



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**METABOLISMO COMPARADO DE JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS
ATTINI**

ALEXANDRE FAVARIN SOMERA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada)

Fevereiro - 2014

ALEXANDRE FAVARIN SOMERA

METABOLISMO COMPARADO DE JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS

ATTINI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

Rio Claro

2014

576 Somera, Alexandre Favarin
S694m Metabolismo comparado de jardins de fungo de formigas
Attini / Alexandre Favarin Somera. - Rio Claro, 2014
206 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maurício Bacci Júnior

1. Microorganismos. 2. Microbiologia. 3. Mutualismo. 4.
Serviços de ecossistema. 5. Fluxos de glicose. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Metabolismo Comparado de Jardins de Fungos de Formigas Attini

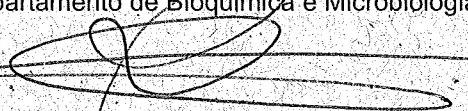
AUTOR: ALEXANDRE FAVARIN SOMERA

ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR

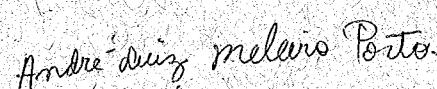
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO MOREIRA CARVALHO DE OLIVEIRA

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas / Campinas - SP


Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ MELEIRO PORTO

Química Orgânica e Biocatálise - QOB Departamento de Físico-Química, Instituto de Química de São Carlos / São Carlos - SP


Profa. Dra. MARISA DE CÁSSIA PICCOLO

Divisão de Funcionamento de Ecossistemas Tropicais - Laboratório de Ciclagem de Nutrientes / Piracicaba - SP

Data da realização: 10 de fevereiro de 2014.

À minha família, a qual me apoiou em todos os momentos, alegres ou difíceis, que
apareceram ao longo deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo carinho, confiança e incentivo a retornar à Universidade.

Prof. Dr. Maurício Bacci Jr, por abrir o laboratório para este projeto e acreditar no desenvolvimento do mesmo.

Dr. Eduardo Arrivabene Diniz, por todo o auxílio durante as coletas e identificação de ninhos de formigas.

Sr. João Sidnei Covre, IB-UNESP Rio Claro/SP, pelo auxílio durante as coletas de jardins de fungo.

Sra. Necis Miranda, por todo o auxílio com os aspectos burocráticos da pós-graduação e aquisição de material de laboratório.

Sr. Sebastião Zenão, pela troca de conhecimentos e auxílio e suporte técnico nos procedimentos de extração e cromatografia.

Profa. Dra. Sandra Mara Martins Franschetti, pela concessão de equipamento para as análises de FTIR, e Dra. Suely Patricia Gonçalves, pelo suporte técnico para a realização dos ensaios de FTIR.

Profa Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pelo suporte nas técnicas respirométricas.

Prof. Dr. João Atilio Jorge, FFCLRP-USP Ribeirão Preto, por fornecer glicose radiomarcada.

Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, Laboratório de Ecotoxicologia - CENA-USP Piracicaba/SP, por abrir o laboratório e oferecer toda a infraestrutura necessária para a realização dos ensaios com radiomarcado, e aos Srs. Carlos Alberto Dorelli e Rodrigo Floriano Pimpinato, CENA-USP-ESALQ Piracicaba/SP, pelo suporte técnico durante os ensaios envolvendo o uso de substratos radiomarcados.

Sr. José Geraldo Catarino, IFSC-USP, pelo auxílio técnico durante a utilização de XRD.

Profs. Drs. Ariovaldo da Cruz Neto e Denis V. Andrade, pelo auxílio nos testes piloto de respirometria aberta e monitoramento de temperatura de jardins de fungo.

Profs. Drs. João Batista Fernandes e Moacir Rossi Forim, Depto. de Química – UFSCar – São Carlos, pelo suporte técnico em FTIR, CE-DAD e LC-ESI-MS, e MSc. Bruno Perlatti e Dra. Barbara Sayuri Belette, DQ-UFSCar, pelo auxílio técnico com o equipamento de CE-DAD e LC-ESI-MS, respectivamente.

Profs. Drs. Antônio Gilberto Ferreira e Tiago Venâncio – DQ-UFScar – São Carlos, pelo auxílio com RMN e CPMAS-RMN.

Profs Drs. Fernando Lanças e Álvaro Santos-Neto, CROMA-IQ-USP São Carlos, pelo apoio com aparelhagem de LC-ESI-MS, e ao Dr. Guilherme Miola Titato, pelo auxílio técnico com o respectivo equipamento.

A todos os colegas de laboratório, pela ajuda e companheirismo.

À UNESP, ao Instituto de Biociências e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, pela infraestrutura e verba disponibilizada para o trabalho.

À Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, pelo auxílio.

À CAPES pelo financiamento e bolsa de doutorado e à FAPESP pelo financiamento de consumíveis.

217. Causa e efeito – Antes do efeito, cremos em outras causas do que depois do efeito.

A Gaia Ciência, Livro III, Nietzsche.

RESUMO

Formigas Attini constroem ninhos que contêm culturas microbianas, os jardins de fungo, para lidar com o ambiente. O cultivo, conhecido como agricultura, é dividido em três grupos filogenéticos majoritários: um plesiomórfico, nomeado basal, com centenas de indivíduos; outro derivado, com milhares de indivíduos; e um subgrupo da agricultura derivada, conhecido como de corte de folhas, com milhões de indivíduos. A sobrevivência e demografia do ninho dependem da habilidade do jardim de fungo em disponibilizar alimentos na forma de biomassa microbiana e açúcares resultantes da hidrólise dos polissacarídeos presentes no material forrageado. O presente trabalho estudou as características funcionais de 342 jardins de fungo de oito espécies de formigas representantes destes três grupos. Para tanto, os sistemas foram generalizados em compartimentos conectados por vetores de fluxos e abordados de forma holística, segundo estratégia da caixa preta, utilizando técnicas respirométricas, enzimológicas e espectroscópicas para caracterizar a biocinética, atividades enzimáticas, produtos de hidrólise e substrato, respectivamente. As avaliações do substrato indicaram substituição de material de serapilheira recalcitrante nos sistemas basais para menos recalcitrante nos derivados e vegetação fresca, rica em produtos facilmente degradáveis, nos de corte de folhas. Esta alteração foi acompanhada pela transição de um sistema enzimático generalista basal para um sistema potente especializado na degradação de amido e hemiceluloses nos derivados e de corte de folhas. As taxas de acúmulo de xilose e glicose aumentaram dos basais para os derivados, sendo maiores nos de corte de folhas. Somente nestes últimos, o acúmulo de xilose superou o de glicose. A resposta respirométrica da microbiota também mostrou a especialização no consumo de xilose pelos grupos de corte de folhas. Assim, embora a especialização enzimática tenha aparecido já nos derivados, suas consequências fisiológicas só foram fixadas nos de corte de folhas, resultado vinculado ao uso de substrato fresco rico em hemiceluloses. As alterações nas taxas de acúmulo foram acompanhadas pela transição de sistemas basais que privilegiaram a manutenção de biomassas para sistemas de corte de folhas que favoreceram o crescimento microbiano. No entanto, a diminuição da biomassa microbiana nos derivados e, em maior grau, nos de corte de folhas, reduziu o dreno de açúcares extracelulares. As taxas de acúmulo de biomassa microbiana, glicose e xilose apresentaram sazonalidade, sendo mais intensas na estação das chuvas que na seca. A secreção proteica, mensurada com ^{14}C , também apresentou ritmo sazonal e mostrou-se vinculada com a atividade proteásica sobre as enzimas ligadas à geração de glicose e xilose. As relações entre demografia e serviços do microbioma não permitiram segregar sistemas de *Acromyrmex* e *Trachymyrmex* para as massas de operárias e crescimento microbiano, mas apresentaram relação positiva quando as massas de operárias foram relacionadas com as taxas de produção de açúcares. Os resultados indicaram que jardins de fungo assemelham-se a biorreatores e permitiram inferir um panorama evolutivo onde as alterações funcionais, definidas pela especialização enzimática e alterações biocinéticas da microbiota, resultaram em incrementos de fluxos e redução das massas microbianas ao longo do curso evolutivo. Essas alterações relacionaram-se com o material forrageado, especialização metabólica e demografia dos ninhos, indicando possível evolução baseada em construção de nicho. Esta é a primeira vez que a dinâmica de jardins de fungo foi avaliada, utilizando abordagem multidisciplinar. Também é a primeira vez que padrões sazonais de funcionamento, o consumo de solutos por operárias em diferentes agriculturas de fungos, os vínculos existentes entre ocupação de nicho, material forrageado, padrões bioquímicos e biocinéticos da microbiota foram avaliados e relacionados com a demografia dos ninhos e suas alterações ao longo do curso evolutivo, estudando materiais diretamente dos seus próprios habitats, resultando em uma nova hipótese evolutiva para a simbiose jardim de fungo – formiga.

Palavras chaves: Jardins de fungo. Mutualismo. Attini. Serviços de ecossistema. Fluxos de glicose.

ABSTRACT

Attine ants build nests containing microbial cultures named fungus gardens to deal with the environment. The cultivation, or agriculture, is divided into three major phylogenetic groups: lower, with hundreds of individuals; higher with thousands of individuals; and the higher subgroup of leaf-cutters with millions of individuals. The demography of nests and ant survival depend on the ability of the microbiota in providing nutrients to the nest from materials foraged by ants. This work comparatively studied the functional characteristics of 342 fungus gardens from 8 species of ants representing these three major groups. A holistic strategy was applied to deal with these issues. Each system was generalized in compartments connected by vectors of flows and studied according to a black box approach using respirometric, enzymological and spectroscopic techniques to characterize substrates, hydrolysis products, enzymatic activity and biokinetics of each fungus garden. The evaluation of the substrate indicated replacement of high recalcitrant litter materials used in the lower group by less recalcitrant materials in higher group and fresh vegetation rich in easily degradable products in leaf-cutters. This change correlated positively with the exchange of a general enzyme system observed in the lower group to a more powerful and specialized enzyme system directed to the degradation of starch and hemicellulose in higher and leaf-cutters groups. Accumulation rates of xylose exceeded glucose only in leaf-cutters indicating preference for hemicelluloses. The physiological profile of the microbiota follows the modifications related to the product generated, starting from a lower generalist system to a leaf-cutter specialist in xylose. Thus, the physiological consequences of enzyme specialization observed in higher systems appeared only in leaf-cutters. This result is linked to the use of fresh substrate rich in hemicelluloses. The changes were accompanied by the transition of a lower system favoring the maintenance of permanent microbial biomass to leaf-cutter systems favoring microbial growth. However, the microbial drain of nutrients remained constant because the reduction of the microbial biomass verified in higher agricultures and in greater extent in leaf-cutters. Accumulation rates of microbial mass, glucose and xylose showed seasonality, increasing during the rainy season. Protein secretion measured with ^{14}C also showed seasonal rhythm and correlated positively with protease activity on enzymes related to the generation of glucose and xylose. The relationship between nest demography and microbiome services was not significant for masses of workers and microbial growth but it was positive when the masses of workers were related to the rates of production of sugars which are used by workers as food. The results indicated that fungus gardens resemble a bioreactor and allowed to infer an evolutionary scenario where the functional changes in the fungus gardens resulted in increments of flows and reduction of microbial masses. The functional changes were related to the material foraged, metabolic specialization and nest demography, indicating a possible evolution based in niche construction. This is the first time that the dynamics of fungus gardens was assessed using a multidisciplinary approach. It is also the first time that seasonal patterns of operation, consumption of solutes by workers from different agricultures, the links between niche occupation, foraged material, biochemical and biokinetic patterns of microbiota were evaluated and related to the demographics of nests and their change over evolutionary course, studying materials directly from their habitats, resulting in a new evolutionary hypothesis for the fungus garden – ant symbiosis.

Keywords: Fungus gardens. Mutualism. Attini. Ecosystem services. Flows of glucose.

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivos gerais.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Modelo teórico.....	25
3.2 Identificação de materiais forrageados pelas formigas.....	28
3.3 Coleta e manejo de jardins de fungo.....	28
3.4 Determinação de massas úmidas e secas e do teor de água.....	29
3.5 Determinação do pH.....	29
3.6 Experimentos envolvendo incubação em estado sólido.....	30
3.7 Inibição da assimilação microbiana em ensaios de quantificação das taxas de acúmulo de açúcares no espaço extracelular.....	30
3.8 Inibição da proteólise durante ensaios de quantificação das taxas de acúmulo de açúcares no espaço extracelular.....	30
3.9 Determinação do teor de açúcares redutores, glicose e xilose no substrato de jardins de fungo.....	31
3.10 Avaliação estrutural do substrato de jardins de fungo.....	31
3.11 Determinação da demanda química de oxigênio, açúcares redutores, glicose	

e xilose em solutos de jardins de fungo.....	33
3.12 Quantificação das taxas de utilização microbiana de C-glicose em jardins de fungo em estado sólido.....	34
3.13 Atividades enzimáticas.....	36
3.14 Ensaaios com jardins de fungo em suspensão.....	37
3.15 Determinação dos parâmetros cinéticos da produção de glicose e do impacto da proteólise sobre a geração extracelular de glicose, usando sistemas em suspensão.....	38
3.16 Transplante enzimático.....	42
3.17. Taxas de respiração microbianas.....	42
3.18 Estimativa de parâmetros biocinéticos da microbiota.....	43
3.19 Respiração induzida por substrato (<i>Substrate Induced Respiration</i> – SIR) e a determinação do perfil fisiológico da comunidade microbiana (<i>Community Level Physiological Profile</i> - CLPP).....	44
3.20 Metodologia para obtenção de inibidores de endoxilanasas.....	44
3.21 Metodologia para obtenção de celulases extracelulares de origem exógena.....	45
3.21.1 Linhagem utilizada e condições de manutenção e crescimento.....	45
3.21.2 Culturas em meio líquido para obtenção de extratos brutos de celulases Extracelulares.....	46
3.22 Desconstrução da estrutura celulósica dos jardins de fungo.....	46
3.23 Demografia dos ninhos.....	46
3.24 Análise dos resultados.....	47
4 RESULTADOS.....	48

4.1 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA RESPIROMÉTRICA E DOS TEMPOS DE ENSAIO COM JARDINS DE FUNGO LIVRES DE FORMIGAS.....	48
4.1.1 Estabilidade fisiológica dos jardins de fungo na ausência de formigas.....	48
4.1.2 Determinação das concentrações saturantes de glicose para a realização dos ensaios de respiração induzida por substrato.....	49
4.2 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA ÁREA DE COLETA.....	52
4.3 DESCRIÇÃO DOS JARDINS DE FUNGO.....	56
4.3.1 MORFOLOGIA DOS JARDINS DE FUNGO.....	56
4.3.1.1 Jardins de fungo de <i>Atta bisphaerica</i>	56
4.3.1.2 Jardins de fungo de <i>Atta laevigata</i>	57
4.3.1.3 Jardins de fungo de <i>Acromyrmex balzani</i>	57
4.3.1.4 Jardins de fungo de <i>Acromyrmex coronatus</i>	58
4.3.1.5 Jardins de fungo de <i>Trachymyrmex fuscus</i>	59
4.3.1.6 Jardins de fungo de <i>Trachymyrmex tucumanus</i>	59
4.3.1.7 Jardins de fungo de <i>Mycetarotes parallelus</i>	60
4.3.1.8 Jardins de fungo de <i>Mycocephurus goeldii</i>	60
4.3.2 MASSAS TOTAIS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	61
4.3.4 PROPRIEDADES DO SUBSTRATO UTILIZADO EM JARDINS DE FUNGO.....	64
4.3.5 PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DOS SOLUTOS.....	69
4.4 TAXAS DE ACÚMULO SAZONAIS DE DQO, ART, GLICOSE E XILOSE EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO.....	73
4.4.1 Sazonalidade das taxas de acúmulo de demanda química de oxigênio em solutos de jardins de fungo.....	73

4.4.2 Sazonalidade das taxas de acúmulo de açúcares redutores totais em solutos de jardins de fungo.....	74
4.4.3 Sazonalidade das taxas de acúmulo de glicose e xilose em solutos de jardins de fungos.....	74
4.4.4 Ritmos de produção de solutos extracelulares na presença de formigas.....	75
4.4.5 Enzimas presentes em jardins de fungo.....	78
4.5 BIOMASSA MICROBIANA.....	81
4.5.1 Parâmetros, controle e sazonalidade.....	81
4.5.2 Perfil fisiológico da comunidade microbiana de jardins de fungo.....	86
4.6 EFICIÊNCIAS ECOLÓGICAS DAS TAXAS DE ACÚMULO DE AÇÚCARES E BIOMASSA MICROBIANA EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO.....	89
4.6.1 Sazonalidade das eficiências ecológicas de acúmulo biomassa microbiana em jardins de fungo.....	89
4.6.2 Sazonalidade das eficiências ecológicas de acúmulo de açúcares redutores, glicose e xilose extracelulares em jardins de fungo.....	89
4.7 ESTRATIFICAÇÃO FUNCIONAL DE JARDINS DE FUNGO:	
Estudo de caso – materiais de jardins de fungo de <i>Atta bisphaerica</i>	92
4.7.1 Descrição dos setores morfológicos de jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i>	92
4.7.2 Estabilidade dos parâmetros físicos e massas secas de jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i> entre Fevereiro e Maio de 2012.....	96
4.7.3 Taxas metabólicas e biocinéticas da microbiota de jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i>	96
4.7.4 Taxas de acúmulo de açúcar redutor e glicose em estado sólido.....	97

4.7.5 Acúmulo de açúcar redutor e glicose com jardins de fungo em suspensão.....	100
4.7.6 Variações enzimáticas globais e entre setores de jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i>	101
4.7.7 Variações na estrutura do material fibroso de jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i> entre os setores.....	102
4.7.8 Perfil fisiológico da comunidade microbiana de cada setor indicou especialização no uso de xilose, gradualmente ampliada nos setores internos.....	107
4.8 MAPEAMENTO SAZONAL DE FLUXOS DE GLICOSE E SECREÇÃO PROTEICA EM ESTADO SÓLIDO, INCLUINDO SISTEMAS ENZIMÁTICOS ENVOLVIDOS E EFEITO PROTEOLÍTICO <i>IN SITU</i>	109
4.8.1 Concentração de C-glicose e taxas de acúmulo de C-glicose extracelular em materiais de jardins de fungo.....	109
4.8.2 Avaliação das taxas de assimilação microbiana de C-glicose extracelular em materiais de jardins de fungo.....	110
4.8.3 Avaliação das taxas de produção de C-glicose extracelular em materiais de jardins de fungo.....	110
4.8.4 Avaliação das taxas de utilização de C-glicose para crescimento microbiano <i>versus</i> biomassas microbianas permanentes.....	111
4.8.5 Avaliação das taxas de utilização de C-glicose pelo metabolismo oxidativo da microbiota.....	112
4.8.6 Atividades enzimáticas relacionadas ao fluxo de C-glicose.....	115
4.8.7 Efeitos da proteólise sobre a geração de glicose em sistemas em estado sólido <i>versus</i> taxas de reposição de C-proteínas oriundas de C-glicose assimilada pela	

microbiota.....	115
4.9 TAXAS DE PRODUÇÃO DE GLICOSE E EFEITOS DA PROTEÓLISE E DA MICROBIOTA SOBRE A DINÂMICA DE ACÚMULO DESTE MONOSSACARÍDEO EM SISTEMAS EM SUSPENSÃO.....	118
4.9.1 Produção de glicose em jardins de fungo com microbiotas ativas.....	118
4.9.2 Efeito da inibição da microbiota com azida sódica sobre a produção de glicose em jardins de fungo.....	119
4.9.3 Atividade proteolítica em jardins de fungo e o efeito de inibidores proteolíticos sobre a produção de glicose.....	119
4.9.4 Parâmetros cinéticos gerais da produção de glicose e do impacto da proteólise e da microbiota sobre o acúmulo extracelular de glicose.....	124
4.10 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INTERFERÊNCIAS EXTERNAS: Efeito de inibidores de endoxilanas da família 11 sobre a fisiologia microbiana.....	130
4.10.1 Efeitos dos inibidores sobre a atividade xilanásica de jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i> e impacto da proteólise intrínseca de jardins de fungo sobre o efeito inibitório.....	130
4.10.2 Confirmação do controle proteolítico intrínseco de jardins de fungo sobre os inibidores de xilanase parcialmente purificados de <i>T. aestivum</i>	131
4.10.3 Efeito da proteólise sobre as atividades xilanásicas.....	131
4.10.4 Efeitos fisiológicos de inibidores de xilanas sobre jardins de fungo de <i>A. bisphaerica</i>	132
4.11 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INTERFERÊNCIAS	

EXTERNAS: Efeito do acréscimo na degradação de celulose sobre a fisiologia de jardins de fungo.....	136
4.11.1 Resiliência a concentrações intermediárias de atividades celulásicas.....	136
4.11.2 Colapso fisiológico da microbiota com a degradação da estrutura celulósica.....	137
4.12 RELAÇÕES ENTRE DEMOGRAFIA DOS NINHOS DE FORMIGAS ATTINI E TAXAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA E AÇÚCARES REDUTORES.....	139
5 DISCUSSÃO.....	143
5.1 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA RESPIROMÉTRICA E DOS TEMPOS DE ENSAIO COM JARDINS DE FUNGO LIVRES DE FORMIGAS.....	143
5.2 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA ÁREA DE COLETA.....	146
5.3 MATERIAIS DE JARDINS DE FUNGO.....	146
5.4 TAXAS DE ACÚMULO SAZONAIS DE DQO, ART, GLICOSE E XILOSE EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO.....	149
5.5 BIOMASSA MICROBIANA.....	151
5.6 EFICIÊNCIAS ECOLÓGICAS DAS TAXAS DE ACÚMULO DE AÇÚCARES E BIOMASSA MICROBIANA EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO.....	155
5.7 ESTRATIFICAÇÃO FUNCIONAL DE JARDINS DE FUNGO DE <i>Atta bisphaerica</i>	158
5.8 COMPROVAÇÃO DO AUMENTO GERAL DE FLUXOS USANDO RADIOTRAÇADORES.....	163
5.9 MECANISMO DE PULSO E O PAPEL DA PROTEÓLISE NA GERAÇÃO DE GLICOSE.....	169

5.10 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INIBIDORES DE ENDOXILANASES.....	172
5.11 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INTERFERÊNCIAS DECORRENTES DA ADIÇÃO DE CELULASES EXÓGENAS.....	173
5.12 PROTEÓLISE E A RESILIÊNCIA A PERTURBAÇÕES FUNCIONAIS RELACIONADAS À ATIVIDADE XILANÁSICA.....	174
5.13 RELAÇÕES ENTRE MASSAS E PRODUTIVIDADE.....	175
5.14 RELAÇÕES ENTRE DEMOGRAFIA DOS NINHOS DE FORMIGAS ATTINI E TAXAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA E AÇÚCARES REDUTORES.....	180
6. CONCLUSÕES E NOVA HIPÓTESE EVOLUTIVA PARA OS JARDINS DE FUNGO.....	183
REFERÊNCIAS.....	188
ANEXOS.....	199
A. JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS ATTINI.....	200
B. PADRÕES BIOGEOGRÁFICOS FISIOLÓGICOS DE JARDINS DE FUNGO.....	201
B.1 Introdução e objetivos.....	201
B.2 Resultados parciais e discussão.....	202

1 INTRODUÇÃO

Organismos modificam regularmente a distribuição local de fontes nutricionais em um processo chamado construção de nicho (ODLING-SMEE, 1988). Tais modificações podem ter consequências profundas sobre a demografia de espécies chaves, controles de fluxos de matéria e energia e relações tróficas específicas (JONES et al., 1994; JONES et al., 1997; CHAPIN et al., 1997). Estas modificações induzem alterações nas forças de seleção natural e influenciam tanto os organismos mediadores quanto aqueles direta ou indiretamente envolvidos (ODLING-SMEE, 1988).

Dentre eles, formigas da tribo Attini, um grupo monofilético com distribuição Neotropical (SCHULTZ; BRADY, 2008), desenvolveram o hábito de cultivar micro-organismos em câmaras para a conversão de substratos forrageados, produzindo alimento com as características necessárias para a sobrevivência do formigueiro.

As culturas microbianas, conhecidas como jardins de fungo e dominadas por fungos Leucocoprineae, são submetidas a controles microbiológicos por meio de padrões comportamentais das formigas, dentre os quais mecanismos ativos de remoção de esporos (CURRIE; STUART, 2001) e antibióticos produzidos por micro-organismos mutualistas, indicando que o microbioma jardim de fungo possui microbiota mista, multifuncional (SANTOS et al., 2004; HAEDER et al., 2008; SEN et al., 2009). As formigas também são responsáveis pelo repique de micélio fúngico (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CURRIE; STUART, 2001), controle térmico do jardim de fungo (STAHEL; GEJSKES, 1939; BOLLAZI; ROCES, 2002; BOLLAZI et al., 2008), entrada e saída de substrato fresco e exaurido (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CURRIE; STUART, 2001) e condicionamento de material para inoculação de fungo por meio de processos de maceração, inclusão de ranhuras no substrato e deposição de secreções (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CURRIE; STUART, 2001).

As domesticações atualmente conhecidas, referidas historicamente como agriculturas de fungos devido à antiga visão de plantio de fungo, o qual era mantido em culturas axênicas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), podem ser divididas em três grupos majoritários, de acordo com a proposta de Schultz e Brady (2008): agricultura basal, agricultura derivada e agricultura de corte de folhas. Dois outros grupos incluem a agricultura de leveduras,

conduzida preferencialmente sobre fezes de inseto (WEBER, 1966; WILSON, 1971) (Tabela 1) e baseada na domesticação de fungos Leucocoprineae, sendo praticada por espécies de formigas do grupo "rimosus" do gênero *Cyphomyrmex*, em Neoattini (Figura 1) (SCHULTZ; BRADY, 2008); e a agricultura de fungos “coral”, praticada por 34 espécies de formigas do subgrupo "pilosum" de *Apterostigma*, em Paleoattini, as únicas cultivadoras de fungos Pterulaceae sobre matéria vegetal lenhosa em decomposição e cadáveres de insetos (WEBER, 1966; WILSON, 1971; SCHULTZ; BRADY, 2008) (Figura 1, Tabela 1).

Dentre os principais grupos de agriculturas estabelecidos, a agricultura basal é praticada pela maioria dos gêneros de Attini, incluindo aqueles que apresentam características consideradas basais. Possuem distribuição polifilética em Paleoattini e Neoattini e cultivam diversas espécies de basidiomicetos da tribo Leucocoprineae (Figura 1) (SCHULTZ; BRADY, 2008), aparentados aos gêneros *Lepiota* e *Leucocoprinus* (CANDUSSO; LANZONI, 1990), os quais contêm espécies nitrofilicas frequentes em solos húmicos (KIRK et al. 2008; BOM, 1993). Empregam desde fezes de inseto até matéria orgânica vegetal misturada a corpos de insetos como substrato para o fungo, tais como os mantidos por espécies de *Mycocepurus* (LEAL; OLIVEIRA, 2000), ou tecidos delicados de gramíneas, como os observados nos ninhos de *Mycetarotes* (LEAL; OLIVEIRA, 2000) (Tabela 1).

Por sua vez, a agricultura derivada é praticada por 63 espécies de formigas não cortadeiras mais derivadas pertencentes exclusivamente a Neoattini (SCHULTZ; BRADY, 2008). Estas apresentam maior estabilidade na associação mutualista (WILSON, 1971; SCHULTZ; BRADY, 2008), ninhos geralmente maiores e nutrição dominada por matéria vegetal morta e partes de frutos e flores (LEAL; OLIVEIRA, 2000) (Tabela 1). Fezes de inseto ainda estão presentes na nutrição dos micro-organismos nos jardins de fungo de *Serycomyrmex* e *Trachymyrmex* (WEBER, 1966; WILSON, 1971).

As agriculturas de folhas-de-corte, uma subdivisão da agricultura derivada praticada pelas espécies de *Atta* e *Acromyrmex*, são consideradas o ápice da atividade agrícola em Attini (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Estes dois gêneros contêm os herbívoros dominantes do Novo Mundo, popularmente conhecidos como formigas cortadeiras. As formigas cortadeiras, ao contrário das demais, coletam vegetação fresca, a qual é utilizada como substrato para as microbiotas simbiotes no interior dos ninhos. Os micro-organismos são cultivados sobre pequenos fragmentos de folhas. O fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, é considerado o principal alimento das larvas e rainhas (WEBER, 1966; WEBER, 1972;

HÖLLDOBLER; WILSON, 2008). Já a porção sólida das folhas, composta principalmente de polissacarídeos, não pode passar através do filtro infra-bucal das formigas e, portanto, não representa parte significativa de suas dietas (QUINLAN; CHERRET, 1978; QUINLAN; CHERRET, 1979). No entanto, os polissacarídeos vegetais são degradados pelos micro-organismos simbiotes (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006a; MOLLER et al., 2011), os quais servem como digestores para solubilização de carboidratos poliméricos.

Embora as inúmeras diferenças existentes, todos os jardins de fungo compartilham o fato de serem artefatos biológicos capazes de converter matéria orgânica forrageada em produtos assimiláveis pelas formigas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CURRIE; STUART, 2001), canalizando a quantidade e a qualidade dos fluxos de matéria e energia nos ninhos. Os desempenhos de produção de cada associação mutualista podem ser inferidos pelo porte dos ninhos e quantidade e qualidade da entrada de matéria orgânica nos mesmos (Tabela 1) (WHEELER, 1907; WEBER, 1966; WILSON, 1971). Dentre eles, a agricultura de corte de folhas é, sem dúvida, o sistema com o maior tamanho e com maior entrada de matéria orgânica.

De forma geral, os jardins de fungo podem gerar dois tipos majoritários de produtos empregados na nutrição das formigas. Estes incluem a biomassa microbiana, a qual é consumida pelas larvas e rainhas (WEBER, 1966; WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 2008), e açúcares solúveis, os quais são assimilados pelas operárias (SILVA et al., 2003). Glicose e xilose são os principais produtos responsáveis pelo tempo de vida das operárias de formigas pertencentes ao grupo das agriculturas de corte de folhas (SILVA et al., 2003) e importantes fontes de carbono e energia para o fungo mutualista destas mesmas agriculturas (SIQUEIRA et al., 1998).

Tendo em vista que a sobrevivência e demografia do ninho, a exploração do ambiente e as interações tróficas existentes entre formigas *Attini* e microbiota de jardins de fungo dependem, em última análise, da habilidade da microbiota em disponibilizar alimentos para o formigueiro a partir do material forrageado e de crescer a uma taxa suficiente para contrabalançar as perdas de biomassa devido à predação pelas próprias formigas, parasitismo dos jardins de fungos por micro-organismos oportunistas ou remoção da biomassa microbiana simbiote devido ao manejo mirmecológico, em geral transportando substrato esgotado contendo material microbiano para o lixo, a compreensão da dinâmica de geração e acúmulo de biomassa microbiana e matéria orgânica dissolvida nos diferentes jardins de fungo, em

especial glicose e xilose, tem importância capital para a identificação das estratégias ecológicas adotadas em cada um destes microbiomas para o suprimento de alimentos para os ninhos.

Portanto, o estudo comparativo da produção dos jardins de fungo torna-se a avaliação das taxas de produção de açúcares e biomassa microbiana entre os diferentes grupos de agriculturas de fungos. Isto pode ser traduzido, em termos ecológicos, como o estudo das relações entre fluxos e massas permanentes e, assim, como a exploração das estratégias bioenergéticas adotadas em cada um desses ecossistemas. De forma mais abrangente, o estudo comparativo das modificações funcionais de jardins de fungo é, também, o estudo da construção de nicho em escala evolutiva, pois permite a verificação das consequências evolutivas da modificação da espécie de formiga, fornecedora de substratos e domesticadora da microbiota de jardins de fungo, sobre a prestação de serviços e a dinâmica de funcionamento de cada tipo de jardim de fungo, além dos respectivos impactos demográficos nos formigueiros.

Diferentes abordagens vêm sendo utilizadas para avaliar os aspectos funcionais da microbiota e a capacidade produtiva dos jardins de fungo, buscando a compreensão dos seus mecanismos funcionais. Dentre elas, encontram-se os trabalhos enzimáticos de Richard et al. (2005), Silva et al. (2006a, 2006b), De Fine Licht et al. (2009), Erthal et al. (2009), Semenova et al. (2011), Bacci et al. (2013) e as avaliações de desconstrução do substrato em diferentes setores dos jardins de fungo feitas por Moller et al. (2011), os quais demonstraram a existência de potencial enzimático completo de ataque a paredes celulares vegetais e amido, alto metabolismo amilolítico *in vitro* (SILVA et al. 2006a, 2006b; BACCI et al., 2013), e atividades enzimáticas sobre estruturas pecticas, hemicelulósicas e, em menor extensão, celulósicas, em sistemas mantidos em condições laboratoriais com nutrição selecionada pelos pesquisadores (MOLLER et al., 2011). Além destas abordagens, encontram-se os ensaios fisiológicos de crescimento do fungo mutualista em culturas puras (SIQUEIRA et al., 1998), os estudos de sinergismo e antagonismo em comunidades microbianas feitos por Schoenian et al. (2011), a particular ausência de metabolismo de celulose pelo fungo *L. gongylophorus* (ABRIL; BUCHER, 2002), resultado que contrasta com as observações feitas por Bacci et al. (1995); e a verificação da existência de fixação de nitrogênio nos jardins de fungo por Pinto-Tomás et al. (2009). Visando a caracterização do material oferecido para a nutrição dos jardins de fungo, podem ser citados os trabalhos de escolha de substrato de Leal e Oliveira (2000) e Seal e Tschinkel (2007). E utilizando métodos moleculares, encontram-se as análises

da composição das comunidades microbianas nos materiais de jardins de fungo e no lixo, feitas por Scott et al. (2010), as análises metagenômicas e proteômicas das comunidades bacterianas de jardins de fungo feitas por Aylward et al. (2012), e a investigação do potencial enzimático do fungo mutualista por meio de análise genômica (AYLWARD et al., 2013).

Embora a grande quantidade de informações geradas por essas abordagens cartesianas, nenhuma foi capaz de descrever e comparar as dinâmicas de funcionamento dos diferentes jardins de fungo, pois todas utilizaram técnicas destrutivas ou a fragmentação do sistema, as quais impossibilitam o acompanhamento temporal dos eventos fisiológicos e bioquímicos e a visão geral da operação destes microbiomas. Assim, estes trabalhos ofereceram apenas uma imagem estática do jardim de fungo, baseada em um mosaico de informações oriundas principalmente do potencial microbiológico inferido por técnicas moleculares, ensaios bioquímicos e fisiológicos *in vitro* ou com materiais de jardins de fungo distantes de suas condições de operação naturais.

Uma vez que a questão norteadora sobre o funcionamento dos jardins de fungo refere-se à qualidade e quantidade de produtos que estes são capazes de canalizar para a nutrição do formigueiro, a análise do funcionamento do jardim de fungo como um todo se torna crucial, pois os diferentes tipos de produção são características emergentes do microbioma e, por isso, somente uma abordagem holística é capaz de acessá-las. Assim, para se verificar qual o tipo majoritário de produção, biomassa microbiana ou açúcares redutores, não é necessária a determinação dos diferentes componentes microbianos ou de suas capacidades específicas. Ao contrário, basta-se monitorar as taxas de produção e a caracterização geral de sua dinâmica no microbioma.

Visto o desconhecimento geral das propriedades ecológicas e fisiológicas dos jardins de fungo e o fato de que as atividades microbianas em culturas puras não são necessariamente as mesmas desenvolvidas em ambiente natural (BROCK, 1971), a pesquisa ecofisiológica sobre jardins de fungo se volta para o estudo destes ecossistemas em condições as mais próximas das originais. Diante da carência de informações sobre dinâmica funcional *in situ*, a abordagem de caixa preta torna-se preferencial, uma vez que permite obter registros do funcionamento do microbioma por meio de interferências realizadas sobre o sistema e avaliação de suas respostas. As dificuldades metodológicas deste tipo de estudo são grandes, tendo em vista a necessidade de se determinar biomassas microbianas, taxas de crescimento e taxas de acúmulo de material extracelular solúvel em meio sólido heterogêneo, bastante

diversificado devido às diferenças existentes entre os grupos de jardins de fungo atualmente conhecidos.

Visando contornar estas dificuldades, o presente trabalho generalizou a estrutura funcional dos jardins de fungo por meio de modelos de compartimentos conectados por vetores de fluxos, ambos descritos por denominadores gerais de matéria e energia. Esta estratégia, somada ao desenvolvimento de técnicas de interferência capazes de eliminar compartimentos específicos, transformou os jardins de fungo no próprio meio de reação. Isto permitiu quantificar as taxas de produção e acúmulo extracelulares de matéria e energia no próprio microbioma, além das massas permanentes de cada compartimento em diferentes jardins de fungo ao longo do período de coleta.

Para tanto, metodologias originalmente desenvolvidas para o estudo de microbiotas de solos, baseadas em bioindicadores fenomenológicos – isto é, respirometria, atividades enzimáticas e incorporação de material radiomarcado – foram adaptadas para a avaliação biocinética das comunidades microbianas de jardins de fungo e suas taxas de produção de açúcares extracelulares solúveis. A opção por bioindicadores fenomenológicos foi resultado da necessidade de acompanhar eventos dependentes do tempo. Portanto, os bioindicadores também devem apresentar temporalidade e vínculo com as propriedades fisiológicas da comunidade microbiana.

Assim, foi possível comparar a dinâmica anual das características produtivas e as diferentes relações entre fluxos e massas permanentes existentes em jardins de fungo representantes dos principais tipos de agricultura conhecidos, permitindo acessar as bases mecanicistas do funcionamento destes microbiomas e suas variações ao longo do curso evolutivo, tendo por base suas posições filogenéticas segundo a proposta de Schultz e Brady (2008). Dessa forma, foi possível propor um cenário evolutivo para os jardins de fungo de formigas *Attini* baseado nas suas estratégias ecofisiológicas e serviços de ecossistema prestados aos formigueiros.

Figura 1 – Filogenia de formigas Attini e suas respectivas agriculturas de fungos (modificado de MEHDIABADI e SCHULTZ, 2010)

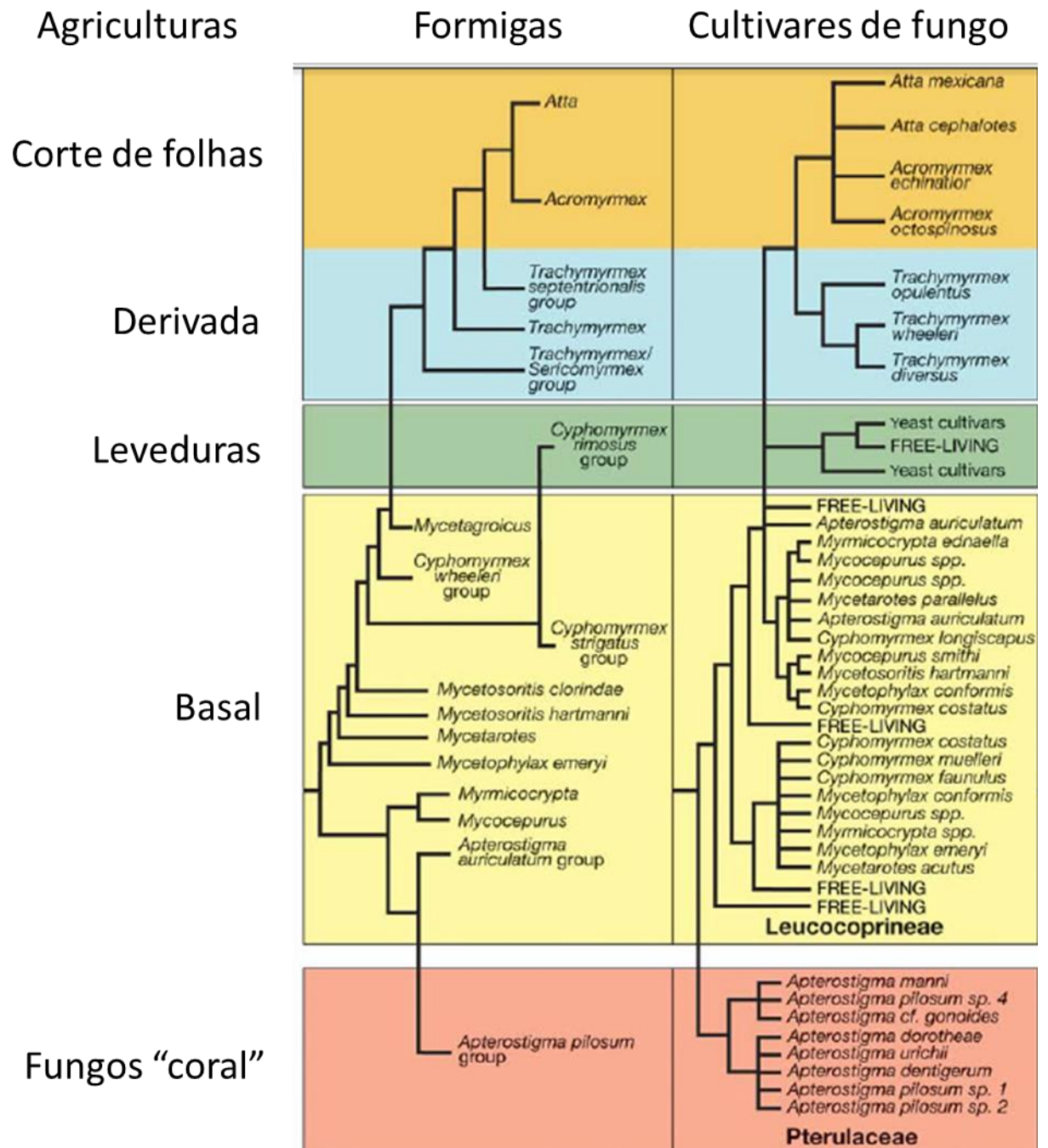


Tabela 1. Características de Gêneros de *Attini* que exibem relações evolutivas aparentes e as propriedades de seus ninhos e cultivares fúngicos.

Gênero	Morfologia	Estrutura do ninho	Tamanho da colônia madura	Substrato do jardim	Grupo de fungos cultivado	Modelo agrícola	Grupo de <i>Attini</i>
<i>Mycocrepus</i>	monomórfico; pequeno	uma célula simétrica no solo	pequeno	fezes de inseto	Leucocoprineae	agricultura basal	Paleoattini
<i>Myrmecocrypta</i>	monomórfico; pequeno	uma célula simétrica grande no solo ou madeira	médio	matéria vegetal; corpos de inseto	Leucocoprineae	agricultura basal	Paleoattini
<i>Apterostigma</i>	monomórfico; tamanho pequeno a médio	um a vários jardins no solo (em algumas espécies) por um véu de micélio construído sob toras ou em cavidades sob madeira, rochas e cascas	pequeno	fezes de inseto; madeira degradada	Pterulaceae	agricultura de fungo coral	Paleoattini
<i>Mycetophylax</i>	monomórfico; pequeno	uma ou duas células simétricas no solo	pequeno	gramíneas mortas	Leucocoprineae	agricultura basal	Neoattini
<i>Myrmecoserphus</i>	monomórfico; pequeno	várias células simétricas arranjadas verticalmente no solo	pequeno	matéria vegetal morta	Leucocoprineae	agricultura basal	Neoattini
<i>Cyphomyrmex</i>	monomórfico; pequeno	cavidades irregulares no solo ou madeira	pequeno a médio	fezes de inseto	Leucocoprineae	agricultura de leveduras	Neoattini
<i>Cyphomyrmex</i>	monomórfico; pequeno	uma célula simétrica geralmente no solo	pequeno	fezes de inseto; corpos de inseto; peças de fruto	Leucocoprineae	agricultura basal	Neoattini
<i>Sericoxymex</i>	monomórfico; tamanho médio	uma a várias células simétricas no solo	médio	frutos e, possivelmente, matéria vegetal morta	Leucocoprineae	agricultura superior	Neoattini
<i>Trachymyrmex</i>	monomórfico a levemente polimórfico; tamanho pequeno a médio	várias células simétricas geralmente arranjadas verticalmente no solo	pequeno a médio	fezes de inseto; partes de flores e matéria vegetal morta	Leucocoprineae	agricultura superior	Neoattini
<i>Aromyrmex</i>	polimórfico; porte grande; acentuada diferença entre os tamanhos operária-rainha	ninhos subterrâneos complexos com uma câmara grande ou várias câmaras	grande	folhas, caules e flores frescas; líquido anal	Leucocoprineae: <i>Leucoagaricus gongilyporus</i>	agricultura superior: folhas de corte	Neoattini
<i>Atta</i>	acentuado polimorfismo; tamanho grande; acentuada diferença entre os tamanhos operária-rainha	ninhos subterrâneos complexos com várias câmaras	grande	folhas, caules e flores frescas; líquido anal	Leucocoprineae: <i>Leucoagaricus gongilyporus</i>	agricultura superior: folhas de corte	Neoattini

OBS.: cultivares fúngicos de grupos basais de *Attini* pertencem a um dado para o gênero *Leucocoprineae* e são, até o momento, inteiramente capazes de uma existência livre fora da simbiose. Baseado principalmente em Wilson, 1971; Wheeler, 1907; Wheeler, 1967; Weber, 1966; Schultz e Brady, 2008.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo definir um cenário evolutivo para os jardins de fungo de formigas Attini com base em suas estratégias ecofisiológicas e serviços de ecossistema prestados aos formigueiros.

2.2 Objetivos específicos

Padronizar o método respirométrico para a avaliação dos materiais de jardins de fungo de formigas Attini.

Verificar se as taxas de acúmulo de carboidrato redutor aumentaram em relação às taxas de produção de biomassa microbiana ao longo do curso evolutivo de jardins de fungo de formigas Attini

Avaliar as variações sazonais das taxas de produção de biomassa microbiana e material solúvel, em especial glicose e xilose, em jardins de fungo de diferentes tipos de agricultura de fungo de formigas Attini, com o fim de avaliar sua dinâmica de funcionamento e possíveis mecanismos de controle e regulação.

Avaliar o impacto da proteólise como mecanismo de controle do canal enzimático responsável pela geração de fluxos de açúcares disponibilizados para o uso da microbiota e da biomassa mirmecológica.

Avaliar as relações existentes entre cada taxa de produção com a posição filogenética da formiga domesticadora, as relações existentes entre cada taxa de produção com as características do material forrageado pela formiga domesticadora, e as relações existentes entre cada taxa de produção com a demografia dos ninhos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo teórico

Devido às diferenças existentes entre os tipos de jardins de fungo e as possíveis variações sazonais na composição e substrato dos jardins, fez-se necessária a elaboração de um modelo generalista o suficiente para possibilitar a comparação dos estoques e dinâmica dos fluxos de carbono entre os diferentes sistemas sem, no entanto, descaracterizar a organização geral dos mesmos. Para tanto, jardins de fungo foram abstraídos em compartimentos correspondendo ao substrato insolúvel, solutos e biomassa microbiana, conectados por vetores de fluxos (página 27, Figura 2). O elemento chave para a elaboração do modelo foi o reconhecimento do compartimento composto pelos solutos como a fonte primordial de nutrientes para a biomassa microbiana, uma vez que fungos e bactérias são incapazes de executar fagocitose e, portanto, internalizarem fragmentos vegetais para posterior degradação intracelular dos seus polímeros constituintes.

O primeiro vetor de fluxo de carbono direciona-se ao compartimento substrato e representa a atividade de coleta de substrato executada pelas formigas. A partir do compartimento substrato, três vetores de fluxos emergem, direcionando-se para os compartimentos lixo, solutos e biomassa de formigas. A partir do compartimento solutos, emergem outros três novos vetores de fluxo, os quais se direcionam, respectivamente, para os compartimentos lixo, biomassa microbiana e biomassa de formigas. Por fim, outros três vetores de fluxos de carbono partem do compartimento biomassa microbiana, direcionando-se para o lixo, biomassa microbiana e respiração. Além disso, um quarto vetor de fluxo parte da biomassa microbiana em direção aos solutos, representando a secreção de carbonos obtidos da glicose na forma de constituintes de estruturas proteicas.

A Figura 2A sumariza os principais vetores e compartimentos de carbono em jardins de fungo operando dentro dos ninhos. Com a remoção das câmaras contendo jardins de fungo de seu ambiente original e sua realocação em câmaras de laboratório fechadas por períodos de tempo de, no máximo, 24 horas, o vetor de entrada de substratos forrageados, o compartimento lixo e os vetores de entrada deste compartimento são suprimidos. A inexistência do compartimento lixo na câmara de laboratório é garantida pelo pequeno

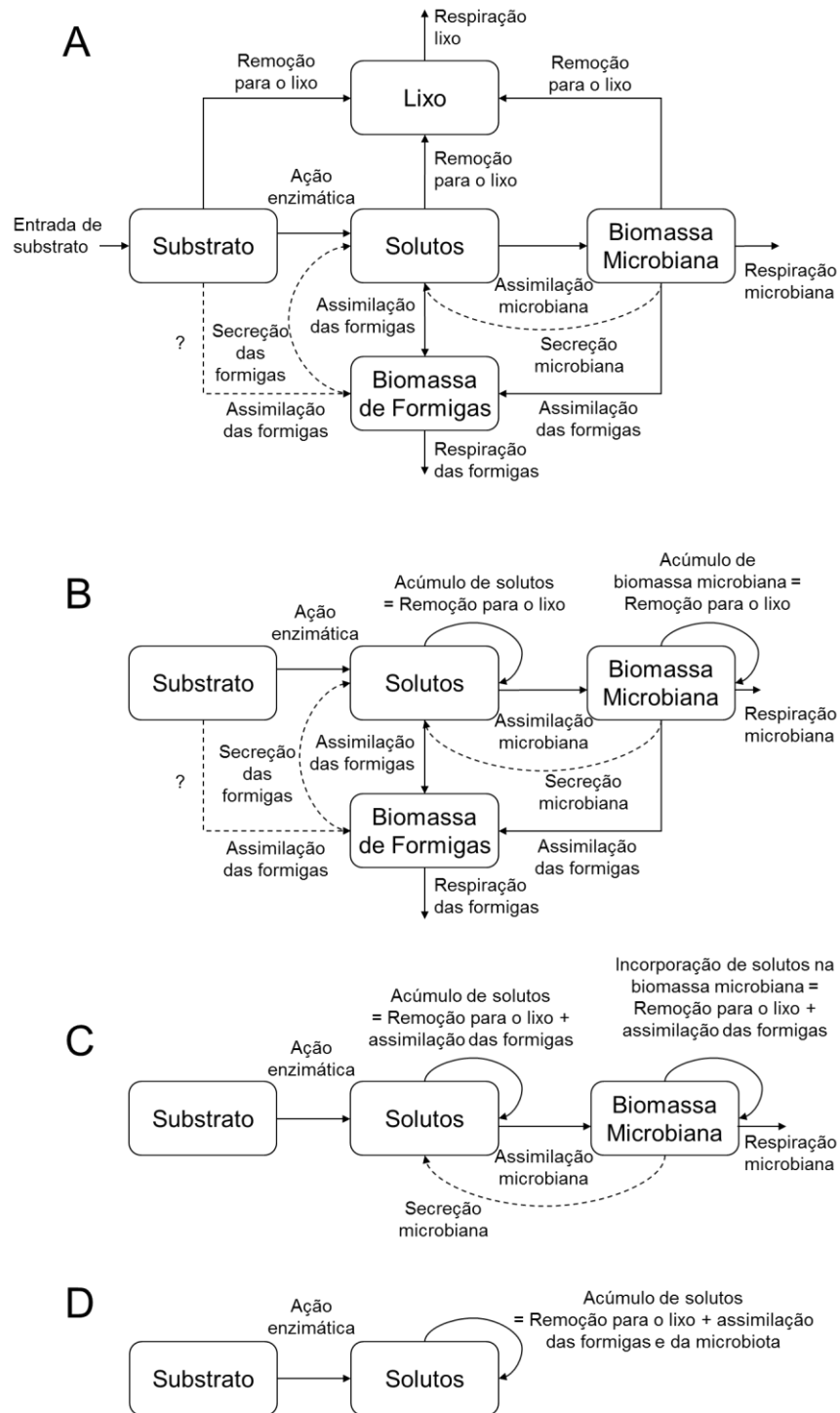
período de incubação, insuficiente para a formação de um novo compartimento lixo. Dessa forma, os fluxos de carbono anteriormente direcionados para o lixo tornam-se vetores de acúmulo de material no respectivo compartimento de saída. A Figura 2B representa o modelo simplificado resultante da coleta e isolamento do material de jardim de fungo em câmara de laboratório e representa o controle com formigas.

A remoção da biomassa de formigas simplifica ainda mais o modelo, uma vez que os vetores de carbono anteriormente direcionados para este compartimento são convertidos em vetores de acúmulo de material, sendo, portanto, acrescidos aos vetores de acúmulo obtidos com a supressão do compartimento de lixo. O modelo simplificado que surge está representado na Figura 2C e permite a quantificação das massas de carbono acumuladas no espaço extracelular, direcionadas para o crescimento microbiano e utilizadas na reposição proteica extracelular e no metabolismo oxidativo da biomassa microbiana.

As enzimas extracelulares formam o canal que controla os fluxos de carbono entre os compartimentos substrato sólido e solutos. Por sua vez, o vetor de fluxo que conecta os compartimentos solutos e biomassa microbiana é controlado pela quantidade de biomassa e seus mecanismos de captura de nutrientes extracelulares. A eliminação da assimilação microbiana de carbono por meio do uso de inibidores metabólicos, tais como o bloqueador da respiração celular, azida sódica, converte o modelo de compartimentos anteriormente exposto em um sistema ainda mais simples, onde a taxa de acúmulo de carbono é igual à atividade enzimática original. A Figura 2D representa esta última simplificação, a qual representa os ensaios com microbiota inibida e na ausência de formigas.

Os modelos em questão não contêm todos os compartimentos e vetores de fluxos existentes nem consideram a existência de perdas laterais. No entanto, são simples o suficiente para uma avaliação comparativa dos serviços de ecossistema prestados pelos diferentes tipos de jardins de fungo, traduzidos como geração de carbono extracelular e biomassa microbiana. A premissa para que estes modelos sejam úteis é a constância das massas dos compartimentos ao longo do tempo, a qual pode ser verificada por meio de coletas mensais. Da mesma forma, a obtenção de valores de fluxos representativos da condição simbiote na ausência de formigas é possível somente se as taxas forem determinadas em experimentos de curta duração, visto a pequena estabilidade fisiológica da microbiota na ausência das formigas (Resultados, página 49, Figura 3).

Figura 2 - Modelo de compartimentos e fluxos para jardins de fungo. **A** – Modelo para jardins de fungo na natureza. **B** – Modelo para jardins de fungo coletados e acondicionados em frascos. **C** – Modelo para jardins de fungo em frascos e sem formigas. **D** – Modelo para jardins de fungo em frascos, sem formigas e com biomassa microbiana inibida.



3.2 Identificação de materiais forrageados pelas formigas

Material forrageado por formigas foi coletado a partir de forrageadoras e avaliado sob estereomicroscópio. Materiais de jardins de fungo foram submetidos à mesma análise. Avaliações foram realizadas para todos os materiais coletados.

3.3 Coleta e manejo de jardins de fungo

Materiais de jardins de fungo provenientes de ninhos de *Mycocepurus goeldii* e *Mycetarotes parallelus* (agriculturas basais), *Trachymyrmex fuscus* e *T. tucumanus* (agriculturas derivadas), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), *Acromyrmex coronatus* (agricultura de corte de folhas, dicotiledôneas) e *Atta laevigata* (agricultura de corte de folhas, mono e dicotiledôneas), foram coletados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2012, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Os ninhos estavam localizados em duas grandes áreas de campo com mesmo padrão fitogeográfico, dominadas por espécies de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp., ABCDEF, A = S 22° 23' 40.6"; W 47° 32' 31.7", B = S 22° 23' 38.6"; W 47° 32' 27.4", C = S 22° 23' 42.9"; W 47° 32' 26.7", D = S 22° 23' 44.9"; W 47° 32' 26.7", E = S 22° 23' 42.6"; W 47° 32' 37.5", F = S 22° 23' 39.7"; W 47° 32' 37.8", e GHIJ, G = S 22° 23' 41.6"; W 47° 32' 46.3", H = S 22° 23' 40.6"; W 47° 32' 55.9", I = S 22° 23' 40.8"; W 47° 32' 55.5", J = S 22° 23' 31.3"; W 47° 32' 42.7". Materiais de jardins de fungo provenientes de diferentes ninhos foram coletados mensalmente, totalizando 342 amostras: *A. balzani* (N = 79); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 74); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 76); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 68); *M. goeldii* (N = 4). Os ninhos foram escavados entre 6 e 8 horas da manhã e a temperatura dos jardins de fungo foi determinada por meio de termômetro infravermelho imediatamente após a abertura das câmaras subterrâneas contendo o material. Materiais de jardins de fungo de *A. coronatus*, espécie arborícola foram coletados de *Helicalix* sp.

Os materiais coletados de cada câmara foram acondicionados em potes plásticos (15 x 15 x 15 cm) portando base de gesso umidecida. Os potes contendo jardins de fungo foram

mantidos em incubadoras DBO, na ausência de iluminação, a 25 °C e 30% de umidade relativa por 24 horas. Este intervalo de tempo foi necessário para a recuperação da estrutura e limpeza dos materiais de jardins de fungo pelas formigas, resultando em jardins de fungo de laboratório estabilizados. Amostras foram coletadas a partir destes jardins de fungo de laboratório após homogeneização por meio de pinças e bastões de vidro. Formigas, larvas, pupas e ovos foram removidos manualmente sob estereomicroscópio e descartadas. O resíduo remanescente contendo substratos sólidos, micro-organismos e matéria orgânica dissolvida compuseram os materiais de jardins de fungo livre de formigas.

3.4 Determinação de massas úmidas e secas e do teor de água

Materiais de jardins de fungo coletados a partir de uma câmara tiveram suas massas determinadas gravimetricamente após remoção de biomassa mirmecológica, tanto antes quanto depois de secagem a 105 ± 2 °C por 24 h. O conteúdo de água foi determinado por meio da diferença entre os valores aferidos antes e depois da secagem do material. Avaliações foram feitas em quintuplicatas para cada material de jardim de fungo coletado e valores obtidos foram representados pela média e desvio padrão obtidos.

3.5 Determinação do pH

Amostras de $1,00 \pm 0,32$ g de massa úmida de material de jardim de fungo livre de formigas foram suspensas em 50 mL de água deionizada em Erlenmeyer e mantidas em shaker sob agitação orbital constante de 150 rpm a 4 °C por 10 min. A suspensão obtida foi filtrada à vácuo em membranas Millipore de 0,45 µm (HAWP 04700, Massachusetts) e o pH do filtrado foi determinado com o auxílio de um potenciômetro. Avaliações foram feitas em quintuplicatas para cada material de jardim de fungo coletado e os valores obtidos foram representados pela média e desvio padrão obtidos.

3.6 Experimentos envolvendo incubação em estado sólido

Jardins de fungo coletados, mantidos em laboratório por no máximo 15 horas, ou $100,00 \pm 0,11$ mg massa úmida de material de jardim de fungo livre de formigas, estes últimos dispostos em triplicatas dentro de tubos de ensaio, foram mantidos por 15 h em incubadoras DBO, na ausência de iluminação, a 25 °C. Com o fim de evitar desidratação, os materiais de jardins de fungo foram regularmente borrifados com água destilada estéril. Amostras foram coletadas nos tempos inicial (0 h) e final (15 h) de incubação e, quando necessário, formigas, larvas, pupas e ovos foram removidos. As amostras assim obtidas foram submetidas à determinação de carboidratos e demanda química de oxigênio, uma medida do teor energético do material. Jardins de fungo de laboratório estabilizados foram empregados como brancos. Avaliações foram feitas em quintuplicatas para cada material de jardim de fungo.

3.7 Inibição da assimilação microbiana em ensaios de quantificação das taxas de acúmulo de açúcares no espaço extracelular

O metabolismo aeróbio da microbiota foi inibido com 10 mM de azida sódica (Sigma-Aldrich S2002), a qual foi acrescentada à água para hidratação. Os procedimentos para incubação, extração e quantificação de glicose seguiram protocolo descrito nas seções anteriores.

3.8 Inibição da proteólise durante ensaios de quantificação das taxas de acúmulo de açúcares no espaço extracelular

A proteólise foi inibida, em testes com microbiota igualmente inativada, utilizando 23 mM AEBSF (Sigma-Aldrich A8456), 2 mM Aprotinina (Sigma A4529), 130 µM Bestatina (Sigma B8385), 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich E9884), 0,3 mM E-64 (Sigma E3132), 0,3

mM Pepstatina A (Sigma P5318) e 10 mM PMSF (Sigma P7626). Os inibidores foram aplicados às amostras teste por meio de diluição na água utilizada para hidratação.

3.9 Determinação do teor de açúcares redutores, glicose e xilose no substrato de jardins de fungo

Para determinação do teor de glicose, xilose e açúcares redutores no substrato coletado presente dentro dos jardins de fungo, $5,00 \pm 0,02$ mg de massa seca de amostras de material foram suspensos em 25 mL de K_2SO_4 0,5M e submetido a extração sob agitação orbital a temperatura ambiente por 4 h. O material sólido obtido foi filtrado, lavado com água MilliQ e utilizado para determinação de açúcares no substrato. As amostras lavadas foram secas a 102 ± 5 °C por 24 horas, trituradas em almofariz e suspendidas em frascos de pressão contendo 3,00 mL de ácido sulfúrico a 72%. Os frascos de pressão foram incubados em banho-maria a 30 ± 1 °C por 60 minutos e agitados a cada 5 minutos. Após os primeiros 60 minutos de hidrólise, a suspensão recebeu 84 mL de água deionizada e foi autoclavada por 1 hora a 121 ± 3 °C. O material hidrolisado e resfriado a temperatura ambiente foi neutralizado com hidróxido de sódio e analisado colorimetricamente para açúcares redutores pelo método de Miller (1959), glicose por meio do método de Bergmeyer e Bernt (1974), utilizando o kit Sigma Glicose-Oxidase (Sigma GAGO-20); e xilose, pelo kit Megazyme (D-Xylose Assay Kit K-XYLOSE). As quantidades de açúcares redutores (ART), glicose (Glc) e xilose (Xyl) foram expressos como porcentagem da massa seca total. Avaliações foram feitas em quintuplicatas para cada material de jardim de fungo.

3.10 Avaliação estrutural do substrato de jardins de fungo

Jardins de fungo foram lavados com excesso de solução de KCl 0,25M, filtrados a vácuo em membrana de nitrocelulose de 0,45 um (Millipore HAWP 04700, Massachusetts, EUA) e secos a 105 ± 2 °C por 24 horas para posterior avaliação em FTIR. Amostras de $10,00 \pm 0,01$ mg massa seca de cada material foram finamente trituradas em almofariz e misturadas a 150 mg de KBr seco. As misturas homogeneizadas foram prensadas por 5

minutos a 30 bar para construção de pastilhas, as quais foram examinadas em espectrofotômetro FTIR *Shimadzu IRPrestige-21*. Avaliações foram feitas em triplicatas para cada material de jardim de fungo.

A taxa de cristalinidade foi avaliada por meio de dois métodos (CIOLACU et al., 2011):

- A razão de absorbância entre as bandas a 1372 cm^{-1} e 2900 cm^{-1}
- A razão de absorbância entre as bandas a 1430 cm^{-1} e 893 cm^{-1}

Para a avaliação de modificações supramoleculares na estrutura dos jardins de fungo, foi empregada a difração de raios-X (XRD) para a avaliação do material fibroso insolúvel. Padrões de difração de raios-X foram coletados com o aparato *Rigaku Ultima IV* equipado com goniômetro de transmissão utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ filtrada por níquel. A varredura 2 theta/theta foi realizada a 40 kV e 40 mA, empregando $\lambda=1,54\text{\AA}$ e velocidade de 1° min^{-1} . Avaliações foram feitas em triplicatas para cada material de jardim de fungo.

A taxa de cristalinidade foi estimada empregando o método da superfície (SHOSEYOV et al., 2006), seguindo a equação:

- $\text{Cr.I. (\%)} = (\text{Sc St}^{-1}) 100$

Onde Sc é a área do domínio cristalino e St a área do domínio total.

Os experimentos de CPMAS-RMN foram feitos no equipamento *Avance III – 400 Bruker*, equipado com uma sonda para amostras em estado sólido (MAS) para rotores de 4 mm. As amostras foram empacotadas em um rotor de zircônia de 4 mm. Foram realizados experimentos com polarização cruzada em torno do ângulo mágico e supressão total de bandas laterais (CPTOSS-*cross polarization with total sideband suppression*), observando o núcleo de carbono-13, com frequência em 100,57 MHz, desacoplado do hidrogênio (com frequência de 399,94 MHz). As amostras foram giradas em uma rotação de 5 KHz. Parâmetros da sequência de pulsos CPTOSS: tempo de contato = 3 ms; intervalo entre

varreduras de 5 s; janela espectral de 300 ppm; tempo de aquisição de 34 ms, número de *scans* de 10.240. Para o processamento do sinal foi aplicado um filtro de multiplicação exponencial com um fator de alargamento de linha (lb) de 30. Avaliações foram feitas em triplicatas para cada material de jardim de fungo.

3.11 Determinação da demanda química de oxigênio, açúcares redutores, glicose e xilose em solutos de jardins de fungo

Amostras de $1,00 \pm 0,13$ g de massa úmida de jardins de fungo livre de formigas ou material oriundo dos experimentos de incubação em tubos de ensaio foram suspensas em 15 mL de solução de KCl a 0,25 M (1g : 50 mL) para cada grama de massa úmida e submetidas à agitação em *vortex* por 5 minutos para extração de matéria orgânica solúvel. As suspensões foram filtradas à vácuo em membranas Millipore de 0,45 μ m (HAWP 04700, Massachusetts) e os filtrados, aquecidos a 105 ± 2 °C por 10 min para desnaturação proteica. Demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada pelo método proposto nas APHA-AWWA-WEF (GREENBERG et al., 1992). Açúcares redutores (ART) foram determinados pelo método de Miller (1959). Glicose (Glc) foi empregada como padrão.

Para quantificação de glicose e xilose, frações dos filtrados obtidos não foram aquecidas, mas submetidas a ultrafiltração em membranas *Amikon Ultra* 3 kDa (Millipore) para remoção de proteínas e interferentes de matriz. Glicose foi determinada pelo método proposto por Bergmeyer e Bernt (1974), utilizando o kit Sigma GAGO-20, e xilose, por meio do kit *Megazyme* (D-Xylose Assay Kit K-XYLOSE). Glicose e xilose foram empregadas como respectivos padrões.

As quantidades médias e desvio padrão de DQO, ART, glicose e xilose foram expressas em mg g⁻¹ massa seca de jardim de fungo. Avaliações foram feitas em quintuplicatas para cada material de jardim de fungo.

3.12 Quantificação das taxas de utilização microbiana de C-glicose em jardins de fungo em estado sólido

A assimilação microbiana de glicose foi determinada por meio da avaliação da incorporação, secreção e emissão de ^{14}C oriundos do consumo de glicose- $^{14}\text{C}(\text{U})$ - (*New England Nuclear Radiochemicals*, atividade específica 16.000 CPM mmol^{-1}) adicionada aos jardins de fungo, nos meses de março e junho de 2010. Jardins de fungo foram incubados por 15 horas a 25 °C em presença de 5,00 mg de glicose- $^{14}\text{C}(\text{U})$ - g^{-1} massa úmida de jardim de fungo, previamente diluída em 100 mL de água destilada e pulverizada uniformemente sobre amostras de $50,00 \pm 0,02$ mg de jardins de fungo. Esta quantidade, equivalente a 15% da quantidade de glicose inicial no sistema, é suficiente para a detecção pelo sistema de contagem de cintilação líquida *Perkin Elmer Tri-Carb 2810TR* utilizado nos ensaios, sem alterar significativamente o comportamento dos jardins de fungo. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 25 mL selados com rolhas de silicone munidas de braços portando, em suas extremidades, compartimentos para 400 μL de NaOH 0,1 N embebido em tiras de papel de filtro *Whatman* n.1 (0,5 x 4 cm) para captura de $^{14}\text{CO}_2$ emitido.

Após 15 horas, os conteúdos dos compartimentos contendo NaOH mais as tiras de papel de filtro utilizadas para a captura de CO_2 foram colocadas em *vials* contendo líquido de cintilação *Perkin Elmer Ultima Gold* para determinação de $^{14}\text{CO}_2$ oriundo da respiração dos jardins de fungo. Estes, por sua vez, foram lavados com 25 mL de solução de KCl 0,25M para a remoção completa do soluto radioativo. As suspensões de jardim de fungo em KCl foram filtradas em papel de filtro *Whatman* n.1 e os filtrados obtidos, submetidos à ultrafiltração em membranas *Amikon Ultra* 3 kDa para desproteinização. Os ultrafiltrados foram utilizados para determinação de glicose- ^{14}C residual nos solutos de jardins de fungo em líquido de cintilação *Perkin Elmer Ultima Gold XR*. Glicose total foi quantificada nos ultrafiltrados por meio do método da glicose-oxidase proposto por Bergmeyer e Bernt (1974).

O conjunto de proteínas capturadas pelo filtro molecular *Amikon Ultra* 3 kDa, dentre elas proteínas secretadas pela biomassa microbiana ativa durante o tempo de ensaio, portando contendo ^{14}C , foram diluídas em tampão MES 100 mM pH 6,3 e precipitadas com ácido acético (9:1 AcCOOH :tampão). O precipitado foi ressolubilizado em 100 mM tampão MES pH 6,3 e contado em líquido de cintilação *Perkin Elmer Ultima Gold XR*. Para determinação da incorporação de glicose- ^{14}C na biomassa, os jardins de fungo previamente lavados com

KCl e retidos nos filtros *Whatman* n.1 foram oxidados a CO_2 em atmosfera contendo 1 atm de O_2 à temperatura de 900 °C, utilizando o sistema de oxidação *R.J. Harvey Instruments Oxidizer OX-500*. O dióxido de carbono gerado, contendo ^{14}C oriundo da incorporação de glicose radiomarcada na biomassa em crescimento, foi capturado em líquido de cintilação *Perkin Elmer Ultima Gold* para contagem de cintilação. A determinação das quantidades de ^{14}C foi feita em contador de cintilação líquida *Perkin Elmer Tri-Carb 2810TR*, empregando curva de calibração feita com glicose- $^{14}\text{C}(\text{U})$ -. Controles receberam glicose sem radiomarcagem para quantificação da radiação de fundo.

Para determinação das quantidades totais de C-glicose assimiladas por cada jardim de fungo, empregou-se a taxa de assimilação de glicose- ^{14}C , igual à somatória das taxas de emissão de $^{14}\text{CO}_2$, secreção de proteínas- ^{14}C e incorporação de ^{14}C na biomassa microbiana, como parâmetro. As taxas de assimilação de glicose- ^{14}C pela biomassa microbiana em crescimento foram modeladas segundo a equação empírica:

- $r_t = r_0 + a e^{(-t/t)}$

Onde r_t é a quantidade de glicose- ^{14}C nos solutos no tempo t , e r_0 , a quantidade inicial de glicose- ^{14}C . Para determinação da quantidade total de glicose assimilada, foi utilizada a diferença entre g_t e g'_t , onde g_t é a quantidade total de glicose produzida no tempo t e g'_t , a quantidade de glicose acumulada observada na presença de assimilação microbiana no tempo $t = 15$ horas, a qual obedeceu a equação linear empírica:

- $g'_t = a t$

Onde a é uma constante experimental. Para a determinação da taxa de produção total de glicose g_t pelo jardim de fungo durante o ensaio, foi empregada a equação empírica:

- $g_t = [g_0 (r_0 - r_t) + r_0 g'_t] (r_0 + r_t)^{-1}$

A qual considera a diluição de glicose- ^{14}C devido ao incremento na quantidade de glicose no sistema ao longo do tempo (taxa de acúmulo g'_t) e a taxa de consumo de glicose- ^{14}C , r_t , por meio da assimilação microbiana. A segunda equação tem como elementos g_t , a quantidade total de glicose produzida no tempo t , g_0 , correspondente à quantidade inicial de glicose nos solutos, e g'_t , a quantidade de glicose acumulada observada na presença de assimilação microbiana no tempo $t = 15$ horas.

A partir da relação entre a taxa de assimilação de C-glicose e a taxa de assimilação de glicose- ^{14}C , determinaram-se, proporcionalmente, as quantidades de carbono oriundas da glicose, emitidos como $\text{CO}_2\text{-C}$, secretados como proteína-C e incorporados na biomassa microbiana, usando como parâmetro as quantidades de ^{14}C presentes em cada um destes vetores. Os valores foram expressos em $\mu\text{g C g}^{-1}$ massa seca de jardim de fungo h^{-1} . Ensaios foram feitos em quadruplicatas.

3.13 Atividades enzimáticas

Amostras de $200,00 \pm 0,41$ mg de massa úmida de jardins de fungo foram suspensas em 50 mL de tampão McIlvaine (1921) pH 6,3 contendo 10 mM de azida sódica para inibição fisiológica da microbiota e um conjunto de inibidores da atividade proteolítica (23 mM AEBSF (Sigma-Aldrich A8456), 2 mM Aprotinina (Sigma A3428), 130 μM Bestatina (Sigma B8385), 100 mM EDTA (Sigma E6758), 0,3 mM E-64 (Sigma E3132), 0,3 mM Pepstatina A (Sigma P5318) e 10 mM PMSF (Sigma P7626)). As suspensões foram mantidas a 4°C e agitadas a 150 rpm por 30 minutos, usando um agitador magnético, para a extração de proteínas. As suspensões foram filtradas à vácuo em membranas *Millipore* de $0,45\ \mu\text{m}$ (HAWP 04700, Massachusetts) e a solução resultante, empregada como extrato bruto de enzimas extracelulares de jardins de fungo.

Para a determinação de atividades enzimáticas gerais *in vitro*, foram empregados 1 mL do extrato bruto e 3 mL de substrato a 2 % w/v em tampão McIlvaine pH 6,3. Brancos empregaram filtrado previamente aquecido a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min em presença de 1 mM de DTT para desnaturação proteica. Os ensaios foram conduzidos em banho-maria a 40°C por 2 h. Alíquotas de 200 μL foram retiradas a cada 30 min e açúcares redutores foram determinados por meio do método de Miller (1959).

Para determinação de atividades celulásicas sobre celulose cristalina, especialmente exoglucanases, foram utilizados tanto Avicel, com baixo índice de polimerização (Sigma (Fluka) PH-101PhEur 11363), contendo aproximadamente 200 resíduos de glicose (HENRISSAT et al., 1985), ou fibra de algodão (*Johnson & Johnson*), com alto índice de polimerização, contendo entre 10.000 a 15.000 resíduos de glicose (HENRISSAT et al., 1985). Para determinação de atividades celulásicas sobre celulosas amorfas, foram usados os substrates celulose Walseth (fibra de algodão tratada com ácido fosfórico) (WALSETH, 1952) e celulose triturada em moinho de bolas. CM-celulose (Sigma C5678) foi empregada como substrato mais específico para endoglucanases. Xilana "*birchwood*" (Sigma Aldrich X4252) foi empregada para quantificação de xilanases. Amido (Sigma S9765), para amilases, pectina cítrica (Vetec 1219), para pectinases, sacarose (Mallinckrodt 8360), para invertases, e quitina (Sigma C9752), a qual é um componente majoritário das paredes celulares fúngicas (BARTINICK-GARCIA, 1968; WESSELS; SIETSMA, 1981), para quantificação de quitinases.

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de extremidades redutoras por minuto de reação. Os valores médios e desvio padrão para as quantidades unidades enzimáticas foram expressas em U g^{-1} massa seca de jardim de fungo. Mensurações de atividades enzimáticas foram feitas em quintuplicatas para cada material de jardim de fungo.

3.14 Ensaios com jardins de fungo em suspensão

Materiais de jardins de fungo livres de formigas ($200,00 \pm 0,32$ mg massa úmida) foram suspensos em 50 mL de tampão McIlvaine (1921) pH 6,3, pH médio observado para as amostras de jardins de fungo coletadas. As suspensões foram mantidas a 25 °C e 150 rpm por 48 h na ausência de luz. Experimentos envolvendo inibição metabólica empregaram 10 mM de azida sódica, enquanto que os ensaios para estudos do efeito proteolítico sobre a produção de açúcares utilizaram, além de azida sódica, 23 mM AEBSF (Sigma-Aldrich A8456), 2 mM Aprotinina (Sigma A4529), 130 μM Bestatina (Sigma B8385), 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich E9884), 0,3 mM E-64 (Sigma E3132), 0,3 mM Pepstatina A (Sigma P5318) ou 10 mM PMSF (Sigma P7626). Alíquotas de 500 μL foram coletadas em tempos de incubação

fixos e aquecidas a 100 °C por 10 min para inativar enzimas em solução. Posteriormente, cada alíquota foi centrifugada a 15.000 $\times$ g por 10 min para precipitar células em suspensão, proteínas desnaturadas e material particulado. O sobrenadante obtido foi utilizado para quantificação de açúcares produzidos.

3.15 Determinação dos parâmetros cinéticos da produção de glicose e do impacto da proteólise sobre a geração extracelular de glicose, usando sistemas em suspensão

Determinação das atividades enzimáticas empregaram 200,00 $\pm$ 1,02 mg de massa úmida de jardim de fungo livre de formigas, suspensos em 50 mL de tampão McIlvaine pH 6,3 (McILVAINE, 1921), valor médio observado em todos os jardins de fungo coletados. As suspensões foram mantidas a 25°C e 150 rpm por 120 horas na ausência de iluminação. O metabolismo aeróbio da microbiota foi inibido com 1% de azida sódica. Consequentemente, sua assimilação foi virtualmente anulada. Controles mantiveram a microbiota ativada. Alíquotas de 500 μ L foram coletadas em horários fixos e aquecidas a 100°C por 10 minutos para inativação da atividade enzimática em solução. Posteriormente, as alíquotas foram centrifugadas a 15.000 $\times$ g por 20 minutos para precipitação de células em suspensão, proteínas desnaturadas ou material particulado. O sobrenadante obtido foi usado como fonte de produtos da atividade hidrolítica. Glicose foi determinada pelo método de Bergmeyer e Bernt (1974). A oscilação nas concentrações proteicas extracelulares foi avaliada por meio do método de Bradford (1976).

A determinação dos parâmetros cinéticos e biocinéticos envolveram três etapas. A primeira etapa empregou sistemas com microbiota e proteólise inibidas. A microbiota foi inibida com a adição de 1 mM de azida sódica. A proteólise foi inibida por meio 23 mM AEBSF (Sigma-Aldrich), 2 mM Aprotinina (Sigma-Aldrich), 130 μ M Bestatina (Sigma-Aldrich), 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 0,3 mM E-64 (Sigma-Aldrich), 0,3 mM Pepstatina A (Sigma-Aldrich) e 10 mM PMSF (Sigma-Aldrich). Para a avaliação da influência de serinoproteases sobre a atividade enzimática extracelular, os ensaios de inibição proteolítica empregaram apenas 10 mM de PMSF (Sigma-Aldrich).

O acúmulo de glicose resultante foi modelado por meio de um sistema de duas equações diferenciais, descritoras do acúmulo de glicose sob inibição competitiva pelo produto e do consumo de substrato:

- $dG dt^{-1} = [(k_3 [E] [A] K_a^{-1}) (1 + A K_a^{-1} + G K_I^{-1})^{-1}]$
- $-d[A] dt^{-1} = (k_3 [E] [A] K_a^{-1}) (1 + A K_a^{-1} + G K_I^{-1})^{-1}$

Os resultados obtidos foram fixados e utilizados na segunda etapa de modelagem, a qual considerou a efeito da proteólise sobre o acúmulo de glicose. Esta segunda etapa empregou sistemas com microbiota inibida por meio de azida sódica, mas manteve a proteólise ativa, excluindo o *cocktail* de inibidores proteolíticos. Os parâmetros cinéticos foram modelados utilizando um sistema de três equações diferenciais ordinárias, composto pelas equações já referidas, mais uma terceira equação descritora do decaimento enzimático, $-d[E] dt^{-1}$:

- $dG dt^{-1} = [(k_3 [E] [A] K_a^{-1}) (1 + A K_a^{-1} + G K_I^{-1})^{-1}]$
- $-d[A] dt^{-1} = (k_3 [E] [A] K_a^{-1}) (1 + A K_a^{-1} + G K_I^{-1})^{-1}$
- $-d[E] dt^{-1} = [E] (j_1 + j_2[A] K_a^{-1}) \cdot (1 + [A] K_a^{-1} + [G] K_I^{-1})^{-1}$

Neste caso, os valores de $[E]$ iniciais foram considerados iguais ou inferiores aos valores de proteína extracelular observados. Os resultados de decaimento proteico foram fixados e, juntamente com os resultados cinéticos obtidos na primeira etapa da modelagem, reutilizados durante a terceira etapa do processo. Nesta última fase, os jardins de fungo em suspensão não receberam nenhum tipo de inibidor de metabolismo microbiano ou da atividade proteolítica. Dessa forma, a terceira etapa do estudo considerou os efeitos da assimilação microbiana sobre o acúmulo de glicose. O modelo matemático utilizado para a modelagem e simulação dos parâmetros cinéticos foi baseado na cinética de Monod e em cinco equações diferenciais derivadas dos estudos de Van der Werf e Verstraete (1987):

- $\mu = (\mu_{\max} [G]) (K_G + [G])^{-1}$ (equação de Monod)
- $dG dt^{-1} = [(k_3 [E] [A] K_a^{-1}) (1 + A K_a^{-1} + G K_I^{-1})^{-1}] - [(1 Y_{\max}^{-1}) (\mu [X] - m Y_{\max} [X])] + m [X]$
- $-d[A] dt^{-1} = (k_3 [E] [A] K_a^{-1}) (1 + A K_a^{-1} + G K_I^{-1})^{-1}$
- $d[E] dt^{-1} = -[E] (j_1 + j_2[A] K_a^{-1}) \cdot (1 + [A] K_a^{-1} + [G] K_I^{-1})^{-1} + Fator \{ \{[(\mu Y_{\max}^{-1}) - m] [X]\} - [\mu [X] - m Y_{\max} [X]] - [(1 - f Y_{\max}) Y_{\max}^{-1}] \mu [X] + m [X] \}$
- $dX dt^{-1} = \mu [X] - m Y_{\max} [X]$
- $dy dt^{-1} = [(1 - f Y_{\max}) Y_{\max}^{-1}] \mu [X] + m [X]$

Neste caso, os valores em mg de glicose foram convertidos para mg DQO_{glicose}, obtidos empiricamente por meio do método colorimétrico descrito e recomendado nas APHA-AWWA-WEF (GREENBERG et al., 1992). A conversão para DQO serve exclusivamente para a utilização do sistema de equações de Van der Werf e Verstraete (1987) e do fator f descrito por esses autores. Os resultados obtidos em DQO foram posteriormente transcritos para massas de glicose para normalização da notação. As equações diferenciais $dG dt^{-1}$ e $d[E] dt^{-1}$ foram modificadas para incorporar os fatores de consumo de glicose e de reposição enzimática, respectivamente. A incógnita *Fator* em $d[E] dt^{-1}$ representa o número de vezes que a quantidade de carbono oriunda da glicose deve ser multiplicada para suportar toda a secreção enzimática necessária para sustentar a atividade extracelular produtora de glicose. Dessa forma, se *Fator* = 1, os carbonos da glicose assimilada são suficientes para suprir toda a secreção de proteínas.

As três etapas do procedimento empregaram a curva de acúmulo de glicose como referência para a regressão. Para todos os casos, $[E]$ representou a concentração aparente de enzima a qualquer tempo, K_a a constante Michaeliana aparente, $[A]$ representou a concentração de glicose no substrato expressa em mg Glc g⁻¹ massa úmida de jardim de fungo, $[G]$ a concentração do produto a qualquer tempo (em mg Glc g⁻¹ massa úmida de jardim de fungo), K_I representou a constante de inibição aparente, j_1 a constante de inativação de enzima livre, j_2 a constante de inativação do complexo enzima-substrato, e $k_3[E]$ no tempo inicial $t = 0$ a velocidade máxima $V_{\max}$. A incógnita f é um fator de conversão igual a 1,33 (VAN DER WERF; VERSTRAETE, 1987). K_G representou a constante de afinidade ao substrato (mg Glc g⁻¹ massa úmida de jardim de fungo), m , o coeficiente de manutenção celular (mg Glc usado mg⁻¹ biomassa microbiana seca h⁻¹), μ , a taxa de crescimento

microbiano específica relacionada ao uso de glicose (h^{-1}), μ_{max} a taxa de crescimento microbiano específica máxima (h^{-1}), $[X]$ a biomassa microbiana ativa capaz de metabolizar glicose (mg biomassa seca g^{-1} massa úmida de jardim de fungo), y , a concentração de O_2 (mg DQO g^{-1} massa úmida de jardim de fungo) e Y_{max} o ganho máximo (mg biomassa microbiana seca formada mg^{-1} Glc usado).

Valores de assimilação específica (q) foram definidos como:

- $q = \mu Y_{max}^{-1} + m$

Enquanto que valores de assimilação bruta do jardim de fungo foram definidos como :

- $Q = q X$

As equações diferenciais ordinárias foram resolvidas manualmente usando o algoritmo lsoda (Runge-Kutta de quarta ordem) pertencente ao pacote odesolve (SETZER, 2008) implementado no *software* R 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Os valores empregados no primeiro conjunto de equações foram conservados e transferidos para os demais grupos de equações. As variáveis dos segundo e terceiro grupos de equações foram ajustadas manualmente até atingirem a melhor representação das curvas experimentais de acúmulo de glicose em conjunto com as curvas de proteína observadas. Combinações de valores que resultaram em curvas simuladas de glicose com ajustes iguais ou superiores a $r^2 = 0,95$ com as curvas reais de acúmulo de glicose foram consideradas válidas e utilizadas para a computação dos valores médios e desvio padrão de cada elemento das equações diferenciais. Ensaios foram realizados em quadruplicata para cada jardim de fungo e os valores obtidos foram representados com concentrações médias e desvio padrão em relação a 1 g de massa seca de material de jardim de fungo.

3.16 Transplante enzimático

Extratos enzimáticos de *A. balzani* foram transferidos para suspensões de amostras de jardins de fungo de *A. bisphaerica* para estudo da resistência proteolítica dos sistemas enzimáticos de *Atta* frente ao forte sistema proteolítico de *Acromyrmex*. Para tanto, proteínas de jardins de fungo de *A. balzani* foram extraídas a partir de $204,00 \pm 10,32$ mg de massa úmida de jardim de fungo livre de formigas, suspensos em 50 mL de tampão McIlvaine pH 6,3 (1921), valor médio observado em todos os jardins de fungo coletados. As suspensões foram mantidas a 25 °C e 150 rpm por 30 minutos na ausência de iluminação. O metabolismo aeróbio da microbiota foi inibido com 1% de azida sódica. O volume obtido foi filtrado a vácuo em membrana Millipore 0,45 μ m (HAWP 04700, Massachusetts). O filtrado foi desproteinizado a 4 °C utilizando filtros moleculares *Amikon Ultra* 3kDa (Millipore). As proteínas retidas foram ressuspensas em 200 μ L de tampão McIlvaine pH 6,3 (1921) e transferidas para suspensões de amostras de jardins de fungo de *A. bisphaerica* livres de formigas ($200,00 \pm 1,02$ mg de massa úmida de jardim de fungo) em 50 mL de tampão McIlvaine pH 6,3 (1921). A produção de glicose foi monitorada como descrito acima. Experimentos foram realizados em quadruplicata.

3.17. Taxas de respiração microbianas

Materiais de jardins de fungo livre de formigas ($200,00 \pm 5,34$ mg massa úmida) foram acondicionados em respirômetros de Bartha e Pramer (1965), os quais foram ventilados com ar livre de CO₂. A câmara de respiração foi mantida a 25° C e 30 % umidade relativa durante 8 h, e o CO₂ emitido foi capturado em 25 mL de solução de NaOH 0,1 N e determinado por titulação potenciométrica. A quantidade de CO₂ emitida por hora por grama de massa seca de jardim de fungo foi convertida para demanda química de oxigênio (DQO) usando a relação estequiométrica 44 mg CO₂: 36 mg O₂. As taxas de respiração do jardim de fungo (R) foram expressas como mg DQO g⁻¹ massa seca de jardim de fungo h⁻¹, e a taxa de respiração microbiana (r) foi expressa como mg DQO mg⁻¹ biomassa microbiana seca h⁻¹. Ensaio respirométrico foram feitos em triplicata para cada jardim de fungo.

3.18 Estimativa de parâmetros biocinéticos da microbiota

A estimativa dos parâmetros biocinéticos da comunidade microbiana de materiais de jardins de fungo foi feita por meio do método de respiração induzida por substrato seguido por modelagem matemática das curvas de respiração. Para tanto, foram empregados 500 mg DQO $\text{Aco}^-\text{Na}^+ \text{ g}^{-1}$ massa úmida de jardins de fungo livres de formigas, a qual se mostrou uma concentração saturante. Parâmetros cinéticos foram estimados usando o método de modelagem e simulação proposto por Van der Werf e Verstraete (1987), adaptado para a liberação de CO_2 devido à razão molar $1\text{O}_2:1\text{CO}_2$ observada para a oxidação biológica de acetato. O modelo empregado é baseado na cinética de Monod:

- $\mu = (\mu_{\max} S) (K_S + S)^{-1}$

E em três equações diferenciais:

- $-dS \, dt^{-1} = Y_{\max}^{-1} dX \, dt^{-1} + mX$
- $dX \, dt^{-1} = \mu X - mY_{\max} X$
- $dy \, dt^{-1} = [(1-fY_{\max}) Y_{\max}^{-1}] \mu X + mX$

Onde f é um fator de conversão igual a 1,33 (VAN DER WERF; VERSTRAETE, 1987), K_S é a constante de semi-saturação para afinidade ao substrato (mg DQO g^{-1} massa úmida de jardim de fungo), m é o coeficiente de manutenção celular ($\text{mg DQO consumido mg}^{-1}$ massa seca de biomassa h^{-1}), μ taxa de crescimento microbiano específico (h^{-1}), S é a concentração de substrato (mg DQO g^{-1} massa úmida de jardim de fungo), X é a biomassa microbiana ativa seca ($\text{mg massa seca g}^{-1}$ massa úmida de jardim de fungo), y é a concentração de O_2 ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1}$ massa úmida de jardim de fungo, derivada da concentração de CO_2 mensurada), e $Y_{\max}$ é o ganho – ou rendimento – microbiano máximo ($\text{mg biomassa seca gerada mg}^{-1}$ DQO consumido). As equações diferenciais foram resolvidas usando o algoritmo lsoda (Runge-Kutta de quarta ordem) obtido do pacote odesolve (SETZER, 2008) implementado no software R 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Ensaios foram realizados em triplicata para cada material de jardim de fungo. Parâmetros foram

ajustados manualmente para a obtenção de curvas de regressão com valores de $r^2 \leq 0,95$. Somente curvas simuladas com $p \leq 0.05$ em testes de “*chi-square goodness of fit*” foram aceitas. Taxas de assimilação microbianas (q) foram definidas como:

- $q = \mu \cdot Y_{\max}^{-1} + m$

Enquanto que as taxas de assimilação dos jardins de fungo (Q) foram definidas como:

- $Q = q \cdot X$.

3.19 Respiração induzida por substrato (*Substrate Induced Respiration – SIR*) e a determinação do perfil fisiológico da comunidade microbiana (*Community Level Physiological Profile - CLPP*)

Amostras de $1,00 \pm 0,52$ g de massa úmida de jardins de fungo previamente lavadas com 50 mL de KCl 0,25M e filtradas a vácuo em papel de filtro Whatman n.1 foram suplementadas 500,00 mg DQO de glicose, xilose ou ácido galacturônico por grama de massa úmida de jardim de fungo e 1000 μ L de água destilada. A mistura foi incubada em garrafas de respirometria de 250 mL por 8 horas a 25 °C e 30% umidade relativa. A emissão de CO₂ foi mensurada ao final dos ensaios e utilizada para inferir as diferenças qualitativas de consumo de determinado substrato (GARLAND; MILLS, 1991). Ensaios foram realizados em triplicata para cada material de jardim de fungo.

3.20 Metodologia para obtenção de inibidores de endoxilanases

A extração de inibidores envolveu a trituração de folhas e raízes de *T. aestivum* (BEAUGRAND et al., 2006; GOESAERT et al., 2004; JUGE; DELCOUR, 2006; JUGE; SVENSSON, 2006) congeladas a -80 °C (grãos comercializados no Mercado Municipal de

Rio Claro; necessário germinar por 5-10 dias) usando um liquidificador. O extrato total foi seco a 60 °C e triturado em almofariz. O material triturado foi suspenso em 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5 (500 mg material : 5 mL tampão) contendo *Protease Inhibitors Cocktail* (Sigma P8215, concentrações de acordo com o fabricante). Após incubação por 30 minutos em banho de gelo sob agitação constante, a suspensão foi centrifugada a 3.500 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi ultrafiltrado a 4 °C em membranas Millipore de 40 kDa. Proteínas foram concentradas em ultrafiltros *Amikon Ultra* 3 kDa. As amostras concentradas receberam solução de anfólitos 5 % e foram submetidas à eletroforese preparativa por meio de focagem isoeletrica, usando sistema em solução. O procedimento empregou anfólitos *Pharmalyte* pH 3-10 e o protocolo de O'Farrel et al. (1977), usando 5% de acrilamida e 5% (v/v) de anfólitos. Após as focagens isoeletricas a 500 V por 6 horas, as seções de gel entre pH 8,5 e 10,0 foram removidas e as proteínas, recuperadas por eletroeluição.

3.21 Metodologia para obtenção de celulases extracelulares de origem exógena

3.21.1 Linhagem utilizada e condições de manutenção e crescimento

Foi empregado o fungo filamentosso *Penicillium citrinum* JSP04.C.H.3, isolado de solo brasileiro e identificado pelo Prof. Dr. André Rodrigues , no Departamento de Microbiologia e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Rio Claro-SP. A cepa foi mantida em tubos de ensaio com 7 mL de meio sólido contendo sais de Vogel (1956), 2 % de glicose e 1,5 % de agar. Após esterilização, os meios de cultura foram solidificados em posição inclinada. Os tubos contendo meio foram inoculados com o auxílio de alça de platina e incubados por 7 dias a 25 °C. As culturas obtidas foram armazenadas em geladeira para posterior uso por, no máximo, 30 dias.

3.21.2 Culturas em meio líquido para obtenção de extratos brutos de celulases extracelulares

Conídios das culturas de 7 dias de idade foram ressuspensos com 10 mL de água destilada estéril, após raspagem da superfície micelial com pipeta esterilizada, e inoculados em meio de Vogel (1956) mais papel de filtro *Whatman* nº 1 1% (m/v). Os frascos de Erlenmeyer com 1/5 de seus volumes preenchidos por cultura em meio líquido foram incubados a 25 °C e 150 rpm por 96 horas em incubadora rotatória. O micélio obtido das culturas em meio líquido foi separado por filtração a vácuo, usando membrana Millipore 0,45 µm (HAWP 04700, Massachusetts). O filtrado obtido foi utilizado como fonte bruta de enzima extracelular.

3.22 Desconstrução da estrutura celulósica dos jardins de fungo

100 U e 300 U de atividade celulásica mensuradas sobre Avicel foram adicionadas a 201,00±10,32 mg de massa úmida de jardim de fungo de *Atta bisphaerica* livre de formigas e o efeito sobre a fisiologia microbiana foi monitorado por meio de respirometria (BARTHA; PRAMER, 1965). Atividades celulásicas residuais foram determinadas ao final dos ensaios utilizando Avicel como substrato. Ensaios foram realizados em duplicata para cada material de jardim de fungo.

3.23 Demografia dos ninhos

Números de operárias e biomassa de operárias foram avaliados por meio de censos das câmaras coletadas e de dados obtidos a partir da literatura.

3.24 Análise dos resultados

A normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson (1973). Os resultados foram analisados por meio de ANOVA em nível de significância de $p \leq 0,05$. Teste Tukey foi usado para analisar contrastes múltiplos entre médias. Na ausência de homogeneidade das variâncias ou da distribuição normal dos dados, os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e ranqueamento de Friedman (para experimentos delineados em blocos casualizados) foram empregados ($p \leq 0,05$). Comparações múltiplas foram feitas por meio do teste de Dunn ($p \leq 0,05$). Resultados foram expressos por meio de médias e desvio padrão. Curvas simuladas foram testadas usando o procedimento “*chi-square goodness of fit*” a $p \leq 0,05$. Análises estatísticas foram feitas em R 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e gráficos, construídos usando o software OriginPro 8.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA RESPIROMÉTRICA E DOS TEMPOS DE ENSAIO COM JARDINS DE FUNGO LIVRES DE FORMIGAS

A padronização de metodologias respirométricas foi feita com materiais de jardins de fungo provenientes de ninhos de *Mycocepurus goeldii* e *Mycetarotes parallelus* (agriculturas basais), *Trachymyrmex fuscus* e *T. tucumanus* (agriculturas derivadas), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), *Acromyrmex coronatus* (agricultura de corte de folhas, dicotiledôneas) e *Atta laevigata* (agricultura de corte de folhas, mono e dicotiledôneas), os quais foram coletados em Fevereiro de 2010 no *campus* da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP, para padronização dos ensaios respirométricos.

4.1.1 Estabilidade fisiológica dos jardins de fungo na ausência de formigas

Materiais de jardins de fungo removidos dos ninhos permaneceram sem a formação do compartimento lixo por tempos de, no máximo, 24 horas. Entretanto, quando desprovidos de formigas, previamente desagregados e homogeneizados com o auxílio de bastão de vidro, permaneceram fisiologicamente constantes em tempos de no máximo 15 horas, após os quais foram registrados crescimentos exponenciais dos valores de CO₂ emitidos (Figura 3). Esta elevação, aparentemente, reflete mudanças fisiológicas oriundas da ausência do manejo das formigas, dentre elas a possível ativação de biomassa em estado dormente, a qual inclui micro-organismos invasores. Assim, todos os ensaios com biomassa ativa foram limitados pelo tempo de constância respirométrica, representativo da condição mutualista.

4.1.2 Determinação das concentrações saturantes de acetato de sódio para a realização dos ensaios de respiração induzida por substrato

Testes com jardins de fungo de *A. bisphaerica* desprovidos de formigas, larvas e ovos e uniformemente borrifados com solução de acetato de sódio (Aco^-Na^+) em diferentes concentrações de DQO. Este substrato é considerado geral pelo fato de entrar diretamente na cadeia dos ácidos tricarboxílicos e, assim, evitar preferências por substrato tais como glicose ou xilose, ou dificuldades oriundas de processos de repressão ou ativação catabólica, ou predileções por determinado substrato. Os resultados revelaram que a concentração saturante para os jardins de fungo coletados foi igual a $500 \text{ mg DQO}_{\text{Aco-Na}^+} \text{ g}^{-1}$ massa úmida. Valores superiores não levaram a acréscimos na taxa metabólica dos jardins de fungo (Figura 4). Resultado similar foi observado para os demais jardins de fungo avaliados, indicando que a concentração definida para jardins de fungo de *A. bisphaerica* é igualmente adequada para outros tipos de material (Tabela 2). Os ensaios foram repetidos com glicose (Tabela 3). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as respostas respirométricas com glicose ou acetato (Tabelas 2 e 3), indicando que glicose pode ser utilizada em substituição ao acetato para os estudos respirométricos de jardins de fungos. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre as respostas com $500 \text{ mg DQO g}^{-1}$ e $750 \text{ mg DQO g}^{-1}$, seja para acetato ou glicose. Dessa forma, a concentração de $500 \text{ mg DQO}_{\text{Aco-Na}^+} \text{ g}^{-1}$ foi empregada nos demais ensaios de indução respirométrica para testes biocinéticos.

Figura 3 – Ensaio de estabilidade respirométrica de jardins de fungo na ausência de formigas, larvas e ovos. Estão representadas as taxas de variação de emissão de CO_2 em intervalos de 2 horas. A seta indica o tempo limite de estabilidade respirométrica na ausência de formigas. Curvas representam as médias obtidas para cada material avaliado ($N = 3$)

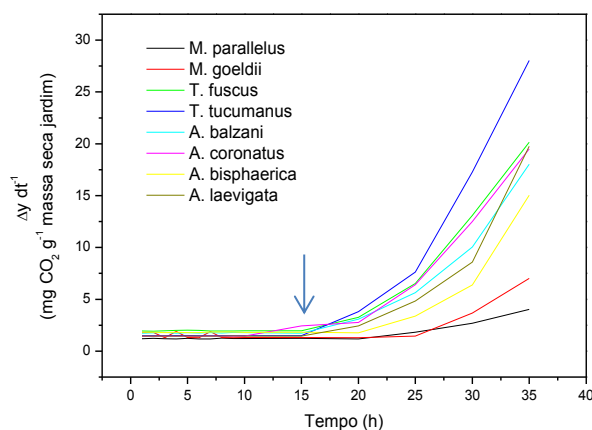


Figura 4 - Determinação da concentração ótima de acetato-Na para a realização de ensaios de respiração induzida por substrato. Modelo utilizado: materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica*. Curvas representam os valores médios obtidos para cada material ($N = 3$).

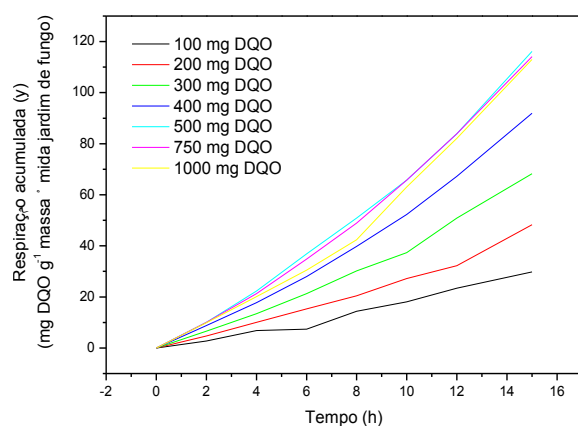


Tabela 2 - Concentrações ótimas de Aco^-Na^+ para SIR

Material de jardim de fungo	[Aco^-Na^+]		
	400 (mg DQO g ⁻¹)	500 (mg DQO g ⁻¹)	750 (mg DQO g ⁻¹)
<i>Mycocephurus goeldii</i>	99,63 ± 25,60 ^a	150,93 ± 22,89 ^a	155,96 ± 28,61 ^a
<i>Mycetarotes parallelus</i>	101,36 ± 40,42 ^a	145,05 ± 21,90 ^a	171,51 ± 16,70 ^a
<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	82,84 ± 24,48 ^b	112,26 ± 11,62 ^b	121,63 ± 29,89 ^b
<i>Trachymyrmex fuscus</i>	65,95 ± 23,90 ^c	103,98 ± 42,10 ^b	104,66 ± 22,46 ^b
<i>Acromyrmex coronatus</i>	26,86 ± 11,63 ^d	48,23 ± 15,57 ^c	34,96 ± 16,59 ^c
<i>Acromyrmex balzani</i>	28,39 ± 8,53 ^d	43,53 ± 8,33 ^c	47,20 ± 8,75 ^c
<i>Atta bisphérica</i>	33,51 ± 9,90 ^d	43,68 ± 10,84 ^c	41,92 ± 11,77 ^c
<i>Atta laevigata</i>	35,32 ± 12,86 ^d	53,27 ± 13,69 ^c	44,21 ± 14,29 ^c

Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 4). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ na mesma coluna.

Tabela 3 - Concentrações ótimas de glicose para SIR

Material de jardim de fungo	[Glc]		
	400 (mg DQO g ⁻¹)	500 (mg DQO g ⁻¹)	750 (mg DQO g ⁻¹)
<i>Mycocephurus goeldii</i>	105,69 ± 32,85 ^a	150,99 ± 24,07 ^a	162,38 ± 33,62 ^a
<i>Mycetarotes parallelus</i>	107,59 ± 42,41 ^a	153,70 ± 23,45 ^a	172,96 ± 23,07 ^a
<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	84,11 ± 32,39 ^b	116,82 ± 13,32 ^b	125,65 ± 32,95 ^b
<i>Trachymyrmex fuscus</i>	74,57 ± 24,35 ^b	108,07 ± 46,30 ^b	111,58 ± 25,61 ^b
<i>Acromyrmex coronatus</i>	36,50 ± 16,83 ^c	48,66 ± 19,10 ^c	44,77 ± 18,10 ^c
<i>Acromyrmex balzani</i>	38,27 ± 13,92 ^c	51,72 ± 15,30 ^c	48,10 ± 14,71 ^c
<i>Atta bisphérica</i>	36,63 ± 12,87 ^c	50,17 ± 13,93 ^c	48,67 ± 13,50 ^c
<i>Atta laevigata</i>	42,39 ± 14,67 ^c	55,05 ± 16,06 ^c	47,34 ± 15,39 ^c

Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 3). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ na mesma coluna.

4.2 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA ÁREA DE COLETA

Materiais de jardins de fungo foram coletados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2012, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Os ninhos estavam localizados em duas grandes áreas de campo com mesmo padrão de vegetação, dominadas por espécies de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp. A primeira área, maior, foi designada ABCDEF, A = S 22° 23' 40.6"; W 47° 32' 31.7", B = S 22° 23' 38.6"; W 47° 32' 27.4", C = S 22° 23' 42.9"; W 47° 32' 26.7", D = S 22° 23' 44.9"; W 47° 32' 26.7", E = S 22° 23' 42.6"; W 47° 32' 37.5", F = S 22° 23' 39.7"; W 47° 32' 37.8". A segunda área, de menor extensão, foi designada GHIJ, G = S 22° 23' 41.6"; W 47° 32' 46.3", H = S 22° 23' 40.6"; W 47° 32' 55.9", I = S 22° 23' 40.8"; W 47° 32' 55.5", J = S 22° 23' 31.3"; W 47° 32' 42.7".

As características climáticas da região de coleta mostraram forte variação sazonal, apresentando estação quente e chuvosa marcante e bem delimitada em relação à estação fria e seca do meio do ano. O período com temperaturas mais baixas foi menos prolongado, restringindo-se aos meses de Maio, Junho e Julho. Em contrapartida, o período seco, com início no final de Maio, apresentou duração maior, perdurando até Outubro, apresentando fraca recuperação pluvionétrica durante Novembro. Picos de pluviosidade e temperatura foram observados nos meses de Janeiro e Fevereiro (Figura 5).

As propriedades da vegetação da área de coleta acompanharam o perfil pluviométrico. Durante os períodos chuvosos, a vegetação mostrou-se abundante (Figura 6), mas escassa e pouco desenvolvida durante os meses de seca (Figura 7).

Figura 5. Perfil pluviométrico e curva de temperatura média mensal da região de coleta entre Fevereiro de 2010 e Fevereiro de 2012 (dados fornecidos pela estação meteorológica do CEAPLA – IGCE – UNESP Rio Claro-SP).

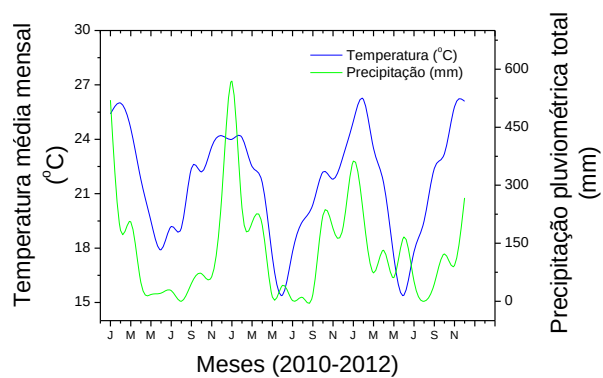


Figura 6 - Áreas de coleta durante a estação chuvosa em Rio Claro-SP, 2010-2013.



Figura 7 - Área de coleta durante o período de seca dem Rio Claro-SP, 2010-2013.



4.3 DESCRIÇÃO DOS JARDINS DE FUNGO

A avaliação sazonal dos jardins de fungo empregou material coletado nas áreas ABCDEF e GHIJ previamente delimitadas. Os materiais coletados foram provenientes de ninhos de *Mycocepurus goeldii* e *Mycetarotes parallelus* (agriculturas basais), *Trachymyrmex fuscus* e *T. tucumanus* (agriculturas derivadas), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), *Acromyrmex coronatus* (agricultura de corte de folhas, dicotiledôneas) e *Atta laevigata* (agricultura de corte de folhas, mono e dicotiledôneas). As coletas para estudos comparativos e sazonais foram realizadas entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011, nas áreas ABCDEF e GHIJ, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro. Gravuras e fotografias de jardins de fungos encontram-se no Anexo A (Jardins de fungo de formigas Attini)

4.3.1 MORFOLOGIA DOS JARDINS DE FUNGO

4.3.1.1 Jardins de fungo de *Atta bisphaerica*

Os jardins de fungo apresentaram aspecto particulado, frágil e quebradiço, com agregados de fungo (tufos) dispersos sobre fragmentos de gramíneas de 4 a 7 mm, às vezes conectados por finos filamentos de hifas. Devido ao tamanho relativamente grande dos fragmentos de gramíneas, estes jardins de fungo foram marcados pela baixa compactação do substrato e grande tamanho dos poros. A composição em massa seca de material sólido insolúvel nos jardins de fungo oscilou entre 23 e 30% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 64 a 75% da composição em massa seca. Os ninhos apresentaram uma única elevação munida de aberturas, com câmaras localizadas abaixo da região central. As câmaras apresentaram formato esférico, com um a três túneis localizados na região mediana ou na base. As dimensões das câmaras oscilaram entre (10,5 x 9,0 x 8,0 cm) e (15,0 x 10,6 x 9,0 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente, com seus volumes tomados quase inteiramente por jardins de fungo assentados na base do

compartimento. A presença de câmaras próximas à superfície do solo, entre os meses de fevereiro a junho, contendo jardins de fungo com fragmentos de folhas recentemente incorporados – caracterizados pela tonalidade verde – sugere adaptações capazes de suportar variações na temperatura e umidade do solo. Entretanto, esta elasticidade, possivelmente, apresenta limites que não permitem a manutenção de câmaras à baixa profundidade em períodos do ano com seca ou calor extremos, tendo em vista que estas não foram observadas a menos de 1 m de profundidade. Os ninhos estavam localizados em áreas abertas, ricas em insolação.

4.3.1.2 Jardins de fungo de *Atta laevigata*

Os jardins de fungo apresentaram aspecto esponjoso frágil e quebradiço, com agregados de micélio e gongilídeos nas áreas superficiais e anastomoses de hifas delgadas conectando-os. Os jardins de fungo foram marcados pelo grande tamanho dos poros. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 27 e 35% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 60 a 69% da composição em massa seca. Os ninhos apresentaram múltiplas elevações munidas de aberturas, com câmaras localizadas abaixo das aberturas centrais. As câmaras apresentaram formato esférico, com dois a quatro túneis localizados na região mediana ou na base. As dimensões das câmaras oscilaram entre (14,5 x 12,0 x 10,0 cm) e (15,0 x 17,4 x 13,2 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente, com seus volumes tomados quase inteiramente por jardins de fungo assentados na base do compartimento. Os ninhos estavam localizados em áreas abertas, ricas em insolação.

4.3.1.3 Jardins de fungo de *Acromyrmex balzani*

Os jardins de fungo apresentaram aspecto particulado, frágil, com tufo de fungo dispersos sobre fragmentos de gramíneas de 2 a 5 mm. Mais uma vez, o tamanho relativamente grande dos fragmentos de gramíneas acarretou baixa compactação do substrato e grande tamanho dos poros. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 22 e

35% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 61 a 74% da composição em massa seca. A arquitetura dos ninhos incluiu câmaras relativamente pequenas, com o tamanho médio da primeira câmara com jardim de fungo igual a (9,8 x 8,5 x 7,2 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente. A massa fúngica por câmara escavada apresentou dimensões médias de (6,3 x 3,2 x 4,5 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente. Externamente, as colônias apresentaram um único olheiro em forma de torre de palha, construído basicamente de pequenos fragmentos de gramíneas secas. Próximo a este olheiro, foi observado um amontoado de solo proveniente das escavações das referidas galerias e câmaras e, juntamente a esse depósito de solo escavado, lixo proveniente da colônia. Os ninhos estavam localizados em áreas abertas, ricas em insolação.

4.3.1.4 Jardins de fungo de *Acromyrmex coronatus*

O único jardim de fungo, arborícola, apresentou aspecto esponjoso frágil e quebradiço, com agregados de micélio e anastomoses de hifas delgadas conectando-os, distribuídos de maneira mais ou menos uniforme por todo o jardim de fungo. Os jardins de fungo apresentaram poros com tamanho inferior ao observado em *A. bazani*, dando ao jardim de fungo característica mais compactada. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 37 e 45% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 58 a 71% da composição em massa seca. Os ninhos apresentaram parede de vegetação, montados em bifurcações de troncos de *Helicalix* sp., com única abertura localizada na porção inferior do ninho. A câmara única apresentou formato esférico e dimensões entre (63,4 x 62,0 x 71,0 cm) e (71,0 x 61,3 x 72,2 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente, com seus volumes tomados inteiramente por jardim de fungo. Lixo encontrava-se depositado à base das árvores que portavam os ninhos. Os ninhos estavam localizados em áreas contendo agregados de vegetação arbórea dispersos em regiões de vegetação aberta.

4.3.1.5 Jardins de fungo de *Trachymyrmex fuscus*

Os jardins de fungo apresentaram consistência pegajosa e intensa pigmentação marrom-avermelhada, substrato cortado finamente, algo macerado, e distribuição mais uniforme do fungo, incluindo hifas com penetração profunda no substrato, garantindo maior consistência e robustez à esponja de fungo. Porções da esponja encontraram-se aderidas às paredes lisas da câmara. As estruturas particuladas, maceradas, dos jardins de fungo levaram a um menor tamanho dos poros e maior compactação do substrato. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 39 e 46% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 48 a 50% da composição em massa seca. Os ninhos escavados apresentaram câmaras elípticas com dimensões médias do jardim de fungo, na primeira câmara portando a cultura microbiana, iguais a 12,3 x 8,5 x 4,1 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente). Os ninhos de *T. fuscus* avaliados apresentaram, externamente, olheiros na forma de canudos de terra endurecida. O diâmetro médio da entrada dos olheiros oscilou entre 1,5 cm a 3 cm. Próximo ao olheiro, todos os ninhos apresentaram um amontoado de lixo de coloração marrom-amarelada, constituído em grande parte de restos do substrato utilizado para o cultivo de seu fungo.

4.3.1.6 Jardins de fungo de *Trachymyrmex tucumanus*

Os jardins de fungo apresentaram aspecto esponjoso e frágil, com poros diminutos e pigmentação verde-acinzentada, substrato desestruturado, mais decomposto, e distribuição mais uniforme do fungo, incluindo hifas com penetração profunda no substrato, garantindo maior consistência e robustez à esponja de fungo. A esponja encontrava-se assentada na base das câmaras, embora aderida às radículas da vegetação localizada à superfície do ninho. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 42 e 56% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 40 a 53% da composição em massa seca. Os ninhos escavados apresentaram câmaras elípticas, com dimensões médias do jardim de fungo, na primeira câmara portando a cultura microbiana, iguais a (9,8 x 7,2 x 4,1 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente. Os ninhos avaliados apresentaram,

externamente, olheiros na forma de canudos de vegetação trançada. Próximo ao olheiro, os ninhos apresentaram um amontoado de lixo de coloração ocre.

4.3.1.7 Jardins de fungo de *Mycetarotes parallelus*

Jardins de fungo apresentaram tamanho igual ou notavelmente inferior ao volume das câmaras, sendo compostos por fungo e fragmentos diminutos de sementes, folhas e caules decompostos como substrato, sem tratamento elaborado. Os jardins de fungo apresentaram pigmentação acinzentada ou ocre e distribuição razoavelmente uniforme do fungo, incluso hifas com penetração profunda no substrato, garantindo maior consistência à esponja de fungo. O reduzido tamanho do substrato e sua condição mais decomposta levaram a um menor tamanho dos poros e maior compactação do substrato. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 43 e 72% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 14 a 40% da composição em massa seca. As câmaras apresentaram dimensões médias iguais a 10,3 x 5,1 x 4,5 (comprimento, altura e largura, respectivamente), com jardins de fungo suspensos nas paredes das câmaras, entremeados em fragmentos finos de raízes. Os ninhos foram caracterizados por entradas em torres de terra granulada entre 1 a 2 cm de altura e presença de uma única câmara a 5.0-13.5 cm de profundidade. Nos meses de junho a setembro, observou-se formação de depósitos externos de material exaurido do jardim de fungo em pilhas ao redor das entradas dos ninhos.

4.3.1.8 Jardins de fungo de *Mycocephurus goeldii*

Jardins de fungo apresentaram tamanho levemente inferior ao volume das câmaras, sendo compostos por fungo e fragmentos diminutos de sementes, folhas, pétalas e caules decompostos como substrato. Os jardins de fungo apresentaram pigmentação esverdeada a acinzentada e distribuição razoavelmente uniforme do fungo, com esponja de fungo consistente, embora delicada, com poros reduzidos. A composição em massa seca de substrato oscilou entre 53 e 69% do valor de massa seca total do jardim de fungo. Os solutos extraíveis representaram 24 a 44% da composição em massa seca. As câmaras apresentaram formato

esférico e dimensões médias iguais a 7,2 x 6,5 x 7,5 (comprimento, altura e largura, respectivamente). Jardins de fungo ocupavam a maior parte do volume da câmara, entremeados em raízes. Todas as câmaras contendo jardins de fungo localizaram-se em profundidades superiores a 80 cm. Os ninhos foram caracterizados por pequena elevação de terra escura depositada ao redor da entrada esférica diminuta, depósito esse ausente em boa parte da época seca.

4.3.2 MASSAS TOTAIS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Todos os jardins de fungo apresentaram pH da solução extracelular constante, com valor médio igual a $6,29 \pm 0,56$ independentemente da época do ano (Figura 8A), o qual foi muito similar ao valor de pH da solução do solo circundante, igual a $6,68 \pm 0,48$ (N=5). As temperaturas registradas para as câmaras também se mostraram estatisticamente constantes, embora com amplitudes entre 21,3 °C e 25,2 °C.

Os valores de massa seca em porcentagem das massas totais também foram similares, oscilando entre 31 a 42% ao longo do ano, sem perfil determinado (Figura 8B). As massas secas de jardins de fungo nas câmaras superficiais (entre 5 e 40 cm) permaneceram constantes no período entre Novembro e Maio, correspondente à estação chuvosa (Figura 5, página 53). A partir do mês de Junho, início da temporada de seca, as massas de jardins de fungo caíram rapidamente para valores inferiores à metade das massas observadas no intervalo de Novembro a Maio e assim permaneceram até o mês de Setembro. Fraca recuperação foi observada no mês de Outubro, início da época de chuvas, embora ainda pouco intensas (Figura 8C).

Câmaras superficiais contendo jardins de fungo não foram observadas em ninhos de *Atta bisphaerica* nas estações secas, em decorrência da inexistência de ninhos jovens e, conseqüentemente, à pequena profundidade, na área de coleta.

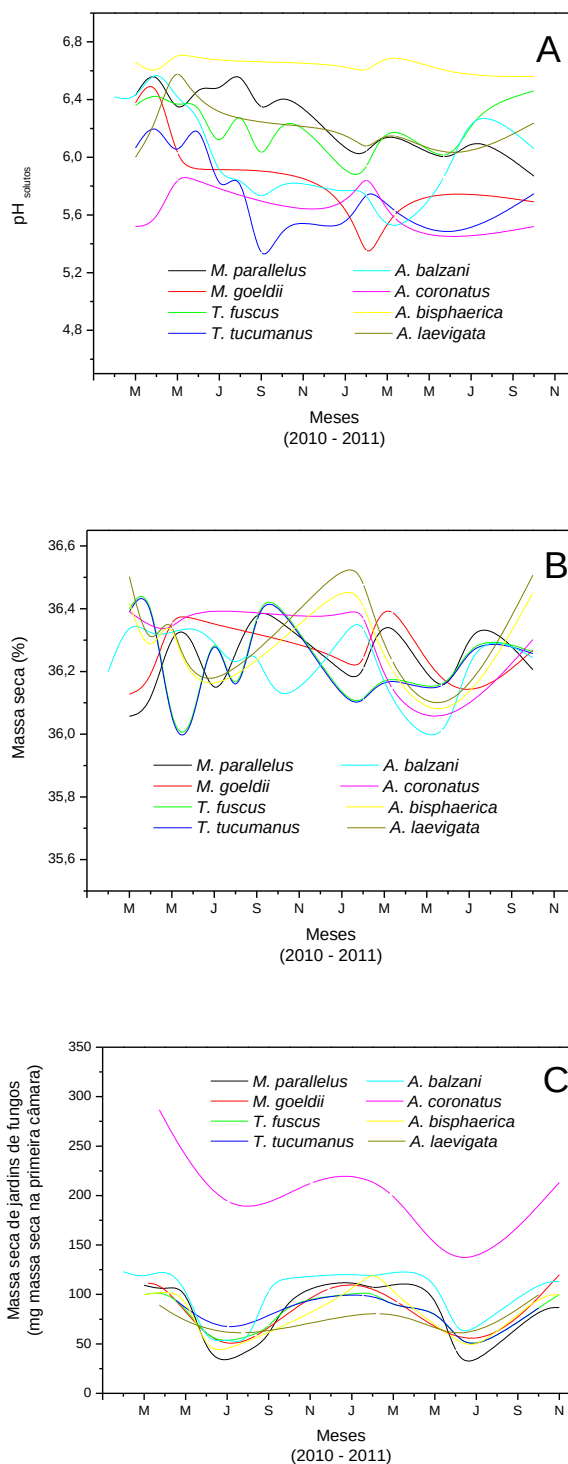
Ninhos de *Mycetarotes parallelus* contendo câmaras com jardins de fungo funcionais também se tornaram escassos no período de seca, quando a maioria dos ninhos encerraram suas aberturas e dispensaram a maior parte dos seus jardins de fungo. Poucos ninhos de *M.*

parallelus mantiveram-se ativos. Destes, a grande maioria localizou-se em regiões de vegetação contendo cobertura arbórea.

Os ninhos de *A. coronatus* também escassearam durante o período de secas. Durante esta estação, os dois únicos ninhos observados na região de coleta encontravam-se no solo, entrameados em vegetação arbustiva.

As coletas foram interrompidas em Outubro de 2010 e retornaram em Janeiro de 2011, mês para o qual foram observadas massas de jardins de fungo similares às encontradas no período de Fevereiro a Maio de 2010. As coletas perduraram até Novembro de 2011, não tendo sido efetuadas nos meses de Maio de 2011, Agosto de 2011 e Setembro de 2011, devido às dificuldades de obtenção de jardins de fungo na área pré-estabelecida. Mesmo assim, os valores das massas de jardins de fungo e as oscilações sazonais observadas para o ano de 2011 foram similares às observadas para o ano de 2010.

Figura 8 - Parâmetros físicos dos jardins de fungo de formigas Attini entre os anos de 2010 e 2011. **A** – pH; **B** – teor de água; **C** – biomassa microbiana seca. Número de jardins de fungo avaliados: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Curvas representam as médias de 5 replicatas para cada material.



4.3.4 PROPRIEDADES DO SUBSTRATO UTILIZADO EM JARDINS DE FUNGO

O substrato presente nos jardins de fungo das agriculturas de corte de folhas apresentou perfil cristalino mascarado por bandas de absorção de xilanas e pectinas (Figura 9). A larga banda de absorção na região entre $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, relacionada à extensão vibracional de grupos OH (deformação axial O-H), apresentou perfil misto, ao mesmo tempo agudo e com extensão larga, propriedades resultantes de combinações de regiões cristalinas e amorfas, incluindo hemicelulases e pectinases. Entretanto, o perfil agudo é visualizado com mais precisão em celulosas amorfas (CIOLACU et al., 2011).

A presença de pico acentuado a $2920,14\text{ cm}^{-1}$, correspondente à deformação vibracional C-H, relaciona-se a estas regiões amorfas (CIOLACU et al., 2011), mas também encontra-se presente em xilanas (SILVA et al., 1998). Por sua vez, a banda de absorção a $2851,46\text{ cm}^{-1}$ está relacionada a grupos C-H terciários, presentes em ligninas não acetiladas (LISPERGUER et al., 2009). A banda de absorção a $1735,44\text{ cm}^{-1}$ relaciona-se à deformação axial da carbonila dos ácidos carboxílicos, indicando a presença de ácidos urônicos, componentes da pectina.

A banda vestigial a $1553,65\text{ cm}^{-1}$, relacionada à deformação axial C=C de anel aromático, pode estar associada à presença de pequenas quantidades de lignina na amostra. Bandas de absorção residuais entre $1506\text{-}1456\text{ cm}^{-1}$ puderam ser constatadas, as quais estão relacionadas às bandas de anéis aromáticos e deformação de C=H vistas em ligninas (LISPERGUER et al., 2009). A banda de absorção visível a $1321,73\text{ cm}^{-1}$ é indicativa da deformação angular de OH, reportado como relacionado à presença de anéis siringil de ligninas não lenhosas (BOERIU et al., 2004). A banda de absorção evidente a $1244,99\text{ cm}^{-1}$ refere-se à extensão C-O de grupos metoxilasas de ligninas.

O pico a $1428,29\text{ cm}^{-1}$, bastante encoberto, relaciona-se à deformação angular de CH_2 simétrico presente em celulosas cristalinas (CIOLACU et al., 2011), reconhecida como “banda de cristalinidade” (CIOLACU et al., 2011). O pico de absorção a $1371,88\text{ cm}^{-1}$ relaciona-se a δCH e νCOO . A banda de absorção a $1165,12\text{ cm}^{-1}$ refere-se a δOH e $\nu\text{C-O}$. A banda centrada em $1042,79\text{ cm}^{-1}$, referente às vibrações do anel glicosídico, deformação angular C-O-H, deformação axial C-O e C-O-C, apresentou perfil semelhante ao das arabinoxilanas com baixo grau de substituição (KACURÁKOVÁ et al., 1994). A banda de

absorção a $898,62\text{ cm}^{-1}$ está relacionada à extensão C-O-C de ligações glicosídicas β -(1→4) e é designada como uma banda amorfa de absorção (CIOLACU et al., 2011), vinculada à presença de celuloses amorfas.

Jardins de fungo de agriculturas derivadas ou de *M. goeldii* apresentaram perfil mais simples, com redução geral da amplitude dos picos, principalmente os relacionados às regiões entre $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, a qual apresentou perda significativa de absorção, e entre $1800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$, indicando perdas estruturais relacionadas à degradação de hemiceluloses (redução drástica da banda de absorção centrada em $1042,79\text{ cm}^{-1}$) e pectinas (forte redução da banda de absorção a $1735,44\text{ cm}^{-1}$). As bandas de absorção a $1553,65\text{ cm}^{-1}$, $1321,73\text{ cm}^{-1}$, $1244,99\text{ cm}^{-1}$ e entre $1506\text{-}1456\text{ cm}^{-1}$ tornaram-se mais evidentes, indicando a preservação de ligninas. A banda de absorção a $1428,29\text{ cm}^{-1}$ tornou-se menos visível, revelando a perda da estrutura de celuloses cristalinas. A banda de absorção a $898,62\text{ cm}^{-1}$ não sofreu alterações significativas, indicando presença de componentes amorfos, dentre eles celulose amorfa. Jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram as maiores alterações estruturais. De forma geral, apresentaram as perdas em relação à amplitude de picos relacionados à presença de carboidratos estruturais, com intensificação relativa das bandas de absorção residuais relacionadas a ligninas e estruturas amorfas.

Os parâmetros de absorção no infravermelho não apresentaram resposta sazonal significativa (Figura 10). O mesmo foi observado para os teores de glicose e xilose no material forrageado (Tabela 4). A alteração do estado de degradação de material forrageado foi acompanhada pela mudança na oferta de glicose e xilose no substrato. Substratos mais decompostos mostraram ganhos proporcionais de glicose, possivelmente devido ao aumento relativo de estruturas cristalinas e amorfas mais refratárias ao ataque enzimático, tais como celulose.

Figura 9 – Espectros de FTIR dos substratos de jardins de fungo durante as chuvas (N = 3).

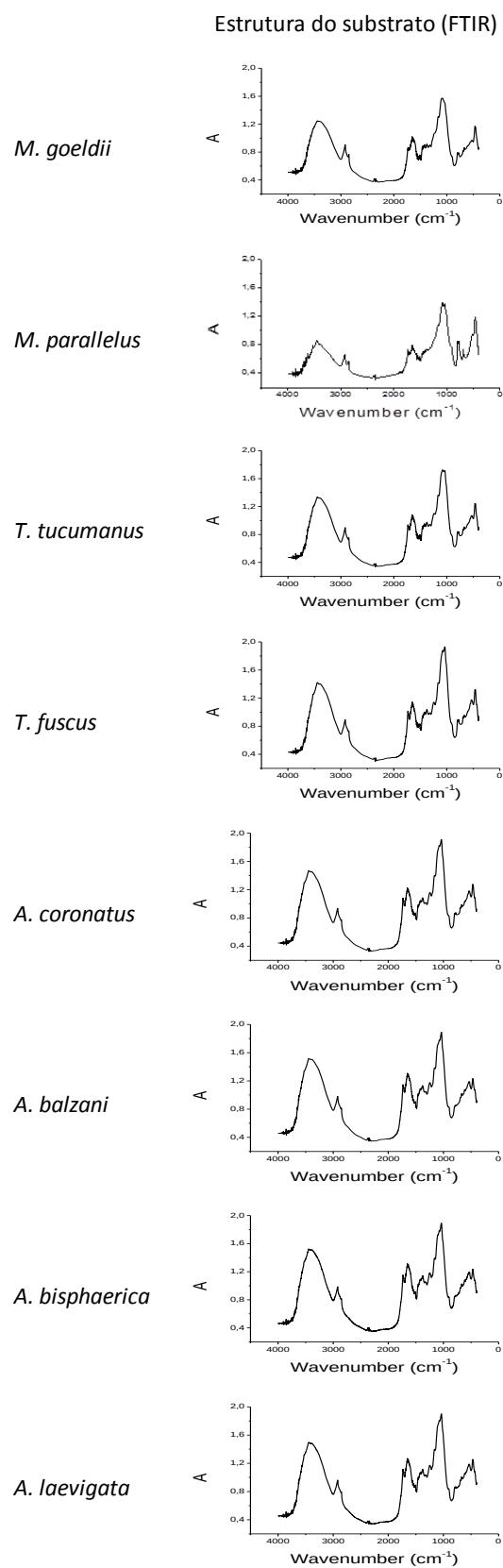


Figura 10 – Espectros de FTIR dos substratos de jardins de fungo durante a seca (N = 3).

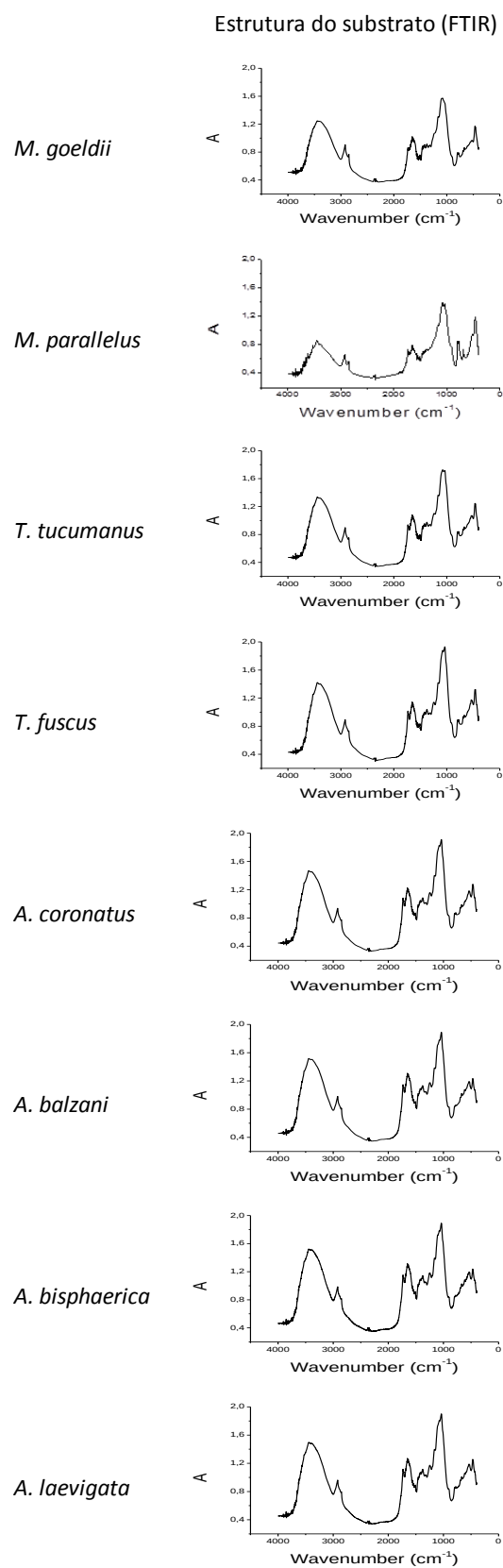


Tabela 4 - Material coletado pelas operárias e utilizado como substrato nos jardins de fungo

Agricultura de fungo	Material coletado	Estado de decomposição	[Glc] %	[Xyl] %	[Glc] [Xyl] ⁻¹
<i>A. balzani</i>	Fragmentos de folhas de monocotiledôneas (Poaceae)	Material fresco	36,3	15,3	2,38 ^a
<i>A. coronatus</i>	Fragmentos de folhas, flores e caules de dicotiledôneas (Myrtaceae, Asteraceae, Rosaceae, Fabaceae)	Material fresco	35,2	15,4	2,29 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	Fragmentos de folhas de monocotiledôneas (Poaceae)	Material fresco	39,2	16,3	2,41 ^a
<i>A. laevigata</i>	Fragmentos de folhas, flores e caules de dicotiledôneas e monocotiledôneas (Poaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Rosaceae)	Material fresco	38,4	16,3	2,35 ^a
<i>T. fuscus</i>	Sementes (Poaceae); fragmentos de flores e folhas mortas (Poaceae, Myrtaceae, Asteraceae)	Material de serapilheira pouco decomposto	42,3	14,6	2,89 ^b
<i>T. tucumanus</i>	Fragmentos foliares mortos (Poaceae, Asteraceae, Rubiaceae)	Material de serapilheira pouco decomposto	45,8	14,7	3,12 ^c
<i>M. parallelus</i>	Pequenos fragmentos de folhas e flores mortas (Poaceae, Asteraceae, Rubiaceae); detrito vegetal não identificado	Material de serapilheira muito decomposto	48,9	10,5	4,66 ^d
<i>M. goeldii</i>	Pequenos fragmentos de folhas e flores mortas (Poaceae, Asteraceae); detrito vegetal não identificado	Material de serapilheira muito decomposto	43,2	10,2	4,25 ^d

Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidade de materiais de jardins de fungo coletada: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Porcentagens obtidas a partir de 5 replicatas para cada material. Razões entre quantidades de Glc e Xyl foram comparadas segundo o teste de Kruskal-Wallis. Letras em sobrescrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a $p \leq 0,05$ para a mesma coluna.

4.3.5 PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DOS SOLUTOS

As demandas químicas de oxigênio em solutos de jardins de fungo, uma representação do estado energético do meio, apresentaram oscilações anuais estocásticas, mantendo-se estatisticamente constantes ao longo dos meses de coleta (Figura 11), sem diferenças significativas entre as agriculturas de folhas-de-corte (Tabela 5). Por sua vez, as agriculturas derivadas e basais apresentaram valores de DQO em média 1,3x inferiores aos registrados para as agriculturas de corte de folhas (Tabela 5). Dentre as agriculturas derivadas, *T. fuscus* apresentou forte oscilação anual, registrando valores de DQO para os primeiros meses do ano de 2011 similares aos observados para as agriculturas de corte de folhas (Figura 11).

As oscilações estocásticas também foram observadas para as quantidades de açúcares redutores, glicose e xilose permanentes nos jardins de fungo (Figuras 12, 13 e 14, respectivamente). As agriculturas basais apresentaram as menores concentrações de açúcares redutores, incluindo glicose, encontrando-se em patamar diferente daquele observado para as demais agriculturas. Entretanto, seus valores para xilose permanente mostraram-se, em média, duas vezes maiores que os das agriculturas de corte de folhas. Embora jardins de fungo de sistemas de corte de folhas tenham apresentado maiores quantidades de açúcares redutores extraíveis em solução de KCl, as quantidades permanentes de glicose observadas em jardins de fungo de agriculturas pertencentes a *Trachymyrmex* foram em média 1,23 vezes superiores às observadas em jardins de fungo de sistemas de corte de folhas. Em compensação, os jardins de fungo pertencentes às espécies de *Atta* e *Acromyrmex* avaliadas mostraram quantidades permanentes significativamente menores de xilose em seus solutos, resultado indicativo de processos metabólicos diferenciados.

Figura 11 - Estabilidade das concentrações de demanda química de oxigênio (DQO) no espaço extracelular de jardins de fungo de formigas Attini. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos coletadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N= 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N= 4). Curvas representam valores médios para 5 replicatas para cada material.

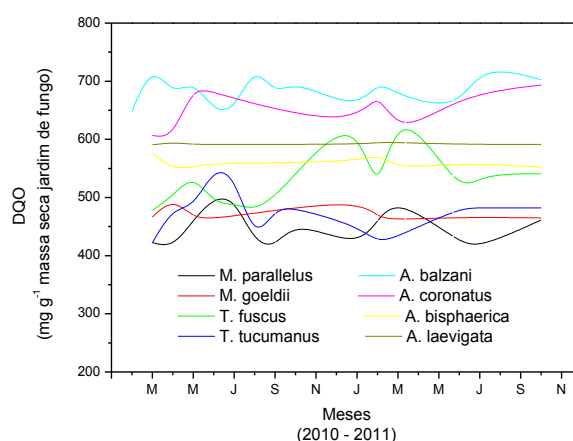


Figura 12 - Estabilidade das concentrações de açúcares redutores (ART) no espaço extracelular de jardins de fungo de formigas Attini. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos coletadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Curvas representam valores médios para 5 replicatas para cada material.

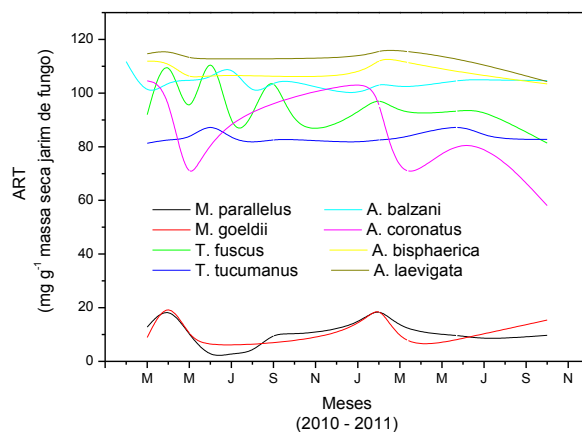


Figura 13 - Estabilidade das concentrações de glicose (Glc) no espaço extracelular de jardins de fungo de formigas Attini. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos coletadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Curvas representam valores médios para 5 replicatas de cada material.

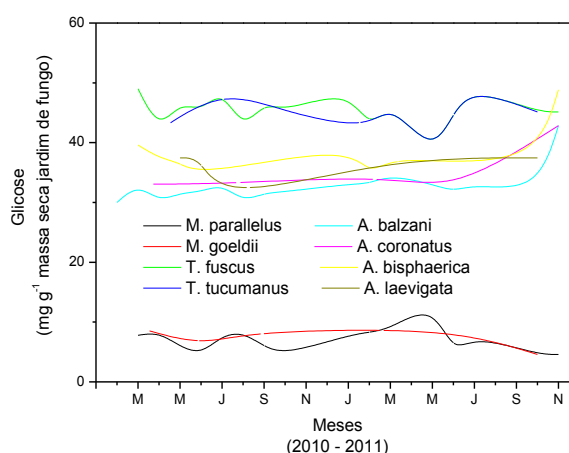


Figura 14 - Estabilidade das concentrações de xilose (Xyl) no espaço extracelular de jardins de fungo de formigas Attini. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos coletadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Curvas representam valores médios para 5 replicatas para cada material.

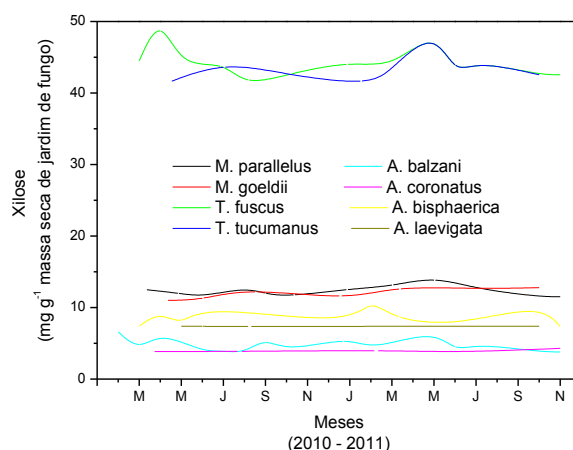


Tabela 5 - Demanda química de oxigênio e açúcares em jardins de fungo de formigas Attini

Materiais de jardins de fungo	[Xyl] (mg g ⁻¹)	[Glc] (mg g ⁻¹)	[ART] (mg g ⁻¹)	[DQO] (mg g ⁻¹)
<i>M. goeldii</i>	11,78 ± 4,96 ^a	6,58 ± 0,45 ^a	12,78 ± 2,56 ^a	466,2 ± 93,2 ^a
<i>M. parallelus</i>	12,73 ± 6,01 ^a	6,43 ± 1,90 ^a	8,93 ± 1,87 ^b	622,4 ± 51,9 ^b
<i>T. tucumanus</i>	46,43 ± 16,43 ^b	37,23 ± 2,98 ^b	81,27 ± 16,25 ^c	422,1 ± 84,4 ^a
<i>T. fuscus</i>	52,54 ± 11,18 ^b	37,83 ± 2,60 ^b	91,96 ± 18,39 ^c	477,6 ± 95,5 ^a
<i>A. coronatus</i>	3,70 ± 0,22 ^c	29,23 ± 3,70 ^c	104,57 ± 20,91 ^d	606,7 ± 121,3 ^b
<i>A. balzani</i>	3,18 ± 0,43 ^c	27,28 ± 2,40 ^c	111,72 ± 22,34 ^d	606,7 ± 129,6 ^b
<i>A. bisphaerica</i>	4,12 ± 1,11 ^{c,d}	31,88 ± 3,41 ^{b,c}	111,87 ± 32,37 ^d	576,2 ± 115,2 ^{a,b}
<i>A. laevigata</i>	5,86 ± 1,02 ^d	31,20 ± 6,20 ^{b,c}	114,66 ± 29,93 ^d	590,6 ± 118,1 ^b

Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos avaliadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Grupos foram comparados segundo o teste de Friedman a $p \leq 0,05$. Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 5 para cada material coletado). Letras em sobrescrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a $p \leq 0,05$ na mesma coluna.

4.4 TAXAS DE ACÚMULO SAZONAIS DE DQO, ART, GLICOSE E XILOSE EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO

A avaliação da produtividade de açúcares solúveis dos jardins de fungo empregou material proveniente de ninhos de *Mycocepurus goeldii* e *Mycetarotes parallelus* (agriculturas basais), *Trachymyrmex fuscus* e *T. tucumanus* (agriculturas derivadas), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), *Acromyrmex coronatus* (agricultura de corte de folhas, dicotiledôneas) e *Atta laevigata* (agricultura de corte de folhas, mono e dicotiledôneas), coletados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011, nas áreas ABCDEF e GHIJ, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP.

4.4.1 Sazonalidade das taxas de acúmulo de demanda química de oxigênio em solutos de jardins de fungo

As taxas de acúmulo de demanda química de oxigênio em solutos de jardins de fungo aumentaram em direção às agriculturas de corte de folhas e apresentaram sazonalidade significativa (Tabela 6). As taxas de acúmulo líquido de DQO em solutos de jardins de fungo de corte de folhas foram, em média, 2,4 vezes maiores que as taxas observadas para os jardins de fungo de *Trachymyrmex* e 347,5 vezes superiores às observadas para as agriculturas basais. As taxas de acúmulo de DQO nos solutos de jardins de fungo de corte de folhas caíram, em média, 1,5 vezes durante a estação seca. Situação similar foi observada para as agriculturas de *Trachymyrmex*, para as quais foram registradas quedas de 1,2 vezes para a estação seca. Quedas de 1,4 vezes foram observadas para as agriculturas basais, indicando efeitos sazonais muito similares nas taxas de acúmulo de DQO nos solutos de todas as agriculturas. Tendo em vista que jardins de fungo contendo formigas foram empregados como controles, servindo de brancos para os ensaios de acúmulo, as taxas observadas refletem realmente taxas de acúmulo de material na ausência de formigas.

4.4.2 Sazonalidade das taxas de acúmulo de açúcares redutores totais em solutos de jardins de fungo

As taxas de acúmulo de açúcares redutores em jardins de fungo desprovidos de formigas também apresentaram dinâmica sazonal (Tabela 6). As taxas de acúmulo de açúcares redutores em sistemas de corte de folhas foram, em média, 73 vezes maiores que as taxas de acúmulo de açúcares em jardins de fungo pertencentes a agriculturas basais. Já as taxas de acúmulo de açúcares redutores em materiais de jardins de fungo de *Trachymyrmex* foram, em geral, metade daquelas observadas em sistemas pertencentes às agriculturas de corte de folhas avaliadas (Tabela 6). As reduções durante os períodos secos do ano oscilaram em torno de 1,2 a 1,7 vezes para a maioria dos jardins de fungo avaliados, sendo mais acentuadas em sistemas de corte de folhas. No entanto, foi observada redução de 4 vezes para os jardins de fungo de *M. parallelus*, oscilação muito superior às demais averiguadas.

4.4.3 Sazonalidade das taxas de acúmulo de glicose e xilose em solutos de jardins de fungo

Novamente, as dinâmicas de acúmulo de monossacarídeos específicos, glicose e xilose, apresentaram sazonalidade relevante, mantendo as taxas de acúmulo mais elevadas em sistemas pertencentes às agriculturas de corte de folhas, as quais foram seguidas pelos jardins de fungo de *Trachymyrmex* e, por fim, pelos sistemas basais (Tabela 6). Estes, por sua vez, apresentaram taxas de acúmulo bastante reduzidas, com as somatórias dos valores de acúmulo de xilose e glicose similares aos valores totais de açúcares redutores, um indicativo da presença maciça de monossacarídeos em sua composição extracelular, em detrimento de oligossacarídeos.

Um importante aspecto da dinâmica de acúmulo de monossacarídeos foi a inversão nos ritmos de produção verificadas entre as agriculturas. Em geral, os materiais de jardins de fungo das agriculturas de corte de folhas apresentaram taxas de acúmulo de xilose maiores que as de glicose, situação inversa à observada para os materiais oriundos de ninhos de *Trachymyrmex* ou de espécies de formigas basais. A exceção foi a dinâmica de *M. goeldii*,

que apresentou um ritmo de produção de xilose superior ao de glicose durante o período das chuvas (Tabela 6).

4.4.4 Ritmos de produção de solutos extracelulares na presença de formigas

Em todos os casos avaliados, as taxas de acúmulo de DQO e açúcares redutores, dentre eles glicose e xilose, mostraram-se muito reduzidos ou não detectáveis (ND) na presença de formigas (Tabela 7). Nesta situação experimental, não foram observados ritmos sazonais para o acúmulo de solutos no espaço extracelular de jardins de fungo.

Tabela 6 - Taxas de acúmulo de demanda química de oxigênio, açúcares redutores totais e glicose e xilose em jardins de fungo em estado sólido, na ausência de formigas

Estação chuvosa					
Materiais de jardins de fungo	$\Delta[\text{DQO}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{ART}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Xyl}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Glc}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\frac{\Delta[\text{Xyl}]}{\Delta[\text{Glc}]}$
<i>M. goeldii</i>	0,06 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,04 ^a	1,11
<i>M. parallelus</i>	0,03 ± 0,03 ^b	0,14 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,02 ^b	0,02 ± 0,02 ^b	0,50
<i>T. tucumanus</i>	5,18 ± 0,56 ^c	4,23 ± 0,17 ^b	0,47 ± 0,25 ^c	0,59 ± 0,58 ^c	0,80
<i>T. fuscus</i>	5,64 ± 0,38 ^c	4,59 ± 0,18 ^b	0,42 ± 0,12 ^c	0,52 ± 0,01 ^c	0,81
<i>A. coronatus</i>	13,34 ± 0,67 ^d	10,88 ± 0,44 ^c	1,36 ± 0,26 ^d	1,03 ± 0,05 ^d	1,32
<i>A. balzani</i>	13,84 ± 0,69 ^d	11,28 ± 0,45 ^c	1,10 ± 0,12 ^d	0,75 ± 0,04 ^e	1,47
<i>A. bisphaerica</i>	13,99 ± 0,70 ^d	11,41 ± 0,56 ^c	1,17 ± 0,16 ^d	0,81 ± 0,06 ^e	1,44
<i>A. laevigata</i>	14,21 ± 0,71 ^d	11,58 ± 0,36 ^c	1,12 ± 0,24 ^d	0,92 ± 0,17 ^{d,e}	1,22
Estação seca					
Materiais de jardins de fungo	$\Delta[\text{DQO}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{ART}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Xyl}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Glc}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\frac{\Delta[\text{Xyl}]}{\Delta[\text{Glc}]}$
<i>M. goeldii</i>	0,06 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,03 ^a	0,05 ± 0,03 ^a	0,80
<i>M. parallelus</i>	0,01 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,01 ^a	ND	0,01 ± 0,01 ^b	ND
<i>T. tucumanus</i>	3,95 ± 0,45 ^c	3,22 ± 0,04 ^b	0,38 ± 0,10 ^b	0,45 ± 0,21 ^c	0,84
<i>T. fuscus</i>	4,68 ± 0,56 ^c	3,81 ± 0,11 ^b	0,35 ± 0,13 ^b	0,38 ± 0,15 ^c	0,92
<i>A. coronatus</i>	8,71 ± 0,17 ^d	7,10 ± 0,11 ^c	0,89 ± 0,25 ^c	0,67 ± 0,10 ^d	1,33
<i>A. balzani</i>	9,50 ± 0,43 ^d	7,75 ± 0,28 ^c	0,71 ± 0,21 ^c	0,50 ± 0,08 ^{c,d}	1,42
<i>A. bisphaerica</i>	8,27 ± 0,29 ^d	6,74 ± 0,19 ^d	0,86 ± 0,34 ^c	0,56 ± 0,14 ^d	1,54
<i>A. laevigata</i>	9,23 ± 0,22 ^d	7,52 ± 0,15 ^c	0,73 ± 0,28 ^c	0,62 ± 0,18 ^d	1,18

Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos utilizadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). ND = não detectado. Grupos foram comparados segundo o teste de Friedman a $p \leq 0,05$. Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 5 para cada material coletado). Letras em sobrescrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a $p \leq 0,05$.

Tabela 7 - Taxas de acúmulo de demanda química de oxigênio, açúcares redutores totais e glicose e xilose em jardins de fungo em estado sólido, na presença de formigas

Estação chuvosa					
Materiais de jardins de fungo	$\Delta[\text{DQO}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{ART}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Xyl}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Glc}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\frac{\Delta[\text{Xyl}]}{\Delta[\text{Glc}]}$
<i>M. goeldii</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. parallelus</i>	ND	0,01 ± 0,01 ^a	ND	0,01 ± 0,01 ^a	ND
<i>T. tucumanus</i>	0,05 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	1
<i>T. fuscus</i>	0,06 ± 0,03 ^{a,b}	ND	ND	ND	ND
<i>A. coronatus</i>	0,07 ± 0,02 ^{a,b}	0,01 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,01 ^a	ND	ND
<i>A. balzani</i>	0,08 ± 0,03 ^b	0,03 ± 0,02 ^c	0,01 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	1
<i>A. bisphaerica</i>	0,08 ± 0,04 ^b	0,01 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,01 ^a	ND	ND
<i>A. laevigata</i>	0,07 ± 0,04 ^{a,b}	0,04 ± 0,04 ^c	0,03 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,02 ^b	1,5
Estação seca					
Materiais de jardins de fungo	$\Delta[\text{DQO}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{ART}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Xyl}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\Delta[\text{Glc}] \Delta t^{-1}$ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	$\frac{\Delta[\text{Xyl}]}{\Delta[\text{Glc}]}$
<i>M. goeldii</i>	0,01 ± 0,01 ^a	ND	ND	ND	ND
<i>M. parallelus</i>	ND	ND	ND	0,01 ± 0,01 ^a	ND
<i>T. tucumanus</i>	0,05 ± 0,05 ^b	0,02 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	ND	ND
<i>T. fuscus</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>A. coronatus</i>	0,06 ± 0,04 ^b	0,02 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	1
<i>A. balzani</i>	0,06 ± 0,03 ^b	ND	0,02 ± 0,01 ^{a,b}	ND	ND
<i>A. bisphaerica</i>	0,07 ± 0,04 ^{b,c}	0,01 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,01 ^a	ND	ND
<i>A. laevigata</i>	0,09 ± 0,02 ^c	0,04 ± 0,02 ^c	0,03 ± 0,02 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	3

Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos utilizadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). ND = não detectado. Grupos foram comparados segundo o teste de Friedman a p ≤ 0,05. Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 5 para cada material coletado). Letras em sobrescrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a p ≤ 0,05.

4.4.5 Enzimas presentes em jardins de fungo

Jardins de fungo de agriculturas basais apresentaram perfil enzimático generalista, com atividades celulásicas, tanto sobre fibras amorfas quanto cristalinas, cujos valores foram similares aos observados para as demais atividades enzimáticas (Figura 15). No entanto, as atividades enzimáticas sobre fibras cristalinas (Avicel) foram inferiores às atividades enzimáticas sobre celulosas amorfas. As atividades xilanásicas e pectinásicas foram as mais elevadas, enquanto que a atividade invertásica, sobre sacarose, foi praticamente inexistente para os extratos enzimáticos extracelulares de jardins de fungo de *M. parallelus*.

Os materiais de jardins de fungo de agriculturas derivadas e de corte de folhas mostraram, ao contrário, intensa segregação de atividades enzimáticas (Figura 15). Para estes, praticamente não houve registros de atividades celulásicas, embora suas presenças tenham sido constatadas em níveis basais. Por sua vez, as atividades invertásicas, amilásicas e, especialmente, as xilanásicas e pectinásicas, mostraram-se extremamente altas, indícios de especialização metabólica. Entre estes materiais de jardins de fungo, dinâmica diferenciada pode ser observada para os jardins de fungo de *T. fuscus*, amilolíticos potentes.

Nenhuma variação qualitativa sazonal importante pode ser observada para os tipos de atividades enzimáticas presentes, salvo oscilações entre atividades amilásicas e invertásicas nas agriculturas de corte de folhas (Figura 16). No entanto, foram observadas quedas de unidades enzimáticas entre 70 e 80%, em média, para a estação seca, quando comparada com os períodos chuvosos dos anos de coleta.

Figura 15 - Atividades enzimáticas presentes em jardins de fungo durante as estações chuvosas dos anos 2010 e 2011. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos utilizadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (N = 5 para cada material coletado).

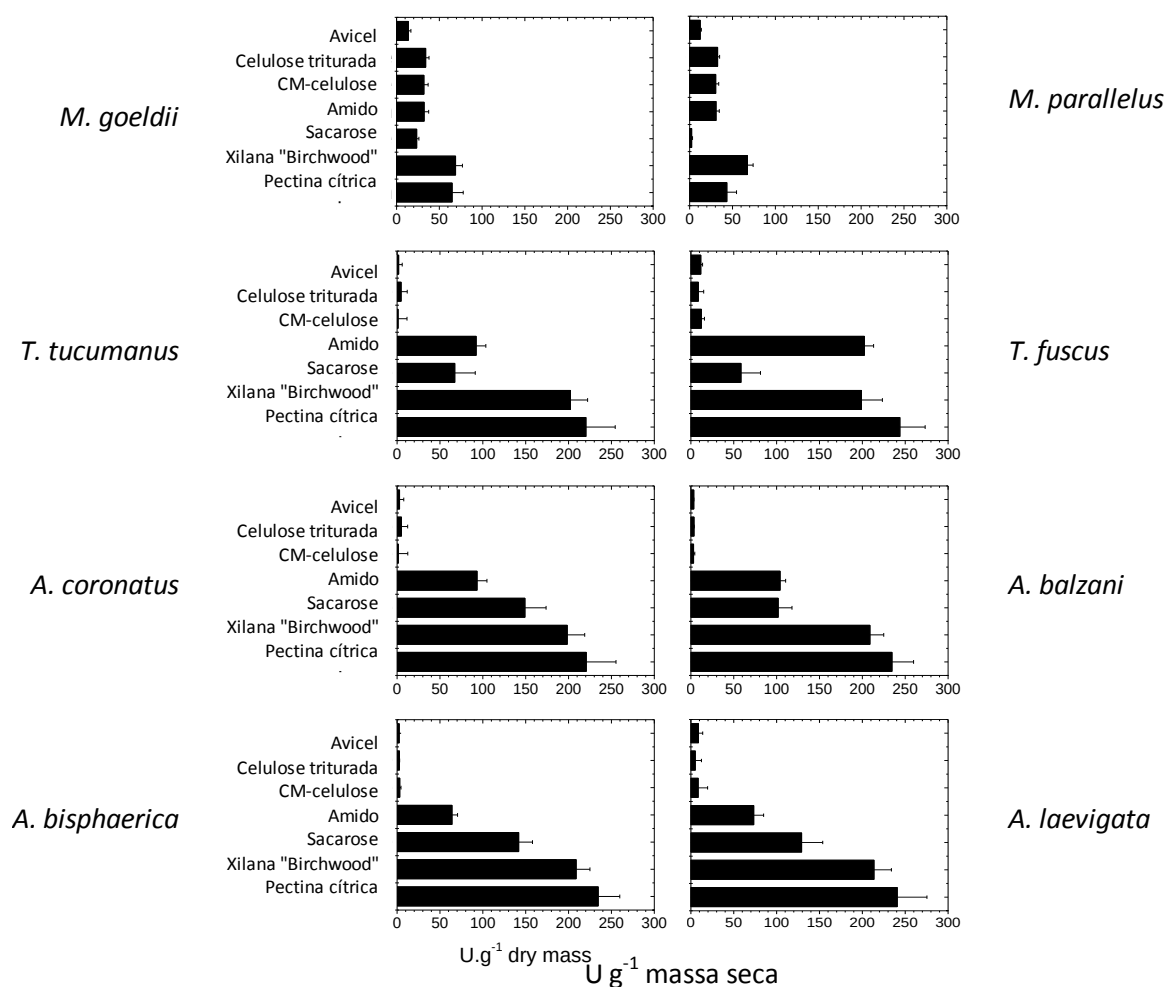
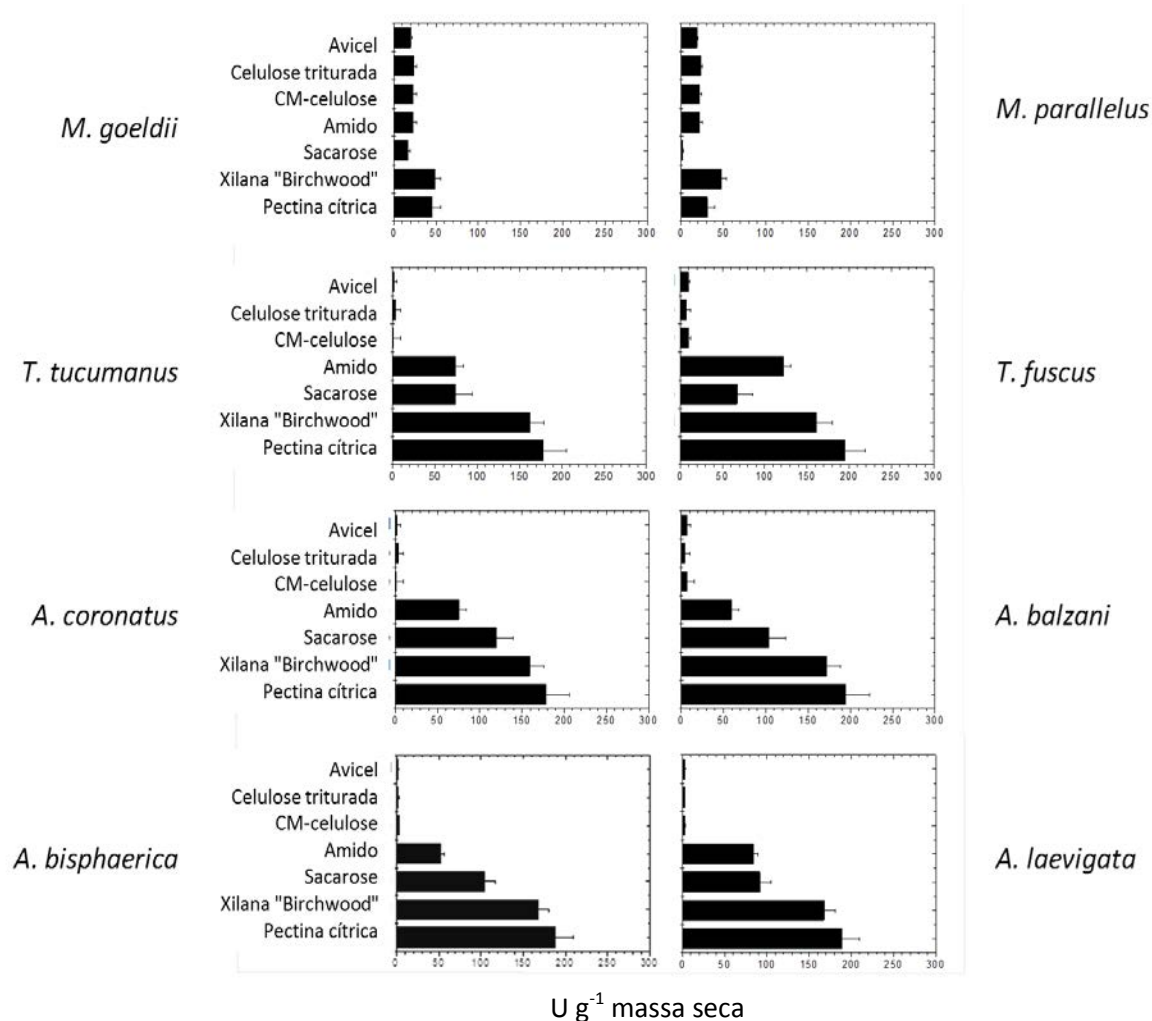


Figura 16 - Atividades enzimáticas presentes em jardins de fungo durante as estações secas dos anos 2010 e 2011. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos utilizadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N= 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N=27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (N = 5 para cada material coletado).



4.5 BIOMASSA MICROBIANA

A avaliação biomassa microbiana em materiais de jardins de fungo empregou material proveniente de ninhos de *Mycocepurus goeldii* e *Mycetarotes parallelus* (agriculturas basais), *Trachymyrmex fuscus* e *T. tucumanus* (agriculturas derivadas), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), *Acromyrmex coronatus* (agricultura de corte de folhas, dicotiledôneas) e *Atta laevigata* (agricultura de corte de folhas, mono e dicotiledôneas), coletados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011, nas ABCDEF e GHIJ, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP.

4.5.1 Parâmetros, controle e sazonalidade

As biomassas microbianas permanentes e seus respectivos parâmetros fisiológicos foram estimados por meio de procedimento de respiração induzida por substrato seguida por modelagem dos parâmetros biocinéticos, tendo por base as curvas respirométricas. Tanto as biomassas microbianas ativas quanto seus parâmetros cinéticos apresentaram variações sazonais marcantes (Tabela 8).

Ao longo da estação chuvosa, jardins de fungo pertencentes às agriculturas basais de *M. parallelus* e *M. goeldii* apresentaram 1,8x mais biomassa microbiana ativa que os jardins de fungo de formigas cortadeiras e 1,5x mais biomassa microbiana que os jardins de fungo de *Trachymyrmex*. Durante a estação seca, as biomassas microbianas permanentes de jardins de fungo de folhas-de-corte caíram para 89,7% dos seus valores registrados ao longo da estação chuvosa, enquanto que as biomassas microbianas dos jardins de fungo das espécies de *Trachymyrmex* foram reduzidas para 83,6% de seus valores iniciais. Já as biomassas microbianas dos jardins de fungo das agriculturas basais foram reduzidas para 85,7% dos seus valores registrados nos meses chuvosos.

As taxas respiratórias (R), indicativas das taxas metabólicas globais da microbiota, apresentaram sazonalidade mais marcante (Figura 17). Durante a estação chuvosa, as agriculturas de folhas-de-corte e as superiores apresentaram taxas respiratórias médias de 1,27

mg DQO g⁻¹, sem diferenças estatisticamente significantes entre si, enquanto que as agriculturas basais se posicionaram em outro patamar, inferior, com taxas respiratórias médias iguais a 0,97 mg DQO g⁻¹. As taxas respiratórias, entretanto, tornaram-se idênticas durante a estação seca, próximas a 0,75 mg DQO g⁻¹.

As taxas respiratórias específicas (r) comportaram-se de maneira diferente (Tabela 8). As agriculturas de folhas-de-corte apresentaram taxas respiratórias específicas superiores, sendo as de *A. laevigata* estatisticamente mais altas. Por sua vez, as taxas observadas em *T. fuscus* não apresentaram diferenças significativas das observadas para os demais jardins de fungo de cortadeiras, diferindo da agricultura de *T. tucumanus*, inferior. As agriculturas basais posicionaram-se, mais uma vez, em outra categoria, apresentando as menores taxas respiratórias específicas. Durante a estação seca, todos os jardins de fungo apresentaram queda substancial em suas taxas respiratórias específicas, estabilizando a menos de dois terços de suas taxas obtidas ao longo da estação chuvosa.

Os parâmetros biocinéticos também apresentaram comportamento sazonal acentuado. As taxas de crescimento foram inversas às massas da existência permanente. Durante a estação chuvosa, as agriculturas de folhas-de-corte apresentaram crescimentos microbianos específicos 2x maiores que os registrados para os jardins de fungo de *Trachymyrmex*, e 6,3x maiores que os observados nas agriculturas basais. Na estação seca, as taxas de crescimento específicas da microbiota de jardins de fungo de cortadeiras foram reduzidas para 65,8% dos valores observados na estação chuvosa. Por sua vez, as taxas de crescimento específico das microbiotas dos jardins de *Trachymyrmex* caíram para 52,6% de seus valores originais, enquanto que as observadas para as microbiotas das agriculturas basais caíram para 60% de seus respectivos valores na estação chuvosa (Tabela 8). Situação similar, embora menos acentuada, foi observada para as taxas de crescimento específico máximas.

Os ganhos máximos apresentaram dinâmica proporcional às taxas de crescimento, sendo superiores para as microbiotas de jardins de fungo de cortadeiras, reduzindo em direção às agriculturas basais. Por sua vez, os coeficientes de manutenção celulares foram inversamente proporcionais aos ganhos máximos, da mesma forma que as constantes de afinidade a substrato. Estas foram maiores para as agriculturas basais, reduzindo em direção às cortadeiras. Essas características apresentaram modulação sazonal, com coeficientes de manutenção celulares e constantes de afinidade a substrato aumentando na estação seca e ganhos sendo reduzidos, indicativos de priorização da manutenção da biomassa. Os

acrécimos nas constantes de afinidade a substrato, somados à manutenção das mesmas concentrações de DQO no espaço extracelular, explicam a redução das taxas de crescimento específico. Por sua vez, esta redução, somada ao decréscimo das quantidades de biomassas microbianas ativas, levou a uma menor taxa de assimilação durante a estação seca (Tabela 8).

As taxas de assimilação específicas (q), de forma geral, foram maiores em microbiotas de agriculturas de folhas-de-corte, intermediárias em agriculturas derivadas e menores em basais, tanto na estação seca quanto na chuvosa. Entretanto, a redução da quantidade de biomassa ativa levou à observação de taxas de assimilação bruta (Q) muito similares, embora as microbiotas de agriculturas basais tenham mantido taxas de assimilação estatisticamente menores. Ambas as taxas apresentaram ritmo sazonal, reduzindo seus valores durante a estação seca. (Tabela 8).

Figura 17 - Sazonalidade das taxas respiratórias de jardins de fungo de formigas Attini. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos utilizadas *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Curvas representam médias de 3 replicatas para cada material.

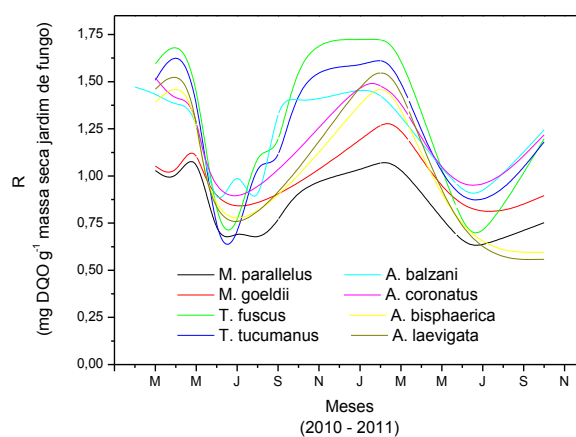


Tabela 8 - Parâmetros biocinéticos de jardins de fungo de formigas Attini

A. Parâmetros biocinéticos durante a estação chuvosa																											
Materiais de jardins de fungo	X mg g ⁻¹			μ h ⁻¹			μ _{max} h ⁻¹			Y _{max} mg mg ⁻¹ DQO			K _S mg DQO g ⁻¹			m mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹			q mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹			Q mg DQO g ⁻¹ h ⁻¹			r mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹		
<i>A. balzani</i>	38,99	±	1,95	0,38	±	0,02	0,63	±	0,01	0,739	±	0,037	612,50	±	3,68	0,075	±	0,009	0,59	±	0,13	22,97	±	0,13	0,036	±	0,009
<i>A. coronatus</i>	35,89	±	4,56	0,35	±	0,04	0,63	±	0,09	0,745	±	0,080	623,12	±	6,71	0,075	±	0,002	0,54	±	0,13	19,55	±	0,14	0,039	±	0,007
<i>A. bispherica</i>	39,63	±	1,98	0,39	±	0,02	0,64	±	0,01	0,738	±	0,037	611,98	±	3,67	0,074	±	0,001	0,60	±	0,13	23,88	±	0,14	0,039	±	0,010
<i>A. laevigata</i>	39,09	±	1,95	0,39	±	0,02	0,61	±	0,03	0,756	±	0,038	643,17	±	3,86	0,076	±	0,001	0,59	±	0,13	23,14	±	0,14	0,042	±	0,011
<i>T. fuscus</i>	46,49	±	2,32	0,20	±	0,01	0,48	±	0,01	0,509	±	0,025	1004,00	±	6,02	0,084	±	0,001	0,48	±	0,10	22,17	±	0,10	0,036	±	0,009
<i>T. tucumanus</i>	51,38	±	6,78	0,18	±	0,06	0,49	±	0,08	0,512	±	0,090	1012,35	±	10,23	0,081	±	0,002	0,43	±	0,17	22,23	±	0,17	0,030	±	0,008
<i>M. parallelus</i>	70,08	±	3,50	0,05	±	0,01	0,42	±	0,03	0,409	±	0,020	1446,50	±	8,68	0,105	±	0,002	0,23	±	0,16	15,93	±	0,17	0,015	±	0,001
<i>M. goeldii</i>	71,03	±	9,44	0,06	±	0,01	0,38	±	0,05	0,445	±	0,090	1379,03	±	21,80	0,107	±	0,005	0,24	±	0,04	17,18	±	0,04	0,018	±	0,001
B. Parâmetros biocinéticos durante a estação seca																											
Materiais de jardins de fungo	X mg g ⁻¹			μ h ⁻¹			μ _{max} h ⁻¹			Y _{max} mg mg ⁻¹ DQO			K _S mg DQO g ⁻¹			m mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹			q mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹			Q mg DQO g ⁻¹ h ⁻¹			r mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹		
<i>A. balzani</i>	35,32	±	1,77	0,25	±	0,01	0,51	±	0,01	0,652	±	0,033	1282,50	±	17,70	0,100	±	0,009	0,48	±	0,08	17,07	±	0,08	0,018	±	0,002
<i>A. coronatus</i>	35,97	±	2,17	0,26	±	0,02	0,53	±	0,03	0,621	±	0,102	1333,29	±	10,98	0,101	±	0,015	0,52	±	0,06	18,64	±	0,06	0,021	±	0,002
<i>A. bispherica</i>	34,03	±	1,70	0,24	±	0,01	0,50	±	0,01	0,663	±	0,033	1280,00	±	27,68	0,099	±	0,012	0,46	±	0,12	15,69	±	0,13	0,015	±	0,001
<i>A. laevigata</i>	35,60	±	1,85	0,24	±	0,02	0,55	±	0,05	0,634	±	0,059	1213,65	±	15,54	0,106	±	0,020	0,49	±	0,10	17,40	±	0,10	0,024	±	0,002
<i>T. fuscus</i>	40,38	±	2,02	0,11	±	0,01	0,35	±	0,01	0,389	±	0,019	1564,00	±	29,38	0,104	±	0,008	0,39	±	0,10	15,62	±	0,10	0,015	±	0,001
<i>T. tucumanus</i>	42,96	±	2,05	0,10	±	0,01	0,36	±	0,05	0,407	±	0,071	1624,24	±	19,74	0,112	±	0,018	0,36	±	0,04	15,38	±	0,04	0,018	±	0,002
<i>M. parallelus</i>	60,28	±	3,01	0,03	±	0,01	0,25	±	0,03	0,217	±	0,011	2346,50	±	14,08	0,118	±	0,014	0,26	±	0,19	15,45	±	0,19	0,009	±	0,001
<i>M. goeldii</i>	61,27	±	3,31	0,04	±	0,01	0,28	±	0,04	0,3076	±	0,083	2216,88	±	14,41	0,121	±	0,016	0,25	±	0,14	15,41	±	0,15	0,009	±	0,001

Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de materiais de jardins de fungos utilizadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Valores representam a média ± desvio padrão de 3 ensaios diferentes para cada material coletado. Grupos foram comparados segundo o teste de Friedman a p≤0,05e diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a p≤0,05 na mesma coluna.

4.5.2 Perfil fisiológico da comunidade microbiana de jardins de fungo

A avaliação do perfil fisiológico de comunidades microbianas por meio de sinais metabólicos foi desenvolvida por Garland e Mills (1991). O procedimento adotado neste trabalho empregou uma adaptação do método da respiração induzida por substrato, inicialmente desenvolvido por Anderson e Domsch (1973), para monitorar o perfil fisiológico por meio de respostas respirométricas.

A respiração induzida por substrato relaciona-se à taxa de utilização de cada monômero fornecido como alimento à determinada microbiota (GARLAND; MILLS, 1991). Os jardins de fungo responderam diferentemente de acordo com o tipo de suplemento (Figura 18). Jardins de fungo de agriculturas de folhas-de-corte, independentemente do subtipo, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, apresentaram respostas respirométricas significativamente maiores com xilose, implicando em maior utilização deste monossacarídeo pela microbiota desses jardins de fungo (Figura 18).

Em contrapartida, as agriculturas derivadas de *T. fuscus* e *T. tucumanus* apresentaram maior resposta respirométrica com glicose (Figura 18). Em particular, os jardins de fungo de *T. fuscus* não mostraram diferenças significantes entre as respostas fisiológicas obtidas para glicose e ácido galacturônico. Já os jardins de fungo de *T. tucumanus* não mostraram diferenças significativas entre as respostas fisiológicas obtidas para xilose e ácido galacturônico.

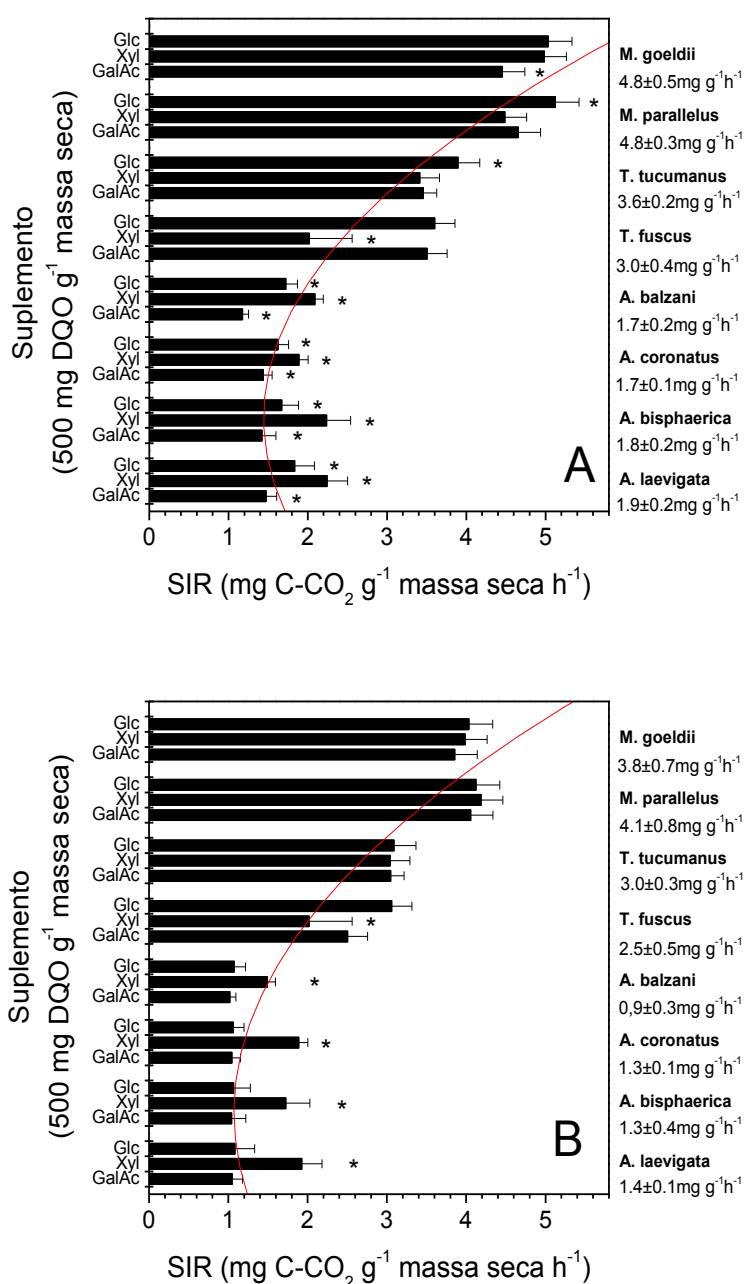
Os jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram resultados similares aos obtidos para os de *T. tucumanus*, apresentando respostas respirométricas mais intensas com glicose (Figura 18). Percentualmente, as respostas respirométricas obtidas com glicose e ácido galacturônico foram relativamente constantes para os diferentes tipos de agriculturas de folhas-de-corte avaliadas, fortalecendo suas similaridades fisiológicas (Figura 18).

O perfil fisiológico não apresentou sazonalidade estatisticamente relevante, apontando estabilidade na estratégia fisiológica dos jardins de fungo (Figuras 18A e 18B).

Os resultados sugerem dois grupos fisiologicamente distintos no período e região geográfica considerados, tendo em vista as taxas respiratórias induzidas por substrato: o primeiro, formado pelas agriculturas de folhas-de-corte, e o segundo, pelas demais

agriculturas estudadas. A distinção fisiológica observada implica em maior utilização de hemiceluloses ou xiloglucanas pelas microbiotas das agriculturas de folhas-de-corte, tendo em vista a maior taxa de utilização de xilose, monossacarídeo constituinte destes tipos de polímeros. Por sua vez, os resultados observados para as agriculturas derivadas e basais avaliadas indicaram maior utilização de celulose, glucomananas, galactoglucomananas e amido, fontes vegetais de glicose. Essas agriculturas também apresentaram capacidade mais elevada de utilização de ácido galacturônico, implicando em maior utilização de pectina na nutrição microbiana.

Figura 18 - Perfil fisiológico da comunidade microbiana de jardins de fungo de formigas Attini. A linha vermelha representa a média de resposta respirométrica, considerando todos os carboidratos testados. Ao lado, o registro do valor médio de resposta respirométrica quando todas as respostas foram consideradas. **A** – Estação chuvosa. **B** – Estação seca. Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de material de jardim de fungo coletadas e avaliadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 replicatas para cada material. Grupos foram comparados segundo o teste de Kruskal-Wallis a $p \leq 0,05$. Letras em sobrescrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a $p \leq 0,05$.



4.6 EFICIÊNCIAS ECOLÓGICAS DAS TAXAS DE ACÚMULO DE AÇÚCARES E BIOMASSA MICROBIANA EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO

Eficiências ecológicas foram definidas neste trabalho como a razão entre a variação líquida, em massa, de um componente, biomassa microbiana ou açúcares, e a demanda energética da microbiota no mesmo intervalo de tempo ($\Delta\text{componente Q}^{-1}$).

4.6.1 Sazonalidade das eficiências ecológicas de acúmulo biomassa microbiana em jardins de fungo

Foram observados acréscimos significativos nas eficiências de crescimento microbiano ($\Delta X \text{ Q}^{-1}$) em jardins de fungo das agriculturas de corte de folhas (Tabela 9). As eficiências de crescimento foram extremamente baixas para as agriculturas basais avaliadas, indicando estratégias ecológicas totalmente distintas nestes sistemas. As eficiências ecológicas apresentaram queda durante a estação seca para todos os jardins de fungo avaliados, repetindo o comportamento sazonal observado para os outros parâmetros fisiológicos da comunidade microbiana. As quedas oscilaram entre 1,6 vezes para as agriculturas de corte de folhas, chegando a atingir valores da ordem de 5 vezes nos sistemas mantidos por *M. goeldii*.

4.6.2 Sazonalidade das eficiências ecológicas de acúmulo de açúcares redutores, glicose e xilose extracelulares em jardins de fungo

As eficiências ecológicas de produção de açúcares redutores ($\Delta \text{ART Q}^{-1}$), glicose ($\Delta \text{Glc Q}^{-1}$) e xilose ($\Delta \text{Xyl Q}^{-1}$) foram igualmente sazonais, mantendo a diferenciação geral de três grandes grupos, agriculturas basais, superiores e agriculturas de corte de folhas, em ordem crescente de índices de eficiência de produção de açúcares (Tabela 9). Entretanto, as eficiências ecológicas de produção de açúcares foram inferiores diante das observadas para a produção de biomassa microbiana nos jardins de fungo de agriculturas basais de *M. goeldii* e

M. parallelus e *Trachymyrmex*. No entanto, as eficiências de produção de açúcares redutores totais em materiais de jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas mostraram-se muito similares às suas eficiências de produção de biomassa microbiana, sendo estatisticamente iguais em sistemas de *A. coronatus*. Durante a estação seca, as relações entre as eficiências ecológicas de produção de biomassa e açúcares redutores totais nos materiais de jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas superaram as eficiências de produção de biomassa microbiana, salvo nas agriculturas de *A. coronatus*, as quais mantiveram ambas as eficiências em um mesmo patamar. Dentre os tipos específicos de açúcares redutores analisados, glicose (Glc) e xilose (Xyl), as suas respectivas eficiências ecológicas de produção sempre se mostraram inferiores que as de biomassa microbiana para todos os materiais de jardins de fungo analisados (Tabela 9). Entretanto, as eficiências ecológicas de produção de Xyl superaram as de produção de Glc em materiais de jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas.

Tabela 9 - Eficiências ecológicas de acúmulo de biomassa microbiana e açúcares em jardins de fungo

A. Estação chuvosa				
Material de jardim de fungo	$\Delta X \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)	$\Delta \text{ART} \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)	$\Delta \text{Glc} \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)	$\Delta \text{Xyl} \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)
<i>M. goeldii</i>	0,051±0,031 ^a	0,009±0,009 ^a	0,005±0,004 ^a	0,006±0,003 ^a
<i>M. parallelus</i>	0,031±0,022 ^a	0,001±0,001 ^b	0,001±0,001 ^b	0,001±0,001 ^b
<i>T. tucumanus</i>	0,320±0,581 ^b	0,190±0,093 ^c	0,027±0,038 ^c	0,021±0,021 ^c
<i>T. fuscus</i>	0,330±0,124 ^b	0,207±0,055 ^c	0,023±0,006 ^c	0,019±0,011 ^c
<i>A. coronatus</i>	0,540±0,321 ^c	0,556±0,153 ^d	0,053±0,009 ^d	0,070±0,020 ^d
<i>A. balzani</i>	0,551±0,171 ^c	0,491±0,200 ^d	0,033±0,009 ^e	0,048±0,013 ^e
<i>A. bisphaerica</i>	0,557±0,175 ^c	0,478±0,193 ^d	0,034±0,010 ^e	0,049±0,015 ^e
<i>A. laevigata</i>	0,562±0,175 ^c	0,501±0,194 ^d	0,040±0,015 ^{d,e}	0,048±0,019 ^e
B. Estação seca				
Material de jardim de fungo	$\Delta X \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)	$\Delta \text{ART} \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)	$\Delta \text{Glc} \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)	$\Delta \text{Xyl} \text{ Q}^{-1}$ (mg mg ⁻¹ DQO)
<i>M. goeldii</i>	0,011±0,175 ^a	0,003±0,003 ^a	0,003±0,003 ^a	0,003±0,009 ^a
<i>M. parallelus</i>	0,017±0,219 ^a	0,001±0,001 ^a	0,001±0,001 ^a	ND
<i>T. tucumanus</i>	0,152±0,051 ^b	0,210±0,010 ^b	0,029±0,004 ^b	0,025±0,007 ^b
<i>T. fuscus</i>	0,180±0,108 ^b	0,244±0,101 ^b	0,024±0,010 ^b	0,022±0,011 ^b
<i>A. coronatus</i>	0,379±0,094 ^c	0,381±0,067 ^c	0,036±0,009 ^c	0,048±0,016 ^{c,d}
<i>A. balzani</i>	0,382±0,101 ^c	0,454±0,100 ^d	0,029±0,018 ^b	0,042±0,014 ^c
<i>A. bisphaerica</i>	0,378±0,145 ^c	0,430±0,238 ^d	0,036±0,016 ^c	0,055±0,023 ^d
<i>A. laevigata</i>	0,360±0,130 ^c	0,432±0,027 ^d	0,036±0,012 ^c	0,042±0,019 ^c

Valores mensurados entre Fevereiro de 2010 e Novembro de 2011. Quantidades de material de jardim de fungo coletadas e avaliadas: *A. balzani* (N = 51); *A. coronatus* (N = 5); *A. bisphaerica* (N = 30); *A. laevigata* (N = 9); *T. fuscus* (N = 48); *T. tucumanus* (N = 27); *M. parallelus* (N = 40); *M. goeldii* (N = 4). ND = não detectado. Valores representam as médias ± desvio padrão de 3 replicatas para cada material coletado. Grupos foram comparados segundo o teste de Friedman a $p \leq 0,05$. Letras em sobrescrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a $p \leq 0,05$ em uma mesma coluna.

4.7 ESTRATIFICAÇÃO FUNCIONAL DE JARDINS DE FUNGO: Estudo de caso – materiais de jardins de fungo de *Atta bisphaerica*

A avaliação dos materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica* empregou material proveniente de ninhos coletados na área GHJ entre Janeiro de 2012 e Maio de 2012, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP. Este tipo de material foi escolhido devido à sua abundância na área de coleta durante o período de estudo e à fácil distinção dos setores morfológicos em seus jardins de fungo.

4.7.1 Descrição dos setores morfológicos de jardins de fungo de *A. bisphaerica*

Os materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentaram aspecto particulado, frágil e quebradiço, com agregados de fungo (tufos) dispersos sobre fragmentos de gramíneas de 5 a 8 mm nas regiões superficiais, às vezes conectados por finos filamentos de hifas. As áreas internas, com material descolorido, apresentaram aparência mais decomposta e material fúngico com distribuição mais difusa, embora com estrutura de suporte preservada (Figura 19). Devido ao tamanho relativamente grande dos fragmentos de gramíneas, estes jardins de fungo foram marcados pela baixa compactação do substrato e grande tamanho dos poros. Os dois setores morfo-fisiológicos de jardins de fungo de *A. bisphaerica* (Figura 19) foram denominados setor periférico e setor interno, contrastando com os três setores anteriormente observados por Möller et al. (2011) em jardins de fungo mantidos em laboratório:

- *Setor periférico*, caracterizado pela presença de substrato fresco, colonização superficial pelo micélio, micélio distribuído em tufos, peças foliares desagregadas, hifas espessas e curtas e maior densidade de estáfilos (média de 6 para cada 20 mm²) (Figura 19A).
- *Setor interno*, com peças foliares despigmentadas e agregadas por hifas, micélio distribuído uniformemente, hifas finas, invasão de substrato por micélio e menor densidade de estáfilos (média de 1 para cada 20 mm²) (Figura 19B).

As características dos materiais de jardins de fungo permaneceram constantes por intervalos de 15 a 20 h na ausência de formigas (Figura 20). A composição geral em massa seca de substrato oscilou entre 23 e 30% do valor de massa seca total do jardim de fungo (N = 6). Os solutos extraíveis em água a frio representaram 64 a 75% da composição em massa seca (N = 6). Os ninhos apresentaram uma única elevação munida de aberturas, com câmaras localizadas abaixo da região central. As câmaras apresentaram formato esférico, com um a três túneis localizados na região mediana ou na base. As dimensões das câmaras oscilaram entre (10,5 x 9,0 x 8,0 cm) e (15,0 x 10,6 x 9,0 cm), comprimento, largura e altura, respectivamente, com seus volumes tomados quase inteiramente por jardins de fungo assentados na base do compartimento. A presença de câmaras próximas à superfície do solo contendo jardins de fungo com fragmentos de folhas recentemente incorporados – caracterizados pela tonalidade verde – sugere adaptações capazes de suportar variações na temperatura e umidade do solo. Os ninhos estavam localizados em áreas abertas, ricas em insolação.

Figura 19 - Setores de materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica*. **A** – Setor periférico e **B** – Setor interno de materiais de jardins de fungo.

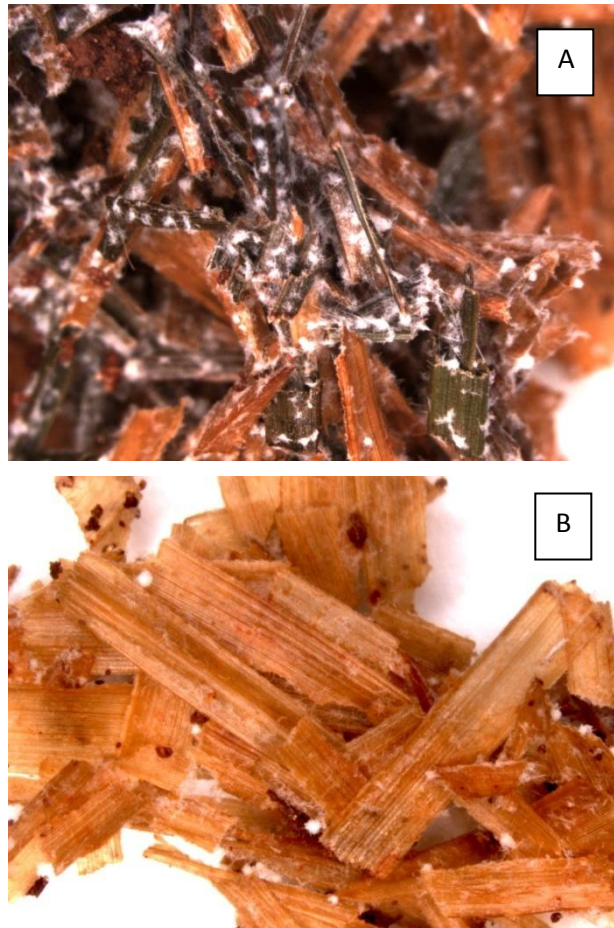
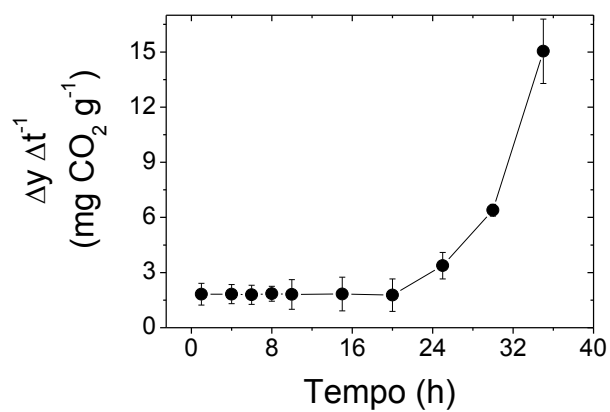


Figura 20 - Taxas de variação de emissão de CO₂ por jardins de fungo na ausência de formigas, larvas e ovos. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de $\Delta y \Delta t^{-1}$ (N = 6).



4.7.2 Estabilidade dos parâmetros físicos e massas secas de jardins de fungo de *A. bisphaerica* entre Fevereiro e Maio de 2012

Todos os materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentaram pH da solução extracelular estatisticamente constante, com valor médio igual a $6,31 \pm 0,26$ ($N = 15$). Os valores de teor de água também foram constantes, oscilando entre 37% a 42% ($N = 15$). As temperaturas permaneceram entre 24-25 °C, com valor médio igual a $24,8 \pm 0,7$ °C ($N = 15$). As massas secas de jardins de fungo nas câmaras superficiais (entre 20 e 80 cm) permaneceram igualmente constantes no período de Fevereiro de 2012 a Maio de 2012, com valor médio igual a $101,23 \pm 15,06$ mg massa seca ($N = 15$).

4.7.3 Taxas metabólicas e biocinéticas da microbiota de jardins de fungo de *A. bisphaerica*

Jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentaram taxas metabólicas globais (r) constantes entre Fevereiro e Maio de 2011, com valores médios iguais a $0,039 \pm 0,010$ mg DQO $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$. Os parâmetros biocinéticos, estimados por meio do método Van der Werf e Verstraete (1987), revelaram um jardim de fungo com pequena quantidade de biomassa microbiana em relação à massa total do jardim de fungo, mas com taxa de crescimento específico apreciável, multiplicando a sua massa por $1,39 \pm 0,02$ a cada hora (Tabela 10), distinta da comumente observada em culturas *in vitro* de *L. gongylophorus*, fungo mutualista em jardins de fungo de *Atta*, o qual cresce muito lentamente em culturas laboratoriais, em geral duplicando sua massa mensalmente (SIQUEIRA et al., 1998).

Os jardins de fungo apresentaram compartimentalização bioenergética e biocinética. As áreas superficiais, ainda com pigmentação esverdeada e tufo de fungos bem definidos, denominadas de setores periféricos, apresentaram menor quantidade de biomassa microbiana total ativa (X), mas taxa de crescimento específico maior (μ). O setor caracterizou-se por alto ganho máximo em massa celular (Y_{max}) e baixo coeficiente de manutenção celular (m), indicando metabolismo voltado ao crescimento microbiano (Tabela 10). Devido à elevada taxa de crescimento, possuiu a maior taxa de assimilação por biomassa (q). Entretanto, a

pequena quantidade de biomassa ativa levou ao menor consumo global de energia no setor (Q) (Tabela 11).

As áreas dos jardins de fungo despigmentadas e com material fúngico mais difuso, denominadas setores internos, apresentaram comportamento biocinético diferenciado, com taxa de crescimento específico (μ) e ganho celular ($Y_{\max}$) menores, mas elevado coeficiente de manutenção celular (m), indicando predomínio de metabolismo de manutenção (Tabela 10). A taxa de assimilação por biomassa (q) foi reduzida graças ao pequeno crescimento, mas a maior quantidade de biomassa levou a uma taxa de assimilação geral superior (Q) (Tabela 11).

As taxas respiratórias apresentaram forte relação com as taxas de crescimento, sendo diretamente proporcionais. Em contrapartida, as constantes de afinidade a substrato foram inversamente proporcionais ao crescimento específico. Infere-se, portanto, a existência de controles relacionados a mecanismos de reconhecimento e transporte de compostos químicos como o meio principal de regulação fisiológica da microbiota.

As características biocinéticas globais foram marcadas por altos ganhos de massa celular ($Y_{\max}$) e coeficientes de manutenção celular intermediários (m), com dinâmica biocinética similar à do setor acumulador, indicando que as áreas assimilatórias, ou setores internos, estão presentes em menor abundância. Assim, o padrão metabólico acumulador predominou, tal como visto na cinética de acúmulo de ART e glicose. Os dados de acúmulo estão sumarizados na Tabela 12.

4.7.4 Taxas de acúmulo de açúcar redutor e glicose em estado sólido

Jardins de fungo sem formigas apresentaram concentrações de açúcar redutor e glicose e taxas de acúmulo global de açúcar redutor ou glicose constantes. A Tabela 12 contém as médias para as quantidades e taxas de acúmulo de açúcar redutor e glicose. As taxas de acúmulo das regiões pigmentadas e com elevada taxa de crescimento foram superiores às observadas para as regiões despigmentadas do interior do sistema, indicando caráter acumulador. Os setores internos, em contrapartida, apresentaram consumo de açúcar redutor e glicose durante o intervalo de 15 horas, evidenciando seu caráter assimilatório previsto pela

respirometria. As taxas de acúmulo específico de açúcar redutor foram superiores às taxas de acúmulo específico de glicose, indicando maior atividade enzimática sobre substratos não glicogênicos.

Tabela 10 - Parâmetros biocinéticos da comunidade microbiana dos setores de jardins de fungo de *A. bisphaerica*

Material avaliado	μ h ⁻¹	$\mu_{\max}$ h ⁻¹	$Y_{\max}$ mg mg ⁻¹ DQO	K_s mg DQO g ⁻¹	m mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹
Total	0,39 ± 0,02 ^a	0,64 ± 0,04 ^a	0,738 ± 0,049 ^a	611,98 ± 7,96 ^a	0,074 ± 0,001 ^a
Setor interno	0,32 ± 0,02 ^b	0,52 ± 0,03 ^b	0,693 ± 0,073 ^b	1081,32 ± 28,11 ^b	0,083 ± 0,008 ^b
Setor periférico	0,42 ± 0,02 ^c	0,65 ± 0,05 ^a	0,741 ± 0,037 ^a	587,13 ± 10,57 ^c	0,070 ± 0,005 ^a

Coletas realizadas entre Janeiro de 2012 e Maio 2012. Valores representam a média ± desvio padrão (N = 15). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ na mesma coluna.

Tabela 11 - Biomassa da comunidade microbiana e taxas assimilatórias

Material de jardim de fungo	X mg g ⁻¹	r mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹	q mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹	Q mg DQO g ⁻¹ h ⁻¹
Total	39,63±2,38 ^a	0,039±0,010 ^a	0,602±0,099 ^a	23,875±0,104 ^a
Setor interno	54,28±3,53 ^b	0,023±0,007 ^b	0,545±0,057 ^b	29,570±0,058 ^b
Setor periférico	32,11±1,93 ^c	0,043±0,008 ^c	0,637±0,160 ^c	20,448±0,164 ^c

Coletas realizadas entre Janeiro de 2012 e Maio 2012. Valores representam a média ± desvio padrão (N = 15). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ na mesma coluna.

Tabela 12 - Dinâmica de acúmulo de ART e Glc em materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica*

Material de jardim de fungo	[ART] (mg g ⁻¹)	μ [ART] (h ⁻¹)	Δ [ART] após 15h (mg g ⁻¹)
Total + operárias	97,32 ± 15,44 ^a	0,006 ± 0,005 ^a	8,7588 ± 7,67 ^a
Total	95,10 ± 17,18 ^a	0,10 ± 0,07 ^b	144,08 ± 18,04 ^b
Setor interno	99,95 ± 14,86 ^b	-0,02 ± 0,09 ^c	-24,59 ± 20,80 ^c
Setor periférico	95,96 ± 12,05 ^a	0,12 ± 0,05 ^b	174,46 ± 8,44 ^d
Material de jardim de fungo	[Glc] (mg g ⁻¹)	μ [Glc] (h ⁻¹)	Δ [Glc] após 15h (mg g ⁻¹)
Total + operárias	26,87 ± 8,45 ^a	0,003 ± 0,002 ^a	1,21 ± 0,78 ^a
Total	25,10 ± 6,12 ^a	0,06 ± 0,02 ^b	22,59 ± 7,34 ^b
Setor interno	28,21 ± 5,07 ^b	-0,01 ± 0,01 ^c	-4,23 ± 3,04 ^c
Setor periférico	26,99 ± 4,05 ^a	0,08 ± 0,03 ^b	32,39 ± 7,29 ^d

Coletas realizadas entre Janeiro de 2012 e Maio 2012. Valores representam a média ± desvio padrão (N = 15). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ na mesma coluna.

4.7.5 Acúmulo de açúcar redutor e glicose com jardins de fungo em suspensão

Devido à maior facilidade de manipulação e acompanhamento da situação extracelular de jardins de fungo na ausência de formigas, o acompanhamento temporal mais detalhado da dinâmica de produção de açúcar redutor e glicose em jardins de fungo foi feito em sistemas suspensos em tampão McIlvaine pH 6,3 (1921), valor médio observado nos jardins de fungo. Jardins de fungo apresentaram maior acúmulo de açúcar redutor ou glicose com microbiota ativa (Figura 21), evidenciando o papel da microbiota na manutenção de elevadas taxas de produção de açúcar extracelular. As curvas de acúmulo de ART e glicose com microbiota ativa mostraram comportamento em pulso, com ápice entre 6 e 10 horas de ensaio. Após este platô, as concentrações de ART (Figura 21A) ou glicose extracelulares (Figura 21B) diminuíram gradativamente, indicando consumo microbiano de material gerado pela atividade enzimática nas primeiras horas de ensaio. As taxas de acúmulo gerais de ART com sistemas em suspensão e microbiota ativa foram maiores que as observadas para sistemas em estado sólido, apresentando $\Delta[\text{ART}]_{15\text{h}}$ iguais a $160,83 \pm 15,67 \text{ mg g}^{-1}$. O mesmo foi observado para as taxas de acúmulo de glicose, as quais apresentaram $\Delta[\text{Glc}]_{15\text{h}}$ iguais a $75,52 \pm 8,12 \text{ mg g}^{-1}$. As áreas denominadas setores periféricos, acumuladoras (Tabela 12), apresentaram comportamento similar, diferindo essencialmente nas curvas de acúmulo de açúcar com microbiota inibida com azida sódica. Neste caso, as taxas de acúmulo de ART foram mais acentuadas, em média 1,15x maiores do que no sistema controle, enquanto que as taxas de acúmulo de glicose foram 1,20x mais acentuadas para o intervalo de 15 horas. As áreas denominadas setores internos, assimilatórias (Tabela 12, Figura 21), mostraram dinâmica distinta. Com microbiota ativa, as concentrações de ART oscilaram suavemente, com decaimento geral de 2,07x em 6 horas de ensaio, o qual foi seguido por recuperação gradativa da concentração inicial de ART durante as 6 horas subsequentes e, posteriormente, nova queda, embora mais suave, apontando mecanismo oscilatório de consumo e acúmulo de ART, com consequente manutenção a longo prazo das concentrações de açúcar redutor.

As concentrações de glicose, por sua vez, mostraram-se estatisticamente constantes, revelando a estabilidade da composição extracelular de glicose e o consumo de outros tipos de açúcares nestes setores (Figura 21B). Inativando o metabolismo aeróbico microbiano com a adição de azida sódica, as regiões internas assimilatórias apresentaram crescimento das concentrações de ART e glicose extracelulares, embora menos acentuados que os observados

nas regiões acumuladoras. Em particular, a alteração da capacidade de acúmulo de glicose com a inibição microbiana foi muito pequena, indicando baixa capacidade de geração de glicose extracelular por este setor.

4.7.6 Variações enzimáticas globais e entre setores de jardins de fungo de *A. bisphaerica*

Atividades enzimáticas globais predominantes incluíram pectinásicas, xilanásicas, quitinásicas, sacarásicas e amilásicas, em ordem decrescente (Figura 22A). Foram observadas atividades celulásicas residuais em jardins de fungo de *A. bisphaerica*. As atividades enzimáticas não foram uniformes entre os setores (Figura 22B).

Setores periféricos acumuladores apresentaram atividade enzimática residual estatisticamente igual sobre celulosas cristalinas com alto índice de polimerização (10.000-15.000; algodão) ou baixo índice de polimerização e riqueza em terminais redutores (200; Avicel) (Figura 22B). Setores internos assimiladores, em contrapartida, não apresentaram atividade sobre celulose cristalina, mas atividade enzimática residual sobre celulosas amorfas, estatisticamente similares às observadas nos setores periféricos acumuladores (Figura 22B). Não houve diferenças significantes entre as atividades celulásicas sobre celulosas amorfas obtidas por métodos químicos ou físicos. Atividade levemente maior foi observada sobre celulose solúvel (CMC), predominantemente na região assimiladora (Figura 22B).

As atividades xilanásicas gerais foram especialmente elevadas (Figura 22A), despontando como a principal atividade enzimática de setores internos assimiladores (Figura 22B). Embora inferiores que as apresentadas pelas regiões internas, as regiões periféricas acumuladoras também apresentaram atividades xilanásicas muito elevadas, inferiores apenas às sacarásicas e pectinásicas. As atividades sacarásicas e amilásicas foram observadas apenas nas regiões periféricas acumuladoras, sendo as sacarásicas mais altas que as amilásicas. As atividades amilásicas, por sinal, foram as menores dentre as atividades enzimáticas representativas em jardins de fungo. Por sua vez, as atividades pectinásicas mostraram-se extremamente altas e uniformemente presentes em todo o jardim de fungo, sendo inferiores apenas às atividades xilanásicas dos setores internos assimiladores.

As atividades quitinásicas estão relacionadas à geração de *N*-acetilglucosamina. Em princípio, quitinases podem ser enzimas autolíticas, tendo em vista que quitina é um componente da parede celular de fungos (BARTNICKI-GARCIA, 1968; WESSELS; SIETSMA, 1981). Atividade quitinásica apresentou valores mais altos nas regiões periféricas acumuladoras, caracterizadas pelas maiores taxas de crescimento microbiano. Nestes setores, as atividades quitinásicas foram estatisticamente iguais, em intensidade, às atividades xilanásicas (Figura 22). As atividades quitinásicas elevadas mostraram-se relacionadas às taxas de crescimento microbiano de cada setor. Os acréscimos de atividades quitinásicas entre setor interno assimilador e setor periférico acumulador foram iguais a 1,34x, enquanto que os acréscimos nas taxas de crescimentos entre os mesmos setores foram iguais a 1,31x.

4.7.7 Variações na estrutura do material fibroso de jardins de fungo de *A. bisphaerica* entre os setores

Mesmo empregando material triturado para avaliação, o exame de FTIR evidenciou o predomínio de estruturas cristalinas de origem celulósica no substrato inicial, somadas a sinais de xilanas e pectinas predominantes na região superficial (Figura 23A).

O substrato inicial apresentou uma larga banda de absorção na região entre 3600-3100 cm^{-1} , com perfil misto, propriedades resultantes de combinações de regiões cristalinas e amorfas, incluindo hemicelulases e pectinases. A presença de pico a 2920,14 cm^{-1} relaciona-se a estas regiões amorfas (CIOLACU et al., 2011) e está presente em xilanas (SILVA et al., 1998). A banda de absorção observada a 2851,46 cm^{-1} indica a presença de ligninas (LISPERGUER et al., 2009). A forte presença da banda de absorção a 1735,44 cm^{-1} relacionada aos ésteres indica presença de grupos carboxila relacionados à existência de pectina.

Bandas de absorção residuais entre 1506-1456 cm^{-1} puderam ser constatadas, as quais estão relacionadas a anéis aromáticos (LISPERGUER et al., 2009). O pico a 1428,29 cm^{-1} , a “banda de cristalinidade”, mostrou-se encoberto (CIOLACU et al., 2011). A banda centrada em 1042,79 cm^{-1} apresentou perfil semelhante ao das arabinoxilanas com baixo grau de substituição (KACURÁKOVÁ et al., 1994). A banda de absorção a 898,62 cm^{-1} , designada

como uma banda amorfa de absorção (CIOLACU et al., 2011), também mostrou-se no espectro, indicando áreas de celulose amorfa.

O substrato presente no setor interno apresentou perfil de absorbância em FTIR mais simples, com redução geral da amplitude dos picos, principalmente os relacionados às regiões entre $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, adquirindo perfil comumente observado em celuloses cristalinas (CIOLACU et al., 2011), e entre $1800\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, indicando perdas estruturais relacionadas à degradação de hemiceluloses e pectinas. As bandas de absorção a $1553,65\text{ cm}^{-1}$, $1321,73\text{ cm}^{-1}$, $1244,99\text{ cm}^{-1}$ e entre $1506\text{--}1456\text{ cm}^{-1}$ tornaram-se mais evidentes, indicando possível preservação de ligninas. Este resultado, no entanto, foi contradito pelos exames de CPMAS-RMN, que mostraram perdas estruturais de grupos fenólicos, típicos de ligninas, embora possam ter origem tânica ou de pigmentos ainda presentes no substrato inicial, fresco (Figura 23B). A banda de absorção a $1428,29\text{ cm}^{-1}$ tornou-se mais visível, revelando a preservação da estrutura de celuloses cristalinas. O leve enriquecimento nos picos referentes a carboidratos em CPMAS-RMN também apontou para a preservação e enriquecimento de carboidrato estrutural e perdas de demais componentes constituintes do substrato, tais como proteínas e demais grupos aminados (Figura 23B).

Estes resultados estão de acordo com os registros enzimáticos avaliados para os jardins de fungo avaliados (Figura 22). A banda de absorção em FTIR a $898,62\text{ cm}^{-1}$ foi reduzida, indicando degradação de componentes amorfos, embora a manutenção da banda de absorção a $2920,14\text{ cm}^{-1}$ indicou que muitos destes componentes ainda permaneceram no substrato. As taxas de cristalinidade sofreram alterações fracas no setor interno.

Os materiais de jardins de fungo caracterizaram-se por um baixo nível de cristalinidade em XRD, com predomínio de estruturas amorfas. O grau de cristalinidade do setor periférico foi igual a 36,47%, e o do setor interno, igual a 42,11%, evidenciando o aumento sutil do grau de cristalinidade entre cada setor e, assim, a inexistência de ataque relevante a estruturas cristalinas, reforçando os resultados obtidos com testes enzimáticos, os quais indicaram pequeno ataque a estruturas cristalinas, visto à baixa atividade celulásica (Figura 22).

Figura 21 - Dinâmica extracelular das concentrações de **A** – açúcar redutor (ART) e **B** – glicose (Glc) em jardins de fungo de *A. bisphaerica* com microbiota ativa ou inativada pela adição de azida sódica. Valores extrapolados para 1 g de massa seca de jardim de fungo como material de partida. Estão representadas as médias $\pm$ desvio padrão para ART e Glc (N = 8).

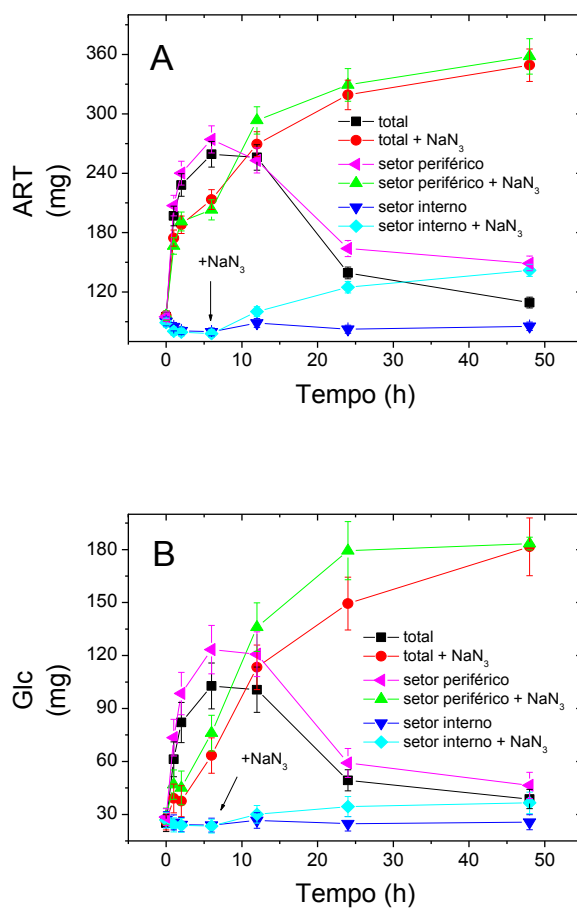


Figura 22 - Atividades enzimáticas extracelulares de jardins de fungo de *A. bisphaerica* relacionadas à degradação de fontes de carbono vegetais majoritárias e componentes do exoesqueleto de insetos e da parede celular fúngica. **A** – Atividades enzimáticas globais dos jardins de fungo; **B** – Atividades enzimáticas observadas em setores de jardins de fungo de *A. bisphaerica*. Estão representadas as médias $\pm$ desvio padrão (N = 8) para as atividades enzimáticas.

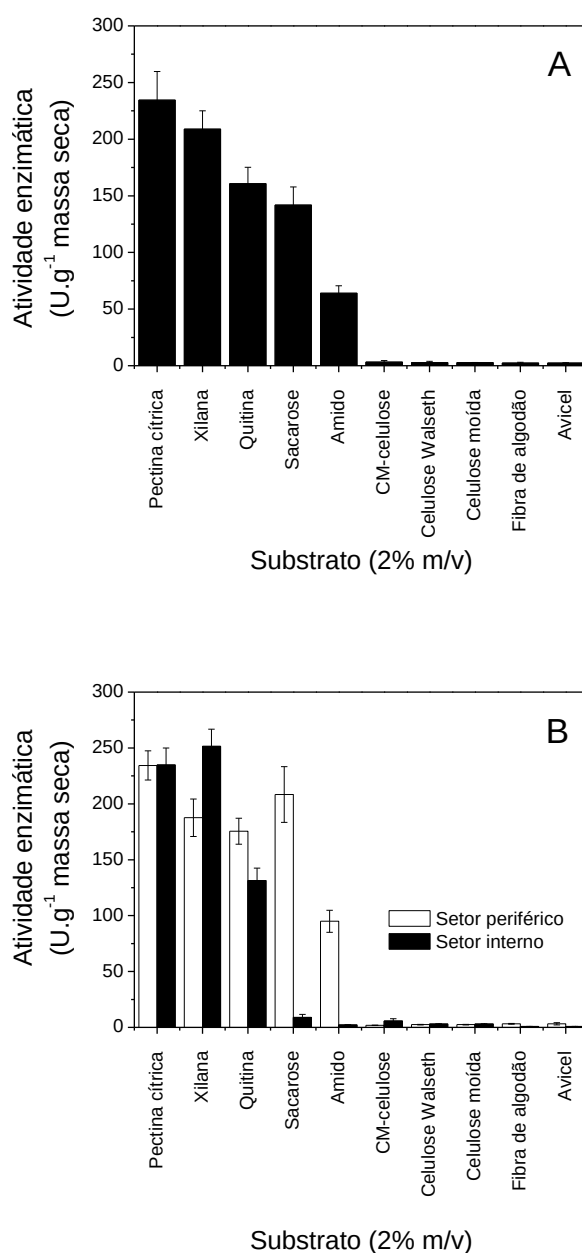
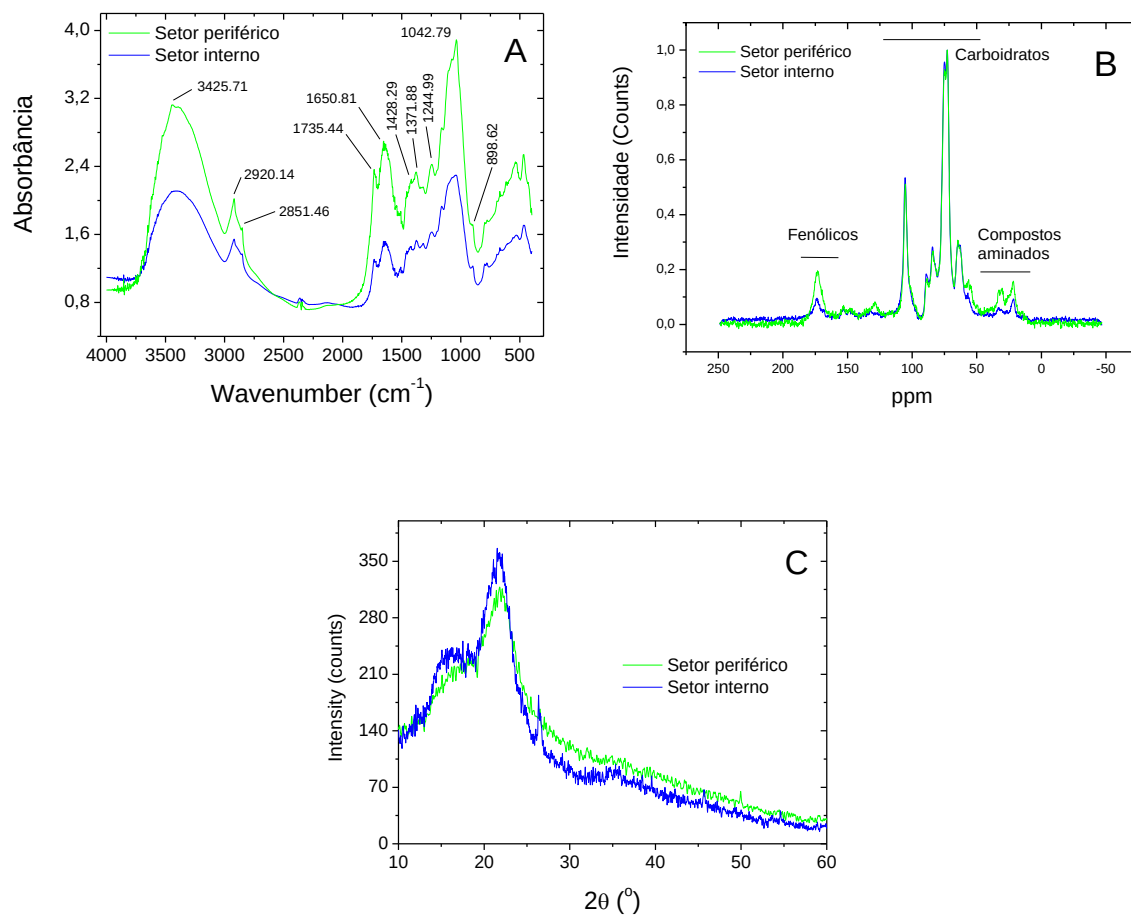


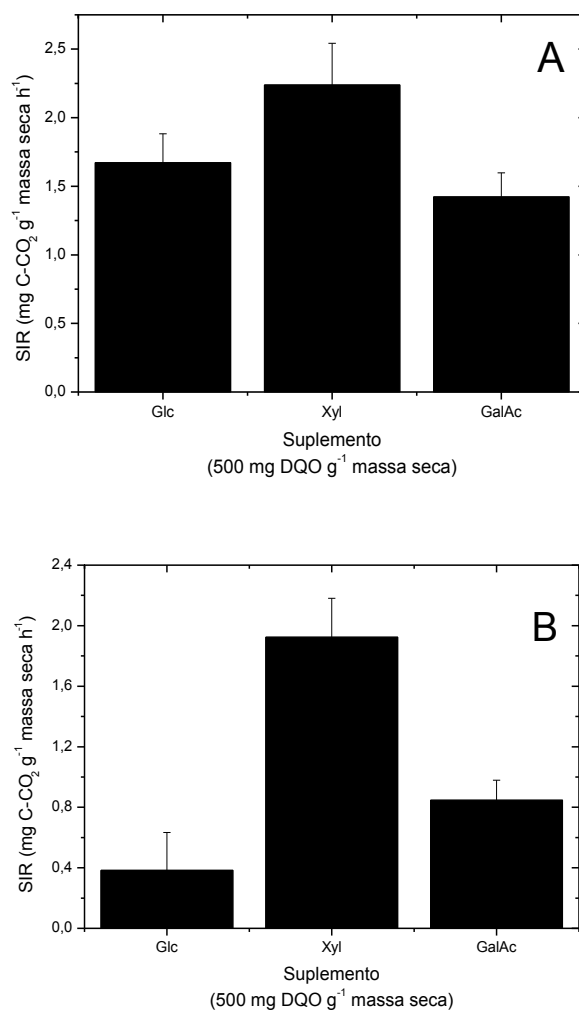
Figura 23 - Estrutura do substrato previamente lavado dos setores externo e interno de jardins de fungo de *A. bisphaerica*. Setor periférico: linha verde. Setor interno: linha azul. **A** – Caracterização por FTIR do material periférico e interno de jardins de fungo. **B**- CPMAS-RMN ^{13}C do setor periférico interno. **C**- Caracterização por XRD do setor periférico e interno. Estão representadas as curvas normalizadas para cada experimento (N = 3).



4.7.8 Perfil fisiológico da comunidade microbiana de cada setor do jardim de fungo

A comunidade microbiana dos setores periféricos apresentou respostas respirométricas induzidas por substrato muito intensas para xilose, mas manteve respostas ainda relevantes para glicose e ácido galacturônico (Figura 24A), contrastando com o setor interno, o qual apresentou resposta intensa frente à indução respirométrica por xilose, com redução das respostas respirométricas induzidas por ácido galacturônico e, especialmente, glicose, indicando maior especialização na utilização de xilose (Figura 24B).

Figura 24 - CLPP – (*Community level physiological profile*). Perfil fisiológico da comunidade microbiana de jardins de fungo dos setores periféricos (**A**) e internos (**B**) de materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica*. Estão representadas as médias $\pm$ desvio padrão (N = 10) para as respostas respirométricas induzidas por substrato.



4.8 MAPEAMENTO SAZONAL DE FLUXOS DE GLICOSE E SECREÇÃO PROTEICA EM ESTADO SÓLIDO, INCLUINDO SISTEMAS ENZIMÁTICOS ENVOLVIDOS E EFEITO PROTEOLÍTICO *IN SITU*

Materiais de jardins de fungo provenientes de ninhos de *Mycetarotes parallelus* (agricultura basal), *Trachymyrmex fuscus* (agricultura derivada), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), foram coletados entre Fevereiro de 2010 e Agosto de 2010, nas áreas ABCDEF e GHII, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP. Os ninhos estavam localizados em duas grandes áreas de campo com mesmo padrão fitogeográfico, dominadas por espécies de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp.

4.8.1 Concentração de C-glicose e taxas de acúmulo de C-glicose extracelular em materiais de jardins de fungo

As taxas de acúmulo de C-glicose extracelular em jardins de fungo em estado sólido foram, em média, 34,2 vezes maiores em jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas quando comparadas com as taxas observadas para jardins de fungo de *M. parallelus*, agricultura basal, mas apenas 1,5 vezes superiores às taxas observadas em jardins de fungo de *T. fuscus*, pertencentes aos sistemas de agricultura derivada (Figuras 25 e 26). Dentre os jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas, os de *A. bisphaerica* apresentaram taxas de acúmulo de C-glicose extracelular levemente superiores, em média 1,02 vezes maiores que as observadas para os jardins de fungo de *A. balzani*. As taxas de acúmulo de C-glicose extracelular não apresentaram comportamento sazonal estatisticamente relevante, diferindo dos resultados anteriormente observados (Tabela 6), embora quedas suaves tenham sido notadas (Figura 26). O mesmo pode ser constatado para as quantidades de C-glicose permanentes nos jardins de fungo, as quais permaneceram constantes entre as estações do ano (Figura 26).

4.8.2 Avaliação das taxas de assimilação microbiana de C-glicose extracelular em materiais de jardins de fungo

Jardins de fungo de *A. balzani* e *T. fuscus* apresentaram as mais altas taxas de assimilação de C-glicose, as quais foram muito similares (Figura 25, A e C), embora as taxas de assimilação de C-glicose em jardins de fungo de *T. fuscus* tenham sido estatisticamente mais elevadas (Figura 25C). Por sua vez, jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentaram taxas de assimilação de C-glicose mais baixas, em média 2,8 vezes menores que as taxas de assimilação apresentadas por jardins de fungo de *A. balzani*, igualmente uma agricultura de corte de folhas. Já os jardins de fungo de *M. parallelus*, agricultura basal, apresentaram taxas de assimilação de C-glicose muito inferiores aos demais, em média 5,5 vezes menores que as apresentadas pelos demais jardins de fungo avaliados.

As taxas de assimilação de C-glicose em jardins de fungo, ao contrário das taxas de acúmulo extracelular, apresentaram comportamento sazonal marcante, com redução acentuada durante a estação seca (Figura 26). Jardins de fungo de *A. balzani*, *A. bisphaerica* e *T. fuscus* apresentaram redução média nas taxas de assimilação de C-glicose estatisticamente idênticas e iguais a 1,4 vezes entre as estações chuvosa e seca (Figura 26 A, B e C, respectivamente). Por sua vez, jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram redução média de 1,5 vezes para o mesmo período (Figura 26D), sendo pouco mais intensa que as quedas observadas nas taxas de assimilação de C-glicose nas demais agriculturas.

4.8.3 Avaliação das taxas de produção de C-glicose extracelular em materiais de jardins de fungo

As taxas de produção de C-glicose extracelular em sistemas em estado sólido, definidas como a somatória das taxas de assimilação e acúmulo extracelular de C-glicose, apresentaram dinâmica similar às taxas de assimilação de C-glicose. Jardins de fungo de *A. balzani* apresentaram as mais altas taxas de produção extracelular de C-glicose em estado sólido (Figura 25A), em média 1,1 vezes maior que as observadas para jardins de fungo de *A. bisphaerica* (Figura 25B). As agriculturas de corte de folhas, por sua vez, apresentaram taxas

de produção extracelular de C-glicose 1,3 vezes maiores que as observadas para os jardins de fungo de *T. fuscus* (Figura 25C) e 14,2 vezes superiores que as avaliadas para jardins de fungo de *M. parallelus* durante a estação chuvosa.

As taxas de produção mostraram sazonalidade, decaindo durante a estação seca (Figura 26). Jardins de fungo de *A. balzani*, *A. bisphaerica* e *T. fuscus* apresentaram decaimentos de produção, similares, em média 1,1 vezes em relação à estação chuvosa, enquanto que jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram decaimento levemente superior, em média 1,3 vezes em relação à estação chuvosa (Figura 26D).

4.8.4 Avaliação das taxas de utilização de C-glicose para crescimento microbiano versus biomassas microbianas permanentes

Jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram as maiores concentrações em massa de micro-organismos, mas as menores taxas de incorporação de C-glicose na biomassa microbiana, em média 5,5 vezes menores que as taxas de incorporação em biomassa apresentadas pelas agriculturas de *A. balzani* e *T. fuscus* e 3,9 vezes inferiores que as observadas para as biomassas microbianas de jardins de fungo de *A. bisphaerica* durante a estação chuvosa. Novamente, jardins de fungo de *A. balzani* e *A. bisphaerica*, ambos pertencentes ao grupo das agriculturas de corte de folhas, diferiram em suas dinâmicas, tendo em vista que jardins de fungo de *A. balzani* incorporaram, em média, 1,4 vezes mais C-glicose na biomassa microbiana que jardins de fungo de *A. bisphaerica* (Figura 25, A e B). Entretanto, ambos foram os que apresentaram as menores biomassas microbianas.

As biomassas e as taxas de incorporação de C-glicose na biomassa microbiana apresentaram dinâmica sazonal (Figura 26). Jardins de fungo de *A. balzani*, *A. bisphaerica* e *T. fuscus* apresentaram redução nas taxas de incorporação de C-glicose muito similares, iguais a 1,4 vezes em relação à estação chuvosa. Por sua vez, jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram quedas maiores, em média iguais a 1,5 vezes em relação à estação chuvosa (Figura 26). As quedas nas quantidades de biomassa, por outro lado, foram similares para todos os jardins de fungo avaliados em termos absolutos, com valores na ordem de 5 mg.g⁻¹. Relativamente às quantidades de biomassas presentes, as quedas observadas em jardins de

fungo de *A. balzani* e *T. fuscus* foram iguais a 1,15 vezes, *A. bisphaerica* 1,20 e *M. parallelus*, 1,11 (Figura 26).

4.8.5 Avaliação das taxas de utilização de C-glicose pelo metabolismo oxidativo da microbiota

As taxas de utilização de C-glicose no metabolismo oxidativo da microbiota de jardins de fungo manteve a mesma dinâmica observada para os demais vetores de fluxos avaliados (Figuras 25 e 26). Jardins de fungo de *A. balzani* e *T. fuscus* empregaram 1,5 vezes mais C-glicose na respiração celular que jardins de fungo de *A. bisphaerica*, e 10,1 vezes mais que os jardins de fungo de *M. parallelus* durante a estação chuvosa no interior do Brasil.

As taxas de metabolização de C-glicose apresentaram sazonalidade marcante, com decréscimos significativos na estação seca. Todos os jardins de fungo avaliados apresentaram decréscimos de utilização de C-glicose na respiração celular similares, iguais a 1,4 vezes em relação ao período chuvoso (Figura 26).

Figura 25 - Fluxos de C-Glc em 1 g massa úmida de material de jardim de fungo durante a estação chuvosa de 2010. **A-** Jardins de fungo de *Acromyrmex balzani*. **B-** Jardins de fungo de *Atta bisphaerica*. **C-** Jardins de fungo de *Trachymyrmex fuscus*. **D-** Jardins de fungo de *Mycetarotes parallelus*. Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (N = 3).

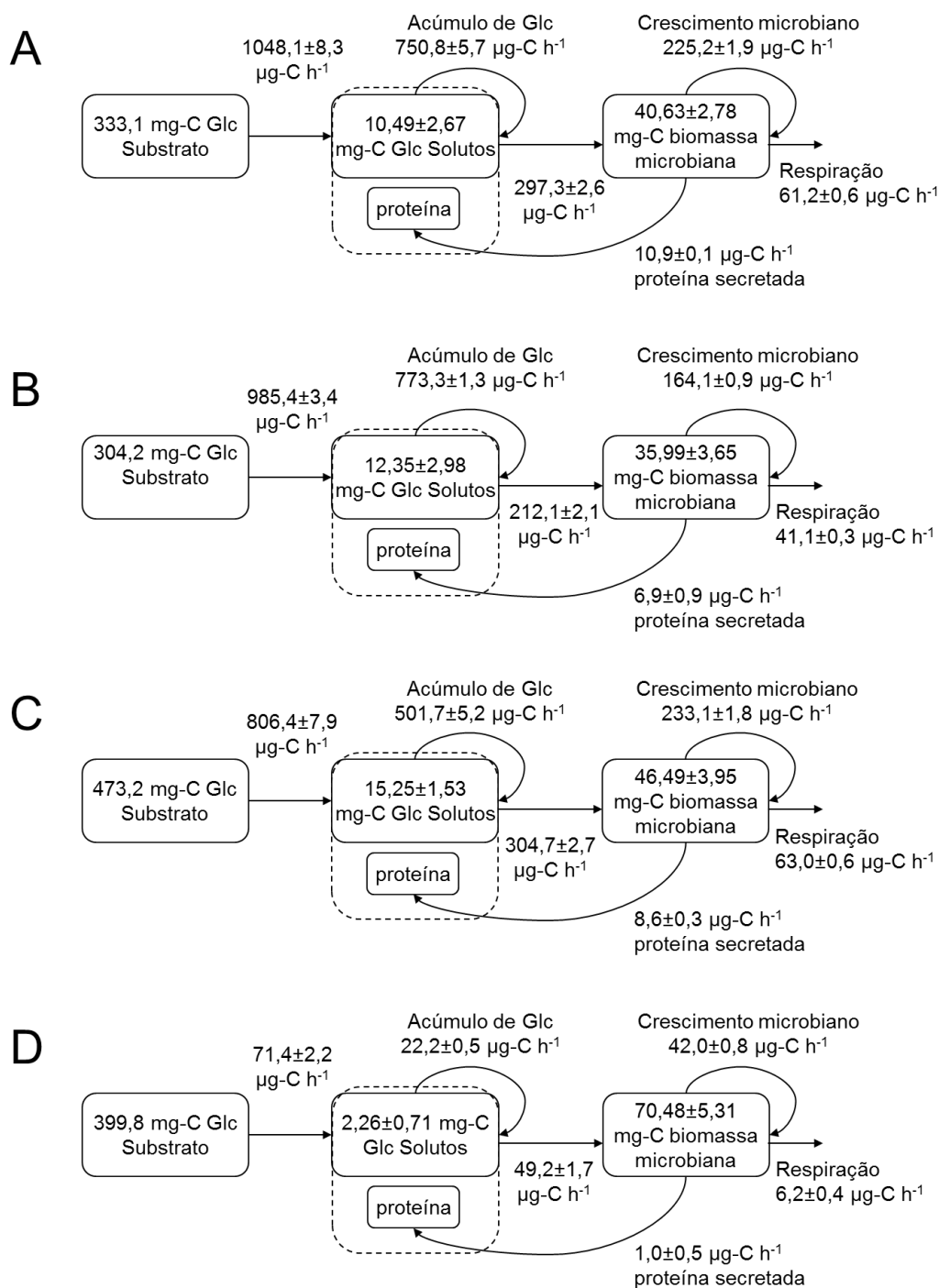
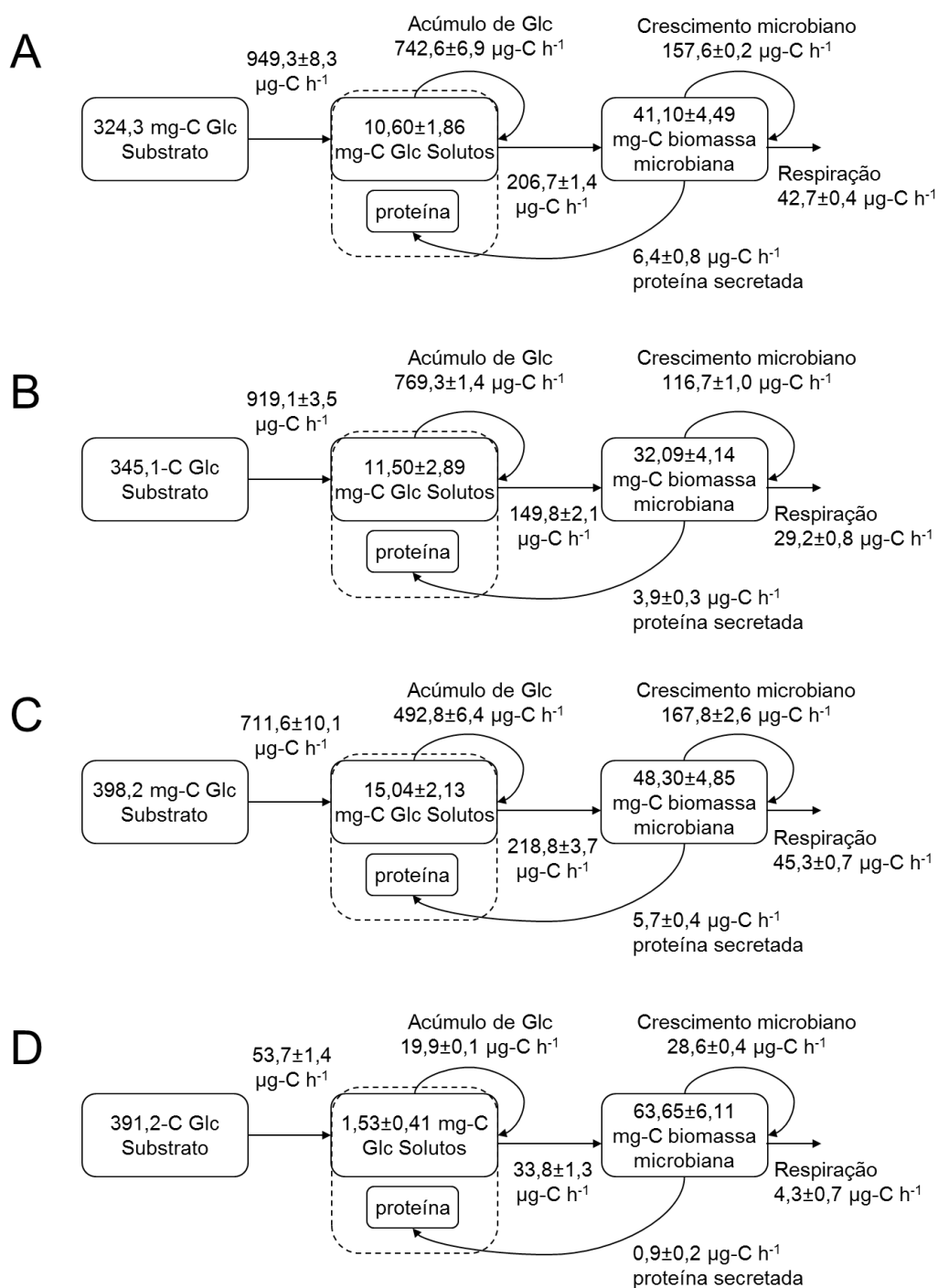


Figura 26 - Fluxos de C-Glc em 1 g massa úmida de material de jardim de fungo durante a estação seca de 2010. **A-** Jardins de fungo de *Acromyrmex balzani*. **B-** Jardins de fungo de *Atta bisphaerica*. **C-** Jardins de fungo de *Trachymyrmex fuscus*. **D-** Jardins de fungo de *Mycetarotes parallelus*. Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (N = 3).



4.8.6 Atividades enzimáticas relacionadas ao fluxo de C-glicose

As atividades enzimáticas globais de *A. balzani* foram superiores às de *A. bisphaerica*, mas inferiores às obtidas para os jardins de fungo de *T. fuscus*. Por sua vez, jardins de fungo de *M. parallelus* posicionaram-se em patamar inferior de atividade enzimática. As atividades enzimáticas de jardins de fungo foram predominantemente amilásicas, sendo os sistemas de *T. fuscus* os mais potentes amilolíticos analisados (Tabela 13).

Já as atividades celulásicas registradas para jardins de fungo de *M. parallelus*, um sistema basal, apresentaram valores similares aos registrados para as suas atividades amilásicas (Tabela 13). Por sua vez, jardins de fungo de corte de folhas apresentaram atividades celulásicas extremamente reduzidas, sendo 3,7x inferiores às de jardins de fungo de *T. fuscus* e 8,3x menores que as de *M. parallelus*, indicando incapacidade de utilização de celulose como substrato para geração de C-glicose durante períodos curtos de incubação.

As atividades enzimáticas apresentaram sazonalidade marcante para as atividades amilolíticas, mas não foram significantes para as atividades celulásicas em todos os jardins de fungo avaliados (Tabela 13). Jardins de fungo de *A. balzani* perderam, aproximadamente, 21% de sua atividade amilolítica, enquanto de sistemas de *A. bisphaerica* perderam 18%, *T. fuscus* 11% e *M. parallelus* 30%.

4.8.7 Efeitos da proteólise sobre a geração de glicose em sistemas em estado sólido versus taxas de reposição de C-proteínas oriundas de C-glicose assimilada pela microbiota

As taxas de acúmulo de C-glicose extracelular em jardins de fungo com microbiota inibida com azida sódica (Tabela 14) foram similares às taxas de produção de C-glicose estimadas por meio da somatória dos vetores de fluxos quantificados por meio do uso de radiomarcadores (Figuras 25 e 26), indicando que azida sódica é um bom inibidor do metabolismo geral da microbiota de jardins de fungo.

O efeito da proteólise sobre a produção de C-glicose foi avaliada em sistemas inibidos com azida sódica. Durante a estação chuvosa, jardins de fungo em estado sólido

apresentaram forte efeito proteolítico sobre a geração de C-glicose extracelular, salvo os de *A. bisphaerica*, os quais se mostraram resistentes (Tabela 14). A produção de C-glicose pelos jardins de fungo de *A. balzani* foi a mais suscetível à proteólise, a qual foi responsável por inativar metade da capacidade enzimática geradora de C-glicose nestes sistemas. Situação menos acentuada foi observada nos jardins de fungo de *M. parallelus* e *T. fuscus*, para os quais a proteólise foi responsável por perdas de 1,75 e 1,62 vezes na capacidade de geração de C-glicose extracelular.

O efeito da proteólise durante a estação seca foi menos acentuado. Novamente, a capacidade geradora de C-glicose pelos jardins de fungo de *A. bisphaerica* mostrou resistência à ação proteolítica, tendo em vista que não foi afetada por nenhum dos inibidores utilizados, os quais cobrem ampla gama de atividades proteolíticas. Mais uma vez, jardins de fungo de *A. balzani* foram os mais afetados, seguidos pelos sistemas de *T. fuscus* e *M. parallelus* (Tabela 14).

O efeito da proteólise sobre a geração de C-glicose mostrou-se qualitativamente relacionado com as taxas de secreção de C-proteínas oriundas de C-glicose assimilada nos jardins de fungo das agriculturas de corte de folhas e superior avaliadas. Jardins de fungo de *A. balzani*, que sofreram o maior impacto da inibição proteolítica sobre a geração de C-glicose, foram, igualmente, os que apresentaram maior taxa de secreção de C-proteínas (Figura 25A), seguidos pelos sistemas de *T. fuscus* e *A. balzani* (Figura 25, C e B, respectivamente), situação que se repetiu, com taxas de secreção menos acentuadas, durante a estação seca (Figura 26). *M. parallelus*, entretanto, não obedeceu esta relação qualitativa, apresentando as menores taxas de secreção de C-proteínas oriundas de C-glicose assimilada pela microbiota (Figuras 25D e 26D).

Tabela 13 - Atividades enzimáticas extracelulares de materiais de jardins de fungo

Materiais de jardins de fungo	Estação chuvosa		Estação seca	
	Amilase (U g ⁻¹)	Celulase (U g ⁻¹)	Amilase (U g ⁻¹)	Celulase (U g ⁻¹)
<i>A. balzani</i>	104,05±6,46 ^a	3,41±0,55 ^a	83,21±8,33 ^a	3,13±1,35 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	64,14±6,34 ^b	2,74±1,33 ^a	53,12±9,12 ^b	3,66±1,22 ^a
<i>T. fuscus</i>	192,33±10,83 ^c	10,84±3,99 ^b	172,11±23,44 ^c	11,32±7,45 ^b
<i>M. parallelus</i>	30,75±3,77 ^d	25,11±2,40 ^c	21,70±5,99 ^d	24,98±5,67 ^c

Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 24). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ em uma mesma coluna.

Tabela 14 - Efeitos da inibição da comunidade microbiana e proteólise extracelular sobre o acúmulo de Glc em solutos de jardins de fungo

Materiais de jardins de fungo	Controle $\Delta \text{Glc } \Delta t^{-1}$ (mg-C g ⁻¹ h ⁻¹)	NaN ₃ $\Delta \text{Glc } \Delta t^{-1}$ (mg-C g ⁻¹ h ⁻¹)	NaN ₃ + In Prot $\Delta \text{Glc } \Delta t^{-1}$ (mg-C g ⁻¹ h ⁻¹)
Estação chuvosa			
<i>A. balzani</i>	0,75±0,03 ^a	1,05±0,10 ^a	2,12±0,32 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	0,77±0,03 ^a	0,98±0,11 ^a	1,05±0,20 ^b
<i>T. fuscus</i>	0,50±0,02 ^b	0,81±0,17 ^b	1,31±0,56 ^c
<i>M. parallelus</i>	0,02±0,01 ^c	0,08±0,03 ^c	0,14±0,08 ^d
Estação seca			
<i>A. balzani</i>	0,74±0,03 ^a	0,94±0,11 ^a	1,45±0,37 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	0,76±0,02 ^a	0,91±0,15 ^a	0,98±0,19 ^b
<i>T. fuscus</i>	0,48±0,05 ^b	0,70±0,13 ^b	1,12±0,54 ^c
<i>M. parallelus</i>	0,02±0,02 ^c	0,06±0,03 ^c	0,10±2,57 ^d

Valores representam médias ± desvio padrão (N = 24). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ em uma mesma coluna.

4.9 TAXAS DE PRODUÇÃO DE GLICOSE E EFEITOS DA PROTEÓLISE E DA MICROBIOTA SOBRE A DINÂMICA DE ACÚMULO DESTE MONOSSACARÍDEO EM SISTEMAS EM SUSPENSÃO

Materiais de jardins de fungo provenientes de ninhos de *Mycetarotes parallelus* (agricultura basal), *Trachymyrmex fuscus* (agricultura derivada), *Acromyrmex balzani* e *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas), foram coletados entre Fevereiro de 2010 e Outubro de 2010, nas áreas ABCDEF e GHIJ, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP. Os ninhos estavam localizados em duas grandes áreas de campo com mesmo padrão fitogeográfico, dominadas por espécies de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp.

4.9.1 Produção de glicose em jardins de fungo com microbiotas ativas

Jardins de fungo de corte de folhas apresentaram forte produção de glicose com microbiota ativa, a qual foi superior à produção de glicose com microbiota inibida para períodos de 6 horas de incubação (Figura 27, A e B). A produção de glicose extracelular apresentou perfil em pulso bastante marcado, o qual se repetiu, em menor intensidade, para o jardim de fungo de *T. fuscus* (Figura 27C). Neste sistema, o pulso com baixa amplitude foi insuficiente para superar a produção de glicose observada quando seus jardins de fungo encontravam-se com o metabolismo aeróbico inibido por azida sódica. Os jardins de fungo de *M. parallelus*, por sua vez, não apresentaram produção de glicose em pulso quando com microbiota ativa (Figura 27D). Neste caso em especial, não foi observado acúmulo de glicose extracelular no sistema.

4.9.2 Efeito da inibição da microbiota com azida sódica sobre a produção de glicose em jardins de fungo

A inibição da microbiota eliminou o perfil em pulso para o acúmulo extracelular de glicose nas agriculturas de corte de folhas e nos jardins de fungo de *T. fuscus* (Figura 27). Como resultado, o perfil de acúmulo de glicose extracelular tornou-se mais pronunciado nos jardins de fungo de *T. fuscus*, tendendo à estabilização após 48 horas de ensaio, quando as concentrações extracelulares de glicose alcançaram valores próximos a 300 mg g⁻¹ (Figura 27C). Em contrapartida, o perfil de acúmulo tornou-se mais suave para os jardins de fungo de *A. balzani* e *A. bisphaerica* (Figura 27 A e B). As curvas de acúmulo de glicose em jardins de fungo de *A. balzani* mostraram forte decaimento, estabilizando as concentrações extracelulares de glicose logo após 24 horas de incubação, quando atingiram concentrações extracelulares de glicose na ordem de 100 mg g⁻¹ (Figura 27A). As curvas de acúmulo de glicose nos jardins de fungo de *A. bisphaerica*, no entanto, apresentaram constância marcante, atingindo a estabilização com concentrações extracelulares produzidas próximas a 300 mg g⁻¹ de massa seca de jardim de fungo, ao final de 120 horas de incubação (Figura 27B). Jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram dinâmica de acúmulo de glicose extracelular muito similar à observada para os jardins de fungo de *A. balzani*, estabilizando rapidamente após 24 horas de incubação, com valores de glicose acumulados na ordem de 100 mg.g⁻¹ (Figura 27D).

4.9.3 Atividade proteolítica em jardins de fungo e o efeito de inibidores proteolíticos sobre a produção de glicose

O impacto da proteólise sobre o canal enzimático gerador de glicose extracelular foi avaliado em suspensões de jardins de fungo com microbiotas inibidas com azida sódica. As agriculturas de *A. balzani*, *T. fuscus* e *M. parallelus* apresentaram fortes incrementos nas taxas de acúmulo de glicose no espaço extracelular quando submetidas à inibição proteolítica geral. Desempenho similar pode ser observado para PMSF, inibidor de serinoproteases (Figura 28), o qual foi responsável por inibir 98,0% do impacto negativo da proteólise sobre a geração de glicose em jardins de fungo de *A. balzani*, 95% em *T. fuscus* e 96% em *M. parallelus*,

indicando a prevalência da atividade serinoproteásica sobre a inativação do canal enzimático extracelular gerador de glicose. A proteólise teve impacto muito reduzido sobre o desempenho do canal enzimático de *A. bisphaerica* (Figura 27B e 28B), tendo em vista a inexistência de alterações relevantes entre os perfis de acúmulo de glicose com microbiota inibida e com microbiota e proteólise inibidas. Além disso, o impacto de PMSF sobre a atividade proteolítica redutora do canal enzimático nestes jardins de fungo foi estatisticamente idêntico ao obtido com o conjunto completo de inibidores (Figura 28B), indicando que toda a atividade proteolítica que interfere na geração de glicose extracelular em jardins de fungo de *A. bisphaerica* é serinoproteásica

A resistência proteolítica do sistema de produção de glicose de *A. bisphaerica* foi colocada à prova por meio do transplante do conjunto de enzimas de *A. balzani* para as suspensões de jardins de fungo da agricultura de *Atta*. Mesmo sob a forte atividade proteolítica de jardins de fungo de *A. balzani*, o sistema enzimático de *A. bisphaerica* foi capaz de manter sua atividade geradora de glicose (Figura 29). Igualmente, o transplante das enzimas dos jardins de fungo de *A. bisphaerica* para as suspensões de jardins de fungo de *A. balzani* reativaram a produção extracelular de glicose em sistemas já estabilizados (Figura 29). Por sua vez, a combinação de conjuntos enzimáticos de *A. bisphaerica* e *A. balzani* em quantidades equivalentes em massa de proteínas geraram perfis de acúmulo equivalentes à metade dos observados para sistemas de *A. bisphaerica* empregados como controles, indicando a prevalência do sistema enzimático de jardins de fungo de *A. bisphaerica* na geração de produtos de hidrólise de componentes do substrato utilizado em jardins de fungos, mesmo sob o forte ataque proteolítico presente nos solutos de materiais de jardins de fungo de *A. balzani* (Figura 29).

Figura 27 - Produção de glucose em materiais de jardins de fungo em suspensão. São apresentados os dados brutos referentes aos controles com microbiota ativa e os resultados obtidos com microbiota inibida, tanto na presença quanto na ausência de cocktail de inibidores proteolíticos, além das curvas modeladas. **A-** Jardins de fungo de *Acromyrmex balzani*. **B-** Jardins de fungo de *Atta bisphaerica*. **C-** Jardins de fungo de *Trachymyrmex fuscus*. **D-** Jardins de fungo de *Mycetarotes parallelus*. Materiais de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Maio de 2012. Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão extrapoladas para 1 g de massa seca de jardim de fungo como material de partida. (N = 4 para todos os sistemas).

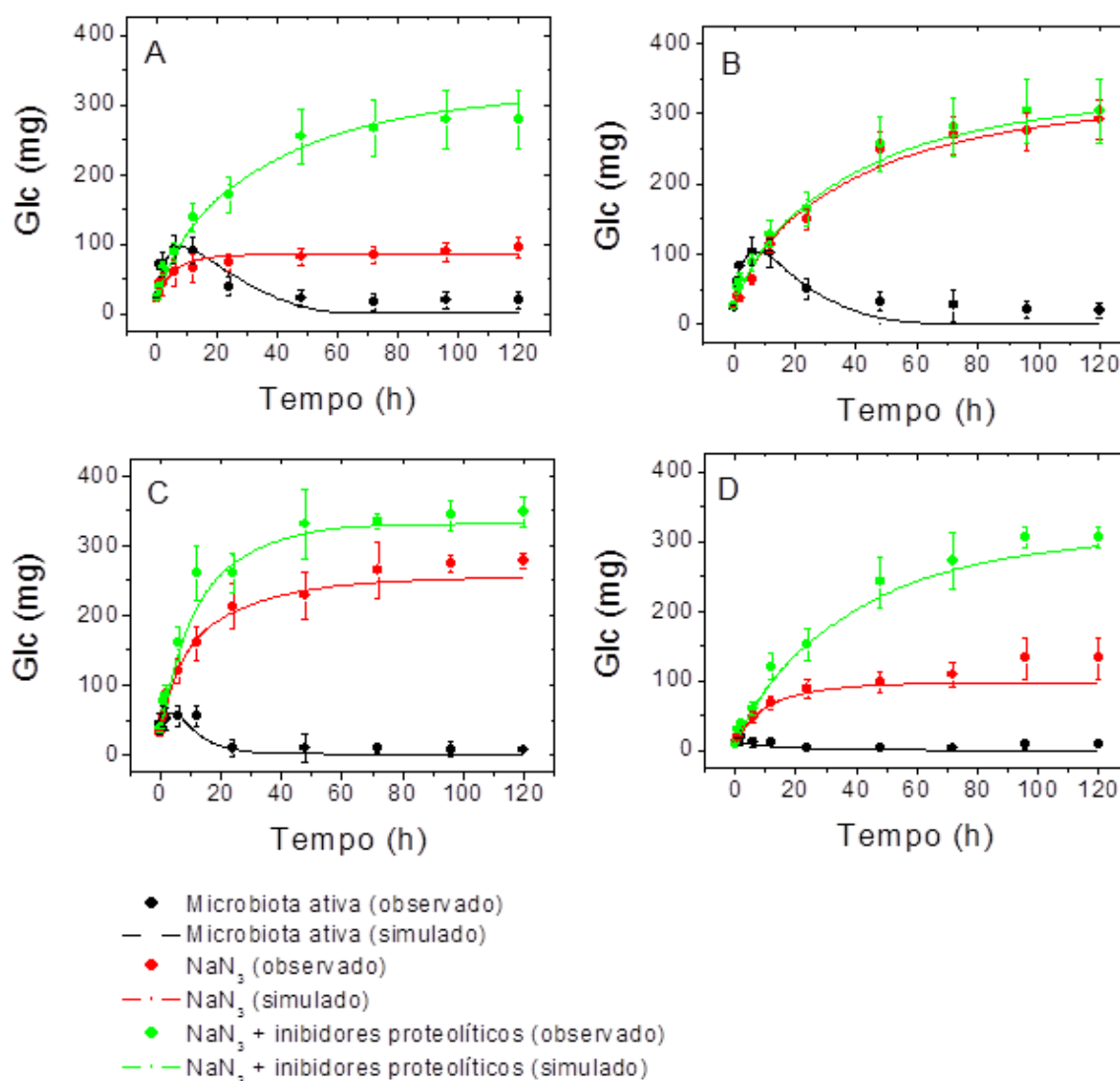


Figura 28 - Comparação dos efeitos do cocktail de inibidores proteolíticos e PMSF sobre a geração de glicose extracelular em material de jardins de fungo em suspensão, com microbiota inibida. **A-** Jardins de fungo de *Acromyrmex balzani*. **B-** Jardins de fungo de *Atta bisphaerica*. **C-** Jardins de fungo de *Trachymyrmex fuscus*. **D-** Jardins de fungo de *Mycetarotes parallelus*. Materiais de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Maio de 2012. Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão extrapoladas para 1 g de massa seca de jardim de fungo como material de partida (N = 4 para todos os sistemas).

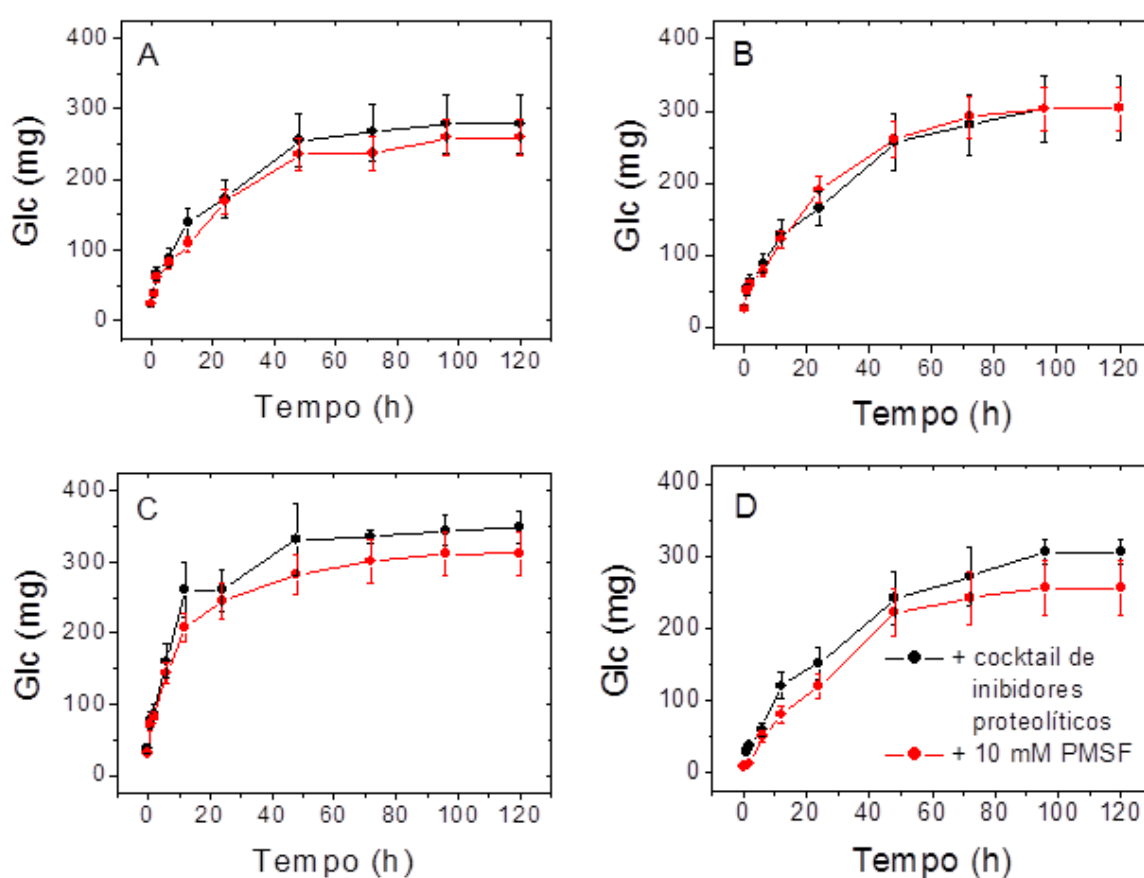
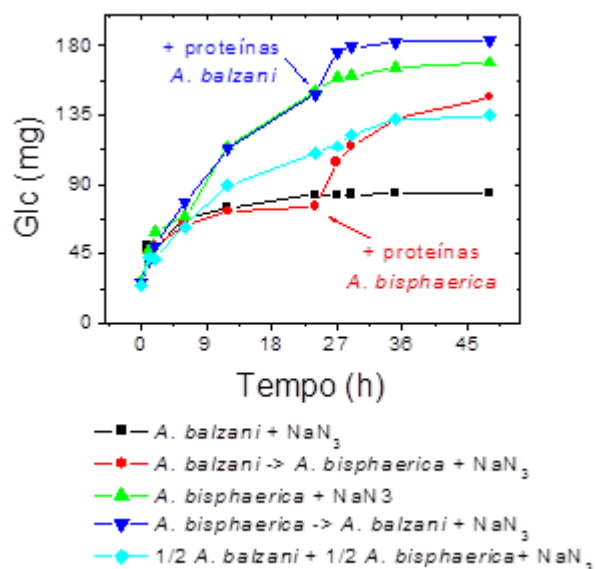


Figura 29 - Transplante enzimático. Adição do conjunto de enzimas extracelulares de material de jardins de fungo de agricultura de folha de corte de *A. balzani* em suspensões de material de jardins de fungo de *A. bisphaerica* e adição de enzimas extracelulares de jardins de fungos de *A. bisphaerica* em jardins de fungo de *A. balzani* em suspensão. As quantidades de proteína transferidas foram equivalentes em ambos os ensaios. Materiais de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Maio de 2012. Valores representam as médias extrapoladas para 1 g de massa seca de jardim de fungo como material de partida (N = 4 para todos os ensaios).



4.9.4 Parâmetros cinéticos gerais da produção de glicose e do impacto da proteólise e da microbiota sobre o acúmulo extracelular de glicose

A caracterização da dinâmica da geração de glicose extracelular e dos impactos da microbiota e da proteólise sobre esta dinâmica foi feita por meio de simulação, empregando como base as curvas experimentais de acúmulo extracelular de glicose e as massas iniciais de micro-organismos e glicose extracelular. Jardins de fungo de corte de folhas apresentaram menores quantidades de biomassa microbiana, 1,2 vezes mais baixas que as observadas nos sistemas de *T. fuscus* e 1,9 vezes menores que as existentes nos jardins de fungo de *M. parallelus* (Tabela 15). As quantidades de glicose presentes nos jardins de fungo apresentaram distribuição diferente da observada para as biomassas microbianas entre as agriculturas avaliadas. Jardins de fungo de *T. fuscus* apresentaram as maiores quantidades de glicose extracelular, em média 1,3 vezes maiores que as observadas nos jardins de fungo de corte de folhas 3 vezes superiores que as observadas para os jardins de fungo de *M. parallelus* (Tabela 15).

Os estudos de simulação indicaram a forte atividade proteolítica presente nos sistemas de *A. balzani*, com valores de j_1 e j_2 aparentes para o canal enzimático extremamente superiores aos observados para as demais agriculturas (Tabela 16). As agriculturas de *T. fuscus* e *M. parallelus* apresentaram valores de j_1 e j_2 próximos, enquanto que os jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentaram valores extremamente baixos, condizente com a fraca atividade proteolítica operando neste sistema de geração de glicose (Tabela 16). Em todos os casos, o valor j_2 , a constante de inativação do complexo enzima-substrato, foi o maior, indicando forte atividade proteolítica sobre enzimas associadas aos seus substratos, neste caso, aos polissacarídeos vegetais presentes nos jardins de fungo, uma vez que estes estudos trataram de sistemas enzimáticos amilolíticos e celulolíticos (Tabela 13).

Os valores de K_a apresentaram forte distinção estatística pelo teste Tukey a 0,05 % de significância entre os tipos de jardins de fungo avaliados. Jardins de fungo de corte de folhas apresentaram valores de K_a em média 3,3 vezes superiores aos registrados para os de *T. fuscus* e *M. parallelus*. Jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram valores de K_a intermediários, enquanto que os de *T. fuscus* apresentaram os menores, em média 1,2 vezes inferiores que os de *M. parallelus*. K_a é uma representação matemática da constante de associação do complexo

enzimático com seu substrato, podendo ser interpretado, de forma simplificada, como uma constante de afinidade deste complexo com o substrato glicogênico.

Os valores de K_I para o canal enzimático, os quais são constantes matemáticas que refletem a concentração inibitória de produto – neste caso glicose – sobre o complexo enzimático capaz de hidrolisar substratos glicogênicos a glicose, foram similares entre os jardins de fungo avaliados. Neste caso, jardins de fungo de corte de folhas apresentaram valores de K_I maiores, sendo o de *A. bisphaerica* 5 unidades maior que o de *A. balzani* (Tabela 16). Os valores de K_I para os jardins de fungo de *T. fuscus* e *M. parallelus* foram estatisticamente iguais por meio do teste Tukey a 0,05 % de significância. Estes últimos sistemas apresentaram valores de K_I , em média, 1,2 vezes inferiores ao observado para *A. bisphaerica*.

As velocidades enzimáticas dos jardins de fungo avaliados mostraram o forte potencial do sistema mantido por *T. fuscus* na geração de glicose (Tabela 16). Os valores de $k_3[E]$, ou V_{max} , obtidos para este sistema, alcançaram resultados iguais a $34,88 \pm 0,88$ mg Glc h^{-1} , contrastando com os valores de *A. balzani*, $28,62 \pm 0,79$ mg Glc h^{-1} , *A. bisphaerica*, $25,70 \pm 0,64$ mg Glc h^{-1} , e *M. parallelus*, $12,43 \pm 0,39$ mg Glc h^{-1} . O potencial do canal enzimático, entretanto, foi mais influenciado pelas quantidades de enzima que pelas características catalíticas aparentes, isto é, valores de k_3 , do conjunto das mesmas (Tabela 16).

Os *Fator*, incógnita multiplicatória de $d[E] dt^{-1}$ que representa o número de vezes que a quantidade de carbono oriunda da glicose deve ser multiplicada para suportar toda a secreção enzimática necessária para sustentar a atividade extracelular produtora de glicose, apresentou valores iguais a 1 para os jardins de fungo de *A. bisphaerica*, indicando que a glicose assimilada foi suficiente para a manutenção do sistema enzimático extracelular. *A. balzani* apresentou *Fator* igual a 3, mostrando que a glicose foi capaz de repor apenas um terço do conjunto enzimático necessário. Jardins de *T. fuscus* e *M. parallelus* apresentaram *Fator* igual a 0,2, mostrando que a glicose assimilada foi excessiva para a reposição enzimática (Tabela 16).

Além da proteólise, a microbiota mostrou papel importante na manutenção das taxas de acúmulo de glicose extracelular. Embora todas tenham demonstrado utilização idêntica de glicose para a manutenção celular (m), sem diferenças significantes na eficiência de utilização de glicose para o crescimento (Y_{max}), os jardins de fungo das agriculturas de corte de folhas

mostraram os menores crescimentos específicos derivados do uso de glicose (μ), os quais estão intimamente ligados à relação entre reduzidas quantidades de glicose extracelular (Tabela 15) e elevados valores de K_G (Tabela 16). Isto se traduziu nas menores taxas de assimilação de glicose, seja específica (q), seja bruta (Q) (Tabela 17). Ao contrário, os jardins de fungo de *T. fuscus* e *M. parallelus* mostraram forte capacidade de drenagem de glicose extracelular para crescimento microbiano, sendo os de *M. parallelus* os mais voltados para a utilização deste carboidrato (Tabela 17).

Tabela 15 – Biomassa microbiana e concentração de glicose em materiais de jardins de fungo

Materiais de jardim de fungo	[X] (mg g ⁻¹)	[Glc] (mg g ⁻¹)
<i>A. balzani</i>	40,12±2,01 ^a	22,32±1,12 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	35,99±1,80 ^b	26,10±1,31 ^b
<i>T. fuscus</i>	46,49±2,32 ^c	31,05±1,55 ^c
<i>M. parallelus</i>	70,79±3,54 ^d	10,01±0,50 ^d

Materiais de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Maio de 2012. Valores representam as médias ± desvio padrão (N = 4 para todos os sistemas). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ em uma mesma coluna.

Tabela 16 - Parâmetros cinéticos e biocinéticos da produção e utilização de glicose pela comunidade microbiana de materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica*

Materiais de jardins de fungo	j1	j2	k3	K _I (mg Glc g ⁻¹)	K _a (mg Glc g ⁻¹)	K _G (mg Glc g ⁻¹)	μ _{max} (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Y _{max} (mg mg ⁻¹ Glc)	m (mg Glc mg ⁻¹ h ⁻¹)	[E] (mg g ⁻¹)	Fator
<i>A. balzani</i>	0,25±0,01 ^a	0,29±0,02 ^a	2,12±0,11 ^a	40,46±2,02 ^a	184,03±9,20 ^a	1001,00±51,12 ^a	1,00±0,05 ^a	0,022±0,001 ^a	0,73±0,04 ^a	0,001±0,001 ^a	13,50±0,68 ^{a,b}	3,0 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	0,01±0,01 ^b	0,01±0,01 ^b	2,52±0,13 ^b	45,43±2,27 ^b	190,03±9,50 ^a	933,99±46,67 ^b	1,01±0,05 ^a	0,027±0,001 ^b	0,70±0,04 ^a	0,001±0,001 ^a	10,20±0,51 ^b	1,0 ^b
<i>T. fuscus</i>	0,08±0,01 ^c	0,13±0,01 ^c	2,30±0,12 ^c	38,50±1,93 ^c	51,06±2,55 ^b	204,03±10,20 ^c	0,60±0,03 ^b	0,079±0,004 ^c	0,67±0,03 ^b	0,001±0,001 ^a	15,10±0,76 ^a	0,2 ^c
<i>M. parallelus</i>	0,09±0,02 ^c	0,12±0,01 ^c	2,26±0,11 ^c	37,17±1,86 ^c	62,14±3,11 ^c	56,12±2,81 ^d	0,51±0,03 ^c	0,076±0,004 ^c	0,70±0,04 ^a	0,001±0,001 ^a	5,50±0,28 ^c	0,2 ^c

Materiais de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Maio de 2012. Valores representam a média ± desvio padrão (N = 4). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a p≤0,05 em uma mesma coluna.

Tabela 17 - Taxas de assimilação de glicose pela biomassa microbiana em materiais de jardins de fungo

Materiais de jardins de fungo	q (mg Glc mg ⁻¹ h ⁻¹)	Q (mg Glc g ⁻¹ h ⁻¹)
<i>A. balzani</i>	0,03±0,01 ^a	1,24±0,03 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	0,04±0,01 ^a	1,42±0,02 ^b
<i>T. fuscus</i>	0,11±0,02 ^b	5,53±0,03 ^c
<i>M. parallelus</i>	0,11±0,03 ^b	7,76±0,05 ^d

Materiais de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Maio de 2012. Valores representam a média ± desvio padrão (N = 4). Letras em sobrescrito representam os resultados do teste Tukey a $p \leq 0,05$ em uma mesma coluna.

4.10 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INTERFERÊNCIAS EXTERNAS: Efeito de inibidores de endoxilanas da família 11 sobre a fisiologia microbiana

Materiais de jardins de fungo provenientes de ninhos de *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas) foram coletados entre Janeiro de 2013 e Abril de 2013, na área GHII, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP. Os ninhos estavam localizados em duas grandes áreas de campo com mesmo padrão fitogeográfico, dominadas por espécies de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp.

4.10.1 Efeitos dos inibidores sobre a atividade xilanásica de jardins de fungo de *A. bisphaerica* e impacto da proteólise intrínseca de jardins de fungo sobre o efeito inibitório

Endoxilanas de *L. gongylophorus* pertencem à família 11 de endoxilanas (SCHIÖTT et al., 2008), e a atividade xilanásica mostrou-se a principal produtora de açúcares extracelulares assimiláveis pela comunidade microbiana de jardins de fungo. Portanto, é a principal candidata a estudos de inibição para triagem de produtos naturais capazes de afetar o funcionamento dos jardins de fungo. *Tritium aestivum* e outras monocotiledôneas possuem inibidores proteicos de endoxilanas das famílias 10 e 11 – XIP-type (~30 kDa, inibidor da família 10 de endoxilanas), TAXI-type (~40, ~30 e ~10 kDa, inibidor da família 11 de endoxilanas) e TLXI-type (~18 kDa) são as principais categorias conhecidas (BEAUGRAND et al., 2006; GOESAERT et al., 2004; JUGE; DELCOUR, 2006; JUGE; SVENSSON, 2006). Todos são caracterizados por um pI superior a 8,5.

As frações brutas de inibidores, preparadas por eletroeluição, apresentaram algum efeito somente quando proteases presentes em jardins de fungo de *A. bisphaerica* foram inibidas – serino-proteases e, principalmente, metaloproteases (Figura 30). (N=10). Mesmo sob inibição, mais da metade das atividades xilanásicas em extratos brutos extracelulares de jardins de fungo de *A. bisphaerica* permaneceu ativa.

4.10.2 Confirmação do controle proteolítico intrínseco de jardins de fungo sobre os inibidores de xilanase parcialmente purificados de *T. aestivum*

Os extratos contendo inibidores de atividade xilanásica de jardins de fungo foram incubados por 30 min a 30 °C com extratos brutos do próprio jardim, os quais possuem atividade proteásica. Os inibidores foram novamente separados por ultrafiltração em membranas Millipore de 40 kDa e concentrados por ultrafiltração em membranas *Amikon Ultra* de 3 kDa. O material obtido foi utilizado nos ensaios de inibição da atividade xilanásica de jardins de fungo.

Após pré-incubação com extratos de jardins de fungo sem EDTA, os inibidores perderam sua eficácia (Figura 31) (N=5). No entanto, a pré-incubação em presença de extratos de jardins de fungo com EDTA manteve a eficácia dos inibidores durante os ensaios de inibição, indicando o papel de metaloproteases sobre os inibidores. Inibidores pré-incubados exclusivamente com EDTA não demonstraram alteração de atividade frente aos inibidores incubados em presença de extratos de jardins de fungo, indicando ausência de metaloproteases nos extratos de inibidores obtidos.

4.10.3 Efeito da proteólise sobre as atividades xilanásicas

A atividade proteolítica também reduziu as atividades xilanásicas de jardins de fungo de *A. bisphaerica* (Figura 32A) (N=10). O efeito de EDTA como inibidor de proteases que degradam xilanases ficou claro devido à sua ação dependente do tempo sobre a atividade xilanásica (Figura 32B) (N=3). PMSF não apresentou efeitos significantes durante os ensaios.

4.10.4 Efeitos fisiológicos de inibidores de xilanases sobre jardins de fungo de *A.bisphaerica*

Solução de inibidores proteicos foi gotejada uniformemente sobre jardins de fungo e a respiração foi monitorada utilizando o método de Bartha e Pramer (1965). Controles receberam água em lugar dos inibidores. As taxas metabólicas dos jardins de fungo apresentaram redução na presença da fração inibitória de xilanases de *T. aestivum* quando em concentrações iguais a $450 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca de jardim de fungo (N=7). O efeito inibitório não foi permanente, sendo cancelado com 8 horas de incubação (Figura 33), indicando que jardins de fungo são capazes de se adaptar à presença de inibidores.

Figura 30 - Efeitos dos inibidores sobre a atividade xilanásica de jardins de fungo de *A.bisphaerica* e impacto da proteólise intrínseca de jardins de fungo sobre o efeito inibitório. Material de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Abril de 2013 (N =3).

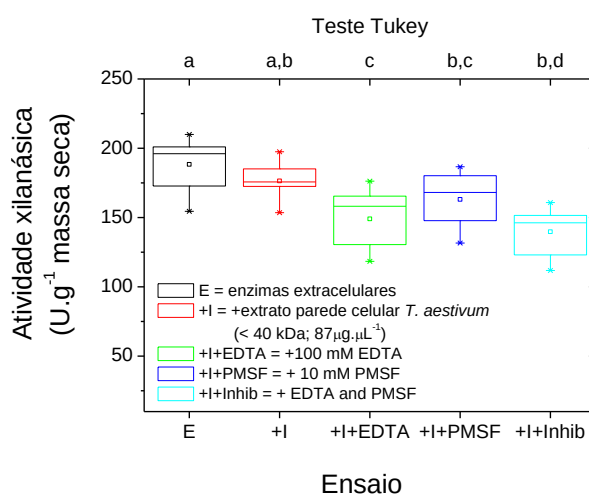


Figura 31 - Controle proteolítico intrínseco de jardins de fungo sobre os inibidores de xilanase parcialmente purificados de *T. aestivum*. Material de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Abril de 2013 (N =3).

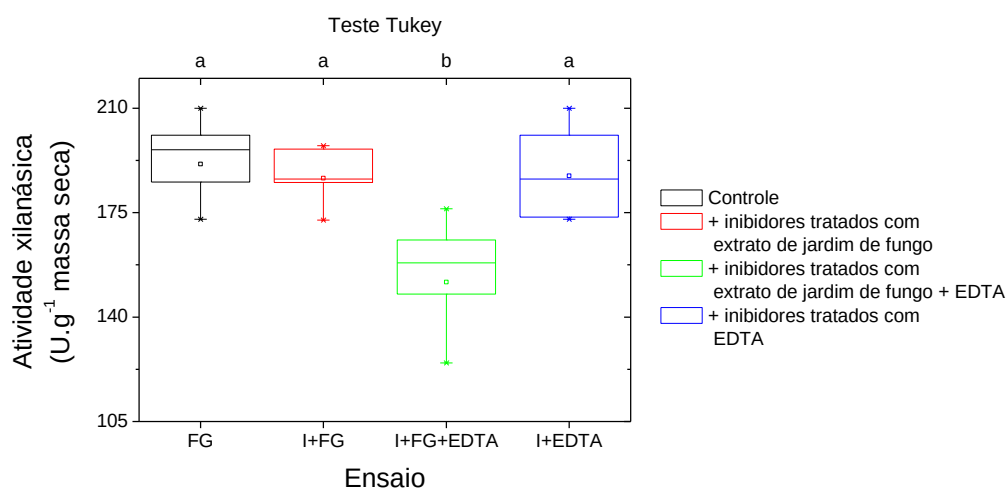


Figura 32 - Efeito da proteólise sobre as atividades xilanásicas. **A** – Impacto de PMSF e EDTA sobre a eficiência dos inibidores proteicos de endoxilanases da família 11 (N=3). **B** – Atividade xilanásica residual na presença ou ausência dos inibidores proteolíticos PMSF e EDTA (N=3). Material de jardins de fungo de *A. bisphaerica* coletados entre Janeiro e Abril de 2013.

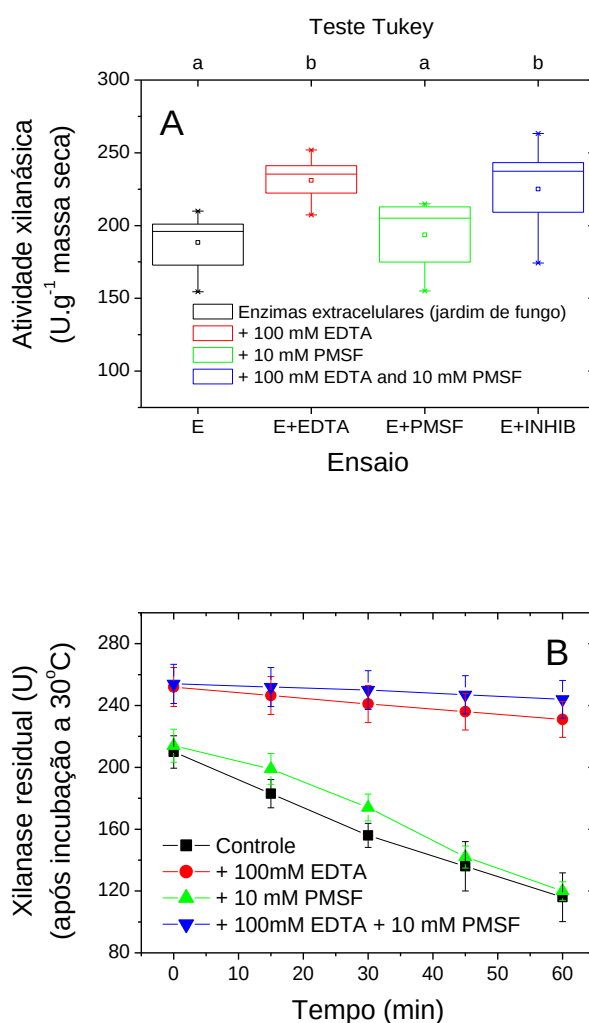
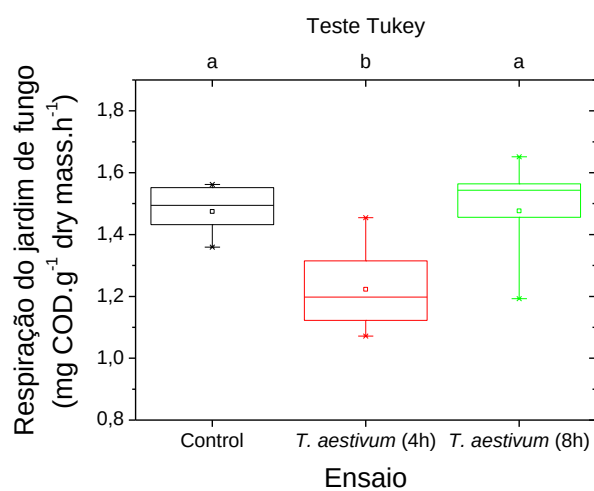


Figura 33 - Efeitos fisiológicos de inibidores de xilanases sobre a microbiota de jardins de fungo de *A. bisphaerica*. Material de jardins de fungo coletados entre Janeiro e Abril de 2013 (N = 3).



4.11 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INTERFERÊNCIAS EXTERNAS: Efeito do acréscimo na degradação de celulose sobre a fisiologia de jardins de fungo

Materiais de jardins de fungo provenientes de ninhos de *Atta bisphaerica* (agriculturas de corte de folhas, monocotiledôneas) foram coletados entre Janeiro de 2013 e Abril de 2013, na área GHII, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP. Os ninhos estavam localizados em duas grandes áreas de campo com mesmo padrão fitogeográfico, dominadas por espécies de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp.

4.11.1 Resiliência a concentrações intermediárias de atividades celulásicas

Jardins de fungo de *A. bisphaerica* (N=2) foram utilizados como sistemas modelo. 100 U de atividade celulásica sobre Avicel, obtidas a partir de culturas de *P. citrinum* gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. André Rodrigues, foram adicionadas a $201,00 \pm 10,32$ mg de massa úmida de jardim de fungo de *A. bisphaerica* livre de formigas e o efeito sobre a fisiologia microbiana foi monitorado por meio de respirometria (BARTHA e PRAMER, 1965). Esta quantidade enzimática corresponde a, aproximadamente, 10 vezes os valores de atividades celulásicas observadas para jardins de fungo de *A. bisphaerica*. Atividades celulásicas residuais foram determinadas ao final dos ensaios utilizando Avicel como substrato.

Após cinco horas de incubação em presença de 100 U enzimáticas de celulasas, foi observado acréscimo nas taxas respiratórias dos jardins de fungo, indicando elevação das taxas fisiológicas da microbiota (Figura 34A), aumento este similar ao crescimento exponencial da respiração registrado para jardins de fungo submetidos a longos períodos de incubação na ausência de formigas (Figura 20), quando atingem completa alteração respirométrica e, portanto, fisiológica, sem, no entanto, manifestar mudanças microscópicas visíveis de estrutura e composição microbiana.

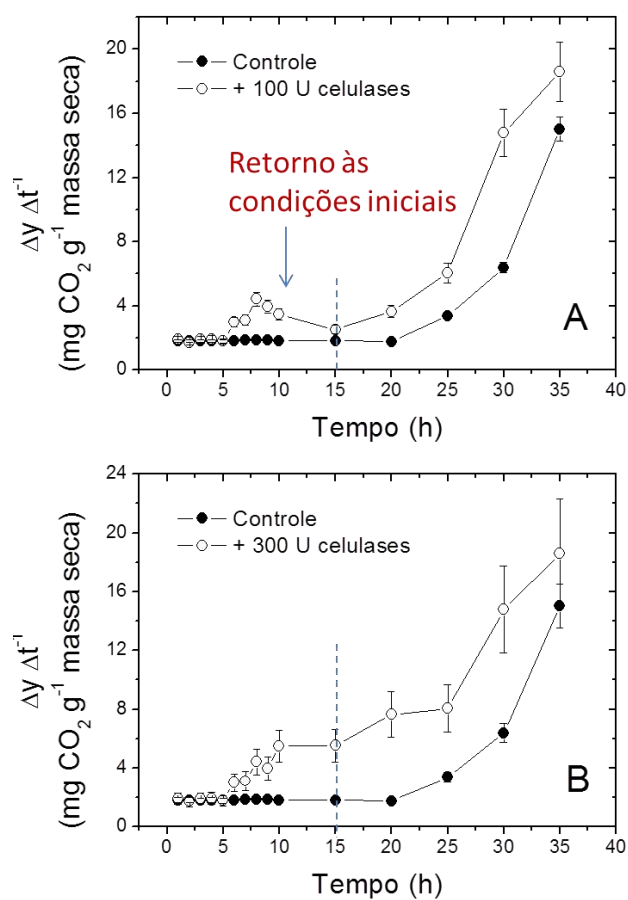
No entanto, a alteração respirométrica foi pontual (Figura 34A). Após 12 horas de incubação com celulasas exógenas, os jardins de fungo retornaram a um estado respirométrico basal similar ao observado para sistemas controle. Somente o aumento exponencial do período de desestabilização fisiológica mostrou-se mais acentuado. Após 12 horas de

incubação, a atividade celulásica residual extracelular de jardins de fungo foi igual a $4.23 \pm 0.95 \text{ U g}^{-1}$ massa seca, valor similar ao observado para estes jardins de fungo em sua condição natural (Tabela 13).

4.11.2 Colapso fisiológico da microbiota com a degradação da estrutura celulósica

Enquanto a utilização de 100 U celulásicas não foi suficiente para desestabilizar a fisiologia microbiana de forma permanente, promovendo um leve acréscimo respirométrico, o qual foi logo neutralizado, a utilização de 300 U celulásicas induziu incrementos respirométricos elevados e permanentes, caracterizados por platôs consecutivos, refletindo alterações na estrutura fisiológica da microbiota (Figura 34B), possivelmente devido à ativação de grupos microbianos dormentes ou modificações cinéticas da microbiota antes do período de estabilidade fisiológica na ausência de formigas, graças à ação celulolítica no sistema, a qual poderia servir não só como fonte de proteínas, mas também como geradora de glicose no curto intervalo de tempo no qual as alterações fisiológicas se iniciaram – 5 horas.

Figura 34 - Efeito da degradação de celulose sobre a fisiologia da comunidade microbiana de jardins de fungo de *A. bisphaerica* coletados entre Abril e Maio de 2013. **A**- Introdução de 100 U de atividade celulásica exógena. **B**- Introdução de 300 U de atividade celulásica exógena. (N=2).



4.12 RELAÇÕES ENTRE DEMOGRAFIA DOS NINHOS DE FORMIGAS ATTINI E TAXAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA E AÇÚCARES REDUTORES

Os ninhos coletados apresentaram números distintos de câmaras contendo jardins de fungo ativos. Aumentos nas massas de jardins de fungo ativos foram conseguidos ou com incremento no número de câmaras, tais como observado entre as agriculturas basais de *M. parallelus* e *M. goeldii* ou entre as agriculturas de corte de folhas de *A. balzani* e *A. laevigata*, ou por meio do aumento da massa de jardim de fungo na câmara, tal como entre as cortadeiras *A. balzani* e *A. coronatus*. As massas secas de jardins de fungo nas câmaras avaliadas permaneceram constantes no período avaliado (Tabela 17).

As relações entre acúmulos brutos de açúcares redutores e de biomassa microbiana, i.e. os serviços de ecossistema prestados pelos jardins de fungo, com a demografia dos formigueiros, definidas como as massas secas brutas de operárias existentes em cada ninho, apresentaram caráter linear (Figuras 35 e 36).

Foram observadas relações entre crescimento microbiano e biomassa sustentada de operárias, tal como previsto, uma vez que a biomassa de operárias está relacionada com a massa de larvas sustentadas pelos ninhos, as quais consomem biomassa microbiana. Estas relações, no entanto, não foram capazes de diferenciar as agriculturas de *Trachymyrmex* e *Acromyrmex* (Figura 35). Talvez os números de indivíduos sustentados pertencentes a ordens de grandezas similares e diferentes hábitos alimentares tenham impossibilitado a segregação destes dois tipos de agriculturas. De qualquer forma, foi constatada a capacidade das agriculturas de *Acromyrmex* em suportar maior biomassa de operárias com menor crescimento microbiano.

Tabela 17 - Números de câmaras e operárias e massas de jardins de fungo e operárias em ninhos de formigas Attini

Ninhos de espécies de formigas Attini	Número médio de câmaras com jardins de fungo ativos	Massa seca total de jardim por câmara (mg)	Massa seca total de jardim de fungo ativo no ninho (mg)	Número médio total de operárias	Massa seca total de operárias (g)
<i>M. goeldii</i>	4 [†]	96,58±10,56	386,39±42,24	1352 ⁺	0,61±0,12
<i>M. parallelus</i>	1 [†]	108,35±22,31	108,35±22,31	115*	0,05±0,02
<i>T. tucumanus</i>	3 [†]	103,46±9,35	310,37±28,05	522 [†]	1,21±0,91
<i>T. fuscus</i>	4 [†]	111,38±14,14	445,53±56,57	712 [#]	1,68±0,23
<i>A. coronatus</i>	1 [†]	356,54±21,89	356,54±21,89	2045 [†]	3,73±0,53
<i>A. balzani</i>	3 [†]	118,77±8,56	316,03±25,69	3010 [§]	5,59±1,55
<i>A. bisphaerica</i>	18 [†]	125,32±9,56	2,25±0,17x10 ³	10 ⁵ [†]	2,51±0,22x10 ³
<i>A. laevigata</i>	74 [¶]	129,58±19,87	9,59±1,47x10 ³	3 x 10 ⁶ [¶]	7,43±0,31x10 ³

* SOLOMON et al. (2004); [†]RABELING et al (2007); [#]OLIVEIRA et al. (2008); [§]PIMENTA et al. (2007); Número estimado de câmaras e operárias frente ao número de aberturas dos ninhos mais velhos observados na área de coleta, tendo como base os estudos de Betancourt citados em Wilson (1971); [†]Censos realizados neste trabalho.

Figura 35 - Relação entre crescimento microbiano bruto e biomassa de operárias em ninhos de formigas Attini. O círculo realça a inexistência de separação das agriculturas de *Acromyrmex* e *Trachymyrmex*. *A. balzani* n = 51; *A. coronatus* n = 5; *A. bisphaerica* n = 30; *A. laevigata* n = 9; *T. fuscus* n = 48; *T. tucumanus* n = 27; *M. parallelus* n=40; *M. goeldii* n=4.

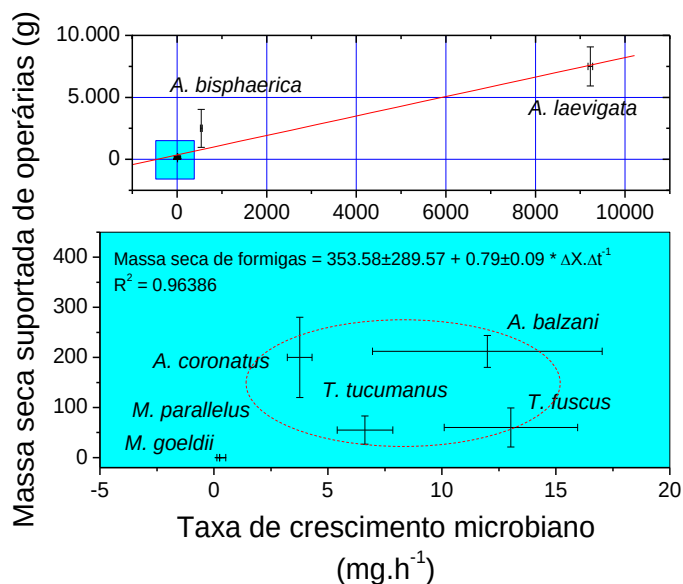
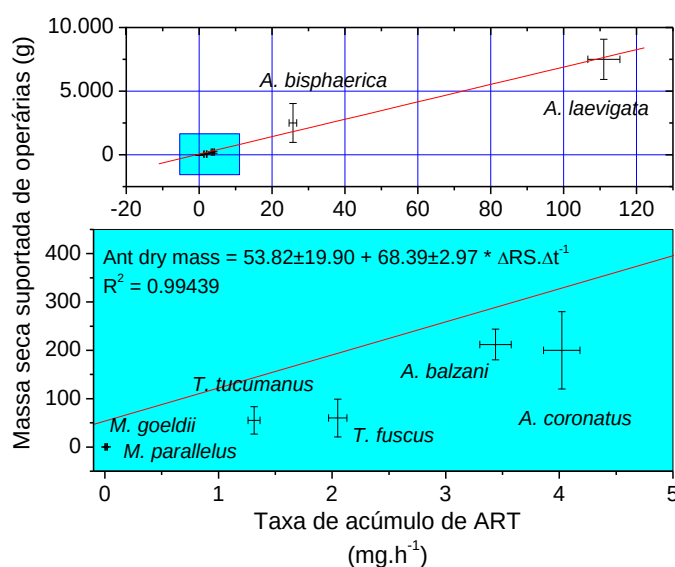


Figura 36 - Relação entre taxas de acúmulo de ART bruto e biomassa de operárias sustentada em ninhos de formigas Attini. *A. balzani* n = 51; *A. coronatus* n = 5; *A. bisphaerica* n = 30; *A. laevigata* n = 9; *T. fuscus* n = 48; *T. tucumanus* n = 27; *M. parallelus* n = 40; *M. goeldii* n = 4.



As agriculturas basais localizaram-se em patamar inferior, reforçando suas diferenças em relação às demais. As grandes agriculturas pertencentes ao gênero *Atta*, por sua vez, localizaram-se no extremo oposto, ocupando um lugar a parte na ordem de grandeza das relações entre crescimento microbiano e biomassa mirmecológica suportados pelos seus ninhos (Figura 35). Tendo em vista que as taxas de crescimento específicas da microbiota não apresentaram mudanças significativas entre jardins de fungo de *A. bisphaerica* e *A. laevigata*, fica claro que os incrementos de crescimento microbiano bruto são frutos do aumento de número de câmaras portando jardins de fungo ativos. Estratégia similar foi observada entre os ninhos de *M. parallelus* e *M. goeldii*.

A existência de relações entre biomassa suportada de operárias e serviços de ecossistema ficou clara quando as biomassas de operárias foram confrontadas com as quantidades de açúcares redutores produzidas pela massa total de jardins de fungo dentro dos ninhos (Figura 36). Foram observadas relações lineares entre produção de açúcares e biomassa suportada de operárias. Neste caso, a segregação das agriculturas de *Acromyrmex* e *Trachymyrmex* foi completa. Estes dois conjuntos de agriculturas, mais as agriculturas basais analisadas, mantiveram massas similares de jardins de fungo em seus ninhos, mas *Acromyrmex* mostrou-se capaz de sustentar maior quantidade de biomassa de operárias adultas, a qual se mostrou fortemente relacionada à maior produção de açúcares por massa de jardins de fungo. *Trachymyrmex* posicionou-se em situação intermediária, enquanto que os sistemas basais ficaram localizados no extremo oposto (Figura 36). Também ficou claro o efeito do aumento de massa de jardim de fungo sobre a capacidade de sustentar a biomassa de operárias.

Mais uma vez, tendo em vista a inexistência de diferenças significativas entre as taxas de acúmulo por grama de massa seca de jardins de fungo verificadas dentro do conjunto das agriculturas de *Atta*, vê-se claramente o efeito do aumento da massa de jardins de fungo em cada ninho como forma de incrementar a quantidade de açúcares produzidos.

Assim, a capacidade de acúmulo e disponibilização de açúcares redutores para os ninhos de diferentes agriculturas foram frutos do aumento da capacidade de produção de açúcares pelos jardins de fungo. Por sua vez, dentro de cada tipo de agricultura, os incrementos na produção de açúcares foram obtidos com o aumento das massas de material de jardins de fungo dentro dos ninhos.

5 DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA RESPIROMÉTRICA E DOS TEMPOS DE ENSAIO COM JARDINS DE FUNGO LIVRES DE FORMIGAS

Jardins de fungo são sistemas complexos. Devido às diferenças existentes entre os tipos de jardins de fungo e as possíveis variações sazonais na composição e substrato desses jardins, fez-se necessária a elaboração de um modelo generalista o suficiente para possibilitar a comparação dos estoques e dinâmica dos fluxos de matéria e energia entre os diferentes sistemas sem, no entanto, descaracterizar a organização geral dos mesmos.

Além da necessidade de generalização e utilização de denominadores comuns de matéria e energia imposta pela comparação de sistemas tão distintos, o fato da biomassa microbiana encontrar-se fortemente aderida ao substrato impõe dificuldades para estudos de cinética de crescimento microbiano. A solução deste problema é fundamental para a avaliação das taxas de produção de biomassa e suas características cinéticas. Portanto, a investigação da metodologia mais adequada para os estudos da dinâmica de produção de biomassa microbiana em jardins de fungo, com ótimo aproveitamento do material coletado, foi necessária.

A maior dificuldade dos estudos de microbiotas em substrato sólido é a quantificação da biomassa e de seus parâmetros de crescimento sobre substrato sólido (BROCK, 1971; LYND et al., 2002). Tendo em vista o elevado teor de matéria orgânica, procedimentos envolvendo fumigação-extração com clorofórmio tornam-se inviáveis (JOERGENSEN, 1995). O uso de ATP para determinação de biomassas microbianas é uma alternativa, mas esbarra com problemas relacionados à extração de ATP (ALEF, 1995). A utilização de carga energética em adenilato como parâmetro de caracterização do estado fisiológico possui complicadores relacionados tanto à extração de ATP, ADP e AMP quanto à presença de AMP e ADP no substrato utilizado como alimento pela microbiota (BROOKES, 1995). Das possibilidades restantes, a microscopia e a respirometria despontam como alternativas atraentes para a quantificação de biomassas microbianas e determinação de parâmetros de crescimento. A microscopia é ferramenta importante para a determinação de biovolumes, e o uso de corantes fisiológicos (BLOEM et al., 1995) e pedoscópios (PERFIL'EV; GABE, 1969) permitem a identificação de taxas metabólicas e de crescimento. Infelizmente, a microscopia

de jardins de fungo de formigas Attini possui complicadores relacionados às dificuldades de diafanização do material, coloração cruzada das células fúngicas com o substrato vegetal e à sua estrutura tridimensional, a qual exige microscopia confocal para análise mais detalhada. Por sua vez, o fungo micobionte não coloniza o capilar de seção triangular do pedoscópio devido ao baixo crescimento de *L. gongylophorus* em meios de cultivo artificiais (SIQUEIRA et al. 1998), impossibilitando a avaliação de sua taxa de crescimento.

Tendo em vista as dificuldades de extração de biomassa microbiana de substratos sólidos, visto sua adesão ou penetração no material, e o fato de que processos temporais, tais como as taxas de produção, não podem ser avaliados adequadamente por meio de bioindicadores estáticos ou pela metodologia destrutiva de aquisição desses bioindicadores, tais como DNA, RNA, ATP, carga energética em adenilato ou os métodos de avaliação de biomassa empregando microscopia ou fumigação-extração, foi feita a opção por métodos respirométricos, intrinsecamente fenomenológicos e não destrutivos e, assim, plenamente capazes de avaliar processos dinâmicos em uma mesma amostra. A única alternativa atualmente viável e de baixo custo para o estudo biocinético completo de jardins de fungo é a respirometria induzida por substrato, das quais o método de Van der Werf e Verstraete (1987) mostrou-se útil graças à sua capacidade de avaliação de biomassas ativas e parâmetros de crescimento microbiano por meio de relações biocinéticas estequiométricas, sendo, portanto, independente de métodos de calibração para a mensuração de biomassas, representando um avanço em relação ao método de Anderson e Domsch (1978), o qual fornece apenas dados de biomassa microbiana total e depende da microscopia ou da fumigação-extração para a sua calibração (ANDERSON; DOMSCH, 1978). O método de Van der Werf e Verstraete (1987) baseia-se na saturação da microbiota a ser avaliada com fonte de carbono facilmente assimilável, tal como acetato. A curva respirométrica inicial correlaciona-se com a curva de crescimento microbiano. Assim, os parâmetros biocinéticos podem ser estimados por meio de modelagem de um sistema de três equações diferenciais mais a cinética de Monod, utilizando a curva de emissão de DQO – oxigênio – ou emissão de CO₂ como parâmetro e o algoritmo Runge-Kutta de quarta ordem para a solução do sistema.

Os estudos respirométricos mostraram-se extremamente capazes para a avaliação das condições fisiológicas dos jardins de fungo e os respectivos parâmetros bioenergéticos da microbiota, graças a sua robustez e versatilidade. Quando somados às taxas de produção de solutos nos jardins de fungo, permitiram a determinação das eficiências ecológicas e suas variações ao longo do curso evolutivo.

Entretanto, a opção pelo emprego de uma estratégia de investigação *top-down*, avaliando as características fisiológicas da comunidade microbiana presente em jardins de fungo por meio de metodologia respirométrica, impôs a necessidade de remoção dos jardins de fungo de seu ambiente natural. Para que não ocorresse a formação de novo compartimento de lixo, foi necessário encurtar os tempos de trabalho com jardins de fungo em laboratório para intervalos inferiores a 24 horas. No entanto, após a remoção da biomassa mirmecológica para eliminar as perturbações causadas pela sua respiração, os tempos para a manipulação experimental dos jardins de fungo se mostraram ainda mais restritos. Foi verificado que o tempo de constância respirométrica da biomassa microbiana na ausência de formigas é reduzido, não ultrapassando, em média, 15 horas. Este intervalo foi considerado representativo da fisiologia da comunidade microbiana em seu estado simbiote e, por isso, tornou-se limitante para os demais ensaios fisiológicos e bioquímicos.

Os valores médios de resposta respirométrica observados para 750 mg DQO glicose ou Aco^-Na^+ foram levemente maiores que os observados para 500 mg DQO glicose ou Aco^-Na^+ em jardins de fungo de agriculturas basais e de *Trachymyrmex*, fato inverso ao verificado para jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas (Tabelas 2 e 3). Tal resultado poderia indicar diferenças de saturação da biomassa microbiana por substrato e tolerância ao estresse osmótico provocado por elevadas concentrações de solutos extracelulares. Entretanto, as diferenças não foram estatisticamente significantes. Assim, a concentração de 500 mg DQO Aco^-Na^+ foi escolhida como a mais adequada para os ensaios de indução respirométrica por substrato. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre ensaios empregando glicose (Glc) e acetato (Aco^-Na^+), este último foi preferido devido à menor influência nas respostas de repressão ou indução catabólica ou predileção a substrato que poderiam estar presentes na utilização de glicose, carboidrato que também participa de processos de sinalização celular (SANTANGELO, 2006). As elevadas concentrações de DQO utilizadas, somadas aos solutos previamente existentes em jardins de fungo, indicam a presença de mecanismos potentes de resistência ao estresse osmótico em jardins de fungo.

5.2 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA ÁREA DE COLETA

Alterações pluviométricas e térmicas possuem forte impacto sobre a disponibilidade de água para o desenvolvimento da vegetação, mecanismos de dessecação do solo e mesofauna, e evapotranspiração pela vegetação. O mesmo pode ser dito a respeito das formigas, igualmente dependentes de água e umidade para a manutenção de suas funções biológicas e controle da dessecação corporal. Assim, alterações nos índices pluviométricos e de temperatura têm o potencial de promover modificações ambientais drásticas, dentre elas a disponibilidade e qualidade de substratos para forrageamento. Da mesma forma, a umidade do solo pode interferir em possíveis trocas nutricionais entre jardins de fungo e solo circundante, tendo em vista que a água é um importante elemento para a difusão de íons e compostos orgânicos.

As quedas de precipitação pluviométrica foram bastante intensas durante os períodos de inverno e sofreram recuperação mais lenta que o aumento da temperatura, resultando em maiores quantidades de material seco disponível para forrageamento na serapilheira e menor desenvolvimento da vegetação (Figura 7). Embora as características físico-químicas do material presente como substrato nos jardins de fungo não tenha variado (Figuras 9 e 10), os prováveis impactos da seca na quantidade de vegetação e atividade de forrageio devem ter importância no suprimento de substratos para as microbiotas dos jardins de fungo, visto as alterações profundas na dinâmica de funcionamento da biomassa microbiana durante a estação seca (Tabela 8).

5.3 MATERIAIS DE JARDINS DE FUNGO

Jardins de fungo são microbiomas que podem ser definidos como sistemas de processamento de material forrageado cujo funcionamento depende de padrões de temperatura e umidade e das propriedades do substrato oferecido como alimento para a microbiota simbiote. A determinação das características do substrato e propriedades bioquímicas dos solutos ao longo do ano permitiu a identificação da dinâmica de forrageio das formigas e seu impacto sobre as características bioquímicas dos jardins de fungo e, assim,

a avaliação da constância de cada compartimento teórico ao longo do tempo. Em última análise, estes dados permitem definir se os jardins de fungo são sistemas termostáticos e quimiostáticos.

Materiais de jardins de fungo de formigas Attini coletados entre 2010 e 2011 apresentaram forte sazonalidade para a dinâmica das massas totais (Figura 8C), revelando a presença de ajustes de porte coincidentes com as épocas de seca e chuva, os quais podem estar relacionados com a quantidade de material forrageado que é oferecido à microbiota simbiote.

No entanto, as porcentagens de massa seca relativa nos materiais de jardins de fungo permaneceram constantes (Figura 8B), indicando que ao menos que o teor de água dos diferentes sistemas foi preservado. Também não foram observadas alterações relevantes nas propriedades físico-químicas do material utilizado como substrato (Figuras 9 e 10) ou nas propriedades bioquímicas dos jardins de fungo, as quais se mantiveram constantes ao longo do período de coleta (Figura 8A, Figuras 11 a 14), indicando que estes microbiomas funcionam como sistemas quimiostáticos. Estes resultados indicam não só a estabilidade nas escolhas de material coletado para suprimento de substrato para o desenvolvimento da microbiota dos jardins de fungo, embora a vegetação mais seca observada durante os períodos de inverno (Figura 7), mas também a importância da manutenção das condições físico-químicas e bioquímicas dos solutos (Figura 8A, Figuras 11 a 14) e da umidade (Figura 8B) para a operação destes microbiomas. Esta constância nas proporções entre os componentes abióticos permite inferir a existência de sistemas regulatórios potentes sobre o funcionamento dos jardins de fungo, os quais podem estar relacionados com possíveis alterações nos padrões comportamentais das formigas, e com os ajustes na dinâmica de crescimento microbiano (Tabela 8) e na composição enzimática extracelular (Figuras 9 e 10) observados.

Embora as constâncias anuais dos parâmetros físico-químicos e bioquímicos, cada tipo de agricultura apresentou propriedades particulares para seus microbiomas. Jardins de fungo de agriculturas basais apresentaram quantidade inferior de material solúvel, taxas de respiração baixas e valores reduzidos de glicose, mas quantidades intermediárias de xilose no espaço extracelular. Em particular, estes sistemas apresentaram predomínio de glicose no substrato (Tabela 4), possivelmente devido à presença de polissacarídeos recalcitrantes compostos por glicose, isto é, celulose, polímero de biodegradação mais lenta e, portanto, mais frequente em material submetido a maior tempo de decomposição. As quantidades de

glicose frente às de xilose mostram as diferenças nas capacidades de degradação de polissacarídeos com maior ou menor recalcitrância.

O inverso foi observado para as agriculturas de corte de folhas, as quais apresentaram grande quantidade de material solúvel extraível em água e quantidades elevadas de monossacarídeos, em especial glicose, no espaço extracelular. Da mesma forma, seus substratos apresentaram quantidade de xilose mais alta que os das demais agriculturas, fator possivelmente vinculado ao uso de substratos frescos e, portanto, ricos em material menos recalcitrante ao ataque enzimático. Entretanto, as quantidades de xilose extracelular foram muito inferiores às das demais agriculturas, indicando possível consumo deste monossacarídeo em detrimento de glicose (Tabela 5).

Os acréscimos nas quantidades de carboidratos redutores em agriculturas derivadas – incluso corte de folhas – foram seguidos por incrementos na quantidade de energia nos solutos destes jardins de fungo (Tabela 5). No entanto, as elevadas quantidades de DQO observadas, quando comparadas com as suas respectivas quantidades de carboidratos redutores, apontam para a existência de outros compostos de alta energia no espaço extracelular diferentes de carboidratos, os quais poderiam ser polióis, amino-açúcares ou ácidos orgânicos.

M. parallelus apresentou quantidades de DQO similares aos sistemas de corte de folhas, resultado cuja origem pode estar vinculada ao aumento das concentrações de xilose extracelulares. A possibilidade de erro devido a interferentes de matriz, neste caso, não está descartada. A matriz é a composição físico-química dos solutos extraíveis, a qual compreende inúmeras substâncias orgânicas e inorgânicas que podem influenciar a reação colorimétrica para determinação de DQO ou interferir na estabilidade da cor desenvolvida. Outro aspecto intrigante foi a maior quantidade de glicose e xilose extracelulares permanentes em jardins de fungo de *Trachymyrmex* quando comparados com os demais sistemas (Tabela 5). Este resultado é indicativo da presença de um potente sistema enzimático, mas também de um dreno microbiano de produtos de hidrólise mais fraco. As quantidades de DQO inferiores às observadas para as agriculturas de corte de folhas mostram que, para estas agriculturas derivadas, os carboidratos são, possivelmente, a principal fonte de energia extracelular.

5.4 TAXAS DE ACÚMULO SAZONAIS DE DQO, ART, GLICOSE E XILOSE EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO

Jardins de fungo são microbiomas que prestam serviços de ecossistema aos ninhos de formigas. Dentre os mais relevantes, encontram-se o fornecimento de açúcares a partir do processamento de matéria orgânica forrageada pelas formigas, os quais incluem material solubilizado pelo ataque enzimático sobre substratos de origem vegetal, em sua maioria poliméricos. Tendo em vista que glicose e xilose mostraram-se relevantes para a sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* (SILVA et al., 2003), a avaliação comparativa das taxas de acúmulo de solutos em jardins de fungo e as qualidades de tais solutos é o aspecto mais importante para a identificação de correlações entre propriedades demográficas dos ninhos e características funcionais dos jardins de fungo.

As propriedades anteriormente verificadas para as qualidades dos materiais extraíveis e substratos de jardins e fungos apresentaram reflexos nos perfis de acúmulo de carboidratos específicos, reforçando a ideia de especialização metabólica na utilização de material menos recalcitrante ao ataque enzimático pelas agriculturas de corte de folhas, em especial amido, xilana e pectina. A fraca atividade celulásica destes sistemas reforça a hipótese de especialização metabólica no ápice da atividade agrícola de detritos em *Attini*.

A especialização em material amiláceo e hemicelulósico mostrou-se anterior à agricultura de corte de folhas, já aparecendo em sistemas de *Trachymyrmex* (Figuras 9 e 10). *T. fuscus* apresentou dinâmica particular, com forte atividade amilásica, possivelmente decorrente do uso de substratos ricos em amido, tais como as sementes de gramíneas (Tabela 4). Em contraste, jardins de fungo basais não apresentaram especialização enzimática, fator que pode estar relacionado ao tipo de substrato empregado, mais decomposto e diversificado, rico em estruturas recalcitrantes (Figuras 9 e 10, Tabela 4).

Os reduzidos valores de atividades enzimáticas e as taxas de acúmulo de carboidratos praticamente inexistentes verificados para materiais de jardins de fungo de agriculturas basais (Tabela 6) também indicaram menor potencial do canal enzimático gerador de açúcares tanto para a microbiota simbiote quanto para a biomassa mirmecológica, apontando diferente estratégia de funcionamento, possivelmente voltada para a manutenção e reciclagem de material, convertendo substratos variados e, provavelmente, mais pobres nutricionalmente, em

um único tipo de alimento, possivelmente biomassa microbiana. Em contraste, os potentes sistemas das agriculturas derivadas e, principalmente, os de corte de folhas, mostraram-se acumuladores vigorosos de produtos de hidrólise extracelulares na forma de açúcares redutores solúveis. Embora as quantidades de unidades enzimáticas tenham sido similares entre jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas e agriculturas derivadas (Figuras 15 e 16), as taxas de acúmulo de material foram maiores em sistemas de corte de folhas (Tabela 6), indicando maior facilidade de acesso ao substrato, maior disponibilidade de substrato para o ataque enzimático, ou menor potencial de drenagem de produtos de hidrólise pela microbiota simbiote.

O efeito da disponibilidade de substrato recebeu suporte ao se verificar que, embora as taxas de atividades xilanásicas destes sistemas tenham sido similares, as agriculturas de corte de folhas, coletoras de material fresco, apresentaram maior capacidade de acúmulo de xilose que as de *Trachymyrmex*, coletoras de material de serapilheira, já degradado. Inclusive, a potencialização da geração de xilose mostrou-se tão marcada que pode ser observada inversão nas taxas de acúmulo entre glicose e xilose, esta última preferida em relação à primeira nas agriculturas de corte de folhas (Tabela 6).

Todos os sistemas apresentaram sazonalidade nas taxas de acúmulo de material e no potencial enzimático extracelular, indicando mecanismos de controle fisiológico atuantes sobre o potencial do canal enzimático, o qual foi reduzido durante a estação seca. Esta redução pode ser oriunda da resposta da microbiota à quantidade ou à qualidade de alimentos fornecidos pelas formigas como substrato para o seu crescimento. No entanto, as qualidades do substrato não mostraram alterações significantes ao longo do ano (Figuras 9 e 10). Assim, a redução do potencial enzimático pode estar mais relacionada ao menor suprimento de substrato para biodegradação e, por conseguinte, à redução dos ritmos de operação dos jardins de fungo. Tendo em vista que as taxas de acúmulo de material diminuíram, a única explicação plausível para a manutenção dos valores de DQO, ART, Glc e Xyl constantes ao longo do ano é o menor consumo de solutos dos jardins de fungo pelas formigas e pela própria microbiota.

Um aspecto importante a respeito do acúmulo de solutos no espaço extracelular é a descaracterização dos jardins de fungo como agriculturas. Embora tratados historicamente dessa forma (WHEELER, 1907), os jardins de fungo podem ser mais bem caracterizados como fermentadores em estado sólido devido às suas propriedades de funcionamento similares às de um vaso de fermentação. Um sistema agrícola baseia-se na coleta da produção

de biomassa para posterior estocagem ou consumo, tal como acontece nas culturas de champinhons, fato que não ocorre nos jardins de fungo. Por sua vez, a retirada de fungo esgotado e a geração e acúmulo de produtos de sacarificação na ausência de formigas, somadas às evidências de consumo de solutos dos jardins de fungo por operárias do gênero *Atta* (SILVA et al., 2003), são fortes evidências de que o jardim de fungo, ao menos os de formigas derivadas, não é uma agricultura, ou mais precisamente uma agricultura de detritos, tal como um cultivo de champinhons, do qual só se pode obter biomassa microbiana como alimento, mas sim um vaso de fermentação, visto gerar produtos de hidrólise e secreções, tais como os fermentadores empregados na produção de citrato (JONGH; NIELSEN, 2008) ou na sacarificação de celulose (RIITONEN et al., 2013).

A alteração na denominação dada aos jardins de fungo gera mudanças fundamentais na forma de análise de sua operação. Os parâmetros descritores de seu funcionamento tornam-se parâmetros de operação de um fermentador em estado sólido. Tais descritores incluem parâmetros físicos, dentre eles massa total, pH, temperatura e teor de água; parâmetros bioquímicos, dos quais as massas e taxas de produção de açúcares redutores são importantes indicadores da produção de fontes de energia extracelulares; e parâmetros biológicos, os quais incluem biomassa microbiana ativa e seus descritores biocinéticos. Além disso, podem ser tratados como o próprio meio de reação, tendo em vista que fermentadores nada mais são que grandes jarros de reações bioquímicas.

5.5 BIOMASSA MICROBIANA

O entendimento da dinâmica biocinética das comunidades microbianas de materiais de jardins de fungo e suas variações entre os diferentes tipos de agriculturas de fungos são indispensáveis para a averiguação dos processos fisiológicos e ecológicos que estiveram envolvidos na evolução da simbiose fungo-formiga. Para tanto, jardins de fungo de diferentes tipos de agricultura localizados no interior do estado de São Paulo, Brasil, foram avaliados por meio de procedimentos de indução e modelagem respirométrica para a determinação das quantidades de biomassa microbiana ativa e suas respectivas taxas de produção. Foram observadas alterações funcionais entre jardins de fungo de diferentes agriculturas, com redução da biomassa microbiana, especialização metabólica no uso de xilose e aumentos

gerais das taxas de produção de biomassa microbiana em direção às agriculturas de corte de folhas, mais derivadas.

Os resultados obtidos mostraram que agriculturas de corte de folhas aumentaram as taxas de produção, tanto de biomassa microbiana (Tabela 8) quanto de matéria orgânica dissolvida oriunda dos processos de biodegradação (Tabela 6). Em adição, reduziram as quantidades de biomassa microbiana ativa permanente (Tabela 8). Assim, jardins de fungo de corte de folhas incrementaram fluxos frente às massas de existência permanente da microbiota quando comparados com as agriculturas derivadas do gênero *Trachymyrmex*, cujos resultados foram em geral intermediários, e as basais, caracterizadas por fluxos muito inferiores e grandes quantidades de biomassa microbiana permanente.

A estratégia de manutenção de biomassa apresentada pelas agriculturas basais, vinculada ao substrato variado de seus jardins de fungo, composto desde matéria vegetal morta a fezes de inseto (LEAL; OLIVEIRA, 2000), aponta para um sistema de reciclagem voltado para o acúmulo e manutenção de elevadas quantidades de um único tipo de alimento, talvez qualitativamente mais rico ou apropriado para o consumo destas formigas, a biomassa fúngica. O baixo fluxo de demanda química de oxigênio nestes jardins de fungo sugere que estes sistemas agrícolas funcionam mais como acumuladores que como fermentadores de fluxo contínuo. Este cenário é compatível com mecanismos de armazenamento de alimentos para momentos críticos, tais como períodos de escassez ou revoada. A queda nas massas destes jardins de fungo nestes períodos, coincidentes com o final da estação seca e início do período chuvoso na região analisada, corrobora sua utilização como estoque de alimentos, mas não permite nenhum tipo de conclusão devido à forte influência da época seca sobre a disponibilidade de alimentos para a sustentação dos jardins de fungo.

Já a estratégia de rápida expansão observada nas microbiotas das agriculturas derivadas mostrou-se vinculada à redução do coeficiente de manutenção celular (m) e de K_S , em conjunto com o aumento de $Y_{\max}$ (Tabela 8). A redução de K_S tem reflexos importantes no incremento do crescimento microbiano, principalmente quando as quantidades de DQO se mantêm constantes, pois permite a saturação nutricional da microbiota sem elevar as quantidades de alimentos extracelulares permanentes.

O rápido crescimento microbiano destas agriculturas (Tabela 8) foi acompanhado por aumentos significativos nas taxas de acúmulo de DQO extracelular solúvel com microbiota ativa (Tabela 6), reforçando a estratégia global de aumento de fluxos. Este desempenho,

aparentemente, foi resultado do balanço observado entre acréscimo nas taxas de crescimento específico e na capacidade produtiva de DQO extracelular em conjunto com a redução da biomassa microbiana permanente (Tabela 8). A redução da biomassa microbiana permanente tem impacto importante sobre as taxas de acúmulo de DQO, pois, se os aumentos nas taxas de crescimento específico viessem acompanhados de incrementos de biomassa microbiana, as taxas de assimilação bruta seriam elevadas a ponto de inviabilizar acúmulos de DQO tão expressivos.

A inexistência de aumento excessivo de assimilação bruta (Q) pelas microbiotas das agriculturas de corte de folhas frente às agriculturas derivadas (Tabela 8), de potencial acumulador de DQO extracelular similar e igualmente r-estrategista, foi igualmente resultado da diminuição da quantidade de biomassa microbiana ativa (Tabela 6). Assim, um pequeno aumento do potencial de produção extracelular de componentes contendo energia, tais como glicose, xilose e demais açúcares redutores nas agriculturas de corte de folhas, seria capaz de promover acúmulos superiores frente às agriculturas derivadas, a ponto de provocar incrementos na eficiência ecológica de acúmulos destes componentes frente aos de biomassa microbiana (Tabela 9). De forma geral, as eficiências ecológicas, tanto da produção de biomassa quanto da produção de material extracelular solúvel, aumentaram em direção às agriculturas de corte de folhas (Tabela 9).

O aumento nas taxas de crescimento específico e a manutenção de reduzida quantidade de biomassa microbiana permitiram, por sua vez, a inferência da existência de processos frequentes de remoção de material microbiano, indicando incremento nas taxas de ciclagem de biomassa da microbiota simbiote. Possivelmente, um aumento nas taxas de remoção de componentes da microbiota tem efeito repicador sobre a mesma, ativando sua secreção enzimática, ou mesmo desempenhando ação atenuadora sobre mecanismos de controle populacional dependentes de densidade (ODUM, 1971), uma vez que é um tipo de controle de concentração de micro-organismos em um determinado local.

Estes resultados corroboram com um cenário evolutivo dominado por mudanças de estratégia ecológica em direção a mecanismos de colonização rápida de substrato, acompanhados por incrementos nas taxas de acúmulo extracelular de açúcares e demais componentes contendo energia (DQO), possivelmente sustentadas por secreção de enzimas. Entretanto, a elevada taxa de ciclagem de biomassa microbiana leva à redução do tempo disponível para os micro-organismos conseguirem assimilar todo o material obtido por meio

de hidrólise enzimática, o qual se acumula no meio. Este, assim, torna-se disponível para a nutrição das operárias das agriculturas de corte de folhas.

A alteração de estratégia ecológica, da manutenção para a produção, foi marcante durante os meses chuvosos, mas mascarada durante a época seca típica do inverno brasileiro, quando os diferentes tipos de agriculturas de fungos passaram a operar de forma similar, voltada para a manutenção das massas e redução de fluxos, mas sem alterar a predileção por um tipo de alimento. Embora as taxas de crescimento microbiano e as taxas metabólicas da comunidade microbiana tenham apresentado forte sazonalidade durante o período avaliado (Tabela 8), as quantidades de DQO e o pH extracelular permaneceram constantes (Figuras 11A e 8A), indicando mecanismos de funcionamento similares a um quimiostato, com processos de controle da dinâmica populacional possivelmente vinculados à estação do ano. As variações em K_s foram substanciais, alterando os parâmetros de saturação da biomassa microbiana. Os efeitos fisiológicos da estação seca, no entanto, não se resumiram ao K_s , se estendendo para a redução de Y_{max} e ao aumento geral dos coeficientes de manutenção celular, indicando alteração da dinâmica de crescimento em prol da manutenção celular. Aparentemente, os controles fisiológicos são extensos, considerando as alterações gerais nos parâmetros biocinéticos conforme a época do ano (Tabela 8). Infere-se que a estação seca impõe fortes restrições hídricas e nutritivas para a fauna e flora locais, impossibilitando o pleno desenvolvimento e crescimento das mesmas, tal como constatado com o pequeno desenvolvimento da vegetação no período das secas (Figura 7). Dessa forma, as respostas voltadas para a redução das taxas metabólicas e de crescimento microbiano podem estar vinculadas a mecanismos de economia energética, visto reduzirem as taxas de assimilação microbianas (Tabela 8).

Em compensação, a manutenção das concentrações de DQO constantes revelou a existência de respostas associadas à manutenção do estado energético extracelular, a qual pode, provavelmente, ter importante papel nos estágios de recuperação observados no início da estação chuvosa, suprimindo a microbiota – e as próprias formigas – com alimentos estocados no espaço extracelular.

As taxas de acúmulo de DQO, no entanto, sofreram alterações sazonais (Tabela 6). Estas flutuações indicam que a estação seca também tem efeitos sobre a capacidade do canal extracelular mediador de fluxos de DQO, tais como potencial enzimático e secreção de produtos de origem microbiana. Entretanto, a DQO permanente (Figura 11) indica o

importante papel da redução da demanda fisiológica da microbiota na manutenção das condições energéticas extracelulares constantes (Tabela 8).

É interessante notar que as mesmas alterações fisiológicas sazonais estão presentes, em escala diferente, na segregação funcional dos diferentes tipos de agricultura, apontando a conservação de propriedades plesiomórficas, as quais se fizeram aparentes durante os períodos críticos da estação fria e seca do interior do estado de São Paulo, Brasil, quando a manutenção da biomassa microbiana ativa tornou-se prioridade, visto o aumento do coeficiente de manutenção celular (Tabela 8). Assim, o controle ou seleção de propriedades funcionais de ecossistemas microbianos pode ter tido importante papel no sucesso das agriculturas de fungos de formigas Attini.

De forma geral, o cenário que emerge destas observações indica que os fluxos gerais foram aumentados em detrimento da manutenção das massas permanentes ao longo do curso evolutivo. Os denominadores fisiológicos apresentaram sazonalidade marcante, indicando modos de operação distintos: um análogo aos sistemas basais, plesiomórficos, caracterizado por elevados coeficientes de manutenção celular e baixas taxas de crescimento específico, tais como os observados nos períodos secos do ano; e outro, apomórfico, caracterizado por reduzidos coeficientes de manutenção celulares e elevadas taxas de crescimento específico, observados exclusivamente nas agriculturas derivadas, em especial as de corte de folhas, com possíveis consequências para as eficiências ecológicas da produção de biomassa microbiana e matéria orgânica dissolvida ao longo do ano.

5.6 EFICIÊNCIAS ECOLÓGICAS DAS TAXAS DE ACÚMULO DE AÇÚCARES E BIOMASSA MICROBIANA EM SISTEMAS EM ESTADO SÓLIDO

Eficiências ecológicas foram definidas neste trabalho como a razão entre a variação líquida, em massa, de um componente e a demanda energética da microbiota no mesmo intervalo de tempo (Δ componente Q^{-1}). Indicam, portanto, a energia gasta pela microbiota para a produção de determinado componente, biomassa ou açúcares produtos de hidrólise.

De forma geral, pode-se observar um aumento nas eficiências ecológicas, tanto de produção de biomassa microbiana quanto de açúcares solúveis extracelulares, das agriculturas

basais para as agriculturas de corte de folhas, indicando que jardins de fungo maximizaram o uso de energia para a produção de biomassa microbiana e açúcares extracelulares. Acréscimos marcantes de eficiências ecológicas foram observados para as taxas de acúmulo de xilose frente às de glicose ao longo do curso evolutivo das agriculturas de formigas Attini, indicando a existência de inversão metabólica, ou seja, alteração nos ritmos de produção de glicose e xilose. Neste caso, a inversão metabólica foi caracterizada pela especialização na geração e acúmulo de xilose em agriculturas de corte de folhas (Tabela 9). A especialização na utilização de xilose em detrimento de outros monossacarídeos também foi observada no perfil fisiológico da comunidade microbiana, indicando que o evento de inversão metabólica também abrangeu a dinâmica de assimilação da comunidade microbiana simbiote (Figura 18).

Os registros de eficiências ecológicas de produção de carboidratos redutores extracelulares similares aos de biomassa microbiana, encontrados em agriculturas de corte de folhas, reforçam a ideia de alteração de estratégia ecológica, privilegiando cada vez mais as taxas de produção de açúcares extracelulares em detrimento da biomassa microbiana. Para tanto, é necessário, além de um maior fornecimento de substrato facilmente degradável e sistemas enzimáticos mais potentes e eficientes, um maior aproveitamento energético da microbiota tanto para o crescimento quanto para a secreção de enzimas, reduzindo a sua capacidade de drenagem de alimentos extracelulares pelo simples fato de necessitar de uma menor quantidade de alimentos para se manter e desenvolver.

No entanto, os registros de (q) observados para as biomassas microbianas de agriculturas de corte de folhas (Tabela 8) foram os mais elevados dentre os materiais de jardins e fungos estudados, indicando que suas microbiotas são drenos extremamente potentes de energia. Os níveis de eficiência ecológica superiores frente aos das demais agriculturas mostraram-se somente possíveis graças à redução do coeficiente de manutenção celular (m) e do aumento do ganho celular (Y_{max}). Assim, embora o consumo de energia tenha se mostrado elevado, as taxas de crescimento mostraram-se ainda maiores, resultando na maior eficiência ecológica da biomassa microbiana de jardins de fungo de corte de folhas.

Já os incrementos nas eficiências de produção extracelular de açúcares redutores, de um modo geral, dependeram não só do maior potencial enzimático (Figuras 15 e 16), mas também da redução do dreno microbiano em agriculturas de corte de folhas, resultando em valores de (Q) similares aos observados para as agriculturas de *Trachymyrmex* (Tabela 8).

Assim, pequenos ganhos no rendimento de hidrólise, sejam pela maior facilidade de acesso ao substrato, maior disponibilidade do mesmo, ou por pequenos incrementos de atividade enzimática, já seriam suficientes para promover a maior eficiência ecológica na geração de açúcares extracelulares solúveis.

Tendo em vista que jardins de fungo de agriculturas derivadas e, principalmente, seu subgrupo de corte de folhas, produzem material solúvel como alimento para a alimentação das formigas, além de biomassa microbiana, a interpretação destes sistemas como biorreatores parece ser mais conveniente, visto que agriculturas de detritos produzem somente biomassa como produto final, excluindo secreções microbianas e produtos de hidrólise acumulados no meio de cultivo.

As eficiências ecológicas extremamente baixas observadas para os materiais de jardins de fungo de agriculturas basais, por sua vez, não são, aparentemente, um indicativo de mau funcionamento destes sistemas, mas um artefato ocasionado pela definição das eficiências ecológicas como derivadas de vetores de fluxos – crescimento microbiano e acúmulo de açúcares extracelulares solúveis. Como esses sistemas operam com taxas de produção de biomassa e açúcares extracelulares muito reduzidas, suas eficiências, por conseguinte, também se tornam inferiores. Tendo em vista que estes sistemas apresentaram os maiores coeficientes de manutenção celular (m) e as menores taxas de crescimento específico (μ) (Tabela 8), seus princípios de funcionamento são totalmente distintos das demais agriculturas de fungos, estando voltados para a manutenção e não para a produtividade.

Dessa forma, a definição geral de eficiência ecológica aqui adotada, voltada para a capacidade produtiva, foi capaz de diferenciar as agriculturas derivadas de seu subgrupo de corte de folhas, mas não foi adequada para a avaliação das agriculturas basais, uma vez que sua aparente estratégia ecológica não está voltada para a produtividade, mas sim para a manutenção. Assim, essas agriculturas de fungos podem não ser eficientes em relação à sustentação de fluxos, isto é, taxas de produção, mas são plenamente adaptadas à sustentação de biomassa microbiana com reduzidas taxas de assimilação (Tabela 8, valores q e Q). As agriculturas basais, dessa forma, não apresentaram as características típicas de um fermentador, ou seja, a produção e acúmulo extracelulares de açúcares e secreções microbianas utilizadas como alimentos pelas operárias (SILVA et al., 2003), mas sim como acumuladores de biomassa microbiana a taxas de crescimento extremamente baixas.

Portanto, os parâmetros biocinéticos da comunidade microbiana e as eficiências ecológicas da produção de açúcares extracelulares e biomassa microbiana (X) (Tabela 9) sugerem que a agricultura basal é k-estrategista, ou seja, voltada para a manutenção da biomassa (ODUM, 1971), enquanto que as superiores e de corte de folhas são r-estrategistas, ou seja, voltadas para a rápida expansão da biomassa microbiana ativa e das quantidades de DQO e açúcares extracelulares.

5.7 ESTRATIFICAÇÃO FUNCIONAL DE JARDINS DE FUNGO DE *A. bisphaerica*

Formigas Attini têm uma estratégia particular para lidar com suas fontes nutricionais. Estas formigas constroem artefatos, ou ninhos, nos quais culturas microbianas são domesticadas dentro de câmaras. Estas culturas, conhecidas como jardins de fungo, são responsáveis pela produção de alimentos para o ninho a partir do material coletado pelas formigas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Dentre os grupos de domesticação conhecidos, o sistema agrícola de corte de folhas, uma subdivisão das agriculturas derivadas praticadas pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (SCHULTZ; BRADY, 2008), são consideradas o ápice da atividade agrícola em Attini (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Estas formigas são únicas porque coletam exclusivamente vegetação fresca para usar como substrato para os micro-organismos simbióticos nos jardins de fungo. Enquanto o fungo mutualista, *L. gongylophorus*, é considerado o principal alimento para as larvas e rainhas (WEBER, 1972; WEBER, 1966; HÖLLDOBLER; WILSON, 2008), os solutos de jardins de fungo são vistos como a principal fonte nutricional das operárias (SILVA et al., 2003).

O jardim de fungo de formigas cortadeiras não é um microbioma homogêneo, mas apresenta estratificação oriunda dos estágios de degradação do substrato (MOLLER et al., 2011). Cada um dos setores possui propriedades independentes, tais como taxas e grupos específicos de atividades enzimáticas (MOLLER et al., 2011), biomassa fúngica – inferida pela quantificação de *N*-acetilglucosamina (MOLLER et al., 2011) e características do substrato inferidas por *microarrays* de polissacarídeos (MOLLER et al., 2011). Uma vez que organismos estão relacionados a modificações na distribuição de alimentos (ODLING-SMEE, 1988), influenciando controles de fluxos de matéria e energia dentro de ecossistemas (JONES

et al., 1994; JONES et al., 1997; CHAPIN et al., 1997), todos esses dados indicam que jardins de fungo têm diferentes propriedades bioenergéticas e ecológicas entre cada estágio de degradação do substrato.

Uma vez que jardins de fungo são responsáveis pela canalização das qualidades e quantidades de alimentos coletados pelas formigas para os ninhos, a determinação do papel bioenergético e da dinâmica produtiva dentro de cada setor é uma questão fundamental relacionada à interação nutricional entre a comunidade microbiana simbiótica e as formigas. Uma vez que materiais de jardins de fungo podem ser interpretados como biorreatores, é possível utilizá-los como o próprio meio de reação, resultando em um novo modo de analisar as suas propriedades funcionais, estratégia utilizada em todas as etapas deste trabalho.

Esta reinterpretação introduz dificuldades técnicas de difícil solução, pois é necessariamente temporal e necessita da determinação da cinética de crescimento microbiano e taxas de acúmulo de solutos – em especial glucose, um dos principais alimentos das operárias (SILVA et al., 2003) – em sistemas em estado sólido. Estudos genômicos, transcriptômicos e proteômicos não são adequados para atender a estas questões porque somente geram imagens estáticas de características potenciais ou expressas que permitem inferências sobre o funcionamento e estratificação do microbioma, mas não são realmente temporais, pois não possibilitam o acompanhamento contínuo de um sistema, visto serem técnicas destrutivas. Entretanto, produzem enorme quantidade de informação e a capacidade de discriminação do papel de cada micro-organismo no sistema.

A estratificação dos jardins de fungo foi uma característica observada em sistemas de corte de folhas (MOLLER et al., 2011) que foi empregada como um indicador de estágios temporais da atividade microbiana dentro dos jardins de fungo. No entanto, esta observação resulta em uma visão estática, pois não identifica os parâmetros dependentes do tempo dentro de cada setor.

No presente trabalho, com o fim de abordar estes parâmetros dependentes de tempo, as medidas das massas, taxas de crescimento e funções particulares de cada micro-organismo foram sacrificadas e o sistema foi observado como um todo, empregando a estratégia da caixa preta, ou seja, interferindo no sistema e avaliando as suas respostas. Esta é uma forma interessante para se determinar as estratégias bioenergéticas e ecológicas das comunidades microbianas em cada setor. Com o fim de mensurar os parâmetros biocinéticos e taxas de acúmulo de biomassa da comunidade microbiana, fez-se a opção por métodos empregados em

microbiologia de solos, devidamente adaptados para seu emprego nos jardins de fungo. Como a dinâmica implica a análise do objeto de estudo em escala temporal, o bioindicador precisa ser igualmente dependente do tempo, funcional, capaz de acompanhar o crescimento microbiano e fornecer indicações de seus parâmetros biocinéticos usando uma mesma amostra de material durante um intervalo de tempo. O método mais interessante para o estudo de um sistema como um todo ao longo do tempo é a respiração induzida por substrato (VAN DER WEERF; VERSTRATE, 1987). A respiração é um indicador fenomenológico da função de um organismo e, quando associada a técnicas de modelagem e simulação, torna-se um poderoso meio para se inferir taxas de crescimento, biomassas ativas e parâmetros biocinéticos de comunidades microbianas (VAN DER WEERF; VERSTRATE, 1987), o alvo deste estudo.

Assim, foram determinadas atividades enzimáticas, e perfis de geração de açúcares extracelulares solúveis durante intervalos de tempo em sistemas em estado sólido ou em suspensão, usando o jardim de fungo como o próprio meio de reação. Também foram determinados os perfis de FTIR, CPMAS-RMN e de difração de raios-X dos diferentes estágios de degradação dos substratos e os parâmetros respirométricos e biocinéticos diretamente dos materiais de jardins de fungo, seja como um todo ou a partir de seus setores, com o fim de se obter uma visão integrada da dinâmica bioenergética e biocinética da comunidade microbiana com as suas estratégias de degradação e produção dentro de um jardim de fungo estratificado, utilizando jardins de fungo de *A. bisphaerica* como sistema modelo.

A sensibilidade da respirometria, somada à identificação de setores morfo-fisiológicos por meio do emprego de observações morfológicas, enzimáticas, difração de raios-X, CPMAS-RMN e espectrometria no infravermelho, permitiu identificar dois setores morfo-fisiológicos com funções igualmente diferentes em jardins de fungo obtidos diretamente dos ninhos desta agricultura de monocotiledôneas (Figura 19), evidenciando a heterogeneidade do sistema. Este resultado contrasta com os observados para jardins de fungo de agriculturas que empregam dicotiledôneas como substrato, ou com os de jardins de fungo destas agriculturas quando mantidos em laboratório (MOLLER et al., 2011), os quais apresentaram três setores morfo-fisiológicos distintos.

Duas regiões puderam ser identificadas. O setor periférico, superficial, aparentemente juvenil devido à manutenção da pigmentação do substrato, foi caracterizado por biomassas

microbianas reduzidas, alta concentração de gongilídeos, presença de atividades amilásicas, xilanásicas e invertásicas – relacionadas ao ataque de material mais facilmente degradável – e taxas elevadas de crescimento e acúmulo de açúcares redutores extracelulares. O setor interno, por sua vez, caracterizou-se por substrato despigmentado levemente amorfo, possivelmente mais velho, com elevada concentração de biomassa microbiana, menor taxa de crescimento, atividades hemicelulásica e pectinásica elevadas e alto consumo de açúcares redutores (Figura 21; Tabelas 10-12). A despigmentação mostra desmontagem de pigmentos, o que desencadeia a liberação de sais minerais de sua composição para o meio. Por sua vez, as hifas mais espessas e o grande número de gongilídeos nas regiões de crescimento rápido acumuladores de açúcar indicam não só acúmulo de carbonos no espaço extracelular, mas também em componentes estruturais e de reserva do fungo mutualista, indicando possível excesso de carbonos produzidos.

A biomassa microbiana reduzida e a maior taxa de crescimento observada nos setores periféricos acumuladores de açúcar redutor implicaram mecanismos de ciclagem de biomassa microbiana, visando a manutenção de sua concentração baixa. A reduzida biomassa contribuiu para o menor consumo de material extracelular (Tabela 11), evidenciando estratégias de manejo possivelmente baseadas em aumento das taxas de repique de fungo. A constante remoção de biomassa microbiana, mantendo suas concentrações sempre baixas, permite reduzir a utilização de produtos oriundos da atividade enzimática extracelular e garantir o caráter acumulador deste setor (Figura 21, Tabela 12). O caráter juvenil do setor periférico tornou-se claro ao se examinar seu perfil enzimático, marcado por atividades amilásicas e invertásicas elevadas, exclusivas desta região (Figura 22B). Uma vez que amido e sacarose são os componentes mais facilmente assimiláveis pela microbiota devido à sua menor refratância química, tornam-se produtos preferenciais para a atuação microbiana. A presença exclusiva destas atividades nas regiões periféricas também sugere que fontes de glicose são preferidas frente às demais existentes no sistema nos estágios iniciais de crescimento da microbiota simbiote.

Entretanto, as atividades pectinásicas e xilanásicas foram surpreendentemente elevadas (Figura 22), sendo as xilanásicas mais presentes nos setores internos assimilatórios, os quais não apresentaram atividades amilásicas ou invertásicas relevantes (Figura 22B). Estes resultados podem estar relacionados com as características nutricionais do substrato utilizado por *A. bisphaerica* em seus fermentadores (Figura 23), isto é, as gramíneas de pastagens, a vegetação majoritária no local de coleta, cujos fragmentos puderam ser

observados nos jardins de fungo. As gramíneas dos gêneros *Brachiaria* e *Paspalum* são caracterizadas por maior teor de xilose (130-160 mg g⁻¹ massa foliar segundo Brito et al., 2003) do que de amido (80-120 mg g⁻¹ massa foliar segundo Ramos et al., 2011, as massas mais elevadas estando relacionadas a solo encharcado) em suas peças foliares. A necessidade de invasão do citoplasma por meio de degradação de parede celular vegetal para posterior ataque do amido, somada à utilização de fontes alternativas de energia para sustentar a biomassa microbiana, principalmente após o esgotamento de fontes de glicose, suportam as atividades hemicelulásicas mais elevadas, principalmente nos setores internos assimiladores (Figura 24B). Estas regiões apresentaram taxas de crescimento reduzidas, relacionadas ao aumento da constante de afinidade a substrato (Tabela 10). Também apresentaram concentração de biomassa elevada (Tabela 11) e remoção de açúcar redutor extracelular (Tabelas 11-12), dinâmica que foi cancelada com a inibição da microbiota (Figura 21). Aparentemente, são setores de recuperação de biomassa microbiana, visto o maior coeficiente de manutenção celular (Tabela 10).

Um aspecto relevante da enzimologia extracelular de jardins de fungo de *A. bisphaerica* foi a elevada atividade quitinásica (Figura 22), a qual mostrou-se relacionada com as taxas de crescimento microbiano (Tabela 10). Tendo em vista que a parede celular fúngica é composta predominantemente por quitina e sua degradação pode estar relacionada com a expansão dos ápices das hifas, a relação entre atividade quitinásica e taxas de crescimento é plausível e pode levar à liberação de alimentos das hifas ou dos gongilídeos para o espaço extracelular. O papel das enzimas autolíticas na dinâmica das paredes celulares de fungos foi sugerido por Rosenberger (1979).

Outra característica enzimática interessante foi a presença de atividades celulásicas residuais, das quais as atuantes sobre celulosas cristalinas estiveram presentes apenas nas regiões periféricas acumuladoras de açúcar redutor (Figura 22B). O fraco ataque sobre celulose, junto com o processamento mecânico de substrato pelas formigas, pode ser importante para a invasão e colonização do substrato pelo micélio fúngico. Entretanto, a atividade celulásica residual mostrou-se insuficiente para a utilização de celulose como fonte de energia, tendo em vista a grande quantidade de glicose em fibra no material residual obtido após ataque enzimático com microbiota inativa e proteção contra proteólise e as evidências de preservação de celulose e ganhos de cristalinidade indicadas por FTIR, CPMAS-RMN e XRD (Figura 23). O exame em FTIR do material do setor interno (Figura 23A) mostrou consumo elevado de xilanas e pectinas e alguma utilização de porções amorfas de substrato

relacionadas à celulose, elevando o aumento da cristalinidade da amostra final (Figura 23C). No entanto, o ensaio de CPMAS-RMN revelou algum ataque a componentes fenólicos, oriundos de compostos tânicos ou ligninas, indicando que estes compostos são lentamente degradados no sistema (Figura 23B). Dessa forma, celulose e lignina serviriam como suporte para o crescimento microbiano e garantiriam a estrutura tridimensional dos jardins de fungo, uma vez que a degradação destas fibras poderia levar ao colapso dos poros destinados à circulação de formigas e à ventilação do fermentador, ou mesmo ao desbalancamento nutricional da relação entre jardins de fungo e formigas (Figura 34B). Sua preservação, no entanto, é dependente do tempo de residência no sistema, uma vez que existem atividades relacionadas à sua degradação (Figuras 22 e 23B).

Todos estes fatores evidenciam a complexidade de operação dos jardins de fungo e sua caracterização adequada como fermentadores em estado sólido capazes de acumular açúcares redutores na ausência de formigas, com metabolismo periférico amilolítico, hemicelulolítico, pectinolítico e sacarolítico, e metabolismo interno hemicelulolítico e pectinolítico, preservando a estrutura lignocelulolítica para suporte e estruturação do fermentador. Tendo em vista a dinâmica de manutenção de biomassa (Tabela 10) utilizando fontes de carbono e energia de degradação mais lenta que o amido no núcleo central dos jardins de fungo (Figura 24B) devido às perdas das respostas respirométricas sobre glicose (relação entre as Figuras 24A e 24B) e às propriedades enzimáticas de cada setor (Figura 23B), é possível inferir que sistemas de corte de folhas, embora com dinâmica funcional totalmente diferente dos sistemas basais, apresentam características funcionais análogas os grupos plesiomórficos, conservadas nas áreas regenerativas de biomassa (aumento dos coeficientes de manutenção celular nos setores internos, Tabela 10). A plasticidade funcional observada entre estações secas e chuvosas (Tabela 8) está, assim, igualmente presente na estruturação funcional destes fermentadores naturais (Tabelas 10-11).

5.8 COMPROVAÇÃO DO AUMENTO GERAL DE FLUXOS USANDO RADIOTRAÇADORES

Glicose é fonte de carbono e energia importante para a sobrevivência de operárias (SILVA et al, 2003) e do fungo mutualista (SIQUEIRA et al, 1998), e o ritmo de sua

produção pode estar diretamente relacionado com a capacidade de sustentação demográfica de ninhos de formigas Attini. Isto porque a demografia depende, em última análise, tanto da capacidade de produção de biomassa microbiana quanto da disponibilização de alimentos solúveis extracelulares. Portanto, compreender a dinâmica de geração, acúmulo e consumo microbiano de glicose nos diferentes jardins de fungo tem importância para a identificação das estratégias ecológicas adotadas em cada um destes microbiomas para o suprimento de alimentos para os ninhos. Utilizando uma abordagem ecológica *top-down* que envolveu a generalização da organização dos jardins de fungo por meio de um modelo de compartimentos e fluxos e um denominador comum de matéria, Carbono, foi possível mapear os fluxos de glicose utilizando radiotraçadores, respirometria, atividades enzimáticas e bloqueadores do metabolismo microbiano em jardins de fungo de quatro diferentes tipos de agricultura de fungos durante o ano de 2010.

Embora este estudo trate os fluxos de glicose de forma ainda parcial, tendo em vista que demais arcos de secreção de produtos oriundos do metabolismo de glicose não tenham sido abordados devido a impossibilidades tecnológicas, tais como a exigência de sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência hifenados a contadores de radiação β , os resultados indicaram que jardins de fungo maximizaram fluxos de C-glicose frente às massas da existência permanente ao longo do curso evolutivo por meio de alterações de controles microbiológicos e bioquímicos. As mudanças indicaram alterações nas estratégias ecológicas, da manutenção de biomassa, observada em jardins de fungo pertencentes a agriculturas basais, para a produtividade e a ciclagem de biomassa microbiana, glicose e proteínas extracelulares, verificadas em jardins de fungo de agriculturas derivadas, em especial os de corte de folhas.

As comparações de três grupos de agriculturas de fungos distintas mostraram que os fluxos de C-glicose em relação às biomassas permanentes de micro-organismos foram maiores nas agriculturas derivadas, em especial no grupo de corte de folhas (Figuras 25 e 26), indicando uma estratégia ecológica em prol da produtividade e ciclagem de massa celular de micro-organismos e glicose, pois as concentrações permanentes de ambos estes componentes permaneceram constantes mesmo com o aumento geral de fluxos relacionados aos seus respectivos vetores de acúmulo de carbonos (Figuras 25 e 26).

Os jardins de fungo de corte de folhas apresentaram as maiores taxas de acúmulo extracelular de C-glicose, as quais se mostraram vinculadas não só à maior capacidade de

geração de C-glicose extracelular pelo canal enzimático, como também a uma menor taxa de assimilação bruta de C-glicose pela microbiota ativa em relação aos jardins de fungo de *T. fuscus*, com desempenho muito parecido, mas menor capacidade de acúmulo de C-glicose extracelular (Figuras 25 e 26). Assim, os maiores ganhos extracelulares de C-glicose nas agriculturas de corte de folhas seriam o resultado de um balanço entre taxas de produção e taxas de assimilação microbianas.

Esse balanço tornou-se claro ao se verificar a demanda das microbiotas de corte de folhas por C-glicose (Figuras 25 e 26). A taxa de assimilação bruta de C-glicose observada para jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas manteve-se similar às taxas de assimilação observadas para os sistemas de *T. fuscus*, mesmo apresentando biomassa microbiana inferior nestas agriculturas de corte de folhas. As suas taxas de assimilação líquida foram, assim, superiores às das demais agriculturas, indicando forte capacidade de drenagem de componentes gerados pela biodegradação de substrato forrageado. Por conseguinte, as altas taxas de incorporação de C-glicose observadas nas microbiotas dos jardins de fungo destas agriculturas poderiam resultar em aumentos nas taxas de crescimento microbiano, intensificando ainda mais o potencial de drenagem de produtos de hidrólise extracelular.

No entanto, as biomassas microbianas de jardins de fungo de corte de folhas permaneceram sempre reduzidas ao longo de todo o período de avaliação. Diante destes dados, é possível inferir a existência de elevadas taxas de ciclagem de biomassa microbiana, garantidas pelo manejo ou predação dos jardins de fungo pelas formigas, as quais seriam capazes de manter as reduzidas massas microbianas destes sistemas e, assim, controlar a capacidade do dreno microbiano de C-glicose a níveis toleráveis, preservando as taxas de acúmulo extracelulares de glicose.

Uma importante característica demonstrada por todos os sistemas avaliados foi a constância dos teores de água, quantidades de glicose no substrato forrageado, quantidades extracelulares de glicose e suas taxas de acúmulo nos jardins de fungo, resultados que apontam para mecanismos regulatórios capazes de manter a constância do meio extracelular e do material fornecido para o jardim de fungo. Embora as taxas de produção de C-glicose tenham apresentado dinâmica sazonal, as taxas de assimilação microbiana também apresentaram comportamento dependente da estação do ano (Figuras 25 e 26). Dessa forma, o enfraquecimento do canal gerador de glicose extracelular foi compensado pelo concomitante enfraquecimento do dreno microbiano de glicose, garantindo as quantidades permanentes e as

taxas de acúmulo extracelulares deste monossacarídeo. Este resultado difere daqueles anteriormente observados para sistemas em estado sólido (Tabela 6), fator possivelmente relacionado ao número amostral, muito menor nestes ensaios com traçadores radioativos (N=3), e à heterogeneidade do material. Entretanto, estes resultados indicam a existência de mecanismos compensatórios da composição do espaço extracelular, os quais são possivelmente relevantes para a sustentação das operárias e para os períodos de recuperação fisiológica dos jardins de fungo após a estação seca, devido ao menor desenvolvimento de vegetação com a escassez hídrica (Figura 7). Assim, todo o sistema operaria para garantir sua manutenção e recuperação. Além disso, a dinâmica sazonal demonstrou a existência de mecanismos de controle e regulação dependentes da época do ano, revelando que jardins de fungo possuem razoável plasticidade para lidar com diferentes regimes ambientais, incluso qualidade e quantidade de substrato oferecido para processamento.

A plasticidade sazonal dos jardins de fungo frente à qualidade de substrato pode ser verificada por meio das variações nas atividades enzimáticas celulásicas e amilásicas, potenciais geradoras de glicose extracelular, ao longo do ano (Tabela 13). Enquanto que as atividades celulásicas permaneceram estatisticamente constantes durante o período avaliado, as atividades amilásicas sofreram fortes oscilações sazonais, decaindo durante o período de inverno seco típico da região (Figura 5). Tendo em vista que atividades enzimáticas são induzidas pelo tipo de substrato, estas variações são, possivelmente, respostas à qualidade do substrato oferecido às microbiotas. Além disso, as atividades amilásicas e celulásicas mostraram-se distintas entre os diferentes tipos de jardins de fungo, resultado provavelmente decorrente dos tipos de substrato oferecidos pelas formigas.

A predileção por substrato amiláceo demonstrada pelas agriculturas derivadas (Tabela 13) acompanhou os potentes vetores de fluxos de C-glicose a partir do substrato oferecido como alimento para os jardins de fungo (Figuras 25 e 26). Potentes atividades amilásicas já foram relatadas para o micobionte *L. gongylophorus* em culturas puras (SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006b), indicando que o fungo mutualista destas agriculturas tem importante papel nos fluxos de C-glicose dentro dos jardins de fungo. É possível inferir que o uso de substratos menos refratários ao ataque enzimático, dependente da atividade de forrageio das formigas, vinculado à elevada expressão de um sistema enzimático amilolítico pela microbiota simbiote, seja responsável pelos potentes vetores de fluxos verificados nas agriculturas derivadas. Por sua vez, a expressão de um sistema enzimático generalista pelos jardins de fungo da agricultura basal de *M. parallelus*, dependente de celulose - polímero

recalcitrante e, por isso, de lenta degradação - pode estar relacionada à utilização de material mais decomposto e, assim, carente de polissacarídeos de fácil degradação. Como resultado, seus sistemas enzimáticos não seriam capazes de suportar fluxos de C-glicose intensos, mas poderiam lidar com uma gama maior de substratos, visto sua maior diversidade enzimática.

Além do envolvimento microbiológico e polissacaridásico com as taxas de acúmulo de C-glicose extracelular, outro fator importante sobre a dinâmica de produção de C-glicose foi o efeito negativo da atividade proteolítica nativa sobre o desempenho do canal enzimático (Tabela 14). Atividades proteolíticas serinoproteásicas e metaloproteásicas foram relatadas como as principais formas existentes em jardins de fungo, havendo predomínio de formas serinoproteásicas em *Trachymyrmex* e metaloproteásicas em agriculturas de corte de folhas e sistemas basais (SEMENOVA et al., 2011). Tal distinção pode ter efeitos regulatórios relevantes nos controles proteolíticos do canal gerador de glicose entre os diferentes tipos de jardins de fungo. Embora não tenha sido possível precisar o efeito proteolítico sobre cada tipo de atividade enzimática em sistemas em estado sólido, este efeito foi acompanhado por uma resposta secretória microbiana relacionada às taxas de reposição de C-proteínas. Esta resposta acompanhou tanto o incremento nos fluxos de C-glicose (Figuras 25 e 26) quanto o impacto da atividade proteolítica sobre o canal enzimático extracelular (Tabela 14).

A dinâmica de reposição de C-proteínas mostrou uma clara diferenciação das estratégias de produção e utilização de C-glicose extracelular pelos jardins de fungo de *A. balzani* e *A. bisphaerica*, as quais, no entanto, apresentaram capacidades equivalentes quanto ao acúmulo de C-glicose extracelular. O jardim de *A. balzani* não só consumiu mais C-glicose para sua manutenção e crescimento, como também empregou maior número de carbonos oriundos de glicose na síntese de proteínas destinadas à secreção, sendo um sistema com fluxos muito mais intensos que os de *A. bisphaerica*, assemelhando-se aos sistemas de *T. fuscus*, salvo na redução da biomassa microbiana permanente e na maior capacidade do canal enzimático da agricultura de corte de folhas em questão. A microbiota dos jardins de fungo de *T. fuscus* também utilizou quantidades levemente superiores de C-glicose para o crescimento microbiano quando comparadas com as de *A. balzani* (Figuras 25 e 26). Dessa forma, os jardins de fungo de *A. bisphaerica* encontraram uma solução mais econômica em relação aos fluxos de C-glicose, não só devido ao menor emprego de C-glicose para o crescimento microbiano, como também para a síntese e secreção de proteínas. Neste caso, a redução da secreção de proteínas acompanhou a menor suscetibilidade do canal enzimático à proteólise nativa, fator que reduziu a demanda por reposição proteica extracelular.

Já os jardins de fungo de *M. parallelus* apresentaram dinâmica totalmente distinta dos demais avaliados, com elevadas massas permanentes de micro-organismos, baixas quantidades permanentes de C-glicose extracelular e reduzido fluxo de C-glicose (Figuras 25 e 26). O elevado efeito da proteólise sobre a produção de C-glicose extracelular (Tabela 14) não foi acompanhado por incrementos nas taxas de secreção de C-proteínas derivadas de C-glicose, indicando uma maior utilização de C oriundos de outros substratos em relação às demais agriculturas. Sua elevada biomassa microbiana permanente, somada ao reduzido fluxo global de C-glicose, também sugerem que este sistema está mais voltado para a manutenção de biomassa microbiana que para incrementos de fluxos ou produtividade, indicando estratégia ecológica totalmente distinta, talvez relacionada com os hábitos de vida ou nutrição destas formigas. É possível que estes jardins de fungo funcionem como acumuladores, e não como fermentadores de fluxo contínuo, garantindo a demanda nutricional de seus pequenos ninhos e estoques de alimentos para períodos críticos, tais como as épocas de revoada.

Estes resultados apontam para um cenário evolutivo onde a qualidade do material forrageado, a dinâmica de utilização de C-glicose pela microbiota simbiote e os mecanismos bioquímicos de controle do canal enzimático gerador de C-glicose nos jardins de fungo tiveram forte relação com incrementos de produtividade. A maximização dos fluxos já foi postulada para a evolução de ecossistemas (LOTKA, 1922; ODUM, 1983), desempenhando papel importante no seu funcionamento (EIGEN; SCHUSTER, 1979). As mudanças nas capacidades de geração, utilização e controle de fluxos de C-glicose, avaliadas comparativamente para diferentes tipos de jardins de fungo localizados em posições filogenéticas distintas (Figuras 25 e 26), indicaram que a seleção para propriedades fisiológicas específicas da comunidade microbiana e características enzimáticas extracelulares particulares, em especial a especialização enzimática e a influência proteolítica, podem ter tido importante papel na evolução das agriculturas de fungos. Uma vez que as mudanças nas propriedades dos ecossistemas já foram indicadas como o resultado indireto da seleção para diferentes características demográficas e funcionais nos organismos envolvidos (LOREAU, 1998), é possível inferir que a engenharia destes pequenos ecossistemas tenha tido importância fundamental no controle de fluxos de alimentos, com reflexos demográficos sobre os ninhos de formigas, visto o importante papel da produtividade de biomassa microbiana (WEBER, 1972; WEBER, 1966; HÖLLDOBLER; WILSON, 2008) e de glicose (SILVA et al., 2003) sobre a nutrição e sobrevivência dos ninhos.

5.9 MECANISMO DE PULSO E O PAPEL DA PROTEÓLISE NA GERAÇÃO DE GLICOSE

Dentre os açúcares redutores produzidos por jardins de fungo, a glicose desponta como um dos principais responsáveis pelo tempo de sobrevivência de operárias pertencentes ao grupo de domesticação conhecido como agriculturas de corte de folhas, além de ser um dos principais produtos extracelulares dos jardins de fungo cuja geração foi maximizada ao longo do seu curso evolutivo. A avaliação dos mecanismos cinéticos capazes de gerar esta maciça amplificação de produção de glicose possui complicadores relacionados à avaliação contínua de sistemas em estado sólido. No entanto, a compreensão, mesmo que aproximada, destes mecanismos é indispensável para o entendimento da evolução dos diferentes tipos de agricultura de fungos. Para tanto, jardins de fungo pertencentes a diferentes tipos de agriculturas de fungos foram coletados e suspensos em solução tamponada para investigação da dinâmica de produção de glicose na ausência de formigas, biomassa microbiana ativa ou proteólise.

Esta interferência no sistema permitiu a investigação e modelagem da dinâmica de produção de glicose. No entanto, esta forma de análise distancia as respostas obtidas daquelas resultantes de um sistema em sua condição real, neste caso em estado sólido, mas permite a exploração de perturbações externas no meio extracelular de forma constante. A inferência da dinâmica de geração e acúmulo de glicose nos solutos de jardins de fungo foi avaliada seguindo este modelo.

Jardins de fungo de *T. fuscus*, pertencentes ao grupo das agriculturas derivadas, apresentaram a maior potência de geração de glicose extracelular, visto suas curvas de progressão para glicose acumulada no meio extracelular em sistemas em suspensão com microbiota inibida e suas quantidades de unidades enzimáticas relacionadas às atividades celulásicas e, principalmente, amilásicas (Figura 27C e Tabela 16). No entanto, esta maior potência de geração de glicose extracelular não se traduziu em maiores taxas de acúmulo de glicose nos solutos de jardins de fungo com microbiota ativa (Figura 27C), tendo em vista as elevadas taxas de assimilação bruta (Q) de glicose observadas nestes sistemas (Tabela 17). A redução da capacidade de acúmulo de glicose em materiais de jardins de fungo de *M. parallelus* com microbiota inibida (Figura 27D), somada às elevadas taxas de assimilação destes sistemas representantes da agricultura basal (Tabela 17), levaram a uma dinâmica ainda

mais estável, sem a existência de taxas de acúmulo mensuráveis de glicose extracelular e, portanto, sem fornecimento relevante deste monossacarídeo para o ninho. Aparentemente, jardins de fungo de *M. parallelus* adotaram uma estratégia ecológica totalmente distinta, baseada na utilização de glicose para a manutenção e crescimento da biomassa microbiana.

Situação totalmente diferente foi observada para os jardins de fungo de corte de folhas. Em ambos os casos avaliados, as taxas de acúmulo de glicose com microbiota ativa foram bastante elevadas, mesmo apresentando potencial enzimático *in vitro* inferior em relação aos jardins de fungo de *T. fuscus* (Tabela 13). Entretanto, a capacidade do canal enzimático das agriculturas de corte de folhas, quando avaliada em sistemas em estado sólido com microbiota inibida, mostrou-se superior a de *T. fuscus*, indicando a influência do modelo de ensaio para a avaliação da capacidade geradora de glicose nos jardins de fungos, uma vez que a suspensão em tampão altera distribuições locais de enzimas e concentrações de produtos. Esta capacidade de acúmulo extracelular de glicose também se mostrou intimamente vinculada ao modo de operação da microbiota, tendo em vista que ambos os jardins de fungo de corte de folhas apresentaram taxas de acúmulo de glicose com microbiota ativa mais altas do que com microbiota ou proteólise inibidas (Figuras 27A e B).

Este aspecto indica o importante papel da microbiota em controlar as quantidades de glicose acumuladas no espaço extracelular. A manutenção de reduzidas massas microbianas (Tabela 15) e taxas de crescimento específicas baseadas em glicose (Tabela 16) mostraram-se fundamentais para a geração do perfil de acúmulo em pulso observado nas agriculturas de corte de folhas (Figuras 27A e B), uma vez que estes parâmetros estão diretamente vinculados às taxas de assimilação da microbiota e, portanto, à drenagem de glicose extracelular produzida (Tabela 17). A dinâmica em pulso caracteriza este aspecto com clareza, pois a redução drástica das quantidades de glicose extracelulares após períodos de 6 horas de incubação estão diretamente relacionadas às taxas de acúmulo da biomassa microbiana em crescimento, como sugerido pelos estudos de simulação (Tabela 16, parâmetro μ). O forte pulso de produção de glicose observado para os jardins de fungo de corte de folhas também só se mostrou possível graças à manutenção de reduzidas massas microbianas (Tabela 15). Caso contrário, o dreno de glicose seria suficientemente potente para reduzir a amplitude do pulso a níveis similares aos observados nos jardins de fungo de *T. fuscus* (Figura 27C), ou mesmo suficientes para eliminar qualquer possibilidade de acúmulo extracelular de glicose e, conseqüentemente, sua disponibilização para o ninho. Este último caso seria tipicamente

caracterizado como uma agricultura, pois não geraria nenhum tipo de produto de hidrólise acumulado no espaço extracelular para posterior consumo.

O perfil de acúmulo em pulso com microbiota ativa em sistemas em suspensão também indica a importância do tempo de residência das enzimas extracelulares nos jardins de fungo e do papel da biomassa microbiana em sustentar os níveis enzimáticos adequados para o provimento de glicose extracelular. Além do balanço entre assimilação e produção de glicose extracelular, a proteólise, em especial a atividade serinoproteásica (Figura 28), mostrou importante papel na dinâmica de produção (Figura 27). Os acréscimos de produção de glicose com proteólise inibida, em geral, foram substanciais quando comparados com os obtidos em ensaios com microbiota inibida e proteólise ativa, apontando a importância do ataque proteolítico na regulação negativa do canal enzimático e o controle microbiológico da ciclagem enzimática na sustentação das taxas de produção de glicose (Figuras 25 e 26).

Os estudos matemáticos dos perfis de geração de glicose em jardins de fungo mostraram diferentes estratégias de manutenção da atividade enzimática com resultados similares para as curvas de acúmulo de glicose extracelular em sistemas de corte de folhas (Tabela 16). Enquanto que jardins de fungo de *A. balzani* apresentaram taxas de proteólise muito mais elevadas, causando incrementos significantes nas taxas de secreção de enzimas nos estudos de simulação ($Fator = 3$, Tabela 16), o canal enzimático responsável pela produção de glicose em jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentou incrível resistência proteolítica, mesmo quando submetido ao aparato enzimático de *A. balzani* (Figura 28B).

Esta solução mostrou-se vinculada à forte estabilidade enzimática do sistema de *A. bisphaerica* à proteólise, ou à ausência de proteólise significativa nestes sistemas. A resistência proteolítica do sistema de produção de glicose de *A. bisphaerica* foi colocada à prova por meio do transplante enzimático, i.e., transferência de enzimas extracelulares de *A. balzani* para as suspensões de jardins de fungo da agricultura de *A. bisphaerica*. A forte atividade proteolítica de jardins de fungo de *A. balzani* no sistema enzimático de *A. bisphaerica* não foi capaz de reduzir a atividade geradora de glicose deste último (Figura 29). Já o transplante das enzimas dos jardins de fungo de *A. bisphaerica* para as suspensões de *A. balzani* reativou a produção extracelular de glicose em jardins de fungo em suspensão já estabilizados (Figura 29). Estes resultados indicam que o canal gerador de glicose extracelular de *A. bisphaerica* é resistente à proteólise e, possivelmente, este é um dos grandes motivos para a menor ciclagem de proteínas extracelulares nestes sistemas (Figuras 25B e 26B) e sua

consequente economia de glicose assimilada, embora tal resultado não tenha sido obtido com sistemas em suspensão (Tabela 17). Possivelmente, estas diferenças são decorrentes das alterações nas concentrações de glicose no meio e à redução da heterogeneidade espacial de distribuição de alimentos entre os jardins de fungo de *A. bisphaerica* e *A. balzani*.

Os resultados apontaram para um cenário evolutivo para os diferentes tipos de agriculturas de formigas Attini caracterizado pela maximização de um mecanismo gerador de glicose em pulso, marcado nas agriculturas de corte de folhas. Este mecanismo mostrou-se controlado negativamente tanto pela atividade serino-proteásica quanto pela assimilação microbiana, e positivamente pela reposição proteica promovida pela biomassa microbiana ativa. A dependência da defasagem entre produção e assimilação microbianas para a formação do pulso pode ser avaliada por meio de modelagem. Esta defasagem indicou que mecanismos de controle externo da densidade microbiana nos jardins de fungo foram fundamentais para a amplificação das taxas de produção de glicose ao longo do curso evolutivo, tendo em vista a relevância do dreno microbiano e das taxas de secreção proteica, estas últimas aparentemente dependentes da taxa de ciclagem de biomassa microbiana, sobre o canal enzimático produtor de glicose extracelular.

5.10 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO A INIBIDORES DE ENDOXILANASES

Endoxilanases de *L. gongylophorus* pertencem à família 11 de endoxilanases (SCHIØTT et al., 2008), e a atividade xilanásica mostrou-se a principal produtora de açúcares extracelulares assimiláveis pela comunidade microbiana de jardins de fungo. Portanto, é a principal candidata a estudos de inibição para triagem de produtos naturais capazes de afetar o funcionamento dos jardins de fungo.

A atividade xilanásica extracelular de materiais de jardins de fungo de *A. bisphaerica* mostrou decaimento em presença de atividades metaloproteásicas (Figura 32). No entanto, as mesmas atividades metaloproteásicas apresentaram atuação sobre inibidores protéicos da atividade xilanásica (Figura 31). Ao considerar ambos os efeitos da proteólise, a sua atuação na remoção de inibidores proteicos presentes em paredes celulares de substratos forrageados foi mais acentuada que o seu papel na redução da atividade xilanásica (Figuras 30 e 31),

levando a um ganho líquido de atividade decompositora sobre hemiceluloses – “um mal necessário”.

As taxas metabólicas de jardins de fungo sofreram forte impacto na presença de extratos inibitórios da atividade xilanásica, com redução média igual a 25% (Figura 33). No entanto, esta alteração não foi permanente, indicando que inibidores proteicos presentes em paredes celulares, embora eficientes por curto período de tempo, não são capazes de sustentar o efeito inibitório a ponto de deteriorar o funcionamento dos jardins de fungo. Isto se deve, possivelmente, ao controle proteolítico extracelular maciço, tendo em vista seus efeitos positivos sobre a sustentação das atividades xilanásicas em presença de extratos parcialmente purificados de inibidores.

5.11 RESILIÊNCIA DE JARDINS DE FUNGO À INTERFERÊNCIAS DECORRENTES DA ADIÇÃO DE CELULASES EXÓGENAS

Abril e Bucher (2002) constataram a ausência de metabolismo de celulose por *L. gongylophorus*, contrastando com dados de Bacci et al. (1995), possivelmente devido às diferenças metodológicas entre os trabalhos. Moller et al. (2011), por sua vez, verificaram incrementos nas quantidades de estruturas amorfas em jardins de fungo de formigas cortadeiras, contrastando com os resultados deste trabalho (Figura 23), mas seus métodos de quantificação envolveram maceração, procedimento que altera o grau de cristalinidade dos substratos analisados. Já a investigação extensa de De Fine Licht et al. (2009) encontrou valores de celulases relevantes, mas o uso de métodos de quantificação por formação de halos em placas, substratos com grupos cromóforos sintéticos e pHs de reação diferentes dos observados em jardins de fungo impossibilitam qualquer comparação quantitativa, ou mesmo qualitativa, dos grupos enzimáticos existentes nas condições encontradas nos jardins de fungo.

Em contrapartida, os estudos enzimáticos e espectrométricos de jardins de fungo de *A. bisphaerica* mostraram a existência de pequena capacidade de degradação de celulose em ensaios com microbiota inibida e sistemas enzimáticos extracelulares autóctones preservados (Figura 22), contrastando com sistemas de agriculturas basais (Figuras 15 e 16), celulolíticos e dominados por grande quantidade de biomassa microbiana (Tabela 8). Tendo em vista que

as fibras de celulose poderiam servir como elemento estrutural para os jardins de fungo desta espécie de formiga cortadeira, *A. bisphaerica*, especulou-se sobre a possibilidade de que a incorporação de sistemas celulásicos exógenos nestes jardins de fungo poderiam promover incrementos significativos de glicose no sistema, causando a desestabilização estrutural e fisiológica do mesmo, levando ao aumento do crescimento microbiano, ou mesmo indução de micro-organismos dormentes. Dessa forma, a incorporação de celulasas exógenas promoveria alterações fisiológicas, as quais podem ser monitoradas por meio de respirometria de modo contínuo. Assim, a incorporação de celulasas exógenas poderia ser um mecanismo útil para o controle biorracional destas formigas, popularmente conhecidas como formigas mata-pasto.

As taxas metabólicas de jardins de fungo sofreram algum impacto na presença de extratos brutos de celulasas de *P. citrinum* (Figura 34). No entanto, esta alteração não foi permanente quando os jardins de fungo foram expostos a 100 U de celulasas, tal como a obtida com inibidores de xilanases, indicando que jardins e fungos são capazes de filtrar alterações enzimáticas exógenas. Entretanto, a resiliência apresentou um limite, uma vez que a exposição dos materiais de jardins de fungo a 300 U de celulasas não foi filtrada, promovendo alterações fisiológicas marcantes nestes microbiomas. Tendo em vista o decaimento da atividade celulásica extracelular nos ensaios que utilizaram 100 U de celulasas, é possível que a proteólise, novamente, tenha importante papel sobre o controle das atividades enzimáticas extracelulares. Infelizmente, o uso de inibidores proteolíticos fica comprometido em ensaios com microbiota ativa, pois esta é capaz de competir com a inibição exógena por meio da regulação da secreção de proteases, fator que impede a comprovação do papel proteolítico sobre o controle da atividade celulásica.

5.12 PROTEÓLISE E A RESILIÊNCIA A PERTURBAÇÕES FUNCIONAIS RELACIONADAS À ATIVIDADE XILANÁSICA

Jardins de fungo de *A. bisphaerica* apresentaram forte resiliência a perturbações externas, tais como a inclusão de inibidores de xilanases ou a incorporação de celulasas exógenas (Seções 4.10 e 4.11, respectivamente). Em ambos os casos, a proteólise pareceu ser um importante mecanismo de controle extracelular do canal enzimático, sendo, portanto, um

elemento regulatório sobre os sistemas enzimáticos extracelulares e mecanismos proteicos ou peptídicos de inibição enzimática.

Assim, a proteólise extracelular ganha importância ao despontar como um potente mecanismo de regulação bioquímica, não se restringindo apenas à obtenção de alimentos extracelulares, reciclagem enzimática ou mesmo a algum papel imunológico dentro dos jardins de fungo.

A regulação bioquímica extracelular garantida pela proteólise, somada aos constantes ajustes fisiológicos e secretórios da microbiota ao longo do ano, formam, portanto, um intrincado mecanismo de regulação que mantém as concentrações extracelulares de alimentos nos jardins de fungo estáveis ao longo do ano.

5.13 RELAÇÕES ENTRE MASSAS E PRODUTIVIDADE

Formigas Attini constroem ninhos contendo culturas microbianas simbiotes para lidar com o seu ambiente, conhecidas como jardins de fungo. Estes microbiomas prestam serviços de biodegradação e síntese de biomassa para conversão de matéria orgânica coletada em alimentos utilizáveis pelos ninhos. Uma vez que os jardins de fungo são os canalizadores imediatos de fluxos de matéria e energia para as formigas, suas particularidades funcionais devem ter importante papel na ocupação de nichos ecológicos e história de vida de cada espécie. Portanto, espera-se coordenação entre as propriedades metabólicas dos jardins de fungo com as atividades de coleta das formigas e com o tipo de serviço que prestam ao ninho. Estes serviços foram identificados por meio de análises de fluxos de matéria e energia e massas permanentes, e incluem o acúmulo e estocagem de alimentos, a produtividade de açúcares solúveis e a produtividade de biomassa microbiana. A identificação das relações existentes entre material coletado, capacidade metabólica e tipos e ritmos de produção é fundamental para a compreensão mais abrangente dos mecanismos evolutivos e ecológicos que estiveram envolvidos na diferenciação dos grupos de agriculturas de fungos, possibilitando o acesso às bases mecanicistas da evolução mediada por simbiose em agriculturas de fungos de formigas Attini.

Para tanto, técnicas espectroscópicas, químicas, enzimáticas e respirométricas foram empregadas para a avaliação das características dos substratos e padrões metabólicos de materiais de jardins de fungo pertencentes a diferentes grupos de agricultura de fungos, possibilitando a análise comparativa dos eventos em escala filogenética. Verificou-se que a alteração do estado de degradação do material forrageado foi acompanhada pela mudança na oferta de substratos contendo glicose e xilose (Tabela 4). Substratos mais decompostos mostraram perdas de material menos refratário ao ataque enzimático e ganhos proporcionais de Glc, possivelmente devido ao aumento relativo de estruturas cristalinas e amorfas refratárias tais como celulose. As atividades enzimáticas revelaram a presença de sistemas decompositores generalistas e lentos nas agriculturas basais, em contraste com os sistemas decompositores especialistas rápidos, baseados em material menos refratário, tais como amido e hemicelulose, das agriculturas de corte de folhas. A especialização enzimática (Figuras 15 e 16), somada ao tipo de material oferecido como substrato (Tabela 4), resultou em alterações nas taxas de produção de glicose e xilose, as quais foram intensificadas (Tabela 6). Foi verificado que, durante o processo, ocorreu inversão metabólica, ou seja, aumento das taxas de produção de xilose em relação às de glicose, evento que se fixou nas agriculturas de corte de folhas (Tabela 6).

Alterações nos padrões enzimáticos já foram observadas entre agriculturas de fungos utilizando ensaios em placa com substratos artificiais (AZCL) (DE FINE LICHT et al., 2009), e relações entre alterações para simbiontes especializados e tamanho de colônias maiores já foram estipuladas (DE FINE LICHT et al., 2009). No entanto, a falta de conexões entre a estrutura do substrato e as características fisiológicas da comunidade microbiana e incoerências nos ensaios enzimáticos levaram a interpretações incorretas da evolução fisiológica das agriculturas de fungos, impedindo a constatação da inversão metabólica naqueles estudos. Os trabalhos comparativos extensos sobre a estrutura enzimática de jardins de fungo feitos por De Fine Licht et al. (2009) empregaram uma forma de ensaio que produziu resultados incertos devido aos problemas de difusão em placa e manutenção das atividades proteásicas extracelulares. Como resultado, as atividades proteolíticas mostraram-se muito altas e encobriram as demais, uma vez que os extratos empregados não possuíam microbiota ativa para repor as enzimas perdidas, nem proteção contra proteólise. Dessa forma, as atividades hemicelulásicas foram encobertas naquele estudo e as atividades celulásicas, sobrepujadas em *Atta*, resultando em valores errôneos devido ao baixo efeito da proteólise sobre os sistemas enzimáticos destas agriculturas na geração de glicose (Figuras 28 e 29).

Além disso, o emprego de pHs diferentes dos observados em jardins de fungo deturpou os dados sobre atividades enzimáticas representativas da condição real do sistema, visto a forte dependência das atividades enzimáticas ao pH.

Em contrapartida, as metodologias desenvolvidas e empregadas ao longo deste trabalho puderam mapear os mecanismos envolvidos na evolução das relações entre grupos enzimáticos extracelulares, substrato fornecido como fonte nutricional e fisiologia da microbiota, identificando a inversão metabólica, e não só a amplificação da capacidade de utilização de amido e os mecanismos generalistas de agriculturas basais, tais como De Fine Licht et al. (2009) ou Moller et al. (2011). Ao contrário, trouxe resultados muitas vezes opostos, tais como o aumento de estruturas cristalinas em materiais mais decompostos nos setores internos de jardins de fungo de corte de folhas e potentes atividades hemicelulásicas presentes desde as agriculturas derivadas. Além disso, vinculou todos estes dados com a dinâmica de crescimento microbiano e acúmulo de solutos em jardins de fungo de diferentes tipos de agriculturas de fungos por meio de estratégias de investigação baseadas no modelo da caixa preta e estudos respirométricos derivados daqueles empregados para avaliar comunidades microbianas de solos.

Assim, foi possível identificar que o perfil fisiológico da comunidade microbiana também indicou que a inversão metabólica – a alteração no emprego especializado de um tipo de alimento por outro – não foi um evento restrito ao ambiente enzimático extracelular. Ao contrário, a inversão foi um evento geral nas agriculturas de corte de folhas, afetando a dinâmica de utilização de cada monossacarídeo pela comunidade microbiana simbiote (Figura 18). A inversão foi tão marcante que mesmo as áreas regenerativas internas de biomassa microbiana de jardins de fungo de *A. bisphaerica*, com dinâmica voltada para a manutenção celular similar aos sistemas basais (Tabela 10), apresentaram perfil fisiológico predominantemente xilanolítico, e não generalista, como poderia ser esperado (Figura 24B). As alterações, mais uma vez, indicaram especialização metabólica voltada para a utilização de xilose em agriculturas de corte de folhas. A inversão metabólica não foi acompanhada por aumentos nas taxas de metabolismo oxidativo (Tabela 18). As taxas metabólicas aumentaram antes da própria inversão, como revelado pelas agriculturas derivadas de *Trachymyrmex*, ainda especializadas no uso de glicose (Figura 18), tal como as de *T. fuscus*, uma coletora de sementes de gramíneas, ou apresentando perfil generalista, tal como *T. tucumanus*, forrageadora de serapilheira.

Os ritmos de produção de biomassa microbiana também aumentaram antes da inversão metabólica registrada para as agriculturas de corte de folhas (Tabela 8), aparecendo já nas agriculturas derivadas, ainda generalistas ou especialistas em glicose. No entanto, as taxas de produção de biomassa foram intensificadas com a inversão metabólica, sendo acompanhadas por maior demanda energética da microbiota (Tabela 8). Entretanto, a manutenção da biomassa microbiana ativa em patamares reduzidos permitiu a sustentação das taxas brutas de assimilação dos jardins de fungo em níveis similares aos observados para as agriculturas derivadas (Tabela 8), não acarretando perdas de material acumulado por meio da intensificação da drenagem microbiana de alimentos extracelulares. Esta dinâmica já havia sido mapeada durante os eventos sazonais de controle dos jardins de fungo e do fluxo global de glicose nesses sistemas (Figuras 25 e 26).

Assim, a inversão metabólica nas agriculturas de corte de folhas mostrou-se correlacionada com a qualidade do substrato forrageado e especialização e potencialização enzimática para ataque de material mais facilmente degradável, promovendo aumentos globais de fluxos e, portanto, da produtividade de açúcares extracelulares e biomassa microbiana.

Tabela 18 - Taxas de respiração microbiana e de respiração induzida por substrato entre glicose e xilose

Materiais de jardins de fungo	R (mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹)	SIR-Glc SIR-Xyl ⁻¹
<i>A. balzani</i>	0,036 ± 0,009 ^a	0,82 ± 0,24 ^a
<i>A. coronatus</i>	0,039 ± 0,010 ^a	0,86 ± 0,25 ^a
<i>A. bisphaerica</i>	0,039 ± 0,010 ^a	0,75 ± 0,51 ^a
<i>A. laevigata</i>	0,042 ± 0,011 ^a	0,82 ± 0,50 ^a
<i>T. fuscus</i>	0,036 ± 0,009 ^a	1,78 ± 0,79 ^b
<i>T. tucumanus</i>	0,030 ± 0,008 ^b	1,14 ± 0,52 ^c
<i>M. parallelus</i>	0,015 ± 0,004 ^c	1,14 ± 0,57 ^c
<i>M. goeldii</i>	0,018 ± 0,005 ^c	1,01 ± 0,58 ^c

SIR-Glc: Respiração induzida por substrato – glicose; SIR-Xyl: Respiração induzida por substrato – xilose. *M. goeldii* (n=6) e *M. parallelus* (n=25) (agriculturas basais), *T. fuscus* (n=19) e *T. tucumanus* (n=24) (agriculturas derivadas), *A. balzani* (n=25), *A. bisphaerica* (n=20), *A. coronatus* (n=3) e *A. laevigata* (n=15) (agriculturas de corte de folhas), foram coletados entre os períodos chuvosos de Fevereiro de 2010 a Maio de 2013, no campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Grupos foram comparados segundo o teste de Friedman a $p \leq 0,05$. Letras em superscrito representam diferenças avaliadas segundo o teste de Dunn a $p \leq 0,05$ em uma mesma coluna.

Os resultados apontam para um cenário de diferenciação de nicho, partindo de sistemas generalistas lentos baseados na utilização de material de serapilheira bastante decomposto para a produção de estoques nutricionais, culminando em sistemas especialistas em amido e hemicelulose, rápidos decompositores baseados na utilização de material fresco e, portanto, rico em substratos facilmente degradáveis pelos conjuntos especializados de enzimas extracelulares, para a geração de açúcares e biomassa microbiana. Somados a estes aspectos, a elevada atividade pectinásica verificada em todas as agriculturas derivadas, incluso cortadeiras (Figuras 15 e 16), juntamente com as atividades celulásicas reduzidas e a invasão do tecido vegetal pelo micélio fúngico devem ter contribuído para a maior acessibilidade ao substrato menos recalcitrante e, assim, ao melhor rendimento de sua degradação em sistemas derivados, resultando em canais enzimáticos capazes de sustentar fluxos muito elevados de alimentos (Figuras 25A, B e C; 26A, B e C; e Figuras 27A, B e C). Possivelmente, um manejo mirmecológico do substrato mais aprimorado nas agriculturas de corte de folhas, incluso maceração ou introdução de ranhuras no material vegetal (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CURRIE; STUART, 2001), podem estar correlacionadas ao maior acesso ao substrato e, assim, ao maior fluxo promovido pelo canal enzimático de agriculturas de corte de folhas, tais como constatados com radiotraçadores (Figuras 25A e B; e 26A e B). Dessa forma, tanto as alterações comportamentais das formigas quanto as diferenças nas características funcionais das comunidades microbianas de jardins de fungo foram relevantes para o desenvolvimento dos diferentes tipos de agricultura de fungos e dos serviços que estes microbiomas prestam aos ninhos de formigas, potencializando a produção de alimentos e garantindo a sustentação de ninhos cada vez maiores (Figuras 35 e 36).

5.14 RELAÇÕES ENTRE DEMOGRAFIA DOS NINHOS DE FORMIGAS ATTINI E TAXAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA E AÇÚCARES REDUTORES

A sobrevivência e demografia do ninho, a exploração do ambiente e as interações tróficas existentes entre formigas Attini e microbiota de jardins de fungo dependem, em última análise, da habilidade da microbiota em disponibilizar alimentos para o formigueiro a partir do material forrageado e de crescer a uma taxa suficiente para contrabalançar as perdas de biomassa microbiana. Assim, o estudo comparativo das modificações funcionais de jardins

de fungo torna-se o estudo da construção de nicho em escala evolutiva, permitindo a identificação de correlações entre a espécie de formiga domesticadora, demografia dos ninhos, qualidade geral dos alimentos fornecidos para o crescimento microbiano e a prestação de serviços de cada tipo de jardim de fungo.

Para verificar as alterações funcionais entre diferentes tipos de jardins de fungo e suas relações com o material forrageado, serviços prestados ao formigueiro e demografia do ninho, foram utilizadas técnicas respirométricas (BARTHA; PRAMER, 1965; VAN DER WEERF; VERSTRATE, 1987) acopladas a simulação (VAN DER WEERF; VERSTRATE, 1987) empregando software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), e métodos espectrofotométricos, permitindo acessar a dinâmica global de cada jardim de fungo. O jardim foi então generalizado, em termos tróficos, por meio da determinação do balanço dos diferentes tipos de taxas de acúmulo, ou seja, açúcares redutores extracelulares dissolvidos (alteração das propriedades abióticas do meio pela ação microbiana), os mais importantes componentes nutricionais das operárias de *Atta sexdens* (SILVA et al., 2003), ou biomassa microbiana, reconhecidamente o componente nutricional para larvas e rainhas (WEBER, 1972; WEBER, 1966; HÖLLDOBLER; WILSON, 2008). Os resultados permitiram mapear as relações entre as alterações funcionais de jardins de fungo com a ecologia (hábito de forrageio e demografia) e evolução (posição filogenética) de formigas Attini.

Os trabalhos de Silva et al. (2003) já apontavam para o uso de açúcares redutores e solutos dos jardins de fungo no aumento do tempo de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens*. Partindo da premissa de que o aumento na produção de biomassa microbiana – voltada para a sustentação das larvas – e de carboidratos extracelulares solúveis – voltados para o consumo das operárias adultas, os resultados obtidos são consistentes com a existência de um processo de segregação nutricional onde a utilização de fontes de energia extracelulares solúveis facilmente assimiláveis teve forte impacto demográfico sobre os ninhos de formigas Attini. Nesse cenário, deve-se considerar que os valores de fluxos de carbono e energia em sistemas basais se enquadram em uma estratégia ecológica totalmente distinta, voltada para o acúmulo e manutenção de biomassa microbiana. Para estes sistemas, será necessário posterior estudo de predileções nutricionais e tempos de sobrevivência com diferentes fontes de alimento para uma melhor interpretação dos dados. Os incrementos de fluxos são, por sua vez, característicos dos sistemas de agriculturas derivadas e, neste caso, os mecanismos de segregação da produção nos jardins de fungo torna-se evidente. A sustentação da maior biomassa de operárias foi conseguida graças às maiores taxas de acúmulo de açúcares nos

solutos de jardins de fungo. Particularmente, as diferenças entre as agriculturas de *Acromyrmex* e *Trachymyrmex* foram sutis. Ambos os gêneros possuem ninhos com números de indivíduos similares. Considerando a capacidade de sustentação de larvas, ambas mostraram-se iguais. No entanto, a maior massa total das operárias adultas de *Acromyrmex*, aparentemente, só pôde ser sustentada graças ao maior acúmulo de açúcares em seus jardins de fungo. Assim, é possível inferir que maiores biomassas populacionais presentes nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* têm relação com a capacidade produtiva dos jardins de fungo. Por sua vez, somente as jardineiras, operárias pequenas e, em menor grau, as médias, têm acesso ao interior dos jardins de fungo destes sistemas de corte de folhas, fato que pode estar diretamente relacionado a um maior controle de manejo do jardim de fungo e, assim, à própria segregação destes microbiomas de agriculturas de corte de folhas em setores produtivos distintos, fato não observado em outras agriculturas (MOLLER et al., 2011).

6. CONCLUSÕES E NOVA HIPÓTESE EVOLUTIVA PARA OS JARDINS DE FUNGO

O presente trabalho avaliou, por meio de estratégia holística e abordagem da caixa preta, o funcionamento de jardins de fungo de formigas Attini e sua dinâmica sazonal, investigando as relações existentes entre ocupação de nicho – substrato forrageado pelas formigas – parâmetros bioquímicos e biocinéticos da microbiota que compõe o microbioma conhecido como jardins de fungo, e as características demográficas dos ninhos entre representantes dos três grupos filogenéticos majoritários de agricultura de fungo: basal, derivada e corte de folhas.

A nova estratégia de estudo, baseada em técnicas respirométricas, bioquímicas e físico-químicas e, principalmente, na generalização dos diferentes sistemas em modelos de compartimentos conectados por vetores de fluxos, permitiu a elaboração de um protocolo de estudo baseado na deleção ou inativação de compartimentos, fato que permitiu identificar o tempo de constância fisiológica dos jardins de fungos na ausência de formigas (15h) e possibilitou a comparação dos diferentes serviços de ecossistema prestados pelos jardins de fungo aos ninhos de formiga, aqui considerados como a produção de biomassa microbiana e de açúcares redutores, especialmente glicose e xilose, alimentos empregados para a sustentação de rainhas/larvas e operárias, respectivamente.

Em primeiro lugar, pode-se verificar que os fluxos de matéria e energia foram priorizados frente às biomassas microbianas permanentes ao longo do curso evolutivo, graças a um processo que envolveu a substituição de material forrageado mais degradado fornecido como nutriente para as microbiotas de jardins de fungo e, portanto, mais rico em compostos recalcitrantes suscetíveis a processos de degradação lenta, por substratos menos degradados, culminando na utilização de substratos frescos pelas agriculturas de corte de folhas.

Esta alteração de material forrageado foi acompanhada por eventos de especialização e potencialização enzimática no uso de compostos menos recalcitrantes, em especial hemiceluloses, amido e pectina, os quais já se mostraram presentes em sistemas derivados de *Trachymyrmex*, mas só puderam ser totalmente aproveitados com a substituição de material de serapilheira por material fresco, mais rico em polímeros de fácil degradação, nos sistemas de corte de folhas.

Assim, as alterações funcionais da microbiota de jardins de fungos antecederam as mudanças nos padrões de forrageio das formigas Attini. Estas alterações produziram incrementos nas taxas de acúmulo de glicose e xilose. Em particular, a maior disponibilidade de xilana e o potente sistema xilanolítico presente em agriculturas de corte de folhas fez com que as taxas de acúmulo de xilose superassem as taxas de acúmulo de glicose, um processo aqui chamado de inversão metabólica, o qual resultou em incrementos de produtividade acentuados, sendo acompanhado pela especialização da microbiota no uso de xilose para manutenção e crescimento em detrimento de celulose, a qual não foi degradada em sistemas naturais, tendo possível papel de suporte físico para o crescimento microbiano, e estrutural, garantindo o formato tridimensional dos jardins de fungo.

Pela primeira vez, igualmente, foi demonstrado que outros grupos de formigas, basais, derivadas e de corte de folhas, também consomem solutos dos jardins de fungos, fato anteriormente observado apenas em *Atta sexdens* (SILVA et al. 2003). O acréscimo na geração de solutos mostrou-se relacionada positivamente com o acréscimo na biomassa sustentada de operárias, culminando nos sistemas de *Atta*, com milhões de indivíduos (Figura 36).

Mais uma vez, este trabalho mostrou, de forma pioneira, as quantidades de biomassa microbiana ativa nos diferentes tipos de agriculturas de fungo e sua dinâmica de funcionamento. Os resultados permitiram concluir que as microbiotas de jardins de fungos evoluíram em direção à maximização da ciclagem de biomassa microbiana, tendo em vista que os grupos basais mostraram-se voltados para o metabolismo de manutenção, sustentando altas concentrações de biomassa microbiana operando com metabolismo reduzido e taxas de crescimento extremamente baixas, estratégia que foi invertida ao longo do curso evolutivo, atingindo seu ápice nas agriculturas de corte de folhas, as quais mantiveram as menores quantidades de biomassa microbiana, mas apresentaram as maiores taxas de crescimento específico. Este fator reduziu o dreno microbiano de matéria e energia, o que possibilitou as elevadas taxas de acúmulo de açúcares nos solutos destes jardins de fungos (Tabela 6). Estes resultados permitiram inferir não só mecanismos de ciclagem da biomassa microbiana mantidos pelas formigas, seja por meio de remoção ou predação, mas também indicaram a existência de aumento nas taxas de repique de fungo, fator que garante o reposicionamento de micélio em substratos frescos e, assim, novos pulsos de secreção de enzimas, os quais são estritamente relacionados aos pulsos de produção de açúcares observados nestes sistemas.

Estes mecanismos de operação, baseados na geração de produtos de hidrólise, revelaram que jardins de fungos evoluíram para sistemas de biorreação naturais controlados pela concentração de biomassa, diferindo dos sistemas comerciais controlados pela taxa de diluição do substrato, garantindo a nutrição de maior número de operárias.

As avaliações também mostraram, pela primeira vez, que os diferentes tipos de jardins de fungo possuem mecanismos de controle sazonal, isto é, adaptação fisiológica. Em particular, todos os sistemas passaram a operar de forma análoga às agriculturas basais, voltando seus funcionamentos para a manutenção da biomassa microbiana. Entretanto, o equilíbrio entre a redução do potencial enzimático e das taxas de assimilação e a constância das concentrações de hidrogeniônicas e composição bioquímica dos solutos mostraram a existência de potentes mecanismos de controle voltados para a manutenção da constância do espaço extracelular, permitindo concluir que jardins de fungo são quimiostatos, regulados pela entrada de substrato e funcionamento e controle da biomassa microbiana.

Os estudos de fluxos de glicose confirmaram o aumento geral de fluxos em relação às massas microbianas permanentes ao longo do curso evolutivo, e estratégias diferentes de acúmulo de glicose entre os sistemas de corte de folhas de *A. bisphaerica*, energeticamente mais econômico e, assim, mais eficiente, e *A. balzani*, com fluxos de geração e assimilação de glicose mais intensos e, portanto, energeticamente menos eficiente, considerando apenas o conteúdo de carbono e energia presente na glicose.

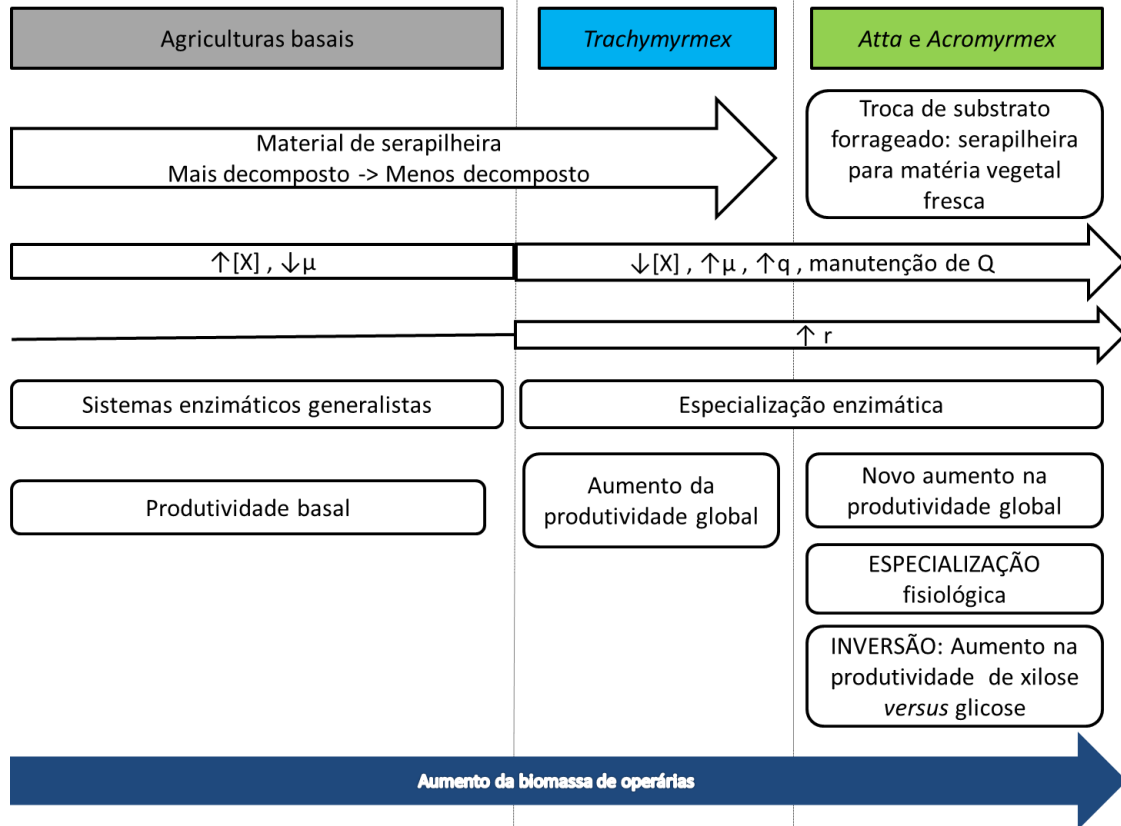
Resultado importante foi observado nos jardins de fungo estratificados de *A. bisphaerica*, que apresentaram um setor periférico com funcionamento típico de um sistema de corte de folhas, mas um setor interno com operação análoga aos sistemas basais, revelando a manutenção de características plesiomórficas nos sistemas mais derivados.

Os testes voltados para a identificação dos controles proteolíticos do canal enzimático extracelular permitiram inferir que os controles do canal enzimático voltado para a geração de glicose é, predominantemente, serinoproteásico em todos os sistemas avaliados, representantes dos três principais grupos de agricultura de fungo, enquanto que os controles proteolíticos voltados para a geração de xilose revelaram-se metaloproteásicos, ao menos para os sistemas de *A. bisphaerica*. Esse mesmo controle foi identificado como o responsável pela remoção de inibidores proteicos de xilanases nestes jardins de fungo, resultando em um sistema de controle metaloproteásico ativo tanto na geração quanto na remoção de inibidores de endoxilanases.

Os mesmos jardins de fungo de *A. bisphaerica* foram empregados para ensaios iniciais de resiliência a perturbações externas. Em primeiro lugar, os testes com inibidores proteicos de endoxilanasas presentes em paredes celulares vegetais não apresentaram efeito permanente, sendo revertido pela atividade metaloproteásica extracelular destes sistemas, capaz de eliminá-los por meio de degradação. Em segundo lugar, foram verificados os impactos fisiológicos da incorporação de celulasas exógenas. Neste caso, o efeito mostrou-se dependente da concentração de enzima aplicada sobre o sistema.

Estes resultados fazem deste trabalho pioneiro no uso de abordagem holística, possibilitando a visualização da operação de diferentes jardins de fungo como um todo. A Figura 37 resume o cenário evolutivo resultante destas avaliações. Entretanto, esta abordagem permitiu ir mais além. Tendo em vista que jardins de fungos são artefatos biológicos empregados para controle de fluxos de nutrientes (qualidade e quantidade) e seus serviços de ecossistema mostraram-se relacionados com a posição filogenética de cada grupo estudado e com a demografia dos ninhos, o presente trabalho conduziu a interpretação evolutiva dos jardins de fungo para uma nova direção. A nova hipótese para a evolução do sistema “jardim de fungo – formiga” aqui proposta é a evolução por meio de processos de engenharia de ecossistema (construção de nicho), ou seja, alterações ambientais, neste caso por meio da construção de artefatos biológicos similares a fermentadores em estado sólido, que possibilitem o aumento do fitness adaptativo da população. Os resultados aqui presentes fornecem o primeiro impulso para a sustentação desta hipótese.

Figura 37 – Cenário evolutivo para as agriculturas de fungo de formigas Attini.



REFERÊNCIAS

ABRIL, A.B.; BUCHER, E.H. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. **Ecology Letters**, v. 5, p. 325-328, 2002.

ALEF, K. ATP content as a parameter to estimate microbial biomass. In.: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 410.

ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. **Archives of Microbiology**, v. 93, p. 113-127. 1973.

AYLWARD, F.O.; BURNUM, K.E.; SCOTT, J.J.; SUEN, G.; TRINGE, S.G.; ADAMS, S.M.; BARRY, K.W.; NICORA, C.D.; PIEHOWSKI, P.D.; PURVINE, S.O.; STARRETT, G.J.; GOODWIN, L.A.; SMITH, R.D.; LIPTON, M.S.; CURRIE, C.R. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1688-1701, 2012.

AYLWARD, F.O.; BURNUM-JOHNSON, K.E.; TRINGE, S.G.; TEILING, C.; TREMMEL, D.M.; MOELLER, J.A.; SCOTT, J.J.; BARRY, K.W.; PIEHOWSKI, P.D.; NICORA, C.D.; Malfatti, S.A.; MONROE, M.E.; PURVINE, S.O.; GOODWIN, L.A.; SMITH, R.D.; WEINSTOCK, G.M.; GERARDO, N.M.; SUEN, G.; LIPTON, M.S.; CURRIE, C.R. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.

BACCI Jr., M.; BUENO, O.C.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; SOMERA, A.F.; SILVA, A. A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 525-531, 2013.

BACCI Jr., M.; ANVERSA, M.M.; PAGNOCCA, F.C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 385-386, 1995.

BARTHA R.; PRAMER D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides. **Soil Science**, v. 100, p. 68-70, 1965.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 22, p. 87-108, 1968.

BEAUGRAND, J.; GEBRUERS, K.; VERVERKEN, C.; FIERENS, E.; CROES, E.; GODDEERIS, B.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A. Antibodies against wheat xylanase inhibitors as tools for the selective identification of their homologues in other cereals. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 59-67, 2006.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.) **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag/Academic Press, 1974. v. 3, p. 1205-1215.

BLOEM, J.; BOLHUIS, P.R.; VENINGA, M.R.; WIERINGA, J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 162-173.

BOERIU, C.G.; BRAVO, D.; GOSSELINK, R.J.A.; VAN DAM, J.E.G. Characterization of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 205-218, 2004.

BOLLAZZI, M.; KRONENBITTER, J.; ROCES, F. Soil temperature, digging behaviour, and the adaptive factor of nest depth in South American species of *Acromyrmex* leafcutting ants. **Oecologia**, v. 158, p. 165–175, 2008.

BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*. **Insectes Sociaux**, v. 49, p. 153–157, 2002.

BON M. **Flore mycologique d'Europe 3: Les Lepiotes**. Amiens Cedex: CRDP de Picardie. 1993. p. 153.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, C.J.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1835-1844, 2003.

BROCK, T.D. Microbial Growth Rates in Nature. **Bacteriological Reviews**, v. 35, n. 1, p. 39-58, 1971.

BROOKES, P.C. Estimation of the adenylate energy charge in soils. In.: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 204-213.

CANDUSSO, M.; LANZONI G. **Fungi Europaei 4: Lepiota s.l.**. Alassio, Italy: Edizioni Candusso. 1990. p. 743.

CHAPIN, F.S.; WALKER, B.H.; HOBBS, R.J.; HOOPER, D.U.; LAWTON, J.H.; SALA, O.E.; TILMAN, D. Biotic control over the functioning of ecosystems. **Science**, v. 277, p. 500-504, 1997.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V.I. Amorphous cellulose – structure and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, p. 13-21, 2011.

CURRIE, C.R.; STUART, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proclames of Royal Society B–Biological Sciences**, v. 268, p. 1033–1039, 2001.

D'AGOSTINO, R.; PEARSON, E. Tests for departures from normality. Empirical results for the distribution of $\sqrt{b_1}$ and b_2 . **Biometrika**, v. 60, p. 613-622, 1973.

DE FINE LICHT, H.H.; SCHIØTT, M.; MUELLER, U.G.; BOOMSMA, J.J. Evolutionary transitions in enzyme activity of ant fungus gardens. **Evolution**, 2009, doi:10.1111/j.1558-5646.2010.00948.x.

EIGEN, M.; SCHUSTER, P. **The hypercycle**. New York: Springer. 1979.

ERTHAL JR., M.; SILVA, C.P.; COOPER, R.M.; SAMUELS, R.I. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 152, p.54–59, 2009.

GALINSKI, E.A.; TRÜPER, H.G. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. **FEMS Microbiology**, v. 15, p. 95-108, 1994.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.I. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GOESAERT, H.; ELLIOTT, G.; KROON, P.A.; GEBRUERS, K.; COURTIN, C.M.; ROBBEN, J.; DELCOUR, J.A.; JUGE, N. Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 193-202, 2004.

GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S.; EATON, A.D. (Ed.) **Standard methods for examination of water and wastewater**. 18.ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 1992, p. 5.1-5.15.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 106, p. 4742-4746, 2009.

HENRISSAT, B.; DRIGVEZ, H.; VIET, C.; SCHULEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio/Technology**, v. 3, p. 722-726, 1985.

HÖLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. Cambridge: Belknap Press, 1990.

HÖLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The superorganism**. New York: W.W. Norton, 2008.

JOERGENSEN, R. The fumigation extraction method. In.: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 383-387.

JOHNSON, D.R.; GOLDSCHMIDT, F.; LILJA, E.E.; ACKERMANN, M. Metabolic specialization and the assembly of microbial communities. **ISME Journal**, 2012, p. 1-7, doi:10.1038/ismej.2012.46.

JONES, C.G.; LAWTON, J.H.; SHACHAK, M. Organisms as ecosystem engineers. **Oikos**, v. 69, p. 373-386, 1994.

JONES, C.G.; LAWTON, J.H.; SHACHAK, M. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. **Ecology**, v. 78, p. 1946-1957, 1997.

JONGH, W.A. de; NIELSEN, J. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger*. **Metabolic Engineering**, v. 10, p. 87-96, 2008.

JUGE, N.; DELCOUR, J.A. Proteinaceous xylanase inhibitors: structure, functions and evolution. **Current Enzyme Inhibition**, v. 2, p. 29-35, 2006.

JUGE, N.; SVENSSON, B. Proteinaceous inhibitors of carbohydrateactive enzymes in cereals: implication in agriculture, cereal processing and nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1573-1586, 2006.

KACURÁKOVÁ, M.; EBRINGEROVÁ, A.; HIRSCH, J.; HROMÁDKOVÁ, Z. Infrared study of arabinoxylans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 66, p. 423-427, 1994.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi** (10th ed.). Wallingford: CABI. 2008. p. 374.

LEAL, I.R.; OLIVEIRA, P.S. Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 376-382, 2000.

LISPERGUER, J.; PEREZ, P.; URIZAR, S. Structure and thermal properties of lignins: characterization by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, p. 460-463, 2009.

LOREAU, M. Ecosystem development explained by competition within and between material cycles. **Proclames of Royal Society London B**, v. 265, p. 33-38, 1998.

LOTKA, A.J. Contribution to the energetics of evolution. **Proclames of National Academy of Science USA**, v. 8, p. 147-151, 1922.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183-186, 1921.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37-55, 2010.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MOLLER, I.E.; DE FINE LICHT, H.H.; HARHOLT, J.; WILLATS, W.G.T.; BOOMSMA, J.J. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. **PLoS ONE** 2011, 6(3): e17506. doi:10.1371/journal.pone.0017506.

O'FARREL, P.Z.; GOODMAN, H.M.; O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1977.

ODLING-SMEE, F.J. Niche constructing phenotypes. In: PLOTKIN, H.C. (Ed) **The Role of Behavior in Evolution**, Cambridge:MIT Press, MA, 1988. p.73-132.

ODUM, E.P. **Fundamentals of Ecology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1971.

ODUM, T.H. **Systems ecology**. New York: Wiley. 1983.

OLIVEIRA, J. P. R.; NUNES, L. P. ; FERREIRA, R. G. ; ARAUJO, M. S. . Atividade de forrageamento por castas sexuadas em ninhos de *Trachymyrmex fuscus* Emery (Formicidae: Attini). In: **XXII Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2008, Uberlândia. XXII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2008.

PERFIL'EV, B.V.; GABE, D.R. **Capillary methods of investigating micro-organisms**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1969.

PIMENTA, L.B.; ARAUJO, M. S.; LIMA, R.S.; SILVA, J.M.S.; NAVES, V.G.O. Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 09, p. 1-12, 2007.

PINTO-TOMÁS, A.A.; ANDERSON, M.A.; SUEN, G.; STEVENSON, D.M.; CHU, F.S.; CLELAND, W.W.; WEIMER, P.J.; CURRIE, C.R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, v. 20 n. 326, p. 1120-1123, 2009.

QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. Aspects of the symbiosis of the leafcutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v.3, p. 221-230, 1978.

QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomological**, v. 4, p. 151–160, 1979.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011.

RABELING, C.; VERHAAGH, M.; ENGELS, W. Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M.smithii*. **Journal of Insect Science**, v. 7, p. 40-53, 2007.

RAMOS, T.J.N.; SOUZA, C.M.A.; CARVALHO, C.J.R.; VIEIRA, I.M.S. Respostas fisiológicas e metabólicas de gramíneas ao alagamento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 54, p. 78-84, 2011.

RICHARD, F.-J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, p. 297–303, 2005.

RIITONEN, T.; ETA, V.; HYVÄRINEN, S.; JÖNSSON, L.J.; MIKKOLA, J.P. Engineering Aspects of Bioethanol Synthesis. In.: PUSHPAVANAM, S. (Ed.) **Advances in Chemical Engineering**, v. 42. Elsevier Inc., 2013. p. 1–73.

ROSENBERGER, R.F. Endogenous lytic enzymes and wall metabolism. In.: BURNETT, J.H.; TRINCI, A.P.J. (Ed) **Fungal Walls and Hyphal Growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p. 265-277.

RUIJTER, G.J.G.; BAX, M.; PATEL, H.; FLITTER, S.J.; VAN DE VONDERVOORT, P.J. I. ; DE VRIES, R.P.; VAN KUYK, P.A.; VISSER, J. Mannitol Is Required for Stress Tolerance in *Aspergillus niger* Conidiospores. **Eucaryotic Cell**, v.2, n.4, p. 690–698, 2003.

SANTANGELO, G.M. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 253 – 282, 2006.

SANTOS, A.V.; DILLON, R.J.; DILLON, V.M.; REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 319–323, 2004.

SCHIØTT, M.; LICHT, H.D.E.; LANGE, L.; BOOMSMA, J.J. Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **BMC Microbiology**, v. 8, p.40, 2008 doi:10.1186/1471-2180-8-40.

SCHOENIAN, I.; SPITELLERB, M.; GHASTEB, M.; WIRTHC, R.; HERZD, H.; SPITELLERA, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. **Proclames of National Acadademy of Science**, v. 108, p. 1955–1960, 2011.

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proclames of National Acadademy of Science USA**, v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.

SCOTT, J.J.; BUDSBERG, K.J.; SUEN, G.; WIXON, D.L.; BALSER, T.C.; CURRIE, C.R. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PLoS One**. 29;5(3):e9922. doi: 10.1371/journal.pone.0009922, 2010.

SCOTT, J.J.; BUDSBERG, K.J.; SUEN, G.; WIXON, D.L.; BALSER, T.C.; CURRIE, C.R. Microbial Community Structure of Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens and Refuse Dumps. **PLoS ONE** 5(3): e9922. doi:10.1371/journal.pone.0009922, 2010.

SEAL, J.N.; TSCHINKEL, W.R. Complexity in an obligate mutualism: do fungus-gardening ants know what makes their garden grow? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, p. 1151–1160, 2007.

SEMENOVA, T.A.; HUGHES, D.P.; BOOMSMA, J.J.; SCHIØTT, M. Evolutionary patterns of proteinase activity in attine ant fungus gardens. **BMC Microbiology**, p. 11-15, 2011.

SEN, R. et al. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings in the Natural Academy Society**, Washington, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.

SETZER, W. Solvers for Ordinary Differential Equations. **The Comprehensive R Archive Network**, Vienna, Austria. 2008.

SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 283-295, 2006.

SILVA, A.; BACCI, M.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 307-313, 2003.

SILVA, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Production of Polysaccharidases in Different Carbon Sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Müller (Singer), the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, v. 53, p. 68-71, 2006a.

SILVA, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiology Research**, v. 161, p. 299-303, 2006b.

SILVA, S.S.; CARVALHO, R.R.; FONSECA, J.L.C.; GARCIA, R.B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 25-33, 1998.

SIQUEIRA, C.G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.A.; HEBLING, M.J.A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus

of the ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

SOLOMON, S.E.; MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; PRICE, S.L.; OLIVEIRA DA SILVA-PINHATI, A.C.; BACCI JR., M.; VASCONCELOS, H.L. Nesting biology of the fungus growing ants *Mycetarotes* Emery (Attini, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, p. 333-338, 2004.

STAHEL, G.; GEIJSKES, D.C. On the nest architecture of *Atta cephalotes* and *Atta sexdens* (Hym. Formicidae) (Translated from German). **Reviews in Entomology**, v. 10, p. 27-78, 1939.

THOMPSON, J.N.; REICHMAN, O.J.; MORIN, P.J.; POLIS, G.A.; POWER, M.E.; STERNER, R.W.; COUCH, C.A.; GOUGH, A.; HOLT, R.; HOOPER, D.U.; KEESING, F.; LOVELL, C.R.; MILNE, B.T.; MOLLEES, M.C.; ROBERTS, D.W.; STRAUSS, S.Y. Frontiers in Ecology. **BioScience**, v. 15, n. 1, p. 15-24, 2001.

VAN DE WERF, H.; VERSTRAETE, W. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: development and verification of the model. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 253-260, 1987.

VOGEL, H.J.A. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). **Microbiology and Genetic Bulletin**, v. 37, p. 387-394, 1956.

WALSETH, C.S. Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. **Tappi**, v. 35, p. 228-233, 1952.

WEBER, N.A. Fungus-growing ants. **Science**, v. 153, p. 587-604, 1966.

WEBER, N.A. **Gardening ants, the attines**. Philadelphia: American Philosophical Society. 1972.

WEBER, N.A. The nest of an anomalous colony of the arboreal ant *Cephalotes atratus*. **Psyche (Camb.)**, v. 64, p. 60-69, 1957.

WESSELS, J.G.H.; SIETSMA, J.H. Fungal cell walls: a survey. In.: TANNER, W.; LOEWUS, F.A. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**, vol 13B, Plant Carbohydrates II. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 352-415.

WHEELER, W.M. The fungus-growing ants of North America. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 23, n. 31, p. 669-807, 1907.

WILLIAMSON, J.D.; JENNINGS, D.B.; GUO, W.W.; PHARR, M. Sugar Alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols-multifunctional plant protection? **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 127, n. 4, p. 467-473, 2002.

WILSON, E.O. **The Insect Societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971. p.49-50.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.S.; DIEN, B.; LADISCH, M.R. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme Microbial Technology**, v. 48, p. 54-60, 2011.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.S.; DIEN, B.; LADISCH, M.R. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p. 170-176, 2010.

ANEXOS

A. JARDINS DE FUNGO DE FORMIGAS ATTINI



Mycocephurus goeldii
(webpace.utexas.edu)



Mycetarotes parallelus
(Somera, 2010)



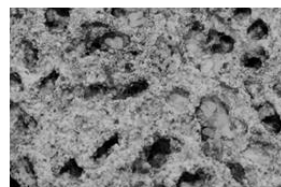
Trachymyrmex fuscus
(Somera, 2010)



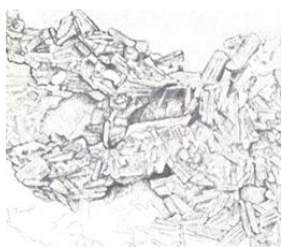
Trachymyrmex tucumanus
(www.masterfile.com)



Acromyrmex balzani
(Somera, 2010)



Acromyrmex coronatus
(Baptista, 2013)



Atta bisphaerica
(Somera, 2010)



Atta laevigata
(www.corbisimages.com)

B. PADRÕES BIOGEOGRÁFICOS FISIOLÓGICOS DE JARDINS DE FUNGO

B.1 Introdução e objetivos

Agriculturas de fungos de formigas Attini possuem distribuição Neotropical (SCHULTZ; BRADY, 2008), englobando diferentes latitudes e condições climáticas, desde áreas equatoriais quentes e úmidas até regiões limítrofes em latitudes elevadas. Agriculturas de corte de folhas possuem distribuição mais restrita, não ultrapassando as regiões ao Centro-Sul da Argentina (WEBER, 1966), incluindo as áreas de Mar del Plata e arredores – Miramar, Batán, Sierra de los Padres e Laguna de los Padres, as quais possuem estação fria bastante úmida que se inicia em meados de Maio e perdura até fins de Setembro e começo de Outubro.

As condições climáticas de cada área, ou seja, Campus da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil, e a região de Mar del Plata, província de Buenos Aires, Argentina, tornam-se muito diferenciadas durante a temporada de inverno, uma vez que o inverno brasileiro tende a ser seco, com poucos dias com temperaturas próximas a 10-15 °C (Figura 5), enquanto que o inverno buonairense é primariamente úmido, em especial na região de Mar del Plata, com fortes chuvas durante os meses de Junho a Setembro e temperaturas que não ultrapassam 8-10 °C até meados de Setembro.

Devido às características contrastantes de cada área durante o inverno, questionou-se a constância fisiológica dos jardins de fungo entre diferentes latitudes. Para tanto, foram feitas avaliações fisiológicas dos materiais de jardins de fungo das agriculturas de corte de folhas coletados na UNESP, campus de Rio Claro, SP, e na região de Mar del Plata, entre os meses de Setembro e Outubro de 2012. Para comparação, foram coletados materiais provenientes de ninhos de *Atta bisphaerica* (Rio Claro-SP), *A. laevigata* (Rio Claro-SP), *Acromyrmex balzani* (Rio Claro-SP), *A. coronatus* (Rio Claro-SP), *A. lundii* (Mar del Plata-Buenos Aires), *A. heyeri* (Mar del Plata, Batán-Buenos Aires) e *A. lobicornis* (Laguna de los Padres-Buenos Aires). Para metodologias de coleta, manejo de jardins de fungo e avaliações fisiológicas, ver Capítulo 3 – Materiais e métodos, da presente tese.

B.2 Resultados parciais e discussão

As taxas metabólicas mostraram-se estatisticamente constantes a $p \leq 0,05$ por meio do teste de Kruskal-Wallis, tanto entre espécies quanto entre latitudes, com valor médio igual a $1,46 \pm 0,26 \text{ mg DQO g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, revelando a grande estabilidade fisiológica do sistema de corte de folhas independentemente de espécie e latitude (Tabela 20). As concentrações de açúcares redutores totais extracelulares (ART) e suas taxas de acúmulo no espaço extracelular em sistemas em estado sólido também apresentaram constância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a $p \leq 0,05$ entre os materiais coletados em diferentes latitudes (Tabela 20). Por sua vez, as biomassas microbianas ativas totais, estimadas por respiração induzida por substrato (VAN DE WERF; VERSTRAETE, 1987), mostraram-se igualmente constantes, em média $37,03 \pm 5,88 \text{ mg g}^{-1}$, indicando que os diferentes tipos de jardins de fungo apresentam estratégias similares de manutenção de biomassa microbiana, independentemente de tipo de jardim de fungo e posição geográfica (Tabela 20). Essas propriedades foram confirmadas por meio da avaliação biocinética das curvas respirométricas (Tabela 21). As taxas metabólicas (Tabela 20) e os perfis fisiológicos predominantemente voltados para o consumo de xilose também se mostraram estatisticamente constantes entre espécies e latitudes (Figura 46). Todos estes fatos mostram que os mecanismos de controle e regulação possivelmente presentes nos ninhos de formigas cortadeiras permitiram a manutenção de um microambiente estável para o funcionamento dos jardins de fungo, indicando ausência de influência biogeográfica nos parâmetros de funcionamento de materiais de jardins de fungo.

Tabela 20 - Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas

Material de jardim de fungo	Taxa metabólica (mg DQO g ⁻¹ h ⁻¹)	Massa microbiana (mg g ⁻¹)	ART (mg g ⁻¹)	ΔART Δt ⁻¹ (mg g ⁻¹ h ⁻¹)
<i>A. balzani</i> -BR	1,40 ± 0,22	35,89 ± 5,56	111,72 ± 22,34	11,28 ± 0,45
<i>A. coronatus</i> - BR	1,40 ± 0,33	38,99 ± 7,95	104,57 ± 20,91	10,88 ± 0,44
<i>A. bispherica</i> - BR	1,55 ± 0,12	39,63 ± 9,98	111,87 ± 22,37	11,41 ± 0,46
<i>A. laevigata</i> - BR	1,64 ± 0,35	39,09 ± 8,95	114,66 ± 22,93	11,58 ± 0,46
<i>A. lundi</i> - ARG	1,67 ± 0,38	35,97 ± 2,17	97,21 ± 11,87	10,33 ± 0,87
<i>A. heyeri</i> - ARG	1,05 ± 0,15	34,03 ± 1,70	98,57 ± 19,71	9,98 ± 0,94
<i>A. lobicornis</i> - ARG	1,54 ± 0,25	35,60 ± 4,85	100,01 ± 20,00	11,20 ± 0,33

Quantidade de ninhos amostrados: *A. balzani* (N=6); *A. coronatus* (N=3); *A. bisphaerica* (N=4); *A. laevigata* (N=4); *A. lundi* (N=2); *A. heyeri* (N=6); *A. lobicornis* (N=5). Valores representam médias ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre tratamentos por meio di teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Tabela 21 - Parâmetros biocinéticos das comunidades microbianas de materiais de jardins de fungo provenientes de diferentes latitudes

Material de jardim de fungo	μ h ⁻¹	μ _{max} h ⁻¹	Y _{max} mg mg ⁻¹ DQO	K _S mg DQO g ⁻¹	m mg DQO mg ⁻¹ h ⁻¹
<i>A. balzani</i> -BR	0,25 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,65 ± 0,03	1282,50 ± 17,70	0,10 ± 0,01
<i>A. coronatus</i> - BR	0,26 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,62 ± 0,10	1333,29 ± 10,98	0,10 ± 0,01
<i>A. bispherica</i> - BR	0,24 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,66 ± 0,03	1280,00 ± 27,68	0,10 ± 0,01
<i>A. laevigata</i> - BR	0,24 ± 0,02	0,55 ± 0,05	0,63 ± 0,06	1213,65 ± 15,54	0,11 ± 0,02
<i>A. lundi</i> - ARG	0,25 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,65 ± 0,00	1216,62 ± 97,64	0,11 ± 0,01
<i>A. heyeri</i> - ARG	0,23 ± 0,04	0,50 ± 0,09	0,62 ± 0,04	1218,43 ± 17,39	0,10 ± 0,01
<i>A. lobicornis</i> -ARG	0,25 ± 0,10	0,51 ± 0,05	0,64 ± 0,00	1219,43 ± 58,47	0,11 ± 0,00

Quantidade de ninhos amostrados: *A. balzani* (N=6); *A. coronatus* (N=3); *A. bisphaerica* (N=4); *A. laevigata* (N=4); *A. lundi* (N=2); *A. heyeri* (N=6); *A. lobicornis* (N=5). Valores representam médias ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre tratamentos por meio di teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Figura 46 - Perfil fisiológico da comunidade microbiana de jardins de fungo de agriculturas de corte de folhas. Quantidade de materiais de jardins de fungo amostrados: *A. balzani* (N=6); *A. coronatus* (N=3); *A. bisphaerica* (N=4); *A. laevigata* (N=4); *A. lundii* (N=2); *A. heyeri* (N=6); *A. lobicornis* (N=5). Glc = glicose, Xyl = xilose, GalAc = ácido galacturônico. Valores representam médias $\pm$ desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre tratamentos por meio do teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

