon **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 13, n. 3, p. 317-325, set.-dez. 2018.

SOUZA, C.R., TEIXEIRA, M.F.N.P; MORAIS, P.B. Diversity of cellulolytic and xylanolytic fungi associated with the digestive tract of aquatic insect larvae in streams of the Amazon Forest and Cerrado in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 82, e265681. 2022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.265681>

TEIXEIRA, M.F.N.P; SOUZA, C.R., MORAIS, P.B. Diversity and enzymatic capabilities of fungi associated with the digestive tract of larval stages of a shredder insect in Cerrado and Amazon Forest, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 82. 2022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.260039>

TERRASAN, C.R.F., GUISAN, J.J., CARMONA, E.C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates, **Electronic Journal of Biotechnology**, Vol 23, 54-62, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.08.001>.

TOMOTANI, E.J., & VITOLO, M.. Method for immobilizing invertase by adsorption on Dowex® anionic exchange resin. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, 42(2), 245–249. 2006. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000200009>

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 117, 109472. 2020.

TYAGI, D. & SHARMA, D. Production and Industrial Applications of Xylanase: A Review. **International Journal of Scientific Research & Engineering Trends** Volume 7, Issue 3. 2021.

ULLAH, S.F., SOUZA, A.A., FREITAS, S.M., NORONHA, E.F. Characterisation of biomass degrading xylanolytic enzymes of *Penicillium chrysogenum* produced using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, V. 112, 62-70, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.012>.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology** 60. 9–18, 2013.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42–43, 1956.

WALIA, A., GULERIA, S., MEHTA, P., CHAUHAN, A., PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. 3 **Biotech**. 7:11. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>

WANG, J.; LI, L.; XU, H.; et al. Construction of a fungal consortium for effective degradation of rice straw lignin and potential application in bio-pulping. **Bioresource Technology**, v. 344, 2022. Elsevier Ltd.

WANG, S.; WANG, L.; FAN, X.; YU, C.; FENG, L.; YI, L. An insight into diversity and functionalities of gut microbiota in insects. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 1976–1986, 2020.

YANG, Y., YANG, J., WANG, R. et al. Cooperation of hydrolysis modes among xylanases reveals the mechanism of hemicellulose hydrolysis by *Penicillium chrysogenum* P33. **Microb Cell Fact** 18, 159 2019. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1212-z>

YEGIN, S., BUYUKKILEC, A.O., SARGIN, S., GOKSUNGUR, Y. Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase: Screening, Bioprocess Optimization and Scale Up. **Waste Biomass Valor** 8:999–1010. 2017. <http://doi.org/10.1007/s12649-016-9646-6>

YUN, J. H. et al. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5254–5264, 2014.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo sobre a comunidade de fungos associada ao trato digestório de larvas de *Trilpsectides* mostrou a presença de uma comunidade diversa destes microrganismos. Muitas dessas espécies atuam como decompositoras, outras ocorrem associadas a hospedeiros, vegetal ou animal, em relações mutualística, simbióticas, comensais ou em parasitismo (NARANJO-ORTIZ & GABALDÓN, 2019). A interação entre fungos e estágios larvais de insetos, possivelmente, vai além da nutrição dos fungos, podendo estar relacionada à digestão e produção de metabólitos. Os estágios larvais de insetos aquáticos dependem do aporte de estoques derivados da vegetação ripária, e possivelmente, da transformação destes substratos em nutrientes por grupos fúngicos que, neste trabalho, começam a ser descobertos. Estudos dessa natureza, com identificação de possíveis novas espécies, descrição da comunidade fúngica, bioprospecção de enzimas, contribuem para desvendar a diversidade fúngica em ecossistemas aquáticos tropicais, muito pouco conhecida. Fornecem dados para compreensão de interações ecológicas, que em insetos terrestres, tanto em adultos quanto em fases larvais, parece determinar a sobrevivência de proles, como no caso da abelha sem ferrão (Meliponini) (DE PAULA et al., 2021) e também o desempenho sexual de adultos, como em moscas-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) (BILLETER & WOLFNER 2018).

Diferenças ambientais entre os riachos dos biomas Cerrado e Floresta Amazônica explicam as distintas comunidades fúngicas encontradas, indicando que fatores ambientais interferem na ocorrência de fungos filamentosos nas larvas de *Triplectides*, possivelmente determinados por componentes do ecossistema, tais como composição florística da zona ripária e variáveis ambientais como clima. Assim, este trabalho fortalece as evidências de que os fungos, como animais e plantas, possuem distribuição ecológica determinada por variáveis ambientais, ou seja, reforça a evidência de uma biogeografia de Fungi (PEAY et al, 2016).

Comprovou-se que essa comunidade fúngica do TD de *Triplectides* possui linhagens produtoras de xilanases e promissoras para a obtenção de xilooligossacarídeos, tal como *Penicillium caseifulvum* MT521726.1. Assim, essa microbiota possui impactos importantes na biotecnologia, podendo incidir em diversas áreas como indústria farmacêutica, de alimentos, de biocombustível, rações animais, entre outras. Isso reforça a compreensão do papel dessa comunidade fúngica que vai além da ecologia, implicando impactos na biotecnologia com a produção de metabólitos.

8.1 REFERÊNCIAS

BILLETER, J.C. & WOLFNER, M.F. Chemical Cues that Guide Female Reproduction in *Drosophila Melanogaster*. **Journal of Chemical Ecology**. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0947-z>

DE PAULA, G.T., MENEZES, C., PUPO, M.T., ROSA, C.A. Stingless bees and microbial interactions, **Curr Opin Insect Sci**. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006>.

NARANJO-ORTIZ, M. A. & GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1443–1476, 2019.

PEAY, K.G., KENNEDY, P.G., TALBOT, J.M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**. 14(7):34–447. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>

Original Article

Diversity and enzymatic capabilities of fungi associated with the digestive tract of larval stages of a shredder insect in Cerrado and Amazon Forest, Brazil

Diversidade e capacidades enzimáticas de fungos associados ao trato digestivo da fase larval de um inseto triturador em Cerrado e Floresta Amazônica, Brasil

M. F. N. P. Teixeira^a , C. R. Souza^{a, b}  and P. B. Morais^{a*} 

^aUniversidade Federal do Tocantins – UFT, Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia Ambiental, Palmas, TO, Brasil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins – IFTO, Gurupi, TO, Brasil

Abstract

Tropical biomes such as Brazilian Cerrado and Amazon Forest have a great diversity of fungi and insects. Interactions between these organisms can be beneficial to both partners. In streams, these interactions contribute to litter decomposition. Studying the digestive tract (DT) of shredder insects as a habitat for fungal microorganisms is an opportunity to obtain fungal strains with biotechnological potential, which may help to understand the symbiotic relationships between these organisms in tropical forests. This study investigated the fungal community in the DT of larvae of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) collected in low-order streams in the Cerrado and Amazon Forest biomes in Brazil. Forty-nine fungal isolates were obtained and identified among 32 species and 12 genera. The genus *Roussoella* was only found in the DT of insects in Amazon Forest streams, while 7 genera only occurred in the DT of insects in Cerrado streams. The genus *Penicillium* (40%) was the most frequent. In the Cerrado, 78% were producers of CMCase, more than two-fold that in the Amazon Forest (35%). And 62% were producers of xylanase, in the Cerrado and 71% in the Amazon Forest. In this context, the fungal community in the DT of *Triplectides* larvae may play an important role in the insect diet by breaking down lignocellulosic material.

Keywords: *Triplectides*, Trichoptera, xylanase, cellulase.

Resumo

Biomias tropicais como o Cerrado brasileiro e a Floresta Amazônica apresentam uma grande diversidade de fungos e insetos. As interações entre esses organismos podem ser benéficas para ambos os parceiros. Em riachos, essas interações contribuem para a decomposição da serapilheira. O estudo do trato digestório (TD) de insetos como um habitat para microrganismos fúngicos é uma oportunidade para obtenção de linhagens fúngicas com potencial biotecnológico, podendo trazer luz para o entendimento das relações simbióticas entre esses organismos em florestas tropicais. Esse estudo investigou a comunidade fúngica do TD de larvas de *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) coletados em riachos de baixa ordem nos biomas Cerrado e Floresta Amazônica no Brasil. Foram obtidos 49 isolados fúngicos e identificados entre 32 espécies de 12 gêneros. O gênero *Roussoella* foi encontrado apenas no DT de insetos em riachos da Floresta Amazônica, enquanto sete gêneros ocorreram apenas no DT de insetos em riachos do Cerrado. O gênero *Penicillium* (40%) foi o mais frequente. No Cerrado, 78% foram produtoras de CMCase, mais que o dobro da Floresta Amazônica (35%). E 62% foram produtoras de xilanase, no Cerrado, e 71% na Floresta Amazônica. Nesse contexto, a comunidade fúngica do TD de larvas *Triplectides* pode desempenhar um papel importante na dieta de insetos por quebrar o material lignocelulósico.

Palavras-chave: *Triplectides*, Trichoptera, xilanase, celulase.

Introduction

Brazilian Cerrado and Amazon Forest biomes are considered biodiversity hotspots. This high biodiversity, especially in neotropical regions, represents a great potential for organisms to be discovered (Almeida et al., 2017), as well as their specificities. Thus, these tropical forests hold a large part of the diversity of insects and

fungi that coexist in several terrestrial and aquatic habitats, where potential interactions may occur between species of the two groups (Boucias et al., 2012; Douglas, 2015). Insects are colonized by microorganisms, in their body surface, in their digestive tract (DT) and interior of certain tissues. Bacteria and fungi prevail in insect microbiomes and

*e-mail: moraispb@uft.edu.br

Received: January 13, 2022 – Accepted: April 27, 2022



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

they are essential for survival, maturation and nutritional functions of hosts among honey bees (Kwong and Moran, 2016; Raymann and Moran, 2018) and also in some species of moths (Chen et al., 2016).

The roles of the symbionts in relations between fungi and insects were found to be nutritional, for protection, or even for hormonal maturation of the insect (Mohammed et al., 2018), whereas the microorganisms receive protection and abundant food in the body of the insect. Fungi contribute nutrients to several insect groups (Gibson and Hunter, 2010), as with bark beetles (Six, 2012) and the carmine cochineal that fungi help in the nitrogen recycling process (León et al., 2016).

Fungi have been often found in the DT of several insects that feed on wood or detritus and, possibly, play a role in the digestion of such plant material (Engel and Moran, 2013; León et al., 2016; Santos et al., 2018; Belmont-Montefusco et al., 2020a, Belmont-Montefusco et al., 2020b). Shredder insects feed on senescent plant material in low-order streams (Graça et al., 2001; Jabioli and Chauvet, 2012) where they contribute to the breakdown of organic matter in aquatic ecosystems together with fungal groups such as Ascomycetes and Hyphomycetes (Graça et al., 2016). Insect species of the genus *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) are shredders during their aquatic larval stage, consuming substrates such as leaves and dead wood (Oliveira and Pes, 2014; Cortez and Gonçalves, 2015). Microbial colonization of those substrates improve palatability and increase nitrogen content of food (Graça et al., 2001). The genus is highly diverse in tropical streams where a variety of substrates are available for fungal colonization that may be ingested by these insects along with food. The hypothesis arises that there is a diversity

of fungi associated with the DT of larvae of insects of the genus *Triplectides* in low-order streams in the Brazilian Cerrado and Amazon Forest.

The fungal composition and diversity in the DT of insects may clarify the role of fungi in the physiology of the host (Gao et al., 2018) and shed light onto the ecological role of symbiosis between the two groups and biotechnological potential of those fungal communities. Thus, this study aimed to verify whether there is a possible specificity of occurrence of fungi in the DT of those insects and to test the potential for the production of xylanases and cellulases, which also shows the potential nutritional role, in food digestion in the DT of the insect.

Material and Methods

Characterization of the study areas

The study was carried out in five streams located in a conservation area and its surroundings in the north part of the Brazilian Cerrado (Tocantins, Brazil) and in four streams in an Amazon Forest (Pará, Brazil) biomes (Figure 1). A 200 m stretch of the body of the stream was sampled using a D-frame net (0.500 mm mesh and 0.465 m² area) in each stream selected. Larvae of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) were collected in the substrate available (especially leaf packages) and identified by specialists based on the taxonomic descriptions by Hamada et al. (2014). Each individual larva was transferred to a sterile tube containing 1 mL sterile saline solution and stored for 2 to 4 h in ice until processing in the laboratory.

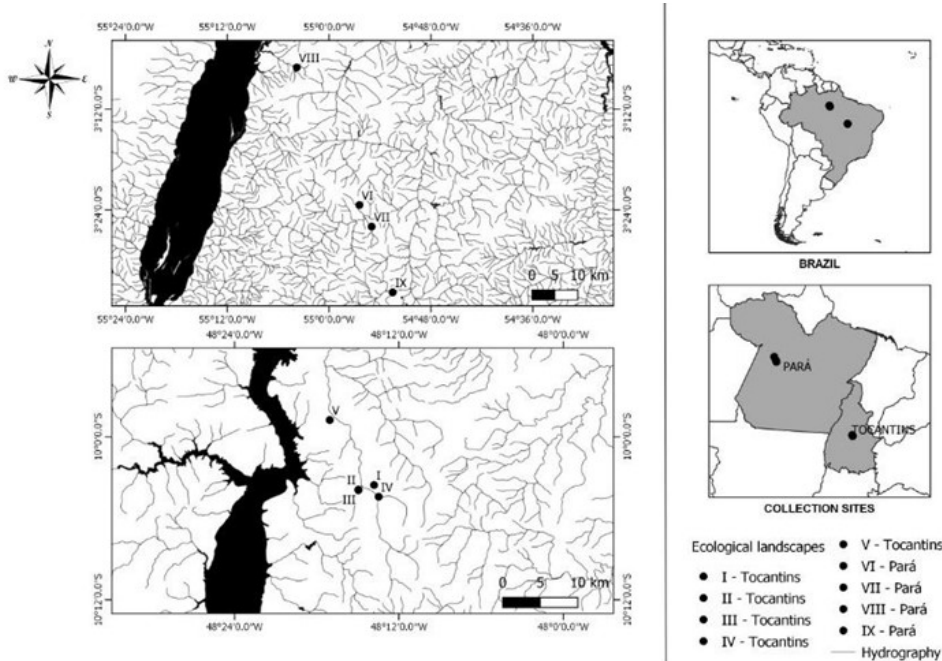


Figure 1. Maps with sampling sites of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) in low-order streams in the Cerrado (Lajeado State Park and surroundings, state of Tocantins, Brazil) and low-order streams in the Amazon Forest (Tapajós National Forest, state of Pará, Brazil) biomes.

Fungal isolation and purification

In the laboratory, the individual larvae were aseptically dissected using a stereoscopic microscope. The intestinal tract was added to 1.0 mL sterile saline solution in an Eppendorf tube. Next, a 0.1 mL aliquot was seeded on a Petri dish containing potato-dextrose agar (PDA) supplemented with 100 µg mL⁻¹ chloramphenicol in triplicates. The dishes were incubated at 28 °C for up to 60 days. The fungal isolates obtained were individually transferred to Petri dishes containing PDA and incubated at 25 °C for seven days for purification. Fungal strains were kept in storage according to adaptations of Castellani (1939).

DNA extraction, amplification and sequencing

The fungal isolates were transferred from storage to dishes containing PDA for 24–28 h and then transferred to 3% ME (Malt Extract) broth for cellular increase for seven days of growth in a rotating shaker (100 rpm) at room temperature. Next, approximately 40 mg of mycelium were collected for DNA extraction with the Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), following the modified protocol by Burghoorn et al. (2002). After extraction, the DNA was analyzed in a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Brazil) spectrophotometer. Primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990) were employed for amplification of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of rDNA (~600 bp) following the amplification conditions proposed by Santos et al. (2016). The amplified ITS fragments were submitted to electrophoresis in 1.0% agarose gel containing GelRed™ (Biotium Inc., USA) and visualized under ultraviolet light in a photo documentation system (Loccus Biotechnology, Brazil). The 1 kb DNA Ladder (Promega, USA) was used as a molecular weight marker.

The amplified products were sequenced in both directions using the same PCR starters in an ABI 3500 XL (Life Technologies, USA) automated sequencer according to the Sanger or chain termination method (Sanger et al., 1977) using a BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Life Technologies, USA). Sequencing was performed by the company Myleus Biotechnology, located in Belo Horizonte – MG, Brazil. Additionally, the amplification of the genes β-tubulin (Bt2a and Bt2b) was used for fungus taxa with low intraspecific variation according to the protocols established by Godinho et al. (2013). All sequences were compared with sequences deposited at the GenBank database using a local alignment algorithm for nucleotide sequences BLAST (Basic Local Alignment Search) (Altschul et al., 1990) and at the CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre) database (<http://www.cbs.knaw.nl>).

Xylanolytic and cellulolytic screening of the fungal community

The fungal community in the DT of *Triplectides* was tested for the production of xylanase and cellulase through screening in solid medium containing xylan or carboxymethylcellulose (CMC) as the only carbon

source. The production of the enzyme was assessed via the growth of the strain on a dish and the revelation of hydrolysis halo using Congo red stain (Zhang et al., 2006). The strains were reactivated in PDA and then repeated in triplicate to a medium with xylan (Xylan, Beechwood purified) or carboxymethylcellulose (CMC) and trace elements composed of (C₆H₈O₇ • H₂O 50; ZnSO₄ • 7H₂O 50; Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ • 6H₂O 10; CuSO₄ • 5H₂O 2.5; MnSO₄ • H₂O 0.05; H₃BO₃ 0.05; Na₂MoO₄•2H₂O 0.05; Salt solution: Na₃C₆H₅O₇ • 5H₂O 150; KH₂PO₄ 250; NH₄NO₃ 100; MgSO₄ • 7H₂O 10; CaCl₂ • 2H₂O 5) and biotin (0.1 mg mL⁻¹) 5 mL; 0.2 mL chloroform (Vogel, 1956).

Next, staining was conducted with Congo red (0.25%) for 30 min and washing was performed with NaCl (1 M) for 15 min. The fungi that exhibited lighter color halos around the colony in the selective medium were considered producers of xylanase or cellulase. A digital caliper was used to measure the diameter of the colonies and the halos. The enzymatic index (EI) was determined by dividing the diameter of the halo by the diameter of the colony (Nogueira and Cavalcanti, 1996).

Statistical analysis

Diversity was measured via the indices of Simpson (1-D), Shannon (H'), Margalef, and Chao-1, which were calculated for the number of sampled larvae from streams in the Cerrado and Amazon Forest. The larvae were considered the sampling unit, being the biomes, and not the streams, the variable of interest. The indices were calculated with 95% confidence using the software PAST version 4.01 (Hammer et al., 2001).

Results

A total of 49 fungal isolates were obtained from 21 larvae of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) and identified among 32 species of 12 genera, besides two taxa with inconclusive taxonomy (Table 1). The average fungal isolates per DT was 2.14 CFU/DT in the Cerrado biome streams and 1.72 CFU/DT in the Amazon Forest streams. In the Cerrado, 32 strains were obtained belonging to 23 species of 11 genera, whereas in the Amazon Forest, 17 strains of 11 species of five genera were obtained. The genus *Rousoella* was only found in the DT of insects in Amazon Forest streams, while seven genera only occurred in the DT of insects in Cerrado streams. The genus *Penicillium* was the most frequent and occurred both in the Cerrado and in the Amazon Forest, with 20 strains (40%) isolated in different DTs. The genera *Cladosporium* (8%), *Talaromyces* (8%), and *Trichoderma* (8%) exhibited similar frequency of occurrence. The genera *Aspergillus* and *Clonostachys*, with one occurrence each, were isolated only in the Cerrado biome.

Among the species, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium paxilli*, and *Neopestaloptopsis formicarum* occurred in the DT of larvae from streams in the Cerrado and Amazon Forest. All other species occurred in only one of the biomes, i.e., 20 species occurred exclusively in the Cerrado and eight, in the Amazon Forest. The most frequent species were *P. paxilli* in the Cerrado, with four strains, and *T. palmae* in

Table 1. Identification of fungi from the DT of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) larvae in Cerrado and Amazon Forest Biomes Brazil and their respective enzymatic indices (EI).

Biomes	Code*	Taxa	N° GenBank accession	No. of bp analyzed	Query cover (%)	Identity (%)	My GenBank number	EI** (Xylanase)	EI** (Cellulase)
CERRADO	I								
	T5TA7	<i>Penicillium caseifulvum</i>	NR_163685.1	414	100	100	MT521710.1	1.14±0.04	1.04±0.01
	T5TA9	<i>Cladosporium kenpengii</i>	KY646222.1	399	100	99	MT521711.1	2.97±0.07	1.32±0.04
	T5TB4a	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	380	100	100	MN737735.1	0	1.29±0.11
	T5TB5	<i>Penicillium vancouverense</i> ***	JN606663.1	369	97	97		1.14±0.06	1.08±0.55
	T5TB7	<i>Penicillium paxillii</i>	MH856391.1	499	100	99	MN737736.1	1.15±0.04	1.99±0.43
	T5TB14	<i>Talaromyces stollit</i> ***	JX315633.1	380	99	100		1.59±0.15	1.13±0.03
	T5TC1	<i>Byssoschlamys spectabilis</i>	NR_130679.1	402	100	100	MN737737.1	0	0
	T5TC2	<i>Penicillium mallochii</i>	NR_111674.1	395	99	99	MN737738.1	1.14±0.01	1.85±0.05
	T5TC3	<i>Penicillium mallochii</i>	NR_111674.1	459	100	100	MN737739.1	0	2.01±0.74
	T5TC4	<i>Trichoderma dorotheae</i>	MH863050.1	449	100	100	MN737740.1	0	0
	T5TC5	<i>Diaporthe passifloricola</i> ***	NR_147595.1	478	97	99		1.17±0.03	1.07±0.01
	T5TC6	Fungal species A						1.27±0.01	1.22±0.03
	T6TA1	<i>Trichoderma virens</i> ***	MH857855.1	330	100	100		0	1.06±0.02
	T6TA2	<i>Penicillium exudans</i>	NR_153273.1	340	100	100	MN737741.1	0	1.12±0.05
	T6TA3	<i>Cladosporium subuliforme</i>	MH864124.1	442	100	100	MT521712.1	2.89±0.38	2.12±0.36
	T6TA13	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	NR_145242.1	456	100	97	MT521713.1	0	1.07±0.02
	T6TB2	<i>Penicillium mallochii</i>	NR_111674.1	462	99	100	MN737742.1	1.07±0.01	1.38±0.02
	T6TC2	<i>Penicillium citrinum</i>	NR_121224.1	420	100	100	MN737743.1	1.16±0.05	1.38±0.03
	T6TC5	<i>Talaromyces stollii</i>	NR_111781.1	475	100	100	MN737744.1	1.25±0.10	0
III	T7TA1	<i>Penicillium citrinum</i>	MH856132.1	398	100	100	MN737745.1	0	1.63±0.04
	T7TA4	<i>Byssoschlamys spectabilis</i>	NR_130679.1	488	98	97	MT521714.1	1.33±0.18	0
	T7TB3.2	<i>Aspergillus stellatus</i>	NR_131287.1	399	100	100	MT521715.1	1.79±0.04	0
	T7TB5	<i>Penicillium atrofulvum</i> ***	JN606677.1	318	100	100		0	1.58±0.33
IV	T7TC2	<i>Penicillium rubens</i>	NR_111815.1	461	100	100	MN737746.1	1.2±0.07	1.27±0.11
	T9TA4	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	468	100	100	MT521716.1	0	
	T9TC3	<i>C. verrucocladosporioides</i> ***	MH863939.1	434	100	100		1.88±0.05	1.34±0.04
	T9TC4	<i>Myxospora musae</i>	NR_155387.1	467	98	100	MN737747.1	0	1.49±0.07

*Fungal codification of the Collection of Microbial Cultures Carlos Rosa CCR of the Federal University of Tocantins, Brazil. ** Arithmetic mean ± standard deviation. *** Identified with β-tubulin and not deposited.

Table 1. Continued...

Biomes	Code*	Taxa	N° GenBank accession	No. of bp analyzed	Query cover (%)	Identity (%)	My GenBank number	EI** (Xylanase)	EI** (Cellulase)	
CERRADO	V	T10TA5B	<i>Penicillium paxilli</i>	423	99	100	MN737748.1	1.35±0.17	1.34±0.09	
		T10TB2	<i>Cladosporium</i> sp.***	475	100	100		1.94±0.10	1.57±0.15	
		T10TB3	<i>Paraphaeosphaeria arecaeearum</i>	483	98	100	MT521717.1	1.25±0.03	1.19±0.02	
AMAZON FOREST		T10TB4	<i>Trichoderma neotropicale</i>	462	100	100	MT521718.1	0	0	
		T10TC2	<i>Clonostachys rosea</i> ***	274	100	96		1.23±0.04	1.09±0.01	
	VI	P2TA3	<i>Diaporthe stewartii</i>	MH855768.1	422	100	98	MT521719.1	0	0
		P2TA6	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	315	100	100	MN737731.1	1.17±0.07	1.6±0.17
		P2TA11	<i>Roussoella solani</i>	NR_145198.1	465	97	99	MT521720.1	0	0
	P2TA13	<i>Roussoella mexicana</i>	KT950848.1	253	100	100	MN401284	1.17±0.08	0	
	P2TA15	<i>Penicillium cairnsense</i> ***	NR_121508.1	385	100	100		1.37±0.02	1.38±0.14	
	P2TA18	<i>Roussoella solani</i>	NR_145198.1	474	100	99	MT521721.1	1.31±0.10	0	
	P2TB6	<i>Penicillium maximae</i>	NR_121343.1	463	100	100	MN737732.1	1.55±0.35	1.33±0.01	
	P2TC9	<i>Penicillium paxilli</i>	MH856391.1	427	97	100	MT521722.1	0	1.24±0.04	
	P2TC12	<i>Diaporthe pterocarpicola</i>	NR_111713.1	379	92	100	MN737733.1	1.15±0.04	0	
	VII	P4TA2	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>	NR_145242.1	403	96	100	MT521723.1	1.11±0.03	1.04±0.02
	VIII	P6TC2	<i>Penicillium rolfsii</i>	MH856397.1	461	100	100	MN737734.1	0	1.13±0.09
		P6TC6	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i> ***	NR_145242.1	326	96	99		0	0
IX	P7TB6	<i>Talaromyces palmae</i>	NR_103617.1	471	100	98	MT521724.1	0	0	
	P7TB11	<i>Talaromyces palmae</i>	NR_103617.1	417	100	98	MT521725.1	0	1.19±0.08	
	P7TB15	<i>Penicillium caseifulvum</i>	NR_163685.1	413	100	100	MT521726.1	1.07±0.03	1.14±0.05	
	P7TC6	<i>Talaromyces palmae</i>	NR_103617.1	515	100	98	MT521727.1	1.27±0.10	0	
	P7TC7	Fungal species B						1.11±0.02	0	

*Fungal codification of the Collection of Microbial Cultures Carlos Rosa CCR of the Federal University of Tocantins, Brazil. ** Arithmetic mean ± standard deviation. ***I identified with β-tubulin and not deposited.

the Amazon Forest, with three strains. Twenty-two species, including four species of the genus *Cladosporium*, seven species of *Penicillium*, three species of *Trichoderma* and *Diaporthe*, in addition to *Aspergillus stellatus*, *Myxospora musae*, *Paraphaeosphaeria areacearum*, *Clonostachys rosea*, and *Rousoella mexicana* occurred as singletons.

The Chao-1 index showed that, in both biomes, the ideal sampling number was not reached. Due to the overvaluation of species considered singletons in the calculation of richness, the Cerrado biome (54 fungal species) showed a greater estimate of richness than the Amazon Forest (15 fungal species). The Margalef richness index was also higher in the Cerrado, as were the Simpson and Shannon diversity indices (Table 2).

Differences in the physicochemical parameters of the water in the nine streams sampled were detected between the Cerrado and the Amazon Forest (Table 3). The mean altitude of Cerrado streams was above 400 m, while those in the Amazon Forest had a mean altitude of 99 m as they were in the Amazon plain. The mean temperature of the streams in the Cerrado was lower than in the Amazon Forest

by about 2 °C. The waters in the Amazon Forest streams were acidic and had higher electric conductivity and turbidity.

A total of 62% (Figure 2A) of the fungal community in the Cerrado exhibited enzyme activity for xylanase and strains *Cladosporium kenpeggii* MT521711.1 and *Cladosporium subuliforme* MT521712.1 showed the highest values of enzymatic indices (EI) (Table 1). Seventy-eight percent strains exhibited cellulolytic activity and the highest EI values were shown by *Cladosporium subuliforme* MT521712.1 and *Penicillium mallochii* MN737739.1 (Table 1). In the Amazon Forest (Figure 2B), 71% of strains exhibited xylanolytic activity and 35% exhibited positive activity for cellulase. The highest EI values were shown by strains *Penicillium maximae* MN737732.1 to xylanase and *Penicillium paxilli* MN737731.1 to cellulase (Table 1).

Discussion

The DTs of *Triplectides* larvae found in streams in the Amazon Forest and Cerrado host a diversified community

Table 2. Number of insects sampled (n) and richness and diversity of filamentous fungi in the DT of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) in Cerrado and Amazon Forest Biomes, Brazil.

Biomes	Geographical coordinates	Sampled larvae (n)	Richness (S)	Chao -1	Margalef	Simpson (1 - D)	Shannon (H)
Cerrado	I (10°03'33.40"S; 48°13'49.30"W)	n=3	10	54	6.5	0.95	3.06
	II (10°03'53.60"S; 48°14'58.00"W)	n=3	7				
	III (10°03'55.90"S; 48°14'57.70"W)	n=3	5				
	IV (10°04'25.00"S; 48°13'29.10"W)	n=2**	3				
	V (09°58'46.30"S; 48°17'03.20"W)	n=3	5				
	Richness	n= 14	23*				
Amazon Forest	VI (03°23'25.2"S; 54°56'26.3"W)	n=3	7	15	3.7	0.90	2.34
	VII (03°25'59.1"S; 54°54'59.6"W)	n=1**	1				
	VIII (03°07'04.3"S; 55°03'49.5"W)	n=1**	1				
	IX (03°33'48.2"S; 54°52'30.90"W)	n=2**	3				
	Richness	n= 7	11*				

Note: *Total value excluding taxon repetition; **Number of samples collected was lower due to lack of larvae during the field trip.

Table 3. Physicochemical parameters of sampled streams of Cerrado and Amazon Forest, Brazil.

Parameters*	Cerrado	Amazon Forest
Altitude (m)	452.2 ± 94.16	99 ± 18.67
Temperature (°C)	23.03 ± 23.03	25.84 ± 0.90
Turbidity	1.91 ± 1.04	2.83 ± 1.68
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	8.72 ± 0.21	8.71 ± 1.46
pH	6.46 ± 0.57	4.02 ± 0.13
Electrical conductivity (mS cm ⁻¹)	6.97 ± 4.23	18.74 ± 0.64
Width (m)	2.19 ± 1.25	3.01 ± 1.60
Depth (m)	0.14 ± 0.07	0.20 ± 0.11
Current velocity (m s ⁻¹)	0.30 ± 0.10	0.21 ± 0.15

*Arithmetic mean ± standard deviation.

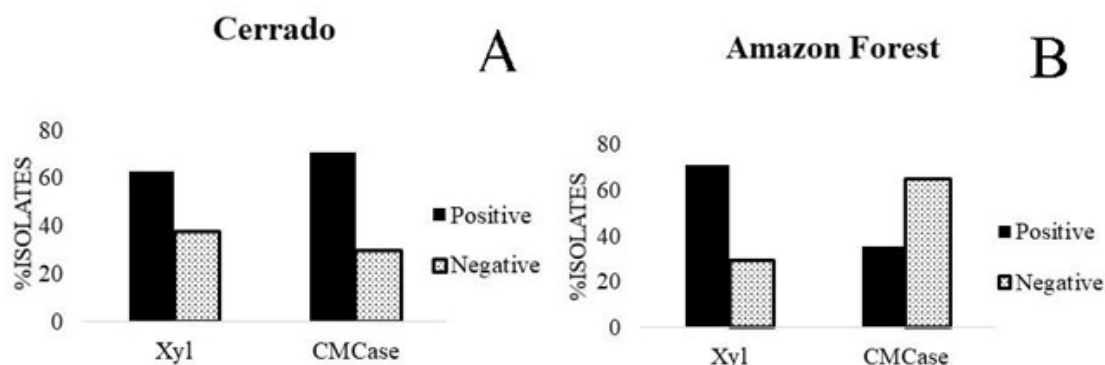


Figure 2. Percentage of fungal isolates from the DT of *Triplectides* (Trichoptera: Leptoceridae) in Cerrado (A) and Amazon Forest (B) biomes producers and non-producers of xylanase (Xyl) and cellulase (CMCase).

of fungi, as the diversity indices show (Table 2). *Triplectides* sp. larvae are usually found in patches of leaves located on the bed of streams and pools of water and are classified as a trophic group of leaf shredders (Kiffer et al., 2016). Therefore, it is expected that, when feeding on leaves, those larvae ingest a variety of microorganisms, including fungi colonizing such substrates, which may make up their mycobiome (Mohammed et al., 2018). That phenomenon is known as conditioning of the plant material and may occur by fungal colonization of the leaf litter in the environment. Those fungi may originate from the plant itself and from soil and water after the abscission of leaves. Seasonality affects the fall of leaf litter in tropical biomes (Atlantic Forest, Amazon Forest, and Cerrado), an effect that possibly impacts the quality and amount of substrates (Tonin et al., 2017). This might reflect on the distribution of shredder species in their microhabitat and also in the choice of the food (Abos et al., 2006). Since the present study did not select the type of leaf where the insect was collected (age, senescence, stage of decomposition, etc.), it is possible that the larvae had fed on leaves of different types that probably contain different microbial communities, thus forming a diverse microbiome.

Another possible origin of the high diversity of fungal groups in DT of larvae is the differences in diets of species and life cycles of the insects. There is strong evidence that substrates determine the intestinal microbiota of larvae and thus the diversity of the intestinal microbiota is fully related to the diet and life cycles of each insect species (Arias-Cordero et al., 2012; Mohammed et al., 2018; Alves Júnior et al., 2019). Recent studies show that the microbiomes differ in the stages of larval development (Chen et al., 2016; Gao et al., 2018; Yao et al., 2019), with higher diversity in the initial phase and greater richness in the adult phase (Gao et al., 2018). Since the larvae collected in this work were possibly at distinct larval stages, a diversified microbiome was expected. Also the physiology and physicochemical characteristics of the DTs of insects may vary between species and, thus, different larvae may host distinct microbial communities (Ceja-Navarro et al., 2014; Mason et al., 2017). In the field, it is not possible to distinguish larvae of different *Triplectides* species, specially in the two biomes where there are few

thorough taxonomic studies of aquatic insects, and the distinction of species is accomplished by examination of adult stages (Pes et al., 2005).

The fungal community was composed mostly of singletons, i.e., with a low frequency of occurrence of a large number of species. One of the possible explanations for this fact is related to the diversity of substrates on which the larvae were collected. That is supported by the literature, the high frequency of singletons may be related to the high diversity of fungi associated with plant substrates (Martins et al., 2017; Malta et al., 2019; Ferreira et al., 2019). It also reinforces evidence that the diets of larvae of the same taxon of Trichoptera may vary due to the differences in riparian vegetation in their aquatic habitats.

A high number of filamentous fungi morphospecies per DT (6.2 ± 6.4) of larvae of *Phylloicus* was counted in streams of the Amazon Forest (Santos et al., 2018). In the present study, the mean number of taxa per DT was 2.33, much lower than the value reported by Santos et al. (2018). That is likely due to the high diversity of the insect genus *Phylloicus* that presents 25 spp described for Brazil (Santos et al., 2019). This study, in turn, investigated the mycobiome of *Triplectides*, which has about 14 species described in Brazil (Pes et al., 2014). It is highly probable that the set of *Triplectides* larvae collected belonged to a narrower group of species. Studies (Clair, 1994; Pimentel et al., 2020) report both *Phylloicus* and *Triplectides* as little selective and the availability of food items is the greatest influence on their diet. *Phylloicus* are detritivores, being shredders only for breaking down leaves for shelter construction (Pimentel et al., 2020), another explanation for the higher diversity of fungi in DT of this genus as compared to *Triplectides*.

The present results indicated common taxa in both biomes, as is the case of the genus *Penicillium*, which was the most frequent in this research (40%) and occurred both in the Cerrado and in the Amazon Forest. The genus *Penicillium* was also found in the DT of larvae of *Phylloicus* in the same sites of Cerrado and Amazon Forest biomes (Santos et al., 2018) as also in larvae of *Triplectides*, *Phylloicus* and *Stenochironomus* aquatic insects in streams sampled in another site of the Amazon Forest in the State of Amazonas,

Brazil, together with *Aspergillus* and *Trichoderma* (Belmont-Montefusco et al., 2020a; Belmont-Montefusco et al., 2020b). In addition, the species *Paraphaeosphaeria arecaeearum*, found in the DT of *Triplectides* in Cerrado, was also isolated in the DT of *Phylloicus* in the same Cerrado sites by Santos et al. (2018). Thus, despite the differences among the environmental factors of each biome and even among the larval species studied, such species may have a mycobiome in common, formed by fungi ubiquitous in the environment, which reinforces the possibility that those fungi are important to the insects.

Many of the fungal taxa found in the DT of *Triplectides* are of broad occurrence in aquatic and terrestrial environments (Gutiérrez et al., 2015; Song et al., 2018). The genus *Penicillium* is found widely in nature in soil and plants, in the air, and in decaying vegetation (Godinho et al., 2015; Mohammadian et al., 2017). The genus *Cladosporium* is very diverse, common, and widespread, including endophytic, pathogenic, phytopathogenic, and saprophytic species (Bensaci et al., 2015).

The most frequent species were *Penicillium paxilli* in the Cerrado and *Talaromyces palmae* in the Amazon Forest. The species *T. palmae* belongs to an endophytic group (Sette et al., 2006), which includes *P. paxilli* that was first isolated from leaves (Rukachaisirikul et al., 2007). Based on those findings and considering the diet of insect larvae is based on leaves, it can be suggested that some of the fungi in the insects diet may be of endophytic or epiphytic origin. Endophytic fungi are a very diversified group present in most plants (Marques et al., 2018; Ramírez-Camejo, 2024) and, according to Peay et al. (2016), the diversity of endophytic fungi associated with leaves is higher in tropical forests when compared with larger spatial scales. And some endophytic fungi may be good producers of enzymes, such as cellulases and xylanases (Amirita et al., 2012; Corrêa et al., 2014).

The community of fungi associated with the DT of *Triplectides* in Cerrado has higher richness and diversity than those in the Amazon forest, which may be influenced by several factors. Particularities of streams such as current velocity, width, and depth (Landeiro et al., 2010) and leaf characteristics are important and must be taken into account in studies on tropical streams (Li et al., 2009; Landeiro et al., 2010). Current velocity may also influence the feeding of insects inhabiting streams (Boyero et al., 2006). Moreover, the taxonomy and functionality of the composition of communities of Trichoptera in Cerrado streams may be determined by factors such as physical structure of the streams and water quality (Ferreira et al., 2017). That may explain the differences in composition of the fungal community of *Triplectides* DT between those two biomes. Streams in the Amazon Forest and Cerrado, besides having distinct abiotic characteristics and plant physiognomies, can host different species of *Triplectides*, thus resulting in different mycobiomes. In the Cerrado, a higher diversity of species of *Triplectides* may have been sampled, since fourteen insects were sampled in the Cerrado whereas only seven were collected in the Amazon Forest. In addition to those, factors such as altitude, which was different in the streams studied, may have an influence. According to Camacho et al. (2009), the

abundance and richness of shredder species vary with the altitude due to the variation in temperature. According to Casotti et al. (2015), the characteristics of the leaves may induce the behavior of shredders, such as *Triplectides*, as these organisms are able to choose the most palatable resources. The Cerrado vegetation has leaves with waxes, hair, and other characteristics (Fank-de-Carvalho et al., 2010) that make them less palatable than forest vegetation (Landeiro et al., 2010; Reis et al., 2019). *Triplectides* larvae may feed preferably in leaves heavily conditioned by fungi in Cerrado streams, explaining the higher fungal diversity in Cerrado than Amazon Forest.

The occurrence of filamentous fungi producers of cellulases and xylanases in the DT of *Triplectides* larvae indicates that those organisms may play a role in the breakdown of lignocellulosic matter ingested by the larva. The percentage of CMCase-producing strains in the Cerrado (78%) was more than two-fold that in the Amazon Forest (35%). The differences in vegetation composition may have influenced the enzymatic profile of the fungal community in the biomes studied since different plant species host different fungal species (Ferreira et al., 2015). Also, the lower palatability of leaves from Cerrado vegetation may account for differences in fungal enzymatic capabilities in leaves of these two biomes. The percentages of strains that broke down xylan in the Cerrado (62%) and in the Amazon Forest (71%) indicate that the fungal community is more xylanolytic than cellulolytic. That is certainly due to the characteristic of the *Triplectides* insect that feeds both on leaves and on wood (Oliveira and Pes, 2014; Cortez and Gonçalves, 2015). And, as plant cell walls are composed of cellulose, hemicellulose (mainly xylan), and lignin (Walia et al., 2017), xylan requires several xylanolytic enzymes for full hydrolysis (Okeke, 2014).

In this work, it was observed that some taxa are potentially higher enzyme-producers than others. The genera *Cladosporium* and *Penicillium* exhibited the highest enzymatic indexes for xylanase and cellulase, having, in this case, greater extracellular enzyme activity (Oliveira et al., 2006). The species that had the highest indices were *Cladosporium kenpeggii*, which is considered a new, little-studied species (Marin-Felix et al., 2017), as well as *Cladosporium subuliforme* (Ramos-García et al., 2016) and *Penicillium malochii* (Rivera et al., 2012). According to the literature, *Penicillium* species may produce enzymes able to break down lignocellulosic material (Andersen et al., 2016; Mohammed et al., 2018), as well as species of *Cladosporium* (Andersen et al., 2016; Marques et al., 2018).

It is likely that the larvae acquire the fungi from their diet, which, along with the environment where they live, impact the formation of the mycobiome of the larvae (Yao et al., 2019). In that case, fungi may represent an additional food item so that many fungi can be considered a reasonable source of amino acids and nitrogen in insect diets (Mason et al., 2017). In addition to being part of larva diet, the symbiotic role of that fungal community may be related to the action of enzymes able to delignify the material made up of, mainly, cellulose, hemicellulose (Gao et al., 2018; Alves Júnior et al., 2019), and xylans, enriching the diet of the insect, thus exerting a nutritional role (Mohammed et al., 2018). Our results point to the

hypothesis that the fungal community found in DT of *Triplectides* larvae helps in processing the food both during conditioning in the ecosystem and in the DT. The presence of xylanolytic and cellulolytic fungi in the DT of aquatic shredder insects supports the hypothesis of a nutritional role of fungi as a symbiont and reinforces the importance of ecological studies for the discovery of biotechnological potential for enzyme production of fungal strains new to science.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for funding the project Edital Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia No. 79/2013; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship provided to Mayra F. N. P. Teixeira; the staff of the LAMBIO - Federal University of Tocantins for the technical support; the staff of the Laboratory of Citotaxonomy and Aquatic Insects - LACIA of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, especially Dr Neusa Hamada, Jefferson Oliveira da Silva and Dr Gizelle Amora Gusmão for the field work on collection and identification of *Triplectides* larvae.

References

- ABOS, C.P., LEPORI, F., MCKIE, B.G. and MALMQVIST, B., 2006. Aggregation among resource patches can promote coexistence in stream-living shredders. *Freshwater Biology*, vol. 51, no. 3, pp. 545-553. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01509.x>.
- ALMEIDA, P.Z., PEREIRA, M.G., CARVALHO, C.C., HEINEN, P.R., ZIOTTI, L.S., MESSIAS, J.M., JORGE, J.A. and POLIZELI, M.L.T.M., 2017. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotropica*, vol. 17, no. 3, p. e20170337. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0337>.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. and LIPMAN, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). PMID:2231712.
- ALVES JÚNIOR, S.L., MÜLLER, C., BONATTO, C., SCAPINI, T., CAMARGO, A.F., FONGARO, G. and TREICHEL, H., 2019. Bioprospection of enzymes and microorganisms in insects to improve second-generation ethanol production. *Industrial Biotechnology*, vol. 15, no. 6, pp. 336-349. <http://dx.doi.org/10.1089/ind.2019.0019>.
- AMIRITA, A., SINDHU, P., SWETHA, J., VASANTHI, N.S. and KANNAN, K.P., 2012. Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World Journal of Science and Technology*, vol. 2, no. 2, pp. 13-19.
- ANDERSEN, B., POULSEN, R. and HANSEN, G.H., 2016. Cellulolytic and xylanolytic activities of common indoor fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 107, pp. 111-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.012>.
- ARIAS-CORDERO, E., PING, L., REICHWALD, K., DELB, H., PLATZER, M. and BOLAND, W., 2012. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e51557. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051557>. PMID:23251574.
- BELMONT-MONTEFUSCO, E.L., NACIF-MARÇAL, L., ASSUNÇÃO, E.N., HAMADA, N. and NUNES-SILVA, C.G., 2020a. Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects. *Acta Amazonica*, vol. 50, no. 4, pp. 346-354. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392202000902>.
- BELMONT-MONTEFUSCO, E.L., OLIVEIRA, J.B., MAR, H.B., SANTA-ROSA, P.S., HAMADA, N. and NUNES-SILVA, C.G., 2020b. Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus Kieffer* (Insecta: Diptera: Chironomidae). *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, no. 5, pp. 28644-28651. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n5-347>.
- BENSACI, O.A., DAOUD, H., LOMBARKIA, N. and ROUABAH, K., 2015. Formulation of the endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* Berk. & M.A. Curtis, isolated from *Euphorbia bupleuroides* subsp. *luteola*, as a new biocontrol tool against the black bean aphid (*Aphis fabae* Scop.). *Journal of Plant Protection Research*, vol. 55, no. 1, pp. 80-87. <http://dx.doi.org/10.1515/jppr-2015-0011>.
- BOUCIAS, D.G., LIETZE, V.U. and TEAL, P., 2012. Chemical signals that mediate insect-fungal interactions. In: G. WITZANY, ed. *Biocommunication of fungi*. Dordrecht: Springer, pp. 305-336. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-4264-2_20.
- BOYERO, L., PEARSON, R.G. and CAMACHO, R., 2006. Leaf breakdown in tropical streams: the role of different species in ecosystem functioning. *Archiv für Hydrobiologie*, vol. 166, no. 4, pp. 453-466. <http://dx.doi.org/10.1127/0003-9136/2006/0166-0453>.
- BURGHOOORN, H.P., SOTEROPOULOS, P., PADERU, P., KASHIWAZAKI, R. and PERLIN, D.S., 2002. Molecular evaluation of the plasma membrane proton pump from *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, no. 3, pp. 615-624. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.3.615-624.2002>. PMID:11850239.
- CAMACHO, R., BOYERO, L., CORNEJO, A., IBÁÑEZ, A. and PEARSON, R.G., 2009. Local variation in shredder distribution can explain their oversight in tropical streams. *Biotropica*, vol. 41, no. 5, pp. 625-632. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.2009.00519.x>.
- CASOTTI, C.G., KIFFER JUNIOR, W.P. and MORETTI, M.S., 2015. Leaf traits induce the feeding preference of a shredder of the genus *Triplectides* Kolenati, 1859. (Trichoptera) in an Atlantic Forest stream, Brazil: a test with native and exotic leaves. *International Journal of Freshwater Entomology*, vol. 36, pp. 43-52.
- CASTELLANI, A., 1939. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 42, pp. 65-72.
- CEJA-NAVARRO, J.A., NGUYEN, N.H., KARAOZ, U., GROSS, S.R., HERMAN, D.J., ANDERSEN, G.L., BRUNS, T.D., PETT-RIDGE, J., BLACKWELL, M. and BRODIE, E.L., 2014. Compartmentalized microbial composition, oxygen gradients and nitrogen fixation in the gut of *Odontotaenius disjunctus*. *The ISME Journal*, vol. 8, no. 1, pp. 6-18. PMID:23985746.
- CHEN, B., TEH, B.S., SUN, C., HU, S., LU, X., BOLAND, W. and SHAO, Y., 2016. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 29505. <http://dx.doi.org/10.1038/srep29505>. PMID:27389097.
- CLAIR, R.M., 1994. Diets of some larval Leptoceridae (Trichoptera) in South-eastern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, vol. 45, pp. 1023-1032. <http://dx.doi.org/10.1071/MF9941023>.
- CORRÊA, R.C.G., RHODEN, S.A., MOTA, T.R., AZEVEDO, J.L., PAMPHILE, J.A., SOUZA, C.G.M., POLIZELI, M.L.T.M., BRACHT, A. and PERALTA, R.M., 2014. Endophytic fungi: expanding the

- arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 41, no. 10, pp. 1467-1478. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>. PMID:25117531.
- CORTEZ, V.G. and GONÇALVES, R.B., 2015. *Guia da biodiversidade de Palotina*. Palotina: Editora UFPR.
- DOUGLAS, A.E., 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, vol. 60, no. 1, pp. 17-34. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>. PMID:25341109.
- ENGEL, P. and MORAN, N.A., 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 37, no. 5, pp. 699-735. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12025>. PMID:23692388.
- FANK-DE-CARVALHO, S.M., GOMES, M.R.A., SILVA, P.I.T. and BÃO, S.N., 2010. Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. *Biocell*, vol. 34, no. 1, pp. 23-36. <http://dx.doi.org/10.32604/biocell.2010.34.023>. PMID:20506628.
- FERREIRA, E.M.S., SOUSA, F.M.P., ROSA, L.H. and PIMENTA, R.S., 2019. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*, vol. 23, no. 1, pp. 151-159. <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-018-1069-9>. PMID:30499002.
- FERREIRA, W.R., HEPP, L.U., LIGEIRO, R., MACEDO, D.R., HUGHES, R.M., KAUFMANN, P.R. and CALLISTO, M., 2017. Partitioning taxonomic diversity of aquatic insect assemblages and functional feeding groups in neotropical savanna headwater streams. *Ecological Indicators*, vol. 72, pp. 365-373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.042>.
- FERREIRA, W.R., LIGEIRO, R., MACEDO, D.R., HUGHES, R.M., KAUFMANN, P.R., OLIVEIRA, L.G. and CALLISTO, M., 2015. Is the diet of a typical shredder related to the physical habitat of headwater streams in the Brazilian Cerrado? *International Journal of Limnology*, vol. 51, no. 2, pp. 115-127. <http://dx.doi.org/10.1051/limn/2015004>.
- GAO, G., GAO, J., HAO, C., DAI, L. and CHEN, H., 2018. Biodiversity and activity of gut fungal communities across the life history of *Trypophloeus klimeschi* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7, p. 2010. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19072010>. PMID:29996485.
- GIBSON, C.M. and HUNTER, M.S., 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters*, vol. 13, no. 2, pp. 223-234. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01416.x>. PMID:20015249.
- GODINHO, V.M., FURBINO, L.E., SANTIAGO, I.F., PELLIZZARI, F.M., YOKOYA, N.S., PUPO, D., ALVES, T.M.A., SALES JÚNIOR, P.A., ROMANHA, A.J., ZANI, C.L., CANTRELL, C.L., ROSA, C.A. and ROSA, L.H., 2013. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal*, vol. 7, no. 7, pp. 1434-1451. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.77>. PMID:23702515.
- GODINHO, V.M., GONÇALVES, V.N., SANTIAGO, I.F., FIGUEREDO, H.M., VITORELI, G.A., SCHAEFER, C.E.G.R., BARBOSA, E.C., OLIVEIRA, J.G., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., SALES JÚNIOR, P.A., MURTA, S.M.F., ROMANHA, A.J., KROON, E.G., CANTRELL, C.L., WEDGE, D.E., DUKE, S.O., ALI, A., ROSA, C.A. and ROSA, L.H., 2015. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, vol. 19, no. 3, pp. 585-596. <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-015-0741-6>. PMID:25809294.
- GRAÇA, M.A.S., CRESSA, C., GESSNER, M.O., FEIO, M.J., CALLIES, K.A. and BARRIOS, C., 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater Biology*, vol. 46, no. 7, pp. 947-957. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00729.x>.
- GRAÇA, M.A.S., HYDE, K. and CHAUVET, E., 2016. Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical – subtropical low order streams. *Fungal Ecology*, vol. 19, pp. 182-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2015.08.001>.
- GUTIÉRREZ, M.H., GALAND, P.E., MOFFAT, C. and PANTOJA, S., 2015. Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. *Environmental Microbiology*, vol. 17, no. 10, pp. 3882-3897. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12872>. PMID:25856307.
- HAMADA, N., NESSIMIAN, J.L. and QUERINO, R.B., 2014. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Manaus: Editora do INPA.
- HAMMER, O., HARPER, D.A.T. and RYAN, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, pp. 1-9.
- JABIOL, J. and CHAUVET, E., 2012. Fungi are involved in the effects of litter mixtures on consumption by shredders. *Freshwater Biology*, vol. 57, no. 8, pp. 1667-1677. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02829.x>.
- KIFFER, W.P., MENDES, F., RANGEL, J.V., BARBOSA, P., SERPA, K. and MORETTI, M.D.A.S., 2016. Size-mass relationships and the influence of larval and case size on the consumption rates of *Triplectides* sp. (Trichoptera, Leptoceridae). *Archiv für Hydrobiologie*, vol. 188, no. 1, pp. 73-81. <http://dx.doi.org/10.1127/fal/2016/0855>.
- KWONG, W.K. and MORAN, N.A., 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 14, no. 6, pp. 374-384. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>. PMID:27140688.
- LANDEIRO, V.L., HAMADA, N., GODOY, B.S. and MELO, A.S., 2010. Effects of litter patch area on macroinvertebrate assemblage structure and leaf breakdown in Central Amazonian streams. *Hydrobiologia*, vol. 649, no. 1, pp. 355-363. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-010-0278-8>.
- LEÓN, A.V.-P., SANCHEZ-FLORES, A., ROSENBLUETH, M. and MARTÍNEZ-ROMERO, E., 2016. Fungal community associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 954. PMID:27446001.
- LI, A.O.Y., NG, L.C.Y. and DUDGEON, D., 2009. Effects of leaf toughness and nitrogen content on litter breakdown and macroinvertebrates in a tropical stream. *Aquatic Sciences*, vol. 71, no. 1, pp. 80-93. <http://dx.doi.org/10.1007/s00027-008-8117-y>.
- MALTA, C.M., FERREIRA, E.M.S., SILVA, T.H., OLIVEIRA, D.A.B., SILVA, F.M.P., SILVA, J.F.M. and PIMENTA, R.S., 2019. Isolation of epiphytic yeasts from *Eugenia dysenterica* DC. fruits and evaluation of their antimicrobial activity against phytopathogenic fungi. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, vol. 14, no. 2, pp. 223-231. <http://dx.doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i2.176>.
- MARIN-FELIX, Y., GROENEWALD, J.Z., CAI, L., CHEN, Q., MARINCOWITZ, S., BARNES, I., BENSCH, K., BRAUN, U., CAMPORESI, E., DAMM, U., BEER, Z.W., DISSANAYAKE, A., EDWARDS, J., GIRALDO, A., HERNÁNDEZ-RESTREPO, M., HYDE, K.D., JAYAWARDENA, R.S., LOMBARD, L., LUANGSA-ARD, J., MCTAGGART, A.R., ROSSMAN, A.Y., SANDOVAL-DENIS, M., SHEN, M., SHIVAS, R.G., TAN, Y.P., VAN DER LINDE, E.J., WINGFIELD, M.J., WOOD, A.R., ZHANG, J.Q., ZHANG, Y. and CROUS, P.W., 2017. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*, vol. 86, no. 1, pp. 99-216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>. PMID:28663602.
- MARQUES, N.P., PEREIRA, J.C., GOMES, E., SILVA, R., ARAÚJO, A.R., FERREIRA, H., RODRIGUES, A., DUSSÁN, K.J. and BOCCHINI, D.A.,

2018. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, vol. 122, pp. 66-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>.
- MARTINS, R.T., MELO, A.S., GONÇALVES JÚNIOR, J.F., CAMPOS, C.M. and HAMADA, N., 2017. Effects of climate change on leaf breakdown by microorganisms and the shredder *Phylloicus electros* (Trichoptera: calamoceratidae). *Hydrobiologia*, vol. 789, no. 1, pp. 31-44. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-016-2689-7>.
- MASON, C.J., LONG, D.C., MCCARTHY, E.M., NAGACHAR, N., ROSA, C., SCULLY, E.D., TIEN, M. and HOOVER, K., 2017. Within gut physicochemical variation does not correspond to distinct resident fungal and bacterial communities in the tree-killing xylophage, *Anoplophora glabripennis*. *Journal of Insect Physiology*, vol. 102, pp. 27-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.003>. PMID:28823530.
- MOHAMMADIAN, E., AHARI, A.B., ARZANLOU, M., OUSTAN, S. and KHAZAEI, S.H., 2017. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan province, Iran. *Chemosphere*, vol. 185, pp. 290-296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.022>. PMID:28700958.
- MOHAMMED, W.S., ZIGANSHINA, E.E., SHAGIMARDANOVA, E.I., GOGOLEVA, N.E. and ZIGANSHIN, A.M., 2018. Comparison of intestinal bacterial and fungal communities across various xylophagous beetle larvae (Coleoptera: cerambycidae). *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 10073. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27342-z>. PMID:29968731.
- NOGUEIRA, E.B.S. and CAVALCANTI, M.A.Q., 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia*, vol. 27, pp. 7-9.
- OKEKE, B.C., 2014. Cellulolytic and xylanolytic potential of high β -glucosidase-producing *Trichoderma* from decaying biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 174, no. 4, pp. 1581-1598. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1121-x>. PMID:25129039.
- OLIVEIRA, A.N., OLIVEIRA, L.A., ANDRADE, J.S. and CHAGAS JÚNIOR, A.F., 2006. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Food Science and Technology*, vol. 26, no. 4, pp. 853-860. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000400022>.
- OLIVEIRA, V.C. and PES, A.M.O., 2014. Inventário da fauna de insetos aquáticos: coleta, preservação e criação. In: N. HAMADA, J.L. NESSIMIAN and R.B. QUERINO, eds. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Manaus: Editora do INPA, pp. 155-171.
- PEAY, K.G., KENNEDY, P.G. and TALBOT, J.M., 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 14, no. 7, pp. 434-447. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>. PMID:27296482.
- PES, A.M.O., HAMADA, N. and NESSIMIAN, J.L., 2005. Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, vol. 49, no. 2, pp. 181-204. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262005000200002>.
- PES, A.M.O., SANTOS, A.P.M., BARCELOS-SILVA, P. and CAMARGOS, L.M., 2014. Ordem Trichoptera. In: N. HAMADA, J.L. NESSIMIAN and R.B. QUERINO, eds. *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia*. Manaus: Editora do INPA, pp. 391-433.
- PIMENTEL, D.R., COUCEIRO, S.R.M. and SALCEDO, A.K.M., 2020. Diet of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) caddisfly larvae in forest streams of western Pará, central Brazilian Amazonia. *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 32, p. e13. <http://dx.doi.org/10.1590/s2179-975x01919>.
- RAMÍREZ-CAMEJO, L.A., 2024. Diversity of culturable endophytic fungi vary through time in *Manihot esculenta* Crantz. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 84, p. e253156. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.253156>. PMID:35019095.
- RAYMANN, K. and MORAN, N.A., 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, vol. 26, pp. 97-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>. PMID:29764668.
- REIS, D.F., MACHADO, M.M.D., COUTINHO, N.P., RANGEL, J.V., MORETTI, M.S. and MORAIS, P.B., 2019. Feeding preference of the shredder *Phylloicus* sp. for plant leaves of *Chrysophyllum oliviforme* or *Miconia chartacea* after conditioning in streams from different biomes. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 79, no. 1, pp. 22-28. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.170644>. PMID:29694562.
- RUKACHAISIRIKUL, V., KAEOBAMRUNG, J., PANWIRIYARAT, W., SAITAI, P., SUKPONDMA, Y., PHONGPAICHT, S. and SAKAYAROJ, J., 2007. A new pyrone derivative from the endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 55, no. 9, pp. 1383-1384. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.55.1383>. PMID:17827767.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>. PMID:271968.
- SANTOS, A.P.M., CALOR, A.R., DUMAS, L.L., PES, A.M.O., SOUZA, W.R.M., HENRIQUES-OLIVEIRA, A.L. and CAMARGOS, L.M., 2019 [viewed 27 April 2022]. *Trichoptera* [online]. Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Available from: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/278>
- SANTOS, T.T., LEITE, T.S., QUEIROZ, C.B., ARAÚJO, E.F., PEREIRA, O.L. and QUEIROZ, M.V., 2016. High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 120, no. 2, pp. 388-401. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12985>. PMID:26541097.
- SANTOS, T.T., OLIVEIRA, K.A., VITAL, M.J.S., COUCEIRO, S.R.M. and MORAIS, P.B., 2018. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, vol. 13, no. 3, pp. 317-325. <http://dx.doi.org/10.46357/bcnaturais.v13i3.340>.
- SETTE, L.D., PASSARINI, M.R.Z., DELARMELENA, C., SALATI, F. and DUARTE, M.C.T., 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 22, no. 11, pp. 1185-1195. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2>.
- SIX, D.L., 2012. Ecological and evolutionary determinants of bark beetle-fungus symbioses. *Insects*, vol. 3, no. 1, pp. 339-366. <http://dx.doi.org/10.3390/insects3010339>. PMID:26467964.
- SONG, P., TANABE, S., YI, R., KAGAMI, M., LIU, X. and BAN, S., 2018. Fungal community structure at pelagic and littoral sites in Lake Biwa determined with high-throughput sequencing. *Limnology*, vol. 19, no. 2, pp. 241-251. <http://dx.doi.org/10.1007/s10201-017-0537-8>.
- TONIN, A.M., GONÇALVES JÚNIOR, J.F., BAMBI, P., COUCEIRO, S.R.M., FEITOZA, L.A.M., FONTANA, L.E., HAMADA, N., HEPP, L.U., LEZAN-KOWALCZUK, V.G., LEITE, G.F.M., LEMES-SILVA, A.L., LISBOA, L.K., LOUREIRO, R.C., MARTINS, R.T., MEDEIROS, A.O., MORAIS, P.B.,

- MORETTO, Y., OLIVERIA, P.C.A., PEREIRA, E.B., FERREIRA, L.P., PÉREZ, J., PETRUCIO, M.M., REIS, D.F., REZENDE, R.S., ROQUE, N., SANTOS, L.E.P., SIEGLOCH, A.E., TONELLO, G. and BOYERO, L., 2017. Plant litter dynamics in the forest-stream interface: precipitation is a major control across tropical biomes. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 10799. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10576-8>. PMID:28883445.
- VOGEL, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetics Bulletin*, vol. 13, pp. 42-43.
- WALIA, A., GULERIA, S., MEHTA, P., CHAUHAN, A. and PARKASH, J., 2017. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*, vol. 7, no. 1, p. 11. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0584-6>. PMID:28391477.
- WHITE, T.J., BURNS, T.D., LEE, S.B. and TAYLOR, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. INNIS, D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY and T.J. WHITE, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. London: Academic Press, pp. 315-322.
- YAO, Z., MA, Q., CAI, Z., RAZA, M.F., BAI, S., WANG, Y., ZHANG, H., MA, H. and ZHANG, H., 2019. Similar shift patterns in gut bacterial and fungal communities across the life stages of *Bactrocera minax* larvae from two field populations. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 2262. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02262>. PMID:31649629.
- ZHANG, Y.-H.P., HIMMEL, M.E. and MIELENZ, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, vol. 24, no. 5, pp. 452-481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>. PMID:16690241.