

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS ÀS FORMIGAS
ATÍNEAS PARA A SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E ZINCO**

Helena Barana Demiate

Orientador: Dr. Quimi Vidaurre Montoya

Coorientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro (SP)
2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

Helena Barana Demiate

PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS ÀS
FORMIGAS ATÍNEAS PARA A SOLUBILIZAÇÃO DE
FOSFATO E ZINCO

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de
Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP

2024

D378p

Demiate, Helena Barana

Prospecção de leveduras associadas às formigas atíneas para a solubilização de fosfato e zinco / Helena Barana Demiate. -- Rio Claro, 2024

23 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro

Orientador: Quimi Vidaurre Montoya

Coorientador: André Rodrigues

1. Biofertilizante. 2. Biotecnologia. 3. Leveduras solubilizadoras. 4. Agricultura sustentável. I. Título.

HELENA BARANA DEMIATE

PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ASSOCIADAS ÀS FORMIGAS
ATÍNEAS PARA A SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E ZINCO

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de
Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de engenheiro Ambiental.

Comissão Examinadora

Quimi Viadaurre Montoya (orientador)

Igor Vinicius Ramos Otero (titular)

Patrícia Giovanella (titular)

Rio Claro, 29 de novembro de 2024

Assinatura da discente

Assinatura do orientador

AGRADECIMENTOS

À UNESP, por toda a infraestrutura e por abrir as portas para oportunidades únicas.

À toda a equipe do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), pela ajuda e disponibilidade em me ensinar os processos laboratoriais.

Aos processos n° 2019/03746-0 e n° 2021/04706-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Às pessoas importantes para mim que, ao longo do caminho, me acompanharam e foram suporte.

RESUMO

As formigas cultivadoras de fungos (as 'atíneas') mantêm uma complexa rede simbiótica com diversos microrganismos, como as leveduras. Estas apresentam uma grande importância ecológica em ambientes de simbiose de outros insetos, além de um alto potencial biotecnológico como solubilizadores de fosfato e zinco para a agricultura. No entanto, tais potenciais das leveduras foram pouco explorados nas colônias das atíneas. Devido à alta diversidade das formigas atíneas e à inerência das leveduras nesse sistema, acredita-se que o ambiente desses insetos seja promissor para a busca desses microrganismos com potencial de solubilização de fosfato e zinco, para aplicação como biofertilizantes. Neste trabalho, pela primeira vez, avaliamos o potencial de leveduras associadas ao jardim de fungo das formigas atíneas para a solubilização de fosfato e zinco. Para tanto, foram avaliadas 43 leveduras (pertencentes a 33 espécies, em 17 gêneros), isoladas dos jardins de fungo de 14 espécies de formigas atíneas, quanto ao potencial de solubilização desses compostos. Os isolados foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultivo *Yeast Malt Extract Agar*. Os inóculos foram preparados utilizando meio líquido *Yeast Peptone Dextrose* e os testes de solubilização de fosfato e zinco foram realizados em placas contendo meio de cultivo *Pikovskaya*, suplementados com fosfato de cálcio e óxido de zinco, respectivamente. A formação de halos transparentes ao redor das colônias foi considerada como positivo para a solubilização desses compostos; já a ausência de halos foi considerada como resultado negativo. Os resultados encontrados mostraram que 31 leveduras solubilizaram fosfato [Índice de Solubilização (IS) < 2], sete apresentaram capacidade de solubilizar zinco (IS < 2) e sete apresentaram capacidade de solubilizar ambos os compostos (IS < 2), o que indica uma capacidade de solubilização de fosfato e zinco baixa, quando comparada com leveduras de outros sistemas, como solo e rizosfera de plantas. Apesar disso, esses resultados são inéditos e preenchem uma lacuna importante no estudo da ecologia e do potencial biotecnológico desses fungos. Estudos mais aprofundados combinando várias técnicas e meios de cultivo, juntamente com testes de consórcio microbiano, são necessários para desvendar o verdadeiro potencial desses microrganismos para a solubilização de fosfato e zinco.

Palavras-chave: Biofertilizante; Biotecnologia; Leveduras solubilizadoras; Agricultura sustentável.

ABSTRACT

Fungus-growing ants (the 'attines') maintain a complex symbiotic network with various microorganisms, such as yeasts. Yeasts play a significant ecological role in the symbiotic environments of other insects, in addition to having high biotechnological potential as phosphate and zinc solubilizers for agriculture. However, these potentials have been minimally explored within the colonies of attine ants. Due to the high diversity of attine ants and the inherent presence of yeasts in this system, it is believed that the environment of these insects holds promise for the discovery of microorganisms with phosphate and zinc solubilizing potential, for use as biofertilizers. In this study, the potential of yeasts associated with the fungal garden of attine ants for phosphate and zinc solubilization was explored for the first time. To this end, 43 yeasts (33 species in 17 genera) isolated from the fungus gardens of 14 species of attine ants were assessed for their ability to solubilize these compounds. The isolates were reactivated on Petri plates containing Yeast Malt Extract Agar medium, inocula were prepared using liquid Yeast Peptone Dextrose medium, and phosphate and zinc solubilization tests were conducted on plates containing Pikovskaya medium supplemented with calcium phosphate and zinc oxide, respectively. The appearance of translucent halos around the colonies was considered a positive result for the solubilization of these compounds, while the absence of halos was considered a negative result. Our findings showed that 31 yeasts solubilized phosphate [Solubilization Index (SI) < 2], seven exhibited the ability to solubilize zinc (SI < 2), and seven solubilized both compounds (SI < 2), indicating lower phosphate and zinc solubilization capacity compared to yeasts from other systems, such as soil and plant rhizospheres. Nevertheless, these results are unprecedented and fill an important gap in the study of the ecology and biotechnological potential of these fungi. Further studies combining various techniques and culture media, along with microbial consortium tests, are necessary to unveil the true potential of these microorganisms for phosphate and zinc solubilization.

Keywords: Biofertilizer; Biotechnology; Solubilizing yeasts; Sustainable agriculture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Obtenção das leveduras.....	9
3.2 Reativação das leveduras	11
3.3 Avaliação do potencial de solubilização de fosfato e zinco	11
3.3.1 Solubilização de fosfato	12
3.3.2 Solubilização de zinco.....	13
3.4 Análises estatísticas.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são organismos diversos que habitam uma elevada variedade de ambientes (Buzzini *et al.*, 2017), incluindo as colônias de diferentes insetos sociais (Giraldo *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2008). Embora o papel ecológico das leveduras associadas a maioria dos insetos ainda é pouco conhecido (Giraldo *et al.*, 2022), há sistemas de insetos nos quais a importância ecológica destes fungos está começando a ser desvendada (Bizarria *et al.*, 2022, 2023; Makopa *et al.*, 2024; Mendes *et al.*, 2012 – Figura 1). Este é o caso das leveduras associadas às formigas cultivadoras de fungos (subfamília *Myrmicinae*, tribo *Attini*, subtribo *Attina*, ‘atíneas’). Visto que as formigas atíneas apresentam uma diversidade consideravelmente alta ao longo das Américas, estudos sugerem que a colônia desses insetos é um ambiente ideal para o estudo do potencial biotecnológico de leveduras (Stefanini, 2018; Bizarria *et al.*, 2022, 2023).

As formigas atíneas mantêm uma complexa rede simbiótica com diversos fungos, incluindo fungos *Basidiomycota* que elas utilizam como principal fonte de alimento (Weber, 1972). Tais relações simbióticas permitiram o sucesso evolutivo das formigas e a ocupação de diversos habitats (Aanen *et al.*, 2002; Nickele *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2024). Estudos sugerem que as interações dentro das colônias são em muitos casos mediadas por compostos químicos, como acontece entre as leveduras pretas com bactérias do gênero *Pseudonocardia*, utilizadas pelas formigas para ajudar no cuidado do seu fungo parceiro (Poulsen, 2009). Assim como o seu papel ecológico dentro dessas associações pode ser benéfico, as aplicações biotecnológicas destes microrganismos também podem trazer benefícios para as atividades humanas, apesar de o estudo de leveduras associadas a esse sistema ainda ser incipiente (Bizarria *et al.*, 2022; Duarte *et al.*, 2014; Little; Currie, 2008; Mendes *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2008; Stefanini, 2018).

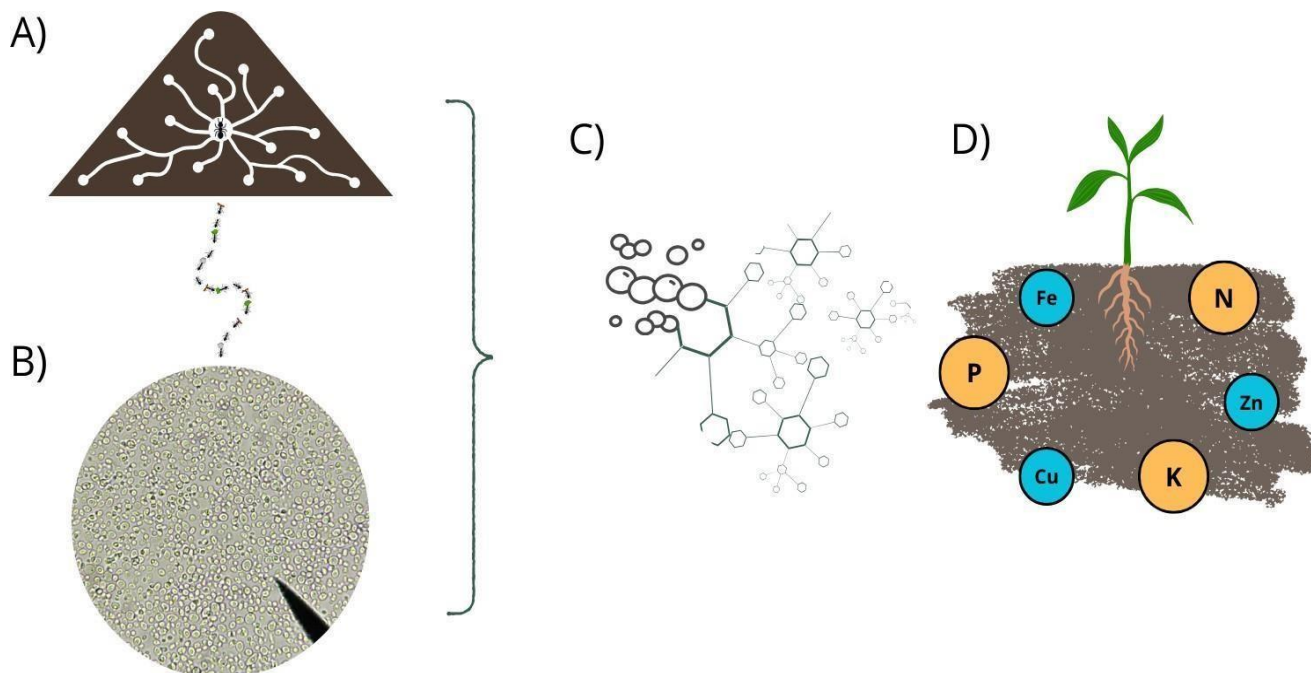
As associações entre formigas atíneas e leveduras foram descobertas há 50 anos por Craven *et al.* (1970). Vasse *et al.* (2017) demonstram que estes fungos apresentam potencial para metabolizar compostos químicos, além de abundante produção de metabólitos secundários que são liberados dentro das colônias. Nesse sentido, as leveduras utilizam os nutrientes do substrato do fungo mutualista e as formigas utilizam as enzimas secretadas por elas para auxiliar na quebra dos polissacarídeos do substrato (Vasse *et al.*, 2017). Alguns papéis ecológicos importantes das leveduras na relação entre formigas atíneas e fungos (Bizarria *et al.*, 2022) são que elas poderiam participar com sua ação enzimática de quebra das macromoléculas (Blair *et al.*, 2021), destoxificação química (Davis *et al.*, 2011), produção de toxinas *killer* (Bizarria *et al.*, 2022) e solubilização de fosfatos e zinco (Bizarria

et al., 2022). No entanto, as hipóteses desses papéis das leveduras na relação mutualística entre formiga-fungo e suas possíveis aplicações (Figura 1) ainda precisam de estudos que abranjam uma maior diversidade de leveduras (Bizarria *et al.*, 2021).

Em ambientes não relacionados com as formigas atíneas, algumas leveduras apresentam a capacidade de solubilizar minerais, como fosfato e zinco, participam do processo de desenvolvimento das plantas (Millan *et al.*, 2020; Kumla *et al.*, 2020) e são aplicadas como biofertilizantes (Fu *et al.*, 2016). Isso deve-se ao fato de que o fósforo e o zinco são, respectivamente, macro e micronutrientes essenciais para diversas funções fisiológicas das plantas, porém geralmente estão em formas insolúveis no meio (Millan *et al.*, 2020), sendo necessária sua inserção no campo com os fertilizantes, causadores de diversos impactos negativos (Hernández-Fernández *et al.*, 2021). A solubilização do fosfato e do zinco ocorre devido a atividade biológica dos microrganismos (Rosa- Magri *et al.*, 2012), como a produção de ácidos orgânicos identificados em leveduras constituintes da microbiota do solo (Pandi *et al.*, 2019). Vários estudos salientam, por exemplo, o potencial de solubilização de compostos insolúveis de fósforo e zinco das leveduras associadas a vinhedos (Millan *et al.*, 2020), solo (Pandi *et al.*, 2019; Kumla *et al.*, 2020) e rizosfera (Fu *et al.*, 2016; Rocha, 2017; Cabrini, 2018).

Embora as leveduras associadas ao jardim de fungo das atíneas hidrolisam o substrato coletado pelas operárias (Carreiro, 2000) e auxiliam as formigas na proteção dos ninhos contra patógenos (Carreiro *et al.*, 2002), pouco se sabe sobre o potencial desses fungos como agentes de solubilização de fosfato e zinco. Visto que o fosfato e o zinco apresentam importância agrônômica por serem compostos que podem causar disbiose nos solos; e que o sistema das atíneas abriga uma grande diversidade de leveduras; estudos que avaliem o potencial desses fungos para a solubilização desses compostos são muito necessários.

Figura 1. Esquema ilustrativo das leveduras que habitam o sistema das formigas atíneas e do seu potencial para solubilizar nutrientes do solo. A) Colônia de formiga atínea. B) Leveduras do jardim de fungo observadas ao microscópio (aumento: 400x). C) Reações químicas hipotéticas de atividades metabólicas de leveduras. D) Macro e micronutrientes disponíveis no solo.



2 OBJETIVO

Explorar o potencial das leveduras associadas ao jardim de fungo de diferentes formigas atíneas para solubilizar fosfato e zinco, para possível aplicação como biofertilizante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das leveduras

A coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, da UNESP – Rio Claro, abriga cerca de 3.500 leveduras isoladas de diversos gêneros de formigas atíneas. Todos os isolados de leveduras do acervo estão preservados em glicerol 10% a -80°C , no método de Criopreservação. Neste trabalho foram escolhidas um total de 43 leveduras isoladas de sete gêneros diferentes de formigas atíneas (*Acromyrmex* = 12 isolados, *Apterostigma* = 4 isolados, *Atta* = 11 isolados, *Cyphomyrmex* = 2 isolados, *Mycetarotes* = 2 isolados, *Mycetophylax* = 1 isolado, *Mycocepurus* = 11 isolados – Tabela 1). Não foi realizada a autenticação taxonômica dessas culturas.

Tabela 1. Leveduras utilizadas no estudo. Todas as leveduras estão depositadas no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF).

Código do isolado	Levedura	Formiga	Local de coleta (cidade, estado, país)
LESF 1493	<i>Candida sp.</i>	<i>Apterostigma sp.</i>	Itatiaia, RJ, Brasil
LESF 1494	<i>Candida blattae</i>	<i>Apterostigma sp.</i>	Itatiaia, RJ, Brasil
LESF 1495	<i>Wickerhamiella sp.</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Anhembi, SP, Brasil
LESF 1496	<i>Starmerella meliponinorum</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1502	<i>Wickerhamiella occidentalis</i>	<i>Mycetophylax</i>	Itatiaia, RJ, Brasil
LESF 1506	<i>Wickerhamiella sp.</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1507	<i>Yamadazyma sp.</i>	<i>Apterostigma sp.</i>	Itatiaia, RJ, Brasil
LESF 1508	<i>Starmerella etchellsii</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1521	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	<i>Apterostigma sp.</i>	Itatiaia, RJ, Brasil
LESF 1640	<i>Vishniacozyma tephrensensis</i>	<i>Atta texana</i>	Austin Texas, EUA
LESF 1642	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	<i>Atta texana</i>	Bastrop Texas, EUA
LESF 1643	<i>Papiliotrema sp.</i>	<i>Atta texana</i>	Bastrop Texas, EUA
LESF 1646	<i>Candida smithsonii</i>	<i>Atta laevigata</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1647	<i>Candida sake</i>	<i>Atta laevigata</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1648	<i>Pichia caribbica</i>	<i>Atta laevigata</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1649	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	<i>Atta laevigata</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1650	<i>Trichosporon laibachii</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1651	<i>Trichosporon multisporon</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1652	<i>Pichia caribbica</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1653	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1654	<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1655	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1656	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Mycetarotes sp</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1657	<i>Pichia subpelliculosa</i>	<i>Mycetarotes sp</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1658	<i>Trichosporon laibachi</i>	<i>Acromyrmex ambiguus</i>	Nova Petrópolis, RS, Brasil
LESF 1723	<i>Rhodotorula marina</i>	<i>Cyphomyrmex wheeleri</i>	Austin Texas, EUA
LESF 1733	<i>Trichosporon dulcitum</i>	<i>Acromyrmex lundii</i>	Chuvisca, RS, Brasil
LESF 1737	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Águas de Santa Barbara, SP,
LESF 1787	<i>Microbotryomycetes sp.</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Anhembi, SP, Brasil
LESF 1788	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Anhembi, SP, Brasil
LESF 1815	<i>Candida membranifaciens</i>	<i>Atta texana</i>	Bastrop, Texas, EUA
LESF 1825	<i>Pichia ofunaensis</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil
LESF 1832	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Águas de Santa Barbara, SP
LESF 1833	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Acromyrmex crassipinus</i>	Ipê, RS, Brasil
LESF 1834	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Acromyrmex lundii</i>	Chuvisca, RS, Brasil

LESF 1835	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Acromyrmex sp.</i>	Santana da Boa Vista, RS,
LESF 1836	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Acromyrmex disciger</i>	Blumenau, SC, Brasil
LESF 1837	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Acromyrmex heyeri</i>	Sentinela do Sul, RS, Brasil
LESF 1838	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	<i>Atta texana</i>	Bastrop, Texas, EUA
LESF 1839	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Atta texana</i>	Austin, Texas, EUA
LESF 1840	<i>Cryptococcus magnus</i>	<i>Atta texana</i>	Austin, Texas, EUA
LESF 1841	<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Cyphomyrmex wheeleri</i>	Austin, Texas, EUA
LESF 1843	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Mycocarpus goeldii</i>	Rio Claro, SP, Brasil

3.2 Reativação das leveduras

Os tubos criogênicos com as leveduras foram retirados do ultra-freezer (-80 °C) e dispostos a -20 °C, durante 20 minutos, para evitar a perda de viabilidade por choque térmico (Carneiro, 2018). Em seguida, os tubos foram mantidos em um isopor com gelo e 100 µL de suspensão das leveduras foi transferida dos tubos para placas de Petri contendo o meio de cultivo *Yeast Malt Extract Agar* (YMA): glicose (10 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹), malte (3 g L⁻¹), extrato de levedura (3 g L⁻¹) e ágar (18 g L⁻¹). Com auxílio da micropipeta de 10 µL e ponteiras com filtros de 10 µL, as leveduras foram inoculadas em triplicata (três gotas distribuídas em formato triangular no meio de cultivo). Em seguida, as placas foram incubadas no escuro, a 25 °C, e avaliadas todos os dias para crescimento.

Após o período de incubação de dois dias, as leveduras foram avaliadas quanto à pureza das culturas mediante a semeadura por esgotamento em novas placas de YMA. Após o crescimento axênico das colônias, elas foram transferidas para tubos inclinados contendo 3,5 ml de meio YMA, em duplicata. Posteriormente, os microrganismos foram inoculados mediante estria sinuosa nos tubos, cada levedura repicada em dois tubos. Feito isto, os tubos foram colocados na incubadora B.O.D a 25 °C. Com o crescimento das leveduras atingido após dois dias, os tubos foram armazenados na geladeira a 10 °C.

3.3 Avaliação do potencial de solubilização de fosfato e zinco

Um total de 43 isolados foi avaliado para a solubilização de fosfato e zinco. Para atingir estes objetivos, primeiramente as leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de solução *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) [glicose (20 g L⁻¹), peptona (20 g L⁻¹) e extrato de levedura (10 g L⁻¹)], durante dois dias. Antes da inoculação dos isolados, a solução líquida de YPD teve o pH ajustado para 6,8, pois as placas dos testes de solubilização apresentavam este mesmo pH. Visto que a temperatura mais adequada para estes microrganismos foi de 25 °C, todos os frascos foram incubados a essa temperatura e com

uma agitação de 150 rpm.

3.3.1 Solubilização de fosfato

Para este teste foram utilizadas placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura *Pikovskaya* (PVK): glicose (10 g L⁻¹), fosfato de cálcio (5 g L⁻¹), sulfato de amônio (0,5 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,2 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,1 g L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g L⁻¹) e ágar (15 g L⁻¹) (Amprayn *et al.*, 2012; Millan *et al.*, 2020). O pH do meio foi ajustado para 6,8 e esterilizado. A fórmula do meio PVK com minerais insolúveis torna as placas opacas, dessa forma, permite que a solubilização do composto desejado seja detectada com a visualização de halos transparentes ao redor das colônias, o que indica capacidade de solubilização (Joe *et al.*, 2018).

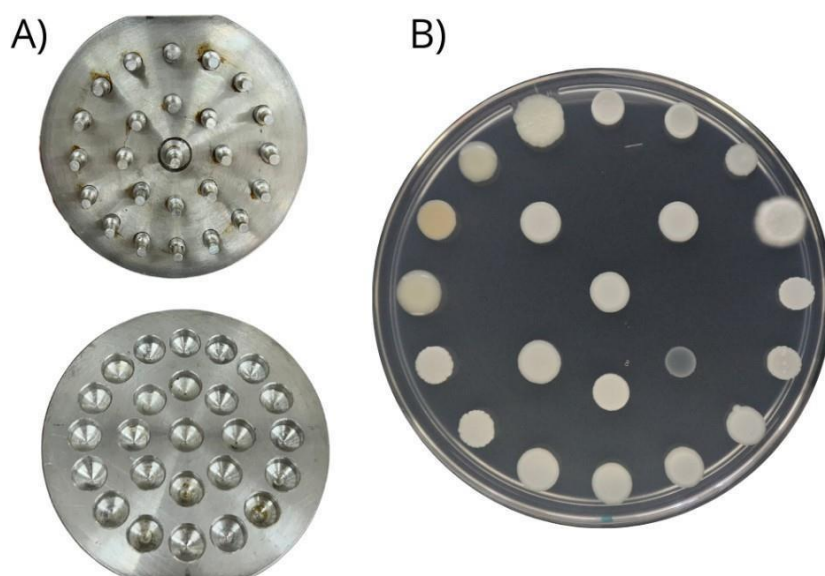
Uma concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ de cada levedura foi inoculado nas placas com o meio PVK. O cálculo da concentração dos inóculos das leveduras foi realizado utilizando a Câmara de Neubauer. Brevemente: os Erlenmeyers com as leveduras cultivadas por dois dias foram inicialmente divididos em grupos de acordo com sua turbidez (baixa, média, alta). Seguidamente, foi quantificada a concentração de UFC mL⁻¹ de um exemplar de cada grupo. Uma vez calculadas as concentrações, foram realizadas diluições seriadas para atingir a concentração final de 10⁸ UFC mL⁻¹ de cada levedura em um volume final de 1 mL. Após a diluição final, foram escolhidos ao acaso três tubos para confirmar que a concentração proposta dos inóculos foi atingida.

O inóculo das placas foi realizado utilizando a técnica *replica-plate* com um carimbo de 25 poços (Figura 2), com um total de 22 isolados para um inóculo (Carimbo 1) e 21 isolados para um segundo inóculo (Carimbo 2), para comportar os 43 isolados. Foi realizado um total de 10 réplicas para cada inóculo, contabilizando um total de 20 placas inoculadas. Todas as placas foram incubadas a 25 °C durante quatro dias, com o crescimento acompanhado todos os dias. O resultado positivo (quanto à solubilização de fosfato) foi revelado com a formação de halos transparentes em volta das colônias no meio de cultivo. O índice de solubilização (IS) foi calculado de acordo com o proposto por Berraquero *et al.* (1976) e Premono *et al.* (1996), descrita pela equação a seguir:

$$\frac{\text{Diâmetro total (diâmetro da colônia + diâmetro do halo solubilizado)}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Os resultados indicam baixa capacidade de solubilização (IS<2), média capacidade (2≤ IS ≤4) e alta capacidade (IS>4)

Figura 2. Esquema ilustrativo do carimbo utilizado para o inóculo das leveduras. A) Carimbo de 25 poços. B) Placa inoculada com a técnica *replica-plate*.



3.3.2 Solubilização de zinco

O método neste caso é o mesmo descrito por Millan *et al.* (2020) e é semelhante com o teste de solubilização de fosfato, o que difere é o uso de ZnO e não o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Assim, o meio PVK contém: glicose (10 g L^{-1}), óxido de zinco (1 g L^{-1}), sulfato de amônio ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), cloreto de potássio ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), sulfato de magnésio ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e ágar (15 g L^{-1}). O pH do meio foi ajustado para 6,8 e, em seguida, esterilizado e vertido nas mesmas condições descritas no item 3.3.1. Assim como no teste de fosfato, as placas são opacas devido a presença de minerais insolúveis e a solubilização pode ser visualizada por halos transparentes ao redor das colônias, após o crescimento dessas (Joe *et al.*, 2018).

A concentração de UFC mL^{-1} de cada levedura para este teste foi a mesma utilizada no teste de diluição de fosfato, mas no meio PVK suplementado com óxido de zinco. Além disso, o cálculo da concentração dos inóculos das leveduras foi a mesma realizada para o teste de fosfato. O inóculo das placas foi realizado utilizando também a técnica *replica-plate* com um carimbo de 25 poços (Figura 2) com um total de 22 isolados para um primeiro inóculo (Carimbo 1) e 21 isolados para um segundo inóculo (Carimbo 2), comportando o total dos 43 isolados. Foi realizado um total de 10 réplicas para cada inóculo contabilizando um total de 20 placas inoculadas. Todas as placas foram incubadas a 25°C durante quatro dias, com o crescimento acompanhado todos os dias e o resultado positivo (semelhante à solubilização de fosfato) foi revelado com a formação de halos transparentes em volta das colônias no meio de cultivo. O índice de solubilização (IS) e os significados dos valores são

os mesmos do item descrito acima (3.3.1).

3.4 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi necessário construir um conjunto de dados baseado nas medidas das áreas e diâmetros dos halos formados pelas leveduras quando solubilizaram o fosfato e o zinco. Para este propósito, primeiramente foram obtidas fotos das placas utilizando uma câmera Canon EOS R7 Mirrorless, a uma distância padrão para todas as fotos. Tais fotos foram avaliadas utilizando o *software* ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). Assim, foram medidos os diâmetros de cada colônia e calculados as áreas de solubilização dos compostos utilizando o mesmo *software*. Uma vez obtido os dados de diâmetros e áreas, foram feitos os cálculos de estatística descritiva, utilizando o *software* R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colônia das formigas cultivadoras de fungos é um sistema que abriga uma grande diversidade de microrganismos (Barcoto *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2008), incluindo leveduras (Bizarria *et al.*, 2022; Craven *et al.*, 1970; Little; Currie, 2008; Duarte *et al.*, 2014; Stefanini, 2018). Uma das capacidades conhecidas desses fungos é a solubilização de minerais insolúveis como o fosfato e o zinco (Millan *et al.*, 2020; Kumla *et al.*, 2020; Cabrini, 2018; Fu *et al.*, 2016; Pandi *et al.*, 2019; Rocha, 2017). Já que o fósforo e zinco são nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas (Kumla *et al.*, 2020), o uso de leveduras para solubilizar essas moléculas é uma alternativa sustentável para a agronomia, com menor custo e impacto no meio (Fu *et al.*, 2024; Hernández-Fernández *et al.*, 2021). O uso de leveduras para solubilizar fosfato e zinco é comum em outros sistemas (Fu *et al.*, 2016; Millan *et al.*, 2020; Pandi *et al.*, 2019), no entanto, apesar desses fungos apresentarem diferentes funções no jardim de fungo das atíneas (Bizarria *et al.*, 2021, 2022; Blair *et al.*, 2021; Davis *et al.*, 2011; Millan *et al.*, 2020), o seu potencial como agente de solubilização destes nutrientes na agricultura é ainda pouco explorado.

Neste trabalho, avaliamos o potencial das leveduras associadas às formigas atíneas para a solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco. Os nossos resultados mostram que das 43 leveduras testadas, 31 foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio (Tabela 2, Figura 3 A, C), sete conseguiram solubilizar o óxido de zinco (Tabela 3, Figura 3 B, C) e sete foram capazes de solubilizar ambos os compostos (Figura 3 C). Nos sistemas de vinhedo, do solo e da rizosfera de plantas, as leveduras apresentam resultados positivos quanto à solubilização de fosfato e zinco. Leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*,

Papiliotrema, *Pichia* e *Rhodotorula* são boas solubilizadoras dessas substâncias (Fu *et al.*, 2024; Hernández-Fernández *et al.*, 2021; Kumla *et al.*, 2020; Rocha, 2017). No caso dos jardins de fungo das formigas atíneas, os mesmos gêneros de leveduras obtiveram diferentes resultados, sendo que a maior solubilizadora de fosfato nesse sistema foi *Trichosporon laibachi* (LESF 1658). Esta levedura apresentou um IS de 2,61 e a maior área solubilizada (1,77 cm²), enquanto a *Yamadazyma* sp. LESF 1507 apresentou a menor área solubilizada (0,08 cm²) com um IS de 1,25. Em outros sistemas, como o caso dos vinhedos, as leveduras apresentam IS > 2,56 (Millan *et al.*, 2020). Embora as leveduras associadas às atíneas apresentem uma baixa capacidade para solubilizar o fosfato e zinco, quando comparadas às leveduras de outros sistemas, é importante salientar que os testes realizados neste estudo foram apenas exploratórios. Outros testes considerando um maior número de métodos e meios de cultura são necessários para demonstrar o verdadeiro potencial de solubilização de fosfato e zinco desses fungos. Os resultados deste trabalho podem certamente ser a base para a escolha dos isolados mais apropriados para realizar esses testes.

Por serem resultados inéditos de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco pelas leveduras associadas às formigas atíneas, é difícil estabelecer comparativos com os resultados encontrados em outros sistemas por serem leveduras de diferentes ecossistemas e com diferentes funções. Portanto, para estabelecer se as leveduras desse estudo são boas solubilizadoras ou não, o ideal seria aprofundar na ecologia desses fungos dentro das colônias das atíneas. Dessa maneira, seria possível criar uma escala de medida para ajudar a comparar com o potencial de solubilização desses fungos com o encontrado na literatura. É importante salientar também que foi utilizado apenas um pequeno número de leveduras associadas às formigas e os testes foram exploratórios e baseados em um único meio de cultura. Estudos ampliando o número de isolados e testes de laboratório, em diferentes meios de cultura, ajudariam a compreender o potencial do sistema das formigas atíneas como um ambiente propício para a busca de leveduras com esse potencial biotecnológico.

Tabela 2. Relação da solubilização de fosfato pelas leveduras. Com desvio padrão representado por (S). Amplitude em cm² [maior área (cm²) - menor área (cm²)]. Índice de Solubilização representado por IS.

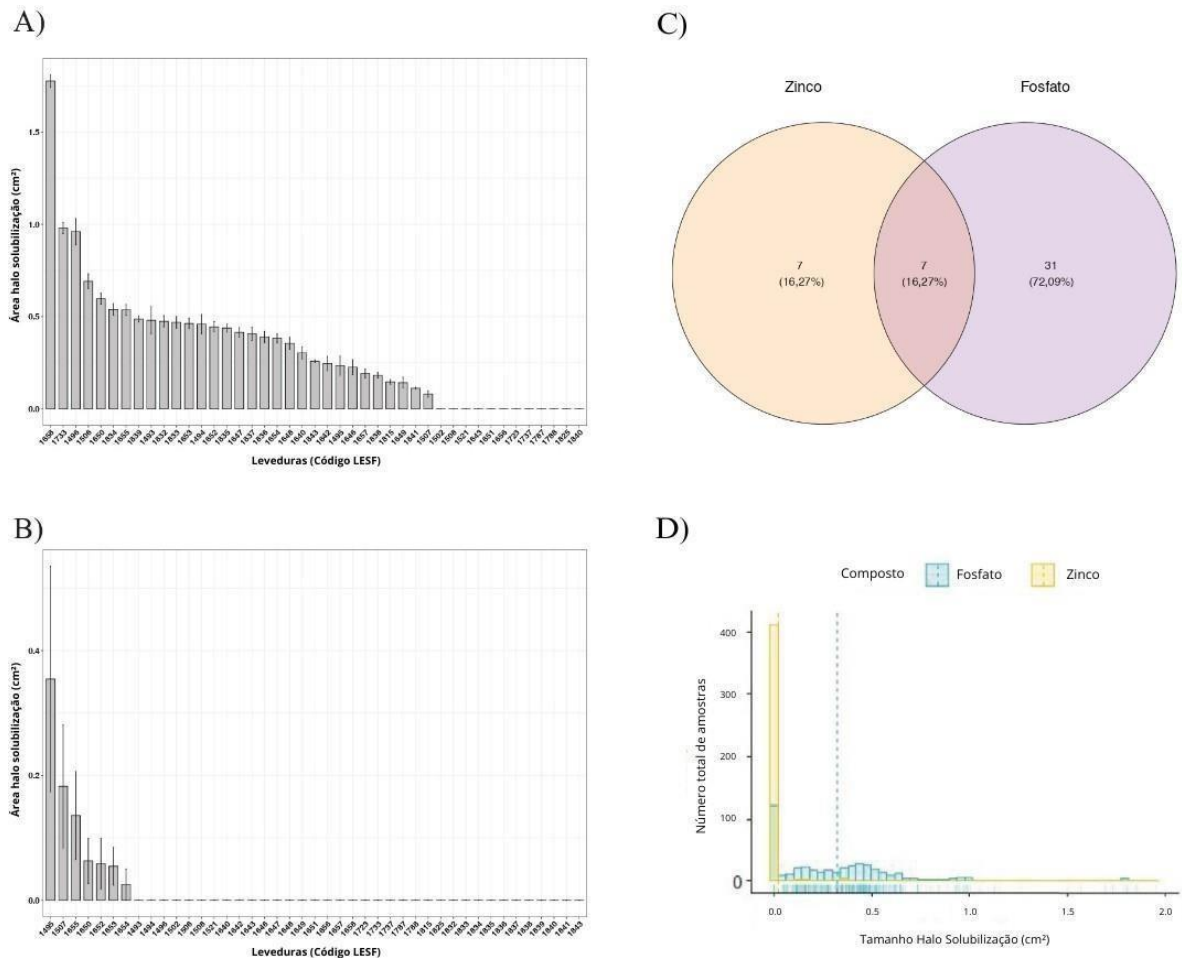
Código Isolado	Levedura	Área Halo cm² (S)	Amplitude	IS
LESF 1494	<i>Candida blattae</i>	0,45 (± 0,16)	0,56	1,58
LESF 1495	<i>Wickerhamiella</i> sp.	0,23 (± 0,16)	0,57	1,33
LESF 1496	<i>Starmerella meliponinorum</i>	0,96 (± 0,22)	0,93	1,99
LESF 1506	<i>Wickerhamiella</i> sp.	0,69 (± 0,13)	0,5	1,75
LESF 1507	<i>Yamadazyma</i> sp.	0,08 (± 0,05)	0,2	1,25

LESF 1640	<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	0,3 ($\pm$ 0,1)	0,28	1,39
LESF 1642	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	0,24 ($\pm$ 0,12)	0,38	1,29
LESF 1646	<i>Candida smithsonii</i>	0,22 ($\pm$ 0,12)	0,36	1,26
LESF 1647	<i>Candida sake</i>	0,41 ($\pm$ 0,08)	0,22	1,51
LESF 1648	<i>Pichia caribbica</i>	0,35 ($\pm$ 0,1)	0,35	1,43
LESF 1649	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0,14 ($\pm$ 0,09)	0,26	1,29
LESF 1650	<i>Trichosporon laibachii</i>	0,59 ($\pm$ 0,09)	0,32	1,62
LESF 1652	<i>Pichia caribbica</i>	0,44 ($\pm$ 0,08)	0,3	1,57
LESF 1653	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	0,46 ($\pm$ 0,09)	0,31	1,56
LESF 1654	<i>Debaryomyces vanriijae</i>	0,38 ($\pm$ 0,07)	0,28	1,53
LESF 1655	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0,53 ($\pm$ 0,09)	0,34	1,48
LESF 1657	<i>Pichia subpeliculosa</i>	0,19 ($\pm$ 0,07)	0,28	1,2
LESF 1658	<i>Trichosporon laibachi</i>	1,77 ($\pm$ 0,1)	0,38	2,61
LESF 1733	<i>Trichosporon dulcitum</i>	0,97 ($\pm$ 0,09)	0,28	1,81
LESF 1815	<i>Candida membranifaciens</i>	0,14 ($\pm$ 0,04)	0,12	1,14
LESF 1832	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,47 ($\pm$ 0,09)	0,32	1,09
LESF 1833	<i>Geotrichum candidum</i>	0,46 ($\pm$ 0,09)	0,27	1,08
LESF 1834	<i>Geotrichum candidum</i>	0,53 ($\pm$ 0,1)	0,32	1,12
LESF 1835	<i>Geotrichum candidum</i>	0,43 ($\pm$ 0,07)	0,23	1,08
LESF 1836	<i>Geotrichum candidum</i>	0,39 ($\pm$ 0,09)	0,32	1,07
LESF 1837	<i>Geotrichum candidum</i>	0,4 ($\pm$ 0,11)	0,35	1,05
LESF 1838	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	0,18 ($\pm$ 0,04)	0,15	1,09
LESF 1839	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,48 ($\pm$ 0,05)	0,15	1,42
LESF 1841	<i>Rhodotorula minuta</i>	0,11 ($\pm$ 0,01)	0,05	1,07
LESF 1843	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,25 ($\pm$ 0,02)	0,08	1,2

Tabela 3. Relação da solubilização de zinco pelas leveduras. Com desvio padrão representado por (S). Amplitude em cm² [maior área (cm²) - menor área (cm²)]. Índice de Solubilização representado por IS.

Código Isolado	Levedura	Área Halo cm ² (S)	Amplitude	IS
LESF 1495	<i>Wickerhamiella</i> sp.	0,35 (±0,57)	1,26	1,91
LESF 1507	<i>Yamadazyma</i> sp.	0,18 (±0,31)	0,81	1,79
LESF 1650	<i>Trichosporon laibachii</i>	0,06 (±0,11)	0,34	1,33
LESF 1652	<i>Pichia caribbica</i>	0,05 (±0,12)	0,37	1,22
LESF 1653	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	0,05 (±0,09)	0,26	1,24
LESF 1654	<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	0,02 (±0,07)	0,25	1,23
LESF 1655	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0,13 (±0,22)	0,52	1,37

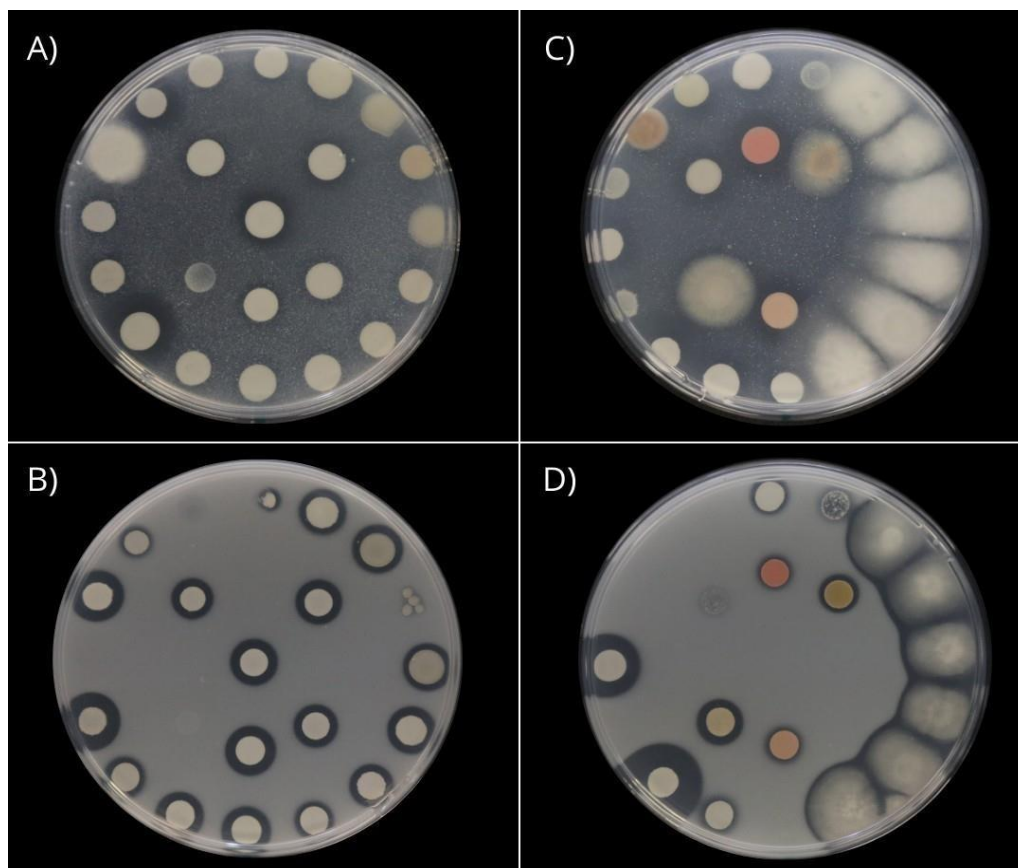
Figura 3. Potencial de solubilização de fosfato e zinco das leveduras testadas. A) Áreas dos halos de solubilização de fosfato (em cm²) para cada levedura. B) Áreas dos halos de solubilização zinco (em cm²) para cada levedura. C) Porcentagem de isolados com capacidade de solubilização para zinco, fosfato ou ambos os compostos. D) Distribuição dos isolados de acordo com o crescimento do halo de solubilização (em cm²).



Em relação ao zinco, apenas sete isolados demonstraram capacidade de solubilização (Tabela 3, Figura 3 B, D). Diferente do fosfato, os isolados no geral apresentaram capacidade de crescer no meio, porém sem solubilizar o óxido de zinco (Figura 4). A levedura mais eficiente neste caso foi *Wickerhamiella* sp. LESF 1495, com uma área solubilizada de 0,35 cm² e IS de 1,91 (Tabela 3). Por outro lado, *Debaryomyces vanrijiae* LESF 1654 conseguiu solubilizar apenas 0,02 cm² (IS de 1,23). Leveduras com IS 6,25 foram reportadas em sistemas de vinhedo por Millan *et al.* (2020). Contudo, os resultados mostram que as leveduras associadas ao sistema das formigas apresentam um IS menor de 1,91 para este composto. Já foi observado em outros estudos que bactérias presentes nas colônias de formigas atíneas podem apresentar a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, tornando os nutrientes disponíveis para o fungo mutualista (Martirena *et al.*, 2023). Isto sugere que tanto bactérias como leveduras podem estar contribuindo positivamente para a solubilização de compostos e o desenvolvimento do microhabitat no jardim de fungos das formigas.

Por outro lado, diferentemente do encontrado por Millan *et al.* (2020), isolados dos gêneros *Wickerhamiella*, *Yamadazyma*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Debaryomices*, *Candida*, *Sporidiobolus* e *Rhodotorula* mostraram capacidade de solubilização tanto de fosfato, quanto de zinco, apesar da significativa baixa capacidade com o zinco quando comparado ao outro estudo. Assim, esses resultados sugerem que as leveduras presentes nos jardins de fungo de formigas atíneas são mais predispostas a solubilizar fosfato que zinco. Dessa forma, estudos mais aprofundados poderiam otimizar as condições de cultivo dessas leveduras para utilizá-las como biofertilizantes e agentes de solubilização fosfato na agricultura.

Figura 4. Capacidade de solubilização de fosfato e zinco das leveduras avaliadas neste trabalho. A-B) Leveduras inoculadas com carimbo 1. C-D) Leveduras inoculadas com carimbo 2. A, C) Placas de meio PVK suplementadas com óxido de zinco. B, D) Placas de meio PVK suplementadas com fosfato de cálcio. Todas as placas foram incubadas por quatro dias, a 25 °C, no escuro. Os halos transparentes mostram a solubilização dos compostos testados.



5 CONCLUSÃO

As leveduras associadas às formigas atíneas apresentam maior potencial para solubilização de fosfato de cálcio, do que de óxido de zinco. Embora os resultados sugere um baixo índice de solubilização desses compostos, quando comparados com leveduras de outros sistemas, é preciso estudos mais detalhados e sobre as mesmas condições para corroborar os nossos resultados. Apesar disso, os resultados deste estudo são inéditos e preenchem uma lacuna importante no estudo da ecologia e do potencial biotecnológico das leveduras associadas às formigas cultivadoras de fungos.

REFERÊNCIAS

- AMPRAYN, K., ROSE, M. T., KECSKÉS, M., PEREG, L., NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295–299, out. 2012.
- AANEN, D. K.; EGGLETON, P.; ROULAND-LEVÈFRE, C.; GULDBERG-FROSLEV, T.; ROSENDAHL, S.; BOOMSMA, J. J. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 99, n. 23, p. 14887–14892, 2002.
- BARCOTO, M. O.; CARLOS-SHANLEY, C.; FAN, H.; et al. Fungus-growing insects host a distinctive microbiota apparently adapted to the fungiculture environment. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1:12384, jul. 2020.
- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.
- BIZARRIA, R.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Yeasts in the attine ant-fungus mutualism: diversity, functional roles, and putative biotechnological applications. **Yeast**, v. 39, n. 1-2, p. 25–39, set. 2022.
- BIZARRIA, R.; PIETROBON, T. C.; RODRIGUES, A. Uncovering the yeast communities in fungus-growing ant colonies. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 1, p. 624–635, ago. 2023.
- BLAIR, E. M.; DICKSON, K. L.; O'MALLEY, M. A. Microbial communities and their enzymes facilitate degradation of recalcitrant polymers in anaerobic digestion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 100–108, dez. 2021.
- BUZZINI, P.; LACHANCE, M. A.; YURKOV, A. Yeasts in natural ecosystems: diversity. **Springer International Publishing** 499, Basel, Switzerland,[s.l: s.n.], 2017.
- CABRINI, P. G. Promoção de crescimento de cultivares de alface pela levedura rizosférica *Torulaspora globosa*. 2018. 98 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2018.
- CARNEIRO, L. S. **Preservação de culturas de fungos do gênero *Escovopsis***. 2018. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro. 2018.
- CARREIRO, S.C., PAGNOCCA, F.C., BACCI, M. et al. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 259–262, jun. 2002.
- CARREIRO, S. C. **Pesquisa do fator Killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.
- CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**, v. 169, n. 3941, p. 184–186, jul. 1970.
- DAVIS, T. S.; HOFSTETTER, R. W.; FOSTER, J. T.; FOOTE, N. E.; KEIM, P. Interactions between the yeast *Ogataea pini* and filamentous fungi associated with the

western pine beetle. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 626–34, nov. 2011.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C. et al. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 465–473, jun. 2014.

FU, S.-F. et al. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal Biology**, v. 120, n. 3, p. 433–448, mar. 2016.

FU, S.-F. et al. The phosphate-solubilising fungi in sustainable agriculture: unleashing the potential of fungal biofertilisers for plant growth. **Folia Microbiologica**, v. 69, n. 4, p. 697–712, 27 jun. 2024.

GIRALDO, C. et al. Yeasts associated with the worker caste of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* under experimental conditions in Colombia. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 5, 27 abr. 2022.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. et al. Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 822, abr. 2021.

JOE, M. M.; DEIVARAJ, S.; BENSON, A.; HENRY, A. J.; NARENDRAKUMAR, G. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p. 305 - 308, jun. 2018.

MAKOPA, T. P., NCUBE, T., ALWASEL, S., BOEKHOUT, T., ZHOU, N. Yeast–insect interactions in southern Africa: Tapping the diversity of yeasts for modern bioprocessing. **Yeast**, v. 41, p. 330–348, fev. 2024.

KUMLA, J.; NUNDAENG, S.; SUWANNARACH, N.; LUMYONG, S. Evaluation of Multifarious Plant Growth Promoting Trials of Yeast Isolated from the Soil of Assam Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) Plantations in Northern Thailand. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1168, ago. 2020.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, mai. 2008.

MARTIARENA, M.J.S.; DEVEAU, A.; MONTROYA, Q.V. et al. The Hyphosphere of Leaf-Cutting Ant Cultivars Is Enriched with Helper Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 86, p. 1773– 1788, fev. 2023.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, v. 3, n. 1, p. 228–245, fev. 2012.

MILLAN, F.; FARRAN, I.; LARRAYA, L.; ANCIN, M.; ARREGUI, L. M.;

VERAMENDI, J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. **Microbiological Research**, v. 237, n. 126480, ago. 2020.

NICKELE, M.; PIE, M. R.; REIS, W.; PENTEADO, S. C. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 53–72, mar. 2013.

PANDI, R. et al. Isolation and screening of soil yeasts for plant growth promoting traits.

Madras Agricultural Journal, v. 106, n. 7-9, set. 2019.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. On ants, plants and fungi. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 785–788, 8 mai. 2009.

PREMONO, A. E.; MOAWAD, A. M.; VLEK, P. L. G. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. **Indonesian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 13-23, 1996.

ROCHA, Renata Kühl. **Solubilização in vitro de fosfato por *Torulaspora globosa***. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.

RODRIGUES, A.; BACCI, M.; MUELLER, U. G. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 5, n. 4, p. 604–614, nov. 2008.

ROSA-MAGRI, M. M.; AVANSINI, S. H.; LOPES-ASSAD, M. L. et al. Release of Potassium from Rock Powder by the Yeast *Torulaspora globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, n. 4, p. 577-582, ago. 2012.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Natural Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.

SCHULTZ, T. R. et al. The coevolution of fungus-ant agriculture. **Science**, v. 386, n. 6717, p. 105-109, out. 2024.

STEFANINI, I. Yeast-insect associations: it takes guts. **Yeast**, v. 35, n. 4, p. 315–330, abr. 2018.

VASSE, M. et al. A phylogenetic perspective on the association between ants (*Hymenoptera: Formicidae*) and black yeasts (*Ascomycota: Chaetothyriales*). **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1850, p. 20162519–20162519, mar. 2017.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577–587, ago. 1972.