


---

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

---

**NOEMI CARLA BARON**

**MICRO-FUNGOS DE INTERESSE PARA O SETOR DE  
PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEIS**



Rio Claro  
2011

NOEMI CARLA BARON

MICRO-FUNGOS DE INTERESSE PARA O SETOR DE PETRÓLEO,  
GÁS E BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Co-orientador: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2011

620.1122 Baron, Noemi Carla  
B265m        Micro-fungos de interesse para o setor de petróleo, gás e  
              biocombustíveis / Noemi Carla Baron. - Rio Claro : [s.n.],  
              2011

              93 f. : il., gráfs., tabs., fots.

              Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências  
              Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
              Biociências de Rio Claro

              Orientador: Derlene Attili de Angelis

              Co-Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

              1. Biodegradação. 2. Tolueno. 3. Biorremediação. 4.  
              Formigas cortadeiras. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*Dedico aos meus pais, Antonio e Benedita,  
Que lutaram de sol a sol para que este sonho se realizasse.  
Muito obrigada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, que sempre me deram tanto apoio e suporte durante estes quatro anos. Só tenho a dizer que cada gota de suor que derramaram está simbolicamente representada neste trabalho, ele é fruto do meu esforço, e eu sou fruto do esforço deles. Ensinarão-me a ser tudo o que sou hoje, e vejo o quanto isso foi essencial para que eu chegasse tão bem até aqui. Agradeço também ao meu irmão, Dudi, sempre tão tranquilo, bondoso e companheiro.

À Deus, sempre tão presente em minha vida e zelando por mim em cada passo.

Ao Prof. Fernando, que gentilmente me abriu as portas de seu laboratório e me deu seu voto de confiança. É um grande homem que admiro imensamente.

Especialmente à Dra. Derlene, minha orientadora e minha “mamis” aqui em Rio Claro. Esta mulher foi a maior benção que eu poderia ter recebido durante a minha graduação e é sem dúvida minha grande inspiração para continuar. Obviamente não deixo de estender minha gratidão aos meus maninhos Gabriel e Dadá, seus filhos, e ao Abel, seu marido, que sempre me acolheram muito bem e foram tão compreensivos.

À minha companheira, Ana Paula, grande amiga e colega de trabalho, e ao Fábio pela grande ajuda e amizade enquanto estava conosco, sempre seremos a Equipe Negra!

Aos colegas de laboratório, os que ainda estão aqui e aos que já partiram, sempre foram amigos e com os quais compartilhei muitas experiências e muitas risadas: Virgínia, Paula, Aline, Castanha, Silvio, Weilan, Tati, Thais, Lídia, Ife, Dirce, Sadala, Liu e Lucas.

A todos os técnicos do departamento de Bioquímica e Microbiologia sempre tão atenciosos e pacientes, especialmente ao Beto, que me acompanhou em meus experimentos.

Ao PRH-05 pelo auxílio e benefícios oferecidos, pelos cursos de verão que foram realmente enriquecedores e que complementaram de forma excepcional nossos conhecimentos acerca do meio ambiente e o setor de petróleo e gás.

Ao apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás (PRH-ANP/MCT) e do Programa de Formação de Recursos Humanos da Petrobras.

Profissionalmente, tenho muito a agradecer ao Dr. Francesc Prenafeta-Boldú. Sua visita à nossa Universidade este ano foi imensamente proveitosa para mim. Agradeço por toda

a paciência e pela grande ajuda concedida, sem contar os ótimos momentos de descontração, é sem dúvidas uma grande pessoa.

A todos os meus colegas de graduação, sem exceções, tenho boas recordações de cada um e certamente serão levadas pelo resto de minha vida. Foi realmente muito bom tê-los conhecido.

Agradeço em especial às minhas grandes amigas Mandinha, Polinha, Baby, Taty e mais recentemente Jujú. São pessoas muito queridas e serão sempre guardadas com um carinho especial. Foi simplesmente excepcional conviver com vocês. Muito obrigada por tudo!

Quero deixar um agradecimento mais que especial ao grande diferencial da minha vida, meu amigo, namorado, meu grande companheiro, Gustavo. Tenho a sorte de ter esta pessoa maravilhosa ao meu lado, que sempre me apoiou, lutou e chorou comigo. Foi o melhor presente de aniversário de toda minha vida!

Obrigada a todos de coração!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.</b> .....	13
2.1. Situação do problema: combustíveis e o meio ambiente .....	13
2.2. Biorremediação e fungos como soluções viáveis .....	15
2.3. Outras fontes de isolamento .....	18
2.4. Coleção de culturas e acervos de pesquisa como suporte para biotecnologia .....	20
<b>3. OBJETIVOS.</b> .....	22
<b>4. CONTEXTO DO PROJETO</b> .....	22
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
5.1. Material .....	23
5.1.1. Substrato de isolamento .....	23
5.1.2. Meios de cultura .....	24
Ágar Sabouraud com Cicloheximida e Cloranfenicol (“Mycosel”)	
Ágar batata dextrose (BDA) (Acumedia Manufactures®)	
Ágar Czapek extrato de levedura (CYA)	
Ágar extrato de malte (MEA) (Acumedia Manufactures®)	
Ágar malte 2% (MA 2%) (Acumedia Manufactures®)	
Caldo de malte 2% (Acumedia Manufactures®)	
Meio Bushnell Haas	

5.1.3. Reagentes e soluções.....	25
Solução de Macronutrientes	
Solução de Micronutrientes	
Solução salina 0,85%	
Solução de cloranfenicol	
Solução de estreptomicina	
Solução de penicilina	
Solução de cicloheximida	
Solução de clorotetraciclina	
Solução de glicerol 30%	
Solução de lise	
Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque)	
Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x	
Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x	
Tris-EDTA (TE) (para 1 L de tampão)	
Gel de agarose 1%	
Gel de agarose 1,4%	
Marcador de massa molecular - primers	
Tampão de amostra para corridas em gel de agarose – “Loading Buffer”	
Solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M pH 8,0	
Acetato de sódio 3 M, pH 4,6	
dNTPS (concentração final: 1,25 mM)	
10X Buffer	
MgCl <sub>2</sub> (concentração final: 50 mM)	
Taq polimerase (5U/ μL)	
Brometo de etídio	
Corante lactofenol azul de algodão (COLLINS, 1969)	
Solução de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	
5.2. Métodos .....	31
5.2.1. Isolamento dos fungos .....	31
5.2.2. Preservação dos fungos .....	32
5.2.3. Identificação morfológica .....	33

5.2.4. Identificação molecular .....	34
Extração do DNA genômico	
Eletroforese	
Microsatélite (MSP-PCR)	
Amplificação do DNA ribossomal - PCR	
Purificação dos produtos da Amplificação (PCR)	
Reação de sequenciamento	
5.2.5. Testes de Biodegradação .....	37
5.2.5.1. Teste com o agente redox DCPIP .....	37
5.2.5.2. Teste em dessecadores – Etapa I .....	39
5.2.5.3. Teste em dessecadores – Etapa II.....	40
5.3. Tratamento de resíduos.....	40
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
6.1. Isolamento .....	42
6.2. Identificação .....	43
6.3. Testes de Degradação/Assimilação de Tolueno .....	45
6.3.1. Tubos com DCPIP.....	45
6.3.2. Microplaca com DCPIP.....	48
6.3.3. Teste em dessecadores.....	49
6.4. Preservação dos micro-fungos .....	53
Fichas Catalográficas	
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
7.1. Isolamento e Identificação .....	69
7.2. Testes com DCPIP .....	71
7.3. Testes em Dessecadores .....	72
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>

<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>11. APÊNDICE .....</b>	<b>89</b>

## RESUMO

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos de diversos tamanhos, incluindo moléculas saturadas e aromáticas. O gás natural é uma mistura de hidrocarbonetos gasosos, sendo seu principal componente o metano. Em nossa sociedade, a grande demanda por estes combustíveis exige rapidez nos processos de extração, transporte e refino, dando margem à ocorrência de acidentes que comprometem o ambiente. O fato de o petróleo ser um recurso finito e a necessidade de reduzir os problemas relacionados à questão da poluição ambiental fez com que a busca por fontes alternativas de combustíveis ganhasse força em nosso país. Assim temos hoje dois importantes biocombustíveis: o etanol e o biodiesel.

Concomitantemente, muitos estudos visando o isolamento de micro-organismos capazes de degradar os resíduos das indústrias petroquímicas têm sido feitos, a maioria utilizando como fonte de isolamento amostras de solo e água coletadas no próprio ambiente contaminado. O isolamento a partir de substratos alternativos surgiu como uma nova estratégia que tem dado resultados satisfatórios. Neste contexto, apresentamos as formigas cortadeiras da tribo Attini como fonte de micro-fungos com potencial para degradação de hidrocarbonetos. Estes insetos são eusociais e possuem um sistema de comunicação intra e interespecífico altamente especializado, baseado no reconhecimento de indivíduos através de compostos químicos voláteis, que em sua maioria são hidrocarbonetos, armazenados em suas cutículas.

O micro-ambiente do exoesqueleto das attini do gênero *Atta* aqui utilizadas mostrou ser uma fonte rica de biodiversidade microbiana, assim como outros estudos já haviam constatado. A técnica utilizada, Flotação em óleo mineral, permitiu a obtenção de 214 micro-fungos, sendo 118 representantes do grupo dos fungos dematiáceos e 96 fungos filamentosos hialinos. A submissão dos fungos a testes de degradação de tolueno revelou ao menos uma estirpe interessante correspondente a cada gênero isolado, a saber: *Teratosphaeria*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Paecilomyces* e *Isaria*.

Um total de 10 estirpes com potencial para aplicação em biorremediação foi selecionado em virtude dos resultados que apresentaram quanto à biomassa produzida nos experimentos em atmosfera modificada em dessecadores. Atualmente as mesmas fazem parte do acervo de culturas do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), sob responsabilidade do Dr. Fernando C. Pagnocca. Tais culturas serão também depositadas na CBMAI (Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e Indústria), CPQBA /Unicamp.

## ABSTRACT

Oil is a hydrocarbon mixture of various sizes, including saturated and aromatic compounds. Natural gas is a mixture of gaseous hydrocarbons and its main component is methane. In our society, the great demand for these fuels requires fast extraction, transportation and refining, increasing the number of accidents that compromise the environment. Oil is a finite resource and it is necessary to reduce the problems related to the question concerning environmental pollution which has encouraged the search for alternative fuel sources in our country. So today we have two major biofuels: ethanol and biodiesel.

Concurrently, many studies have been done directed toward the isolation of microorganisms capable of degrading petrochemical industrial wastes, most of them using as a source of isolation soil and water collected in a contaminated environment. Isolation from alternative substrates has emerged as a new strategy that has provided satisfactory results. In this work, we present the leaf-cutter ants of the Attini tribe as a source for the isolation of micro-fungi with the potential for hydrocarbon degradation. These insects have a social way of life and a highly specialized system of intra and interspecific communication, which is based on the recognition of individuals through volatile chemical compounds, the majority hydrocarbons, stored in their exoskeleton.

The micro-environment exoskeleton of Attini ants (genus *Atta*) used in this work proved to be a rich source of microbial biodiversity, as other studies have found. The flotation isolation technique applied here allowed the achievement of 214 micro-fungi, 118 representatives of the dematiaceous fungi group and 96 hyaline filamentous fungi. They were submitted to toluene degradation tests and at least one strain of each genus presented good results, namely *Teratosphaeria*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Paecilomyces* and *Isaria*.

Ten strains with potential for use in bioremediation were selected regarding the results of biomass production in the tests of modified atmosphere into desiccators. At present they are part of the private collection of cultures under the responsibility of Dr. Fernando Carlos Pagnocca, at the Microbiology Laboratory of the Center for Studies of Social Insects. These strains will be also deposited at CBMAI (Brazilian Collection of Microorganisms of Environment and Industry), CPQBA/Unicamp.

## 1 – INTRODUÇÃO

A cada dia, intensificam-se as buscas por micro-organismos capazes de degradar moléculas tóxicas resultantes de diversos eventos, como derramamento de petróleo e despejo de resíduos industriais. Ao conjunto de técnicas de tratamento biológico utilizadas para degradar, reduzir ou eliminar a periculosidade de compostos orgânicos ao meio ambiente e à saúde humana, denominamos biorremediação. Pelas vantagens que oferece em relação às técnicas convencionais, a mesma tem conquistado um espaço cada vez maior no meio científico (SEABRA, 2008)

A biorremediação é um processo que contribui para o equilíbrio de um ecossistema e seu sucesso depende, em grande parte, da microbiota existente. Micro-organismos úteis para uso em biorremediação geralmente são aqueles presentes em um local contaminado, pois parte-se do princípio que ali sobrevivem graças à habilidade metabólica que apresentam para assimilar as substâncias tóxicas (SARKAR et al, 2005).

Durante muito tempo os micro-organismos mais empregados foram as bactérias, porém atualmente, a utilização de fungos, especialmente os filamentosos, tem sido substancialmente recomendada em processos de biorremediação devido à sua maior capacidade de adaptação a condições inóspitas. Esta característica deve-se à sua destacada bioatividade e ao seu crescimento morfológico (LEITÃO, 2009; GOPINATH et al, 2005), revelando diversas espécies de grande potencial (PRENAFETÁ-BOLDÚ et al., 2006; SINGH, 2006; MARIANO et al. 2008; SATOW et al., 2008).

Exemplos de compostos passíveis de assimilação por estes micro-organismos são os hidrocarbonetos. O petróleo é formado por uma mistura complexa destas moléculas, cuja composição pode variar em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas de sua formação. Sua composição é intermediária às substâncias facilmente biodegradáveis e outras que exigem sistemas mais complexos para sua degradação (CRAPEZ et al., 2002; SÃO PAULO, 2002).

Investigando fungos potencialmente degradadores de benzeno Guedes (não publicado) encontrou várias cepas de importante potencial. Dentre as fontes de isolamento investigadas, o estudo destacou o exoesqueleto de insetos sociais, especificamente as formigas cortadeiras. A literatura reporta que insetos apresentam hidrocarbonetos na constituição de suas cutículas, os quais, dentre outras funções, lhes tornam hidrofóbicos (BLUM, 1985; ENDLER et al., 2004). Outra investigação relatou a presença de um grupo específico de fungos, denominados fungos dematiáceos ou fungos negros (devido à sua característica coloração escura, dada pela

presença de melanina na constituição de sua parede celular) em ninhos de formigas, concluindo existir uma relação de mutualismo entre o inseto e estes fungos (LITTLE & CURRIE, 2008). O potencial de assimilação de hidrocarbonetos aromáticos nesse grupo de micro-organismos já foi anteriormente reportado (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2004, 2006; SATOW et al., 2008).

Neste contexto, objetivou-se investigar micro-fungos associados à cutícula de formigas, testando a capacidade de crescimento dos mesmos em ambiente de atmosfera modificada de hidrocarbonetos. Objetivou-se selecionar fungos para aplicação em biorremediação de solos contaminados. Além disso, esta pesquisa também fomentou um acervo de culturas de interesse para o setor de petróleo e gás com as cepas selecionadas, pois considera-se de fundamental importância a preservação dos recursos biológicos para futuros estudos. Afinal, uma pesquisa científica só tem valor se puder ser convenientemente reproduzida.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Situação do problema: combustíveis e o meio ambiente

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos e, em menor quantidade, de derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. A proporção de hidrocarbonetos existentes no petróleo ultrapassa a faixa dos 90%. É uma substância inflamável, oleosa e de densidade menor do que a da água. Sua composição global pode ser definida pelo teor de hidrocarbonetos saturados, alcanos de cadeia normal e ramificada (parafínicos) e cicloalcanos (naftênicos), e de hidrocarbonetos aromáticos, que incluem moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (naftenoaromáticos), compostos cíclicos de enxofre, resinas e asfaltenos (componentes policíclicos, de alto peso molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio).

A formação do petróleo ocorre a partir da deposição de matéria orgânica morta advinda do plâncton, mediante um processo denominado catagênese, que se passa em profundidade suficiente para que se atinjam temperaturas entre 60 e 150°C. O petróleo então se armazena em bolsas no subsolo, conhecidas como trapas ou armadilhas, que se localizam nas denominadas rochas-reservatório (NEIVA, 1986). As jazidas de petróleo mais antigas datam de 400 milhões de anos, enquanto as mais novas 10 milhões de anos.

O gás natural é uma mistura de hidrocarbonetos gasosos, desde o metano até o hexano, sendo o metano o componente principal, perfazendo pelo menos 70% da mistura. Pode também apresentar em pequenas quantidades outros componentes como nitrogênio e dióxido de carbono, por exemplo, dependendo de fatores relativos ao campo em que o gás é produzido, processo de produção, condicionamento, processamento e transporte. O gás natural apresenta-se tanto dissolvido no petróleo bruto, sendo denominado *gás natural associado*, e é separado durante o refinamento, ou em um reservatório próprio, do qual pode ser obtido diretamente e é conhecido por *gás natural não-associado*.

Na década de 40, com as descobertas de óleo e gás na Bahia, teve início o uso do gás natural no Brasil. Desde então sua maior utilidade é sua re-injeção nos reservatórios com o intuito de permitir a recuperação secundária do óleo, além de servir também como combustível na geração de energia elétrica ou nas indústrias (NEIVA, 1986).

Desde seu surgimento, a indústria do petróleo tem crescido exponencialmente. Com o tempo o petróleo substituiu a madeira e principalmente o carvão, e adentrou cada vez mais em nossas vidas com o desenvolvimento dos processos de refino, originando inúmeros derivados,

presentes em uma infinidade de produtos. Entretanto, para ser utilizado, o petróleo precisa ser extraído, transportado e refinado. Todas estas etapas dão margem à ocorrência de acidentes que podem levar ao derramamento de óleo no meio ambiente. Em 2007 o mundo consumia diariamente 84,5 milhões de barris de óleo por dia, mas a previsão para 2030 é de um consumo diário de 115 milhões de barris (MILANELLI, comunicação pessoal).

O transporte através de navios (hidroviário) e oleodutos são os principais meios de impacto ambiental. Existem mais de oito mil petroleiros navegando pelos oceanos e mares do mundo, cada um carregando em média de 150 a 300 mil toneladas de petróleo. Cerca de 0,25% de todo petróleo que é transportado via hidroviária se perde em derramamentos anualmente, o que corresponde a em média 6 milhões de toneladas, que contaminam tanto os oceanos quanto os ambientes costeiros. Os vazamentos advindos de oleodutos são grande problema para a porção terrestre, promovendo a contaminação de solos e de cursos fluviais quando próximos (MILANELLI, comunicação pessoal).

Além da contaminação durante o transporte, a extração também condena os locais onde é realizada, seja no ambiente aquático ou terrestre. A indústria petroquímica gera diariamente uma grande quantidade de resíduos derivados do refinamento do petróleo. Dentre as moléculas tóxicas geradas pelo refino do petróleo estão o benzeno, tolueno, xileno, e etilbenzeno, compostos aromáticos que apresentam maiores riscos à saúde humana, pois possuem propriedades carcinogênicas e mutagênicas, além de serem biocumulativos. Os anéis aromáticos são de difícil degradação e assim podem permanecer no ambiente por um longo período prejudicando os ecossistemas (SINGH, 2006).

Os vazamentos de petróleo envolvem danos em diversos níveis biológicos aos organismos, como:

- Danos no metabolismo, envolvendo alterações em reações químicas em escala celular e até mesmo no DNA;
- Alterações estruturais e funcionais no organismo, como danos físicos em órgãos, geralmente por recobrimento físico que pode levar à morte por asfixia, aumento da temperatura corpórea, perturbações fisiológicas relacionadas à excreção, absorção de água e metabolismo, além de prejudicar a locomoção, a reprodução e nas plantas causar o bloqueio da fotossíntese; Alterações na dinâmica e equilíbrio das populações (reprodução, expectativa de vida, natalidade, mortalidade) e na estrutura e função das comunidades (distúrbios na teia trófica) levando a uma perturbação geral do ecossistema (MILANELLI, comunicação pessoal).

Por ser um recurso não renovável e também pelos danos ambientais que vem causando, a substituição do petróleo e seus derivados por uma fonte alternativa de energia ganha forças a cada dia, tendo como um de seus escopos a preservação do meio ambiente sem a perda da qualidade de vida. Neste contexto foram criados os biocombustíveis, derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. São desenvolvidos a partir de produtos agrícolas como a cana-de-açúcar, mamona, soja, canola, babaçu, mandioca, milho, beterraba, e outros (ANP, 2011).

Os dois principais biocombustíveis utilizados no Brasil são o etanol da cana-de-açúcar e o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis. O Brasil apresenta uma matriz energética considerada mundialmente limpa: cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos pelo país são renováveis. No resto do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não-renováveis. Pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por muitos países que buscam fontes alternativas estratégicas ao petróleo. Os biocombustíveis poluem menos porque seu processo de produção tende a ser mais limpo e pela emissão de resíduos menos tóxicos (ANP, 2011). Além disso, a composição química das moléculas dos biocombustíveis é mais simples, e mais susceptível aos processos de biodegradação.

Sabe-se que este tema instiga o profundo estudo sobre micro-organismos capazes de degradar os compostos tóxicos da indústria do petróleo, no âmbito de gerar novas descobertas que possam minimizar os graves problemas atravessados atualmente.

## **2.2 – Biorremediação e fungos como soluções viáveis**

A biorremediação é uma nova tecnologia que foi desenvolvida na busca de formas de recuperação de áreas contaminadas e de procedimentos adequados para a manipulação de resíduos. É uma metodologia muito efetiva e promissora para o tratamento de diferentes contaminações com hidrocarbonetos, incluindo as de petróleo. Ela visa a mineralização de compostos tóxicos ou a diminuição de sua concentração a níveis aceitáveis. Compostos poluentes e/ou tóxicos podem ser degradados a substâncias com peso molecular menor, com

maior polaridade, menos nocivas ao ambiente propiciando a recuperação das áreas contaminadas (ALEXANDER, 1994; MARTINS et al., 2005).

A versatilidade metabólica dos micro-organismos sustenta praticamente todas as aplicações da biorremediação e a maioria dos trabalhos atuais tem se concentrado em poluentes orgânicos, embora a gama de substâncias que podem ser transformadas ou detoxificadas por micro-organismos inclua resíduos sólidos, líquidos, materiais naturais e poluentes inorgânicos como metais tóxicos e metalóides. A maioria das aplicações desenvolvidas até o momento envolve principalmente o uso de bactérias. Ainda observa-se uma acentuada falta de apreciação do potencial dos fungos na biorremediação ambiental, apesar da vantagem apresentada por seu modo de crescimento filamentosos e ramificados que permite uma eficiente colonização e exploração de substratos como solos contaminados (GADD, 2001).

A biorremediação é além de tudo viável financeiramente, pois seu custo é extremamente baixo em comparação com outros processos, principalmente físicos, como extração de vapor do solo e bombeamento, entre outros. As técnicas de biorremediação não utilizam água tratada e nem produtos químicos nocivos ao meio ambiente. Entretanto, o processo é lento e, frequentemente, faz-se necessário o isolamento da área contaminada.

A aplicação das técnicas pode ser feita no local (*in situ*) ou *ex situ*, quando há a remoção do solo contaminado devido a riscos de dispersão do poluente para os lençóis freáticos ou alastramento da área contaminada. O processo *in situ* quando possível é mais viável, devido ao elevado custo na remoção e transporte do substrato (MARTINS et al., 2005). No ambiente contaminado, as estratégias de biorremediação incluem tanto a utilização de micro-organismos autóctones (encontrados no local da contaminação), sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (denomina-se biorremediação intrínseca ou natural), como também a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) ou a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2003).

Fungos são organismos heterotróficos (quimiorganotróficos) que se alimentam por absorção de matéria orgânica digerida extracelularmente através da secreção de enzimas. São multicelulares, excetuando-se as leveduras, sendo constituídos por hifas que em conjunto formam o micélio fúngico. Possuem parede celular de composição geralmente quitinosa, são imóveis e se reproduzem tanto sexuadamente quanto assexuadamente, sendo esta última a forma de reprodução mais predominante (MUELLER et al., 2004; MADINGAN et al., 2010). Habitam

tanto o meio aquático, quanto o ambiente terrestre. Neste, encontra-se a maioria das espécies fúngicas, seja no solo ou sobre matéria orgânica morta, onde são essenciais para processos de mineralização do carbono orgânico. Os fungos também são capazes de interagir com plantas e animais, por exemplo como patógenos ou simbiotes (micorrizas)(MADIGAN et al, 2010).

Recentemente estes micro-organismos têm sido amplamente estudados no âmbito da degradação de compostos orgânicos nocivos. Existem vantagens quanto ao uso dos fungos em relação às bactérias como: grande diversidade de cepas em ambientes terrestres; maior tolerância a estresse osmótico e variação de temperatura; capacidade de viver em meios com pH ácido (pH 5,5); crescimento em ambientes com baixo grau de umidade; necessidade de menor quantidade de nitrogênio, desenvolvimento em ambientes com altas concentrações de gás carbônico, capacidade de degradar moléculas complexas como a lignina e, principalmente, não apresentam restrição quanto ao tamanho da cadeia do hidrocarboneto a ser degradada (ROSATO, 1997; TORTORA et al., 2003).

Gutnick e Rosenberg (1977) relataram que os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos possuem três características essenciais:

1. Um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos com sítios especiais de ligação e/ou produção de substância emulsificante para o transporte do hidrocarboneto para o interior da célula;
2. Enzimas oxigenases específicas e;
3. Especificidade induzida, apresentando resposta positiva ao petróleo e seus constituintes.

A qualidade e quantidade de misturas de hidrocarbonetos e as propriedades dos ecossistemas afetados determinam a persistência dos hidrocarbonetos do petróleo. Dependendo do ambiente e das condições ambientais os hidrocarbonetos podem permanecer por meses ou então serem degradados dentro de poucas horas ou dias. Fungos filamentosos não exibem degradação diferencial para um determinado comprimento de cadeia de alcanos, porém a fração saturada mostra maiores taxas de biodegradação, seguida pelos aromáticos leves, e os aromáticos com alto peso molecular, sendo que os compostos polares exibem as menores taxas. Devido à presença de vários componentes de estruturas complexas, ocorre um aumento na resistência à degradação das misturas residuais. A degradação completa de óleo cru nunca ocorre, um resíduo complexo sempre permanece. Este resíduo de coloração negra contém uma elevada proporção de constituintes asfálticos e exibe baixa toxicidade (SINGH, 2006).

Davies e Westlake (1979, apud SINGH, 2006) estudaram a capacidade de crescimento de 60 isolados fúngicos em n-tetradecano, tolueno, naftaleno, e sete óleos brutos de petróleo de várias composições. Quarenta culturas, incluindo 28 isolados do solo, apresentaram crescimento em um ou mais dos óleos brutos de petróleo. Os gêneros comumente isolados de solos são aqueles de abundante produção de pequenos conídios, como *Verticillium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e são ótimos em assimilar hidrocarbonetos. Estes fungos também crescem em n-parafinas com 10 átomos de carbono, em vez de frações de petróleo ou compostos aromáticos.

Pesquisas atuais revelam que a mineralização dos hidrocarbonetos pode se dar tanto por degradação (oxidação) ou através de co-metabolismo. Pouco ainda se sabe sobre o aparato enzimático envolvido nestes processos e quais grupos ou espécies realizam cada um desses processos.

### **2.3 – Outras fontes de isolamento**

Durante muito tempo a principal fonte de isolamento microbiano foi o solo. A busca por um micro-organismo com potencial para degradação de um dado composto, por exemplo, tinha como passo inicial o isolamento a partir de solos contaminados com o mesmo. A busca por fontes de isolamento alternativas ganhou adeptos, e parte da procura de micro-organismos com um dado potencial em ambientes que possam oferecer condições similares às que seriam encontradas em solos contaminados (ATTILI-ANGELIS, comunicação pessoal).

Neste projeto, buscamos explorar o exoesqueleto de insetos sociais, especificamente as formigas cortadeiras da tribo Attini, seguindo a lógica de que estes insetos possuem um apurado sistema de comunicação intra e interespecífico, o qual é baseado no reconhecimento através de feromônios, compostos químicos voláteis, majoritariamente hidrocarbonetos, que encontram-se armazenados em sua cutícula (WAGNER, 2000). Além disso, estudos recentes com formigas cortadeiras pertencentes à tribo Attini têm revelado que uma enorme gama de micro-organismos, incluindo micro-fungos, podem se apresentar associados aos ninhos (DUARTE, 2010; GUEDES, 2010; RODRIGUES, 2004; PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011). Dentre os micro-fungos obtidos nestes trabalhos, muitos apresentam diferentes potenciais descritos na literatura, incluindo o de degradação de compostos tóxicos. Os resultados obtidos nestes estudos, demonstrando a grande diversidade

microbiana relacionada a estes insetos, se associam à possibilidade da descoberta de novos micro-fungos com potencial para degradação de hidrocarbonetos.

A tribo Attini (ordem Hymenoptera, Família: Formicidae, Subfamília: Myrmicinae) compreende aproximadamente 230 espécies de formigas, divididas em 12 gêneros. Popularmente conhecidas como “saúvas”, “formigas cortadeiras” ou “quén-quéns” estas formigas possuem um hábito de forrageamento singular, o qual lhes garante até hoje o mérito de estarem enquadradas dentre as piores pragas da agricultura brasileira por causarem o desfolhamento das lavouras. As Attini possuem o hábito de cortar elevadas quantidades de material vegetal fresco, o qual é convertido em substrato pelas operárias para o crescimento de um fungo simbiote, o basidiomiceto *Leucoagaricus* (Agaricales: Lepiotaceae), que lhes serve de alimento (MARCONI, 1970). O substrato processado pelas operárias juntamente ao micélio do fungo compõe o “jardim de fungo”, cultivado no interior de câmaras subterrâneas no formigueiro (ANDRADE et al., 2002).

As formigas cortadeiras são consideradas insetos eusociais, sendo que os indivíduos encontram-se divididos em castas (operárias, jardineiras, soldados e a rainha). Existem também as formas aladas, apenas encontradas durante a época reprodutiva: as içás (fêmeas) e os bitús (machos) (DELLA LUCIA et al., 1993; JUSTI, 1996). A fundação de uma nova colônia tem início com a revoada das formas sexuadas. Ao saírem da colônia original, as içás carregam uma pequena porção do fungo simbiote em sua cavidade bucal (denominada *pellet*), o qual serve de inóculo para o cultivo do jardim de fungo que alimentará todo o formigueiro. (JUSTI et al., 1996; CAETANO et al., 2002).

O reconhecimento entre insetos sociais de uma mesma colônia ou de colônias distintas, de seu estado reprodutivo e de sua casta, ocorre através de substâncias produzidas na cabeça e que podem ser encontrados por toda a cutícula das formigas. Estas substâncias são denominadas feromônios, e se tratam de hidrocarbonetos voláteis que permanecem no exoesqueleto juntamente a uma camada de lipídeos que atua na proteção e impermeabilização dos insetos. Através do contato entre as antenas os indivíduos são capazes de reconhecer o perfil dos hidrocarbonetos um do outro (WAGNER et al., 2000; GREENE; GORDON, 2007).

O perfil de hidrocarbonetos em uma colônia pode variar com o tempo ou mesmo ao longo das estações do ano, e é composto por uma variedade de moléculas com diferentes comprimentos de cadeia que são distribuídas nas classes dos n-alcanos, metilalcanos ramificados e n-alcenos (WAGNER et al., 1998; GREENE; GORDON, 2007).

Diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem ocorrer em um estado dormente ou participar da dinâmica do funcionamento da simbiose formiga e micro-organismos (FISHER et al. 1996; RODRIGUES, 2004) ou até mesmo prejudicar a simbiose (CURRIE, 2001a), como é o caso dos fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), que ocasionam decréscimo de biomassa do jardim, diminuição na produção de pupas, larvas e operárias, levando a um retardo no crescimento da colônia (CURRIE, 2001b). Existem ainda outras questões interessantes a serem esclarecidas, por exemplo, a das leveduras negras relacionadas ao gênero *Phialophora*, descritas por Little e Currie (2007), os quais sugerem este fungo como um novo simbionte das formigas Attini. As leveduras negras são um grupo particular de micro-organismos que encontram-se em sua maioria ligadas a doenças humanas. Little e Currie (2007) em seu estudo constataram que as leveduras negras encontradas utilizam uma bactéria simbiote das formigas como fonte de nutrientes. Estas bactérias pertencem ao gênero *Pseudonocardia*, são actinomicetos que produzem antibióticos que auxiliam as formigas no combate ao fungo parasita do gênero *Escovopsis*.

#### **2.4 – Coleções de cultura e acervos de pesquisa como suporte à biotecnologia**

Tendo em vista as perturbações ambientais a que muitos ecossistemas são submetidos, majoritariamente por ação antrópica, acredita-se que inúmeros micro-organismos vêm sendo destruídos antes mesmo de serem identificados. A preservação de micro-organismos fora de seu ambiente natural demonstra ser a melhor alternativa para a conservação da microbiota de locais ameaçados. Neste contexto, as coleções de culturas, que foram criadas especialmente no intuito da manutenção de micro-organismos relacionados a patentes, passaram a ser utilizadas para a preservação de culturas dos mais variados tipos, funcionando como um verdadeiro banco genético (CGEE, 2009; KRIEGER et al., 2009; MELLO et al., 2003).

As coleções de cultura utilizam métodos de preservação que exigem tempo e recursos financeiros, mas funcionam como um banco genético onde são depositadas culturas de interesse industrial, agrícola, patogênico e ambiental. Podem também ser abordadas no contexto da educação ambiental mediante exposições que possam vir a ser realizadas com o intuito de promover a divulgação destes micro-organismos para serem conhecidos (CGEE, 2009; KRIEGER et al., 2009; MELLO et al., 2003).

As agências de fomento têm estimulado a informatização de acervos e a criação de redes de dados, visando um sistema que disponibilize informações de recursos genéticos microbianos, a fim de se manter um fluxo contínuo de materiais e informações de forma integrada e facilitada, minimizando a realização de trabalhos semelhantes e maximizando a produção técnica e acadêmica da área (MELLO et al., 2003).

### 3 – OBJETIVOS

Este trabalho objetivou:

- Isolar e identificar micro-fungos a partir de iças da tribo Attini (formigas cortadeiras), pertencentes ao gênero *Atta*;
- Reconhecer e selecionar as espécies degradadoras de tolueno através da aplicação de testes em dessecadores e do agente redutor 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP);
- Fomentar uma coleção de culturas de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustível com as cepas selecionadas.

### 4 – CONTEXTO DO PROJETO

O laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, ao qual esta pesquisa está vinculada, acumulou 20 anos de experiência em estudos sobre micro-fungos em formigas. Além dos objetivos anteriormente propostos, este trabalho também contempla a formação de recursos humanos capacitados para estudos da microbiota, a nível taxonômico e biotecnológico.

Ressalta-se que houve uma mudança parcial dos objetivos inicialmente propostos. Este trabalho visou à priori a seleção de espécies degradadoras de hidrocarbonetos com o uso de n-hexadecano como única fonte de carbono e energia. Por sugestão do Dr. Francesc Prenafeta-Boldú do Instituto de Gerenciamento de Resíduos de Barcelona – Giro, Espanha, este hidrocarboneto foi substituído por tolueno, dada a maior riqueza de estudos existentes que utilizaram este hidrocarboneto para testes com micro-fungos.

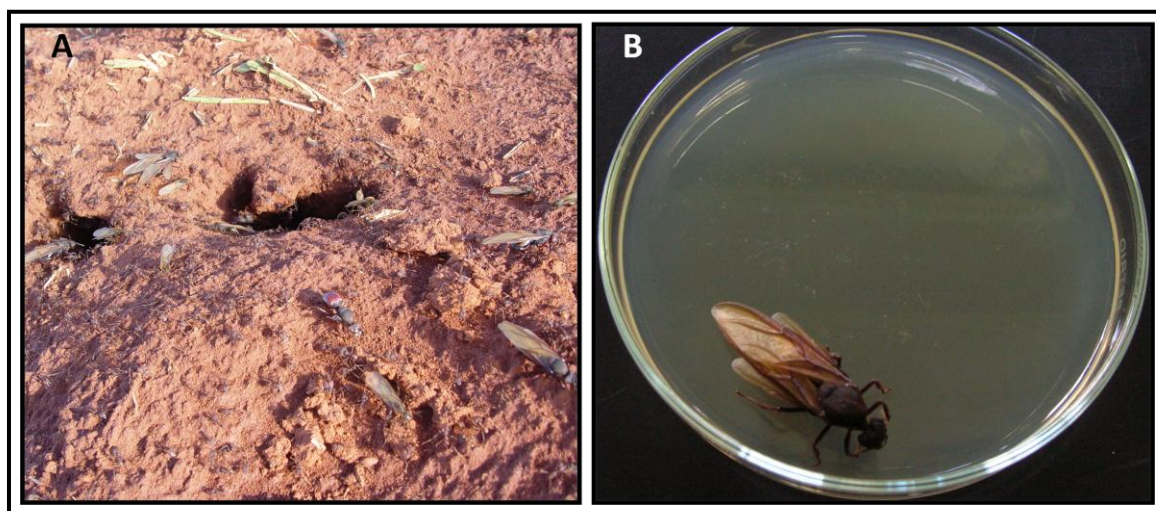
## 5 – MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 – Material

#### 5.1.1 – Substrato de isolamento

O isolamento dos micro-fungos foi realizado a partir do corpo e *pellet* de iças das espécies *Atta capiguara* e *A. laevigata* obtidas durante o período de acasalamento, também conhecido como revoada.

As iças foram capturadas na saída dos olheiros, momentos antes de iniciarem o vôo nupcial. A captura foi feita com pinças estéreis e as iças foram colocadas em placas de Petri também estéreis nas quais foram transportadas. Coletou-se em três ninhos adultos de *A. capiguara* Gonçalves (1944) e um ninho adulto de *A. laevigata* Smith (1858), localizados na Fazenda Santana, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (GPS: 22°50.6' S; 48°26.1' W; elevação 798 m), em novembro de 2008 e novembro de 2009. Na área são encontradas predominantemente gramíneas *Paspalum* sp.



**Figura 1.** A – Saída de iças e bitus dos olheiros de um formigueiro de *Atta capiguara* antes de iniciarem o vôo nupcial. B – Iça coletada e acondicionada em placa de Petri estéril para transporte ao laboratório. Imagens cedidas pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

### 5.1.2 – Meios de Cultura

#### Ágar Sabouraud com Cicloheximida e Cloranfenicol (“Mycosel”)

Dextrose	20,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	20,0 g
Cicloheximida	500,0 mg
Cloranfenicol	200,0 mg
Estreptomicina	200,0 mg
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### Ágar batata dextrose (BDA) (Acumedia Manufactures®)

Ágar batata dextrose	39,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### Ágar Czapek extrato de levedura (CYA)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Czapek concentrado	10 mL
Extrato de levedura	5,0 g
Sacarose	30,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### Ágar extrato de malte (MEA) (Acumedia Manufactures®)

Ágar Extrato de Malte	61,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,5 e esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

**Ágar malte 2% (MA 2%) (Acumedia Manufactures®)**

Extrato de Malte	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

**Caldo de malte 2% (Acumedia Manufactures®)**

Extrato de Malte	20,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

**Meio Bushnell Haas**

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,0g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0265g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{FeCl}_3$	0,05g
Água destilada q.s.p.	1000mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

**5.1.3 Reagentes e soluções****Solução de Macronutrientes**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,5g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	2,0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

**Solução de Micronutrientes**

FeCl <sub>3</sub>	120 mg
H <sub>3</sub> BO	350 mg
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	10 mg
KI	10 mg
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	45 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	20 mg
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	75 mg
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	50 mg
AlK(SO <sub>4</sub> ) . 12H <sub>2</sub> O	20 mg
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	13,25 g
NaCl	10,0 g
Água destilada q.s.p.	1000mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

**Solução salina 0,85%**

NaCl	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

**Solução de cloranfenicol**

Cloranfenicol	1,0 g
Álcool 95°GL q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada por ultra-filtração em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro e mantida a -20° C.

**Solução de estreptomicina**

Estreptomicina	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20 °C.

**Solução de penicilina**

Penicilina	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro e mantida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solução de cicloheximida**

Actidiona	1,0 g
Acetona q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro e mantida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solução de clorotetraciclina**

Clorotetraciclina	1,0 g
Álcool 70% q.s.p.	100 mL

Esterilizar com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro e manter a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solução de glicerol 30%**

Glicerol	300 mL
Água destilada q.s.p.	700 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm.

**Solução de lise**

Tris	50 mM
Ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA)	50 mM
NaCl	250 mM
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,3%, pH= 8,0

A solução foi esterilizada com membrana filtrante e mantida a temperatura ambiente.

**Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque)**

Tris	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA	8,3 g
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	600 mL

Ajustar o pH da solução entre 8,2 - 8,3 (ajuste realizado com NaOH 1,0 M, quando necessário). Completar o volume para 1000 mL.

**Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x**

TBE 10x (solução estoque)	100 mL
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	900 mL

Misturou-se os dois volumes. Não foi necessário esterilizar.

**Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x**

TBE 10x (solução estoque)	50 mL
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	950 mL

Misturou-se os dois volumes. Não foi necessário esterilizar.

**Tris-EDTA (TE) (para 1 L de tampão)**

Tris 1M	10 mL
EDTA 0,5M	2 mL

Ajustou-se para pH=8,0 e completou-se o volume para 1 L com água miliq. Autoclavou-se durante 20 minutos.

**Gel de agarose 1%**

Agarose	1,0 g
TBE 1x	100,0 mL

Pesou-se a agarose que foi adicionada a um Erlenmeyer de 250 mL, juntamente com TBE 1x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até tornar-se completamente límpida. Deixou-se a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

**Gel de agarose 1,4%**

Agarose	1,4 g
TBE 0,5x	100,0 mL

A agarose foi pesada em um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se o TBE 0,5x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até tornar-se completamente límpida. Deixou-se a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

**Marcador de massa molecular**

DNA Ladder 1 kb (LGC<sup>®</sup>)

**Primers**

Para a amplificação do DNA, utilizaram-se os seguintes *primers*:

V9G (5'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') (DE HOOG et al., 1998)

LS266 (5'-gCATTCCCAAACAACCTCgACTC-3') (PRYCE, 2010)

Para a reação de sequenciamento:

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (WHITE et al., 1990)

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990)

NL1 (5'- TGCTGGAGCCATGGATC-3') (VILELA et al., 2005)

NL4 (5'-TAGATACATGGCGCAGTC-3') (VILELA et al., 2005)

Os *primers* foram diluídos em tampão TE até a concentração de 10 µmol no caso de ITS1 e ITS4 e a 10 µM no caso de NL1 e NL4, sendo mantidos a -20°C.

**Tampão de amostra para corridas em gel de agarose – “Loading Buffer”**

Azul de bromofenol	0,025 g
Sacarose	4,0 g
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	10 mL

A solução foi misturada e armazenada a 4 °C.

**Solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M pH 8,0**

Na-EDTA (Titriplex III Bio Rad 161- 0729)	186,1 g
Água ultrapura q.s.p.	800 mL

Adicionou-se Na-EDTA a água ultra pura e misturou-se com auxílio de agitador magnético. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH ( $\pm 20$ g NaOH em “pellet”) e a solução foi autoclavada.

#### **Acetato de sódio 3 M, pH 4,6**

Acetato de sódio (CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O) (Merck 6267)	20,4 g
Água ultra pura q.s.p.	50 mL

Dissolveu-se o acetato de sódio em 50 mL de água ultra pura, ajustou-se o pH para 4,6 e armazenou-se a -20 °C.

#### **dNTPS (concentração final: 1,25 mM)**

Pipetar em microtubo de 1,5 mL, 10  $\mu$ L de cada dNTP (100mM) do kit illustra dNTP Set, 100 mM solutions - GE<sup>®</sup>. Adicionar 760  $\mu$ L de água ultra pura, qualidade Milliq<sup>®</sup>. Misturar em vortex e centrifugar por alguns segundos. Aliquotar 50  $\mu$ L dessa solução em microtubos de 0,5 mL.

#### **10X Buffer**

Tampão do kit Taq-polimerase Brasil - Invitrogen<sup>®</sup> pronto para uso. Aliquotar 125  $\mu$ L em microtubos de 0,5 mL.

#### **MgCl<sub>2</sub> (concentração final: 50 mM)**

Cofator do kit Taq-polimerase Brasil - Invitrogen<sup>®</sup> pronto para uso. Aliquotar 50  $\mu$ L em microtubos de 0,5 mL.

#### **Taq polimerase (5U/ $\mu$ L)**

Aliquotar 10  $\mu$ L de Taq-polimerase Brasil - Invitrogen<sup>®</sup> em microtubos de 0,5 mL.

#### **Brometo de etídio**

Brometo de etídio	8 $\mu$ L
Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x	300 mL

O brometo foi adicionado ao TBE 1x em um recipiente e misturados até homogeneização da solução.

**Corante lactofenol azul de algodão (COLLINS, 1969)**

Ácido fênico fundido-fenol 1%	20 mL
Ácido láctico	20 mL
Glicerina	40 mL
Azul de algodão	0,05 g

**Solução de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)**

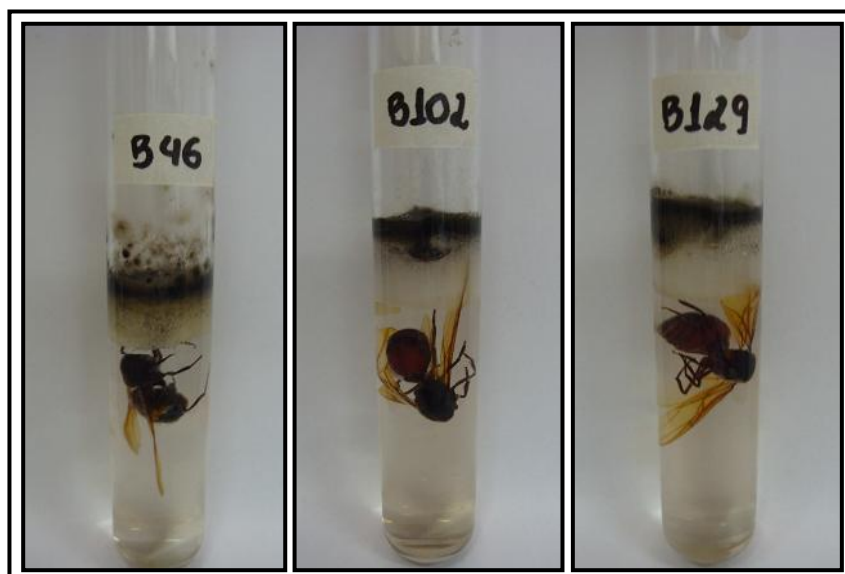
2,6-diclorofenol indofenol	1g
Água destilada esterilizada	100mL

Foi adicionada água ao DCPIP em um recipiente e foram misturados até homogeneização, obtendo-se uma solução aquosa de coloração azul escura.

**5.2 – Métodos****5.2.1 – Isolamento dos fungos**

Para o isolamento dos fungos das içás, utilizou-se a técnica de flotação em óleo mineral (SATOW et al., 2008). As formigas foram colocadas em tubos de 50 mL contendo 25 mL de solução salina; 200 U de penicilina; 200 µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de cicloheximida (actidiona). Os tubos foram agitados manualmente e incubados à temperatura ambiente por 30 min. Após, adicionou-se a essa solução 5 mL de óleo mineral esterilizado, seguido de uma agitação vigorosa em vórtex por 5 minutos. Por 20 minutos os tubos foram deixados em repouso. Da interface desta solução foram retiradas alíquotas de 100µL, e semeadas em Agar Mycosel. As placas foram incubadas a 35°C por aproximadamente 15 dias, até o aparecimento de colônias. O isolamento das mesmas foi feito em placas contendo MA 2% e antibióticos (16.570 U/ml de penicilina; 100.000 µg/ml de estreptomicina; 10.000 µg/ml de clorotetraciclina) para garantir a pureza da cultura.

Alguns tubos foram incubados a 25°C por um período de até 45 dias, sendo também realizado um isolamento destes. Uma pequena porção do micélio do fungo foi retirada do tubo e transferida para placas contendo MA 2% e antibióticos (16.570 U/ml de penicilina; 100.000 µg/ml de estreptomicina; 10.000 µg/ml de clorotetraciclina). A figura 2 ilustra o crescimento fúngico observado nestes tubos.



**Figura 2.** Crescimento fúngico em tubo (camada superficial negra), observado pela técnica de flotação em óleo mineral. Incubação a 25°C por 45 dias.

### 5.2.2 – Preservação dos fungos

As estirpes foram preservadas pelo método de repicagem contínua em tubo inclinado com ágar malte, em duplicata, mantidos em geladeira a 10°C. Foram também preservadas em ultra-freezer a -80°C. Todas as estirpes têm sido mantidas no Laboratório de Microbiologia do CEIS - UNESP Campus de Rio Claro (Figura 3).

A técnica de criopreservação consiste basicamente em conservar cada estirpe em um meio com crioprotetor utilizando esferas de vidro (“pérolas”) como suporte. Em microtubos de 2mL devidamente identificados com o código das estirpes foram adicionados 300 µL de caldo de malte 2%. Posteriormente, estes microtubos receberam o inóculo fúngico que foi aí cultivado por sete dias. Após, foi adicionado 300 µL de glicerol 30%, obtendo-se uma concentração final de 15% de glicerol, e agitou-se vigorosamente em vórtex por 10 segundos e, logo após, foram adicionadas 12-15 pérolas de vidro de 0,2-03 mm de diâmetro até cobrir todo o volume de glicerol. Após esta imersão, os microtubos contendo as esferas de vidro com as células aderidas foram colocados em temperatura de -20°C por no mínimo duas horas, sendo então acondicionados em caixas plásticas no interior do freezer a -80°C (modificado de CBS, 2010).

Todas as estirpes preservadas compõem um- acervo de culturas de interesse para a Petrobrás.



**Figura 3.** Método de criopreservação. Na parte superior à esquerda uma imagem da caixa de criopreservação utilizada para acondicionar os microtubos (parte superior à direita) contendo o micélio cultivado com as pérolas e o crioprotetor. Abaixo uma imagem do ultrafreezer que se encontra no Laboratório de Microbiologia do CEIS (Unesp – Rio Claro) onde são mantidas as estirpes. Imagens cedidas por Aline da Silva Cruz.

### 5.2.3 – Identificação morfológica

A caracterização morfológica das culturas foi feita através de observações macro e microscópicas mediante o uso de estereomicroscópio e preparação de lâminas para microscopia óptica a partir da técnica de microcultivo. Para tal, o fungo foi inoculado em dois pequenos pedaços de ágar, de em média 1,0 x 1,0 cm, sobre uma lâmina de vidro mantida dentro de uma placa de petri sobre um pequeno tubo em U. A inoculação foi feita nos lados ou nos cantos do bloco de ágar, e em seguida coberto com uma lamínula estéril. A este conjunto foi adicionado um pedaço de algodão umedecido em água destilada esterilizada, criando uma condição úmida para evitar o dessecamento do meio. A placa foi então fechada e mantida em sala de incubação a temperatura de 25°C (CROUS et al., 2009a).

Após três a quatro dias o sistema foi aberto, retiraram-se as lamínulas e as mesmas foram colocadas sobre novas lâminas contendo uma gota do corante lactofenol (Azul de Algodão) e analisadas sob microscópio óptico.

Para a caracterização dos gêneros mais comuns, foram utilizados chaves e manuais de identificação, que se utilizam de medições de estruturas, coloração e superfície de colônias, e taxa de crescimento. Muitas das culturas possuíam marcadores fenotípicos insuficientes para uma identificação morfológica, por isso foi necessária a realização do seqüenciamento do DNA ribossômico (rDNA).

#### **5.2.4 – Identificação molecular**

##### **Extração do DNA genômico**

O equivalente a 100 µL de micro-esferas de vidro esterilizadas (Sigma®) foram adicionadas a microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de lise estéril. Foram adicionadas aproximadamente duas a três alçadas da cultura com até 10 dias de crescimento e agitadas vigorosamente em vórtex por 4 minutos, promovendo a quebra das células para liberação do DNA. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a 65°C. Repetiram-se os procedimentos de agitação e aquecimento em banho-maria mais duas vezes e, depois disso, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, recuperou-se a fase aquosa (aproximadamente 400 µL) em novos tubos estéreis previamente marcados (modificado de Sampaio et al.,2001 e Almeida, 2005a).

##### **Eletroforese**

Produtos de extrações, ampliações e purificações foram caracterizados em gel de agarose a 1% em TBE 1x para conferir a qualidade do procedimento. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal, onde o gel de agarose carregado com 2 µL de cada amostra obtida do DNA bruto misturadas com 2 µL de corante (Loading Buffer) foram submetidos a 100V e 50 mA por 40 minutos. O marcador de peso molecular (ladder) utilizado foi de 1kb. Depois da corrida, o gel foi corado em brometo de etídio 0,5 µg mL<sup>-1</sup>, que permite que o DNA fique visível quando submetido à luz UV e visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave™ Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

### **Microsatélite (MSP-PCR)**

As extrações bem sucedidas foram diluídas na proporção de 1  $\mu\text{L}$  de amostra para 750  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril, qualidade Milliq<sup>®</sup> para a realização do procedimento de PCR para microsatélite (MSP-PCR), adaptado de Meyer et al. (1993). Nesta técnica é possível realizar a comparação de padrões de bandas de todas as amostras de DNA extraídas para realização de agrupamentos entre as linhagens e para a detecção de diferenciações intra-específicas. Os padrões de bandas das amostras foram comparados com marcador molecular (Ladder), que possui 1000 pares de bases com pesos conhecidos (Promega<sup>®</sup> Corp.), aplicando-se 5  $\mu\text{L}$  nos poços das extremidades do gel. Para a amplificação por MSP-PCR, foi preparado um mix de reagentes contendo o *primer* GAC, conforme demonstrado na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Reagentes para o MIX de PCR para microsatélite

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade por amostra</b>
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 $\mu\text{L}$
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 $\mu\text{L}$
Primer GAC – (10 $\mu\text{M}$ )	2,0 $\mu\text{L}$
Água ultrapura, qualidade Milliq <sup>®</sup> estéril	10,3 $\mu\text{L}$
Taq polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,2 $\mu\text{L}$

Após rápida agitação em vórtex o mix passa por centrifugação por alguns segundos. São então distribuídas alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do mix em microtubos de 0,2 mL e por fim, adiciona-se 5  $\mu\text{L}$  do DNA diluído. Os microtubos foram agitados em vórtex brevemente e logo em seguida centrifugados por alguns segundos. Depois, foram colocados em um termociclador para dar início ao programa “MSP-PCR”, que consiste em 1 ciclo inicial à temperatura de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 93°C/ 45 s (desnaturação), 50°C/ 1 min (anelamento), 72°C/ 1 min (polimerização) e 72°C/ 6 min (extensão final). Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,4% preparado com TBE 0,5x), em tampão TBE 0,5x para verificar a qualidade dos produtos formados. Depois da corrida, o gel foi revelado em brometo de etídio, visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave<sup>™</sup> Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID<sup>®</sup>. Quando identificada a semelhança entre as estirpes, uma foi selecionada para seguir as etapas subsequentes de sequenciamento.

### Amplificação do DNA ribossomal - PCR

Para o sequenciamento foi realizada a amplificação da região ITS e D1/D2 do DNA ribossômico 26S a partir das amostras de DNA genômico. Para isso, um mix de reagentes contendo os *primers* V9G e LS266 (quando sequenciada a região ITS) ou NL1 e NL4 (quando sequenciada a região D1/D2) foi preparado como indicado na tabela abaixo.

**Tabela2.** Reagentes para o MIX de PCR para amplificação da região ITS e D1/D2 do DNA ribossômico 26S

Reagentes	Quantidade por amostra
Água ultrapura, qualidade Milliq <sup>®</sup> estéril	8,3 µL
Primer V9G (10 pmol)/ NL1 (10 µM)	2,0 µL
Primer LS266 (10 pmol) / NL 4 (10 µM)	2,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µL
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

O mix foi distribuído em alíquotas de 20 µL em tubos de 0,2 mL e, em cada tubo, foram adicionados 5 µL de sua respectiva amostra de DNA diluído em água ultrapura, qualidade Milliq<sup>®</sup> estéril na proporção de 1:750. Os tubos foram agitados em vórtex por 5 segundos, aproximadamente, e passaram por breve centrifugação para serem distribuídos no termociclador e iniciar o programa de amplificação: 1 ciclo de 94°C/ 2 min seguido de 35 ciclos a 94°C/ 35 s, 52°C/ 30 s, 72°C/ 1 min para a região ITS, e 1 ciclo de 96°C/ 3min seguido de 35 ciclos a 96°C/ 30 s, 61°C/ 45 s, 72°C/ 1 min para a região D1/D2. Para verificação dos produtos de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% como realizado para verificação da extração do DNA genômico.

### Purificação dos produtos da Amplificação (PCR)

Posterior à verificação da qualidade dos produtos formados na amplificação, as amostras foram purificadas, utilizando-se o kit “Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit”, da GE Healthcare<sup>®</sup>. As amostras puras resultantes foram aplicadas em gel de agarose 1% para eletroforese para nova checagem.

### Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit “DYEnamic<sup>™</sup> ET Dye Terminator Kit”, da GE Healthcare<sup>®</sup>. Apenas 1 µL de cada amostra purificada foi necessário para esta

etapa. Empregou-se o programa “DYEnamic”, o qual é composto de 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/ 15 s e 60°C/ 60 s. Após a reação, todas as amostras seguiram para nova purificação, adaptada do manual de instruções do kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit”, GE Healthcare®. Em seguida, após secagem, os *pellets* das amostras foram re-suspendidos com 3 µL de formamida (do kit do DYEnamic®), agitadas em vórtex, centrifugadas por alguns segundos, colocadas no gelo e abrigadas da luz até serem aplicadas no sequenciador automático 3130 Genetic Analyser – model 627-0040 (Applied Biosystems, Foster City, E.U.A).

As seqüências resultantes foram editadas usando o software BioEdit v.7.0.5.3 (HALL, 1999). Um “blast” foi realizado no banco de dados do National Center for Biotechnology Information – Genbank, a fim de se comparar as seqüências “consensus”.

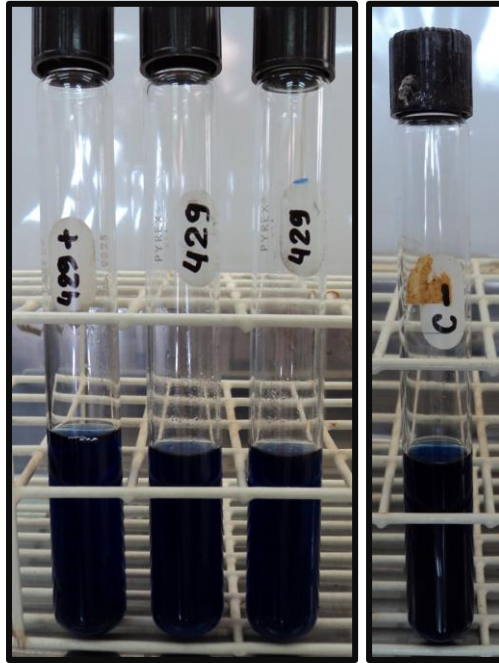
## 5.2.5 – Testes de Biodegradação

### 5.2.5.1 – Teste com o agente redox DCPIP

Os micro-fungos obtidos foram submetidos a um teste para seleção quanto à capacidade de degradação e assimilação de tolueno, utilizando o agente redutor DCPIP, sigla de 2,6 – diclofenol indofenol. O teste fundamenta-se na transferência de elétrons para os aceptores (como oxigênio, nitrato e sulfato), que ocorre durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos. A incorporação de um acceptor de elétron ao meio de cultura, no caso o DCPIP, possibilita averiguar a capacidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos como substrato. O resultado é confirmado com a mudança de cor de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Esta técnica desenvolvida por Hanson et al. (1993) tem sido bem aceita (MARIANO et al., 2008; MONTAGNOLLI et al., 2008; SANCHES, 2009).

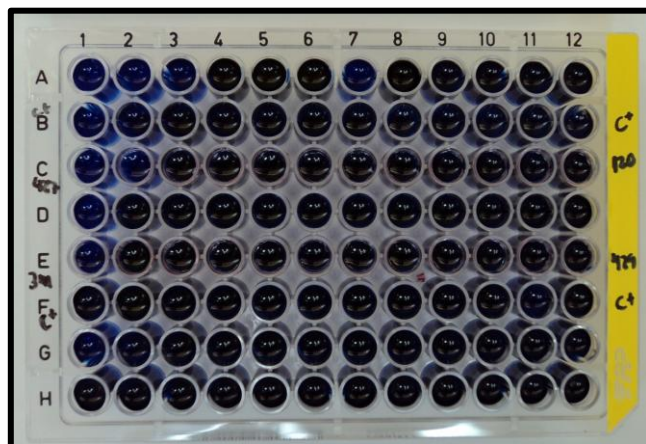
O teste foi realizado de duas formas:

1ª - Em tubos de cultura contendo meio de Bushnell Haas (meio mineral) adicionado de DCPIP, em triplicata, sendo um dos tubos o controle positivo, contendo glicose ao invés de tolueno, e os outros dois de teste, contendo apenas tolueno como fonte de carbono e energia. Desta forma foi possível averiguar a viabilidade do inóculo através da avaliação do crescimento no tubo com glicose. Também foi feito um controle negativo, um tubo contendo apenas o meio mineral com o DCPIP, a fim de se verificar se havia algum problema ou interferência de degradação química.



**Figura 4.** Tubos de cultura montados para os testes de degradação e assimilação de tolueno com o indicador DCPIP.

2<sup>a</sup> – Em microplaca, de 96 poços, contendo controle positivo e teste em quintuplicata (cinco poços cada para cada estirpe). Em cada poço havia meio de Bushnell Haas, DCPIP, fonte de carbono (tolueno ou glicose) e o inóculo, como nos tubos. O intuito da realização do teste desta forma foi verificar se o teste se desenvolveria da mesma forma em uma escala reduzida. Caso os resultados fossem idênticos, a metodologia utilizando a microplaca permitiria uma economia de tempo e reagentes.



**Figura 5.** Fotografia de uma microplaca montada para os testes de degradação e assimilação de tolueno com uso do indicador DCPIP.

As estirpes que apresentassem melhor resultado de descoloração na pré-seleção, passariam por uma avaliação para degradação de hidrocarbonetos mais complexos, como os presentes na gasolina, óleo diesel e biodiesel, empregando-se a mesma técnica.

#### **5.2.5.2 – Teste em dessecadores – Etapa I**

Os micro-fungos obtidos nos isolamentos também foram selecionados quanto à capacidade de degradação e assimilação de tolueno através do teste utilizando dessecadores. As estirpes isoladas foram crescidas em tubo de cultura com ágar malte 2% inclinado por 7 dias e então uma pequena quantidade de micélio foi inoculada em pequenos tubos de ensaio contendo solução de macronutrientes e micronutrientes (proporção de 2 mL de solução de micronutrientes para cada litro de solução de macronutrientes). Cada tubo continha 3 mL de meio mineral, um volume pequeno afim de se garantir uma boa difusão da atmosfera de hidrocarboneto no interior do dessecador.

Os tubos foram fechados com papel alumínio, o qual foi perfurado no momento da incubação para permitir a difusão da atmosfera no interior do tubo, e incubados por um período de 25 dias em um dessecador onde foi criada uma atmosfera rica em tolueno.

Para promover uma liberação lenta e constante do tolueno no interior do dessecador, o mesmo foi dissolvido em dibutilftalato, um solvente orgânico pouco volátil. Desta forma, criou-se um ambiente com tolueno como única fonte de carbono disponível para ser utilizada para o crescimento dos fungos. Foram preparados dois dessecadores, sendo que em um deles havia a mistura de dibutilftalato e tolueno e no outro apenas o dibutilftalato, visando a comprovação de que caso haja crescimento fúngico a única fonte utilizada tenha sido o tolueno. O hidrocarboneto e o solvente foram colocados em pequenos béqueres no interior dos dessecadores.

Após o período de incubação a ocorrência de biodegradação foi avaliada pela análise do crescimento de biomassa através da medida de seu peso seco. O conteúdo dos tubos foi submetido à secagem por 24 horas em estufa a 105 °C e então pesado em balança analítica para a obtenção dos valores de biomassa produzida.



**Figura 6.** Fotografia ilustrando a montagem do experimento com dessecadores. À esquerda uma imagem do dessecador ainda aberto contendo os tubos de ensaio inoculados e o béquer com solvente e tolueno. À direita o dessecador já fechado.

#### **5.2.5.3 – Teste em dessecadores - Etapa II**

A metodologia deste teste foi exatamente a mesma do descrito acima, porém, ao invés de dois dessecadores, foram preparados três: um contendo apenas o solvente (dibutilftalato), outro com o solvente mais o hidrocarboneto (dibutilftalato + tolueno) e um terceiro apenas com o tolueno, sem solvente. O período de incubação foi de 20 dias. O terceiro dessecador, sem a presença do solvente, foi incluído devido à ocorrência de crescimento fúngico constatada no dessecador que continha apenas dibutilftalato na etapa I. Assim, a utilização de um dessecador contendo apenas tolueno foi capaz de demonstrar de forma mais precisa se os micro-organismos a serem testados seriam capazes de utilizar este hidrocarboneto como única fonte de carbono e energia.

### **5.3 – Tratamento dos Resíduos**

Durante o desenvolvimento do projeto, vários resíduos foram gerados sendo que alguns deles apresentam potencial perigo à saúde. Desta forma, todos os resíduos gerados foram devidamente tratados como ilustrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resíduos produzidos, seus efeitos prejudiciais e formas de tratamento

<b>Resíduo</b>	<b>Efeitos Prejudiciais</b>	<b>Tratamento</b>
Materiais recicláveis, como papel, plástico e outras embalagens	Compõem “lixões” que poluem o meio ambiente e representam perigo às pessoas que praticam catação (MUÑOZ, 2002)	Foram coletados pelo Programa de Coleta Seletiva da UNESP Rio Claro para posterior venda para a Empresa Primos (Apara de Papel)
Materiais não recicláveis, como placas de petri e lâmpadas	Por apresentarem caráter perfuro-cortante apresentam riscos às pessoas que vivem próximas a “lixões”, e possuem tem de decomposição superior a 10 mil anos	Os pedaços foram enrolados em papel grosso, acondicionados em tambores e encaminhados para reciclagem
Resíduos infecciosos, como placas e tubos com micro-organismos cultivados em meio de cultura contendo ágar	Risco à saúde pública em decorrência à exposição a agentes patogênicos e poluição ambiental	Esterilização do material através de calor úmido em autoclave durante 20 minutos a 121°C
Materiais contaminados com brometo de etídeo, como luvas de nitrila e géis de agarose	Substância intercalante de alta toxicidade e mutagenicidade, causando danos à saúde humana e ao meio ambiente (MOREIRA, 2010)	Separados e etiquetados em sacos plástico azuis e encaminhados à Central de Resíduos da UNESP Rio Claro para posterior incineração
Resíduos líquidos não-tóxicos, como soluções aquosas	Poluição de rios, alterando a qualidade da água	Lançados diretamente na rede coletora de esgoto, passando por posterior tratamento na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da cidade
Soluções com antibióticos: cloranfenicol, penicilina, estreptomicina, clorotetraciclina e cicloheximida	Se liberados na rede de esgoto não são completamente removidos pelo tratamento nas ETES, podendo causar efeitos adversos na saúde humana e de outros organismos, como peixes (BILA; DEZOTTI, 2003). Cicloheximida é uma substância muito tóxica por inalação, ingestão e em contato com a pele, possuindo caráter cancerígeno	Por possuírem componentes termossensíveis foram inativados durante esterilização por calor úmido em autoclave, sendo o resíduo eliminado em água corrente durante lavagem da vidraria (LUNN; SANSONE, 1994)
Solução de brometo de etídeo	Substância intercalante de alta toxicidade e mutagenicidade, causando danos à saúde humana e ao meio ambiente (MOREIRA, 2010)	Armazenadas em galões reforçados, encaminhados à Central de Resíduos da UNESP Rio Claro e posteriormente incinerados

## 6. RESULTADOS

### 6.1 – Isolamento

Isolou-se um total de duzentas e quatorze estirpes, sendo a maioria advinda de indivíduos da espécie *A. capiguara* (Tabela 4). Observou-se que a proporção entre fungos negros e hialinos foi 55,1% e 44,9%, respectivamente. As tabelas 5 e 6 apresentam o total de fungos em cada coleta.

**Tabela 4.** Total de isolados obtidos a partir da aplicação da técnica de flotação em óleo mineral.

Formiga	Número de içás	Número de fungos isolados		Total de isolados
		Negros	Hialinos	
<i>A. capiguara</i>	170	104	79	183
<i>A. laevigata</i>	50	14	17	31
<b>Total</b>	220	118	96	214

**Tabela 5.** Quantidade e origem das içás e dos fungos isolados na primeira coleta (Novembro/2008).

Formiga	Número de içás	Número de fungos isolados		Total de fungos isolados
		Negros	Hialinos	
<i>Atta capiguara</i> 1	30	6	17	23
<i>Atta capiguara</i> 2	10	19	9	28
<i>Atta capiguara</i> 3	30	17	29	46
Total	70	42	55	97

**Tabela 6.** Quantidade e origem das içás e dos fungos isolados na segunda coleta (Novembro/2009).

Formiga	Número de içás	Número de fungos isolados		Total de fungos isolados
		Negros	Hialino	
<i>Atta capiguara</i> 1	50	33	13	46
<i>Atta capiguara</i> 2	50	29	11	40
<i>Atta laevigata</i>	50	14	17	31
Total	150	76	41	117

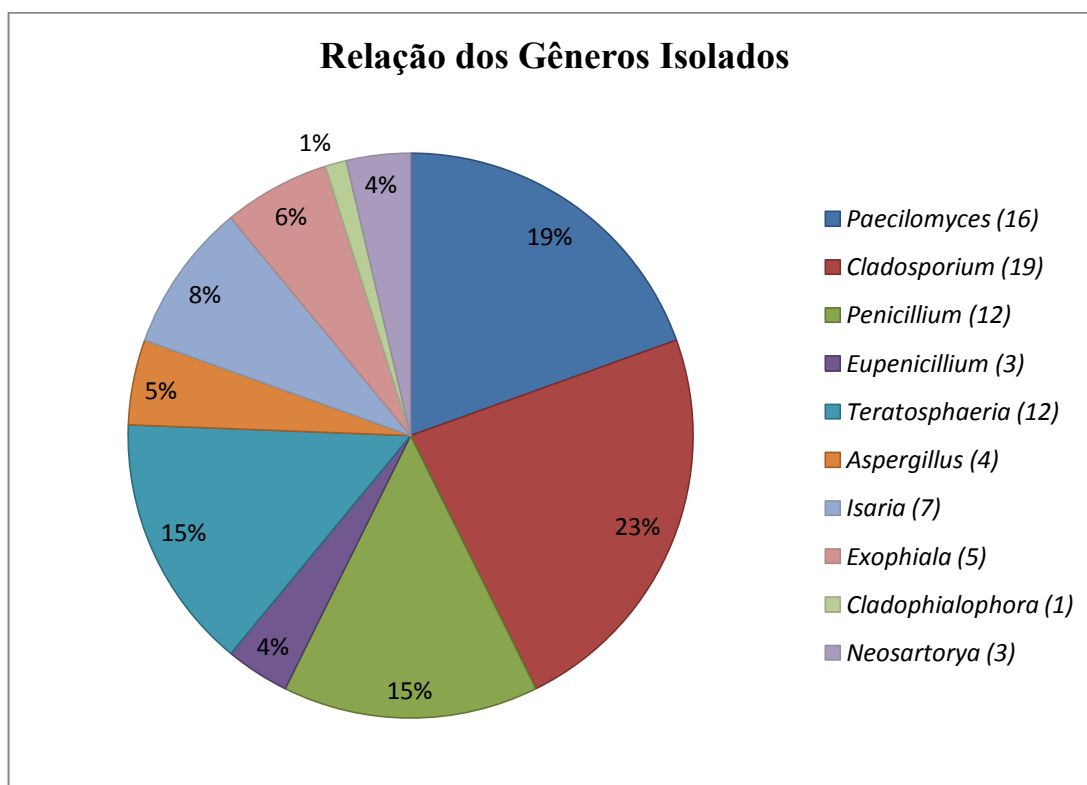
Do total de 214 isolados, 100 foram utilizados para a realização deste trabalho, enquanto as restantes foram vinculadas a outros projetos. Destas 100 estirpes, 55 correspondem a fungos negros, enquanto 45 são hialinas.

## 6.2 – Identificação

Foram identificados gêneros cosmopolitas, como *Cladoporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, e outros de menor ocorrência, como *Cladophialophora* e *Exophiala*. A Figura 7 ilustra o gráfico dos gêneros encontrados bem como suas freqüências. Na Tabela 7 apresentam-se dados sobre a importância dos gêneros e espécies isolados.

Na Tabela 8 encontram-se os dados referentes ao substrato de origem e à espécie de formiga de onde foram obtidos os gêneros e espécies isolados.

As análises moleculares permitiram a identificação ao nível de espécie da maioria das estirpes. As sequências obtidas foram comparadas, através do programa *Blast*, com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI. O código das sequências de comparação, bem como os demais dados, encontram-se nas fichas catalográficas dispostas no tópico 6.4.



**Figura 7.** Gráfico de identificação dos gêneros de fungos isolados das formigas cortadeiras

**Tabela 7.** Importância e aplicação dos principais gêneros de fungos isolados.

<b>Táxon</b>	<b>% Isolados</b>	<b>Importância e Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus</i> sp.; <i>A. protuberus</i>	5%	Biorremediação de ambientes com hidrocarbonetos. Espécies fitopatogênas. Atividade antimicrobiana e anticancerígena.	SATOW, 2005; COLLA, et al., 2008; MATHAN et al., 2011.
<i>Neosartorya udagawae</i>	4%	Causadora de aspergilose severa.	VINH et al., 2009; SUGUI et al., 2010.
<i>Cladophialophora</i> sp.	1%	Biorremediação de BTEX. Interesse médico (patogenicidade)	PRENAFETA-BOLDÚ, et al., 2002; PATTERSON et al., 1999
<i>Cladosporium</i> sp.; <i>C. perangustum</i> ; <i>C. cladosporioides</i> ; <i>C. xilophyllum</i>	23%	Patógena (lesões na pele, sinusites e infecções pulmonares); fitopatogêna de <i>Passiflora</i> ; controle biológico de insetos (mosca branca da mandioca - <i>Besimia argentifolii</i> ).	SUTTON, 1998; KRUSCHEWSKY et al., 2006; FARIAS; SANTOS FILHO, 1992
<i>Exophiala dermatitidis</i>	6%	Espécie patógena responsável por feohifomicose, cromoblastomicose e micetoma.	SUDDUTH et al., 1992; DE HOOG et al., 2000
<i>Paecilomyces</i> sp.; <i>P. lilacinus</i>	19%	Interesse médico; biodeteriogênico.	DE HOOG et al., 2000. SAMSON et al., 2004.
<i>Penicillium</i> sp.; <i>P. citrinum</i>	15%	Espécies fitopatogênas e produtoras de antibióticos	TAKAHASHI; FERREIRA-LUCAS, 2008
<i>Teratosphaeria</i> sp.; <i>T. parva</i> ; <i>T. jonkershoekensis</i>	15%	Fitopatogêna de <i>Eucalyptus</i> spp.	HUNTER et al., 2009; CROUS et al. 2009b.

**Tabela 8.** Identificação do substrato de origem e espécie de formiga dos quais foram obtidos os gêneros e espécies isolados.

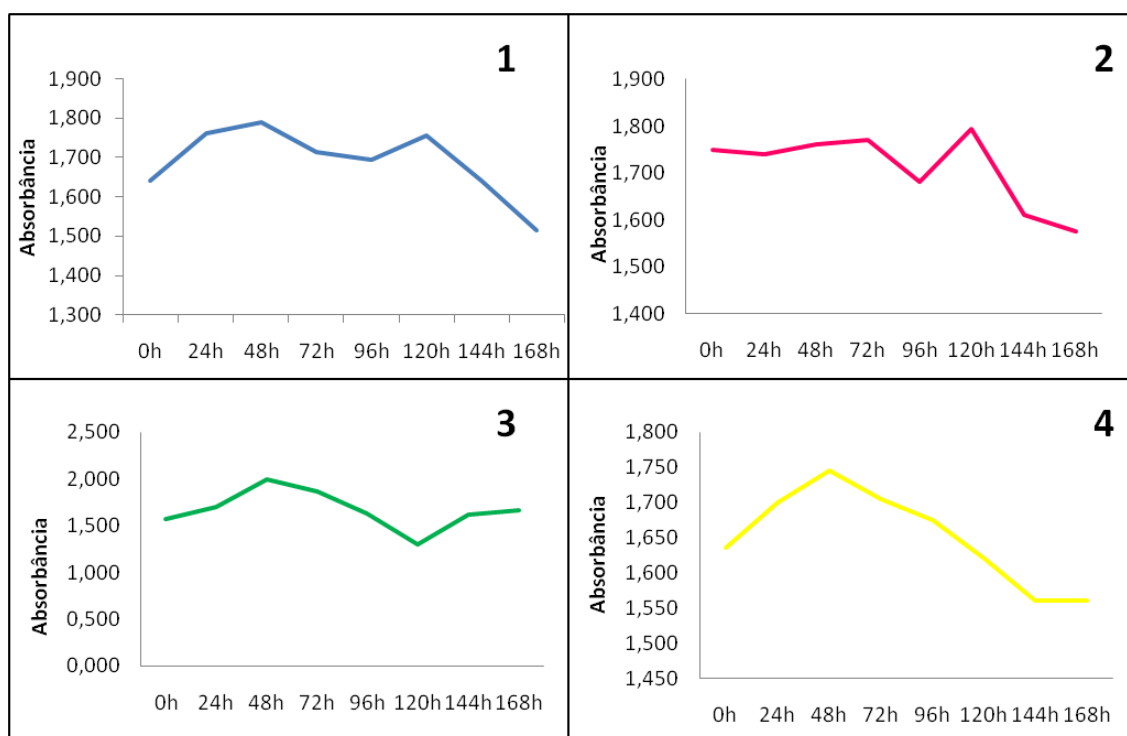
Formiga	Ninho	Gênero	Nº Ocorrências	Substrato de Origem
A. <i>capiguara</i>	2	<i>Penicillium citrinum</i>	2	Corpo
	1 e 3	<i>Penicillium</i> sp.	2	Pellet
	1	<i>Eupenicillium zonatum</i>	2	Pellet
	1	<i>Eupenicillium</i> sp.	1	Pellet
	1	<i>Cladosporium perangustum</i>	1	Pellet
	1	<i>Cladosporium</i> cf. <i>tenuissimum</i>	1	Pellet
	1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	Pellet
	1 e 2	<i>Cladosporium</i> sp.	10	Corpo/Pellet
	2	<i>Teratosphaeria jonkershoekensis</i>	1	Corpo
	2	<i>Teratosphaeria parva</i>	3	Corpo
	1 e 2	<i>Teratosphaeria</i> sp.	8	Corpo
	2	<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	Corpo
	2	<i>Cladophialophora</i> sp.	1	Corpo
	3	<i>Aspergillus protuberus</i>	1	Pellet
	1 e 3	<i>Aspergillus</i> sp.	2	Corpo
	1	<i>Neosartorya udagawae</i>	2	Corpo
	1 e 2	<i>Isaria takamisuzanensis</i>	6	Corpo
	1	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	Corpo
1 e 2	<i>Paecilomyces</i> sp.	9	Corpo	
A. <i>laevigata</i>	1	<i>Penicillium citrinum</i>	8	Corpo/Pellet
	1	<i>Cladosporium perangustum</i>	1	Corpo
	1	<i>Cladosporium xylophilum</i>	1	Corpo
	1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	Corpo/Pellet
	1	<i>Cladosporium</i> sp.	2	Corpo
	1	<i>Exophiala dermatitidis</i>	4	Pellet
	1	<i>Aspergillus</i> sp.	1	Corpo
	1	<i>Neosartorya udagawae</i>	1	Corpo
	1	<i>Isaria takamisuzanensis</i>	1	Corpo
	1	<i>Paecilomyces</i> sp.	6	Corpo

### 6.3 – Testes de degradação/assimilação de Tolueno

#### 6.3.1 – Tubos com DCPIP

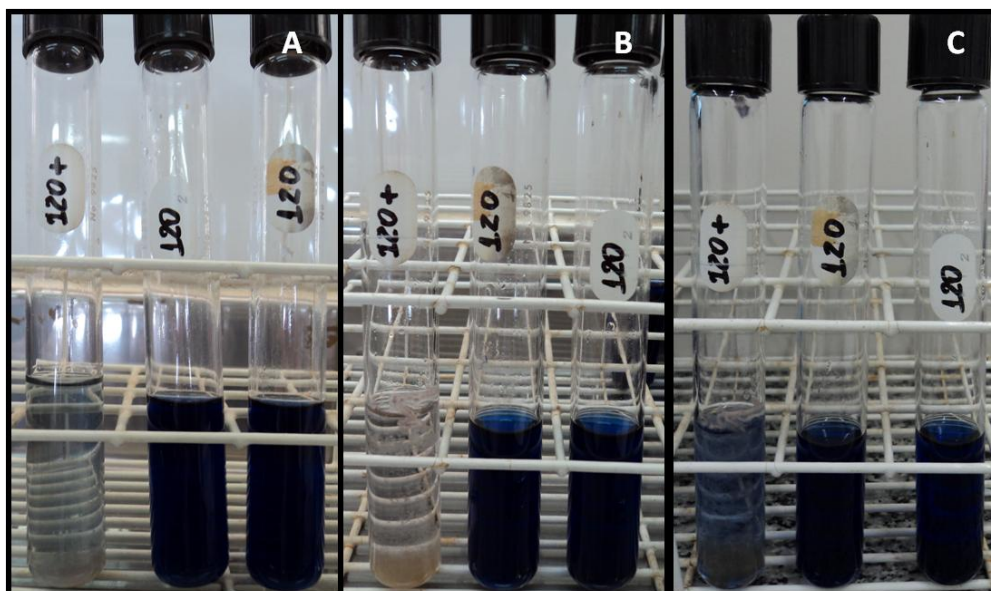
A metodologia envolvendo o uso do agente redutor 2,6 – diclorofenol indofenol foi aplicada em quatro estirpes: *Isaria takamisuzanensis*, *Exophiala dermatitidis*, *Neosartorya*

*udagawae* e *Cladosporium cladosporioides*. Os resultados obtidos do acompanhamento diário através de medida de absorbância a 540nm são demonstrados abaixo na Figura 8.

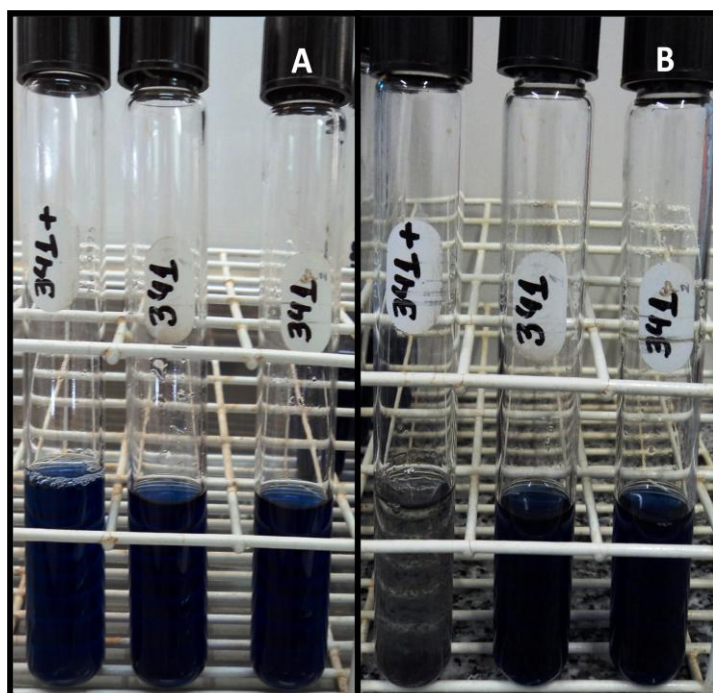


**Figura 8.** Gráficos da variação dos valores médios de absorbância medidos diariamente para as estirpes testadas em tubos. 1 – *Cladosporium cladosporioides*; 2 – *Isaria takamizusanensis*; 3 – *Exophiala dermatitidis*; 4 – *Neosartorya udagawae*.

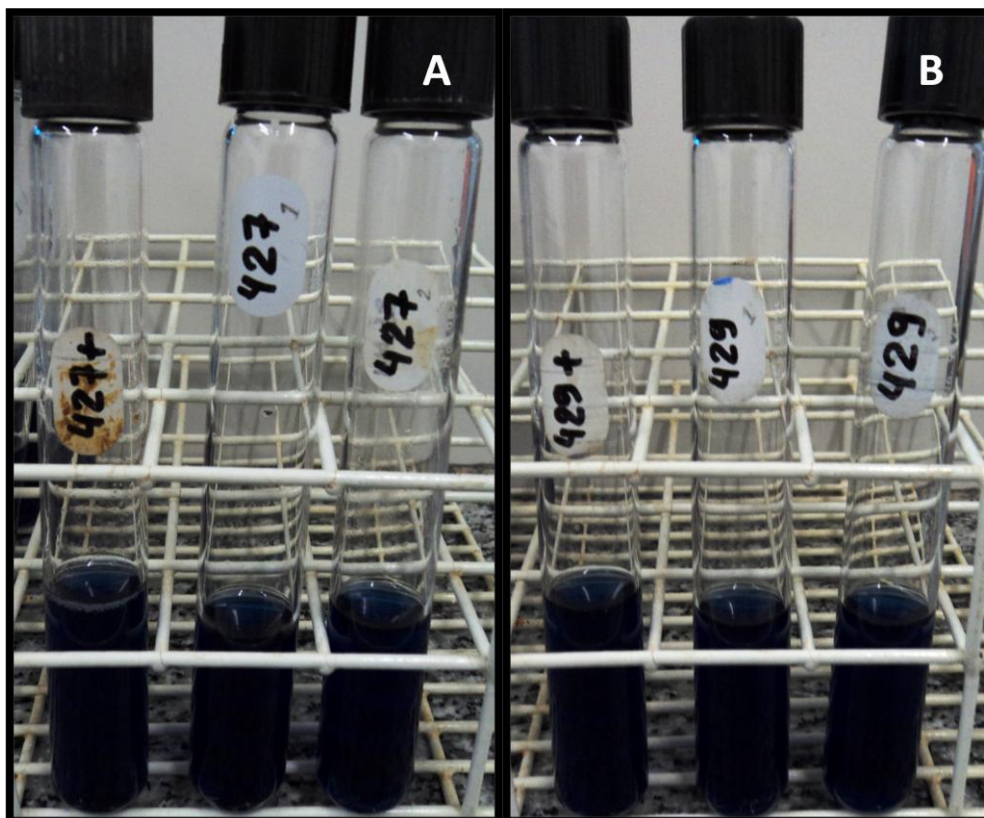
As estirpes testadas *I. takamizusanensis* e *N. udagawae* foram as únicas que apresentaram descoloração nos tubos de controle positivo. Para *I. takamizusanensis* a descoloração no controle positivo foi significativa já nas primeiras 24 horas, embora o tubo tenha voltado a apresentar uma coloração mais escura no tempo T = 144 horas, ao final do experimento (Figura 9). A causa para tal reversão é desconhecida, mas indica que o corante não foi degradado pelo micro-fungo, e sim que por alguma outra razão ele retornou ao estado oxidado. Para *N. udagawae* a descoloração no controle positivo foi significativa a partir do tempo T = 96 horas (Figura 10), e assim como para *I. takamizusanensis* não houve decréscimo significativo nos valores de absorbância medidos durante o período de experimentação. Tanto no tubo controle quanto nas duplicatas de teste com tolueno houve crescimento fúngico considerável para os dois fungos (Figuras 9 e 10). Quanto às estirpes correspondentes ao grupo dos fungos negros, *Exophiala dermatitidis* e *Cladosporium cladosporioides*, nem mesmo nos tubos de controle positivo houve descoloração (Figura 11), porém, o crescimento de biomassa também foi considerável.



**Figura 9.** Teste para biodegradação de tolueno utilizando o agente redox DCPIP para *Isaria takamisuzanensis* (código 120). O sinal + indica o tubo controle positivo que contém glicose. A = 24 horas; B = 96 horas; C = 144 horas. Notar no tubo controle o grande crescimento fúngico (micélio róseo) e a volta da coloração azul (C) indicando que o DCPIP foi novamente oxidado. Notar também a não ocorrência de alteração na coloração dos tubos teste com tolueno (sem o sinal +)



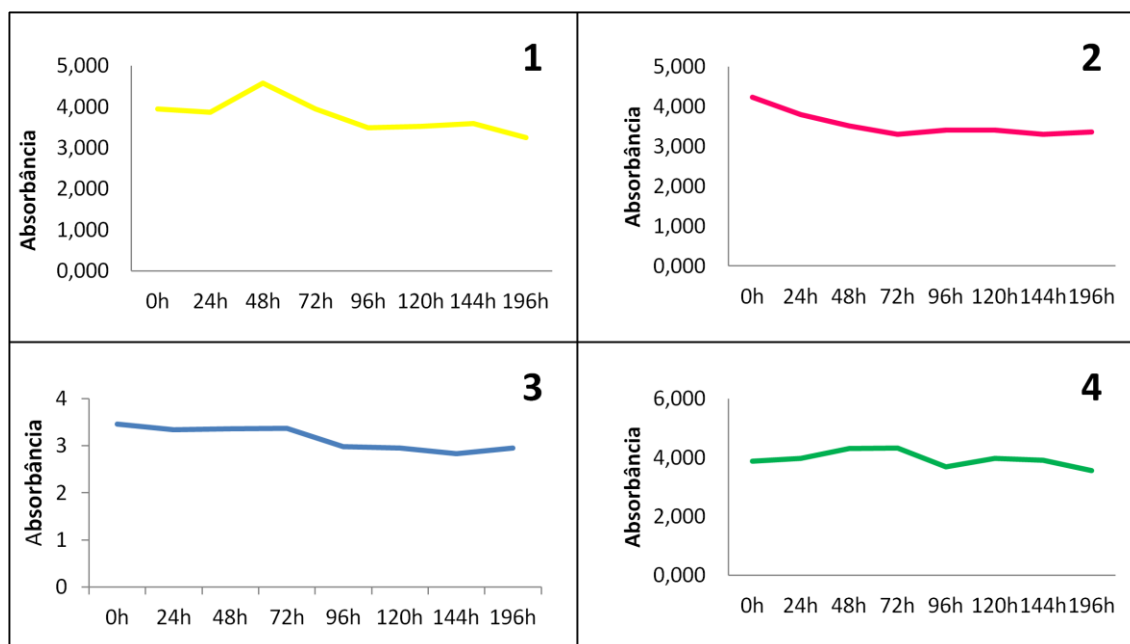
**Figura 10.** Teste para biodegradação de tolueno utilizando o agente redox DCPIP para *Neosartorya udagawae* (código 341). O sinal + indica o tubo controle positivo que contém glicose. A = 96 horas; B = 144 horas. Notar o crescimento fúngico no controle positivo e a não alteração na coloração dos tubos teste com tolueno.



**Figura 11.** Teste para biodegradação de tolueno utilizando o agente redox DCPIP para *Cladosporium cladosporioides* (código 427) e *Exophiala dermatitidis* (código 429). O sinal + indica o tubo controle positivo que contém glicose. A e B = 168 horas. Notar que não houve alteração na coloração dos controles positivos e nem dos tubos teste com tolueno.

### 6.3.2 – Microplaca com DCPIP

Para o teste em microplaca, foram testadas as quatro estirpes que foram submetidas ao teste nos tubos, *Isaria takamizusanensis*, *Exophiala dermatitidis*, *Neosartorya udagawe* e *Cladosporium cladosporioides*. As leituras a 540 nm foram efetuadas através de um espectrofotômetro de microplacas (leitor de Elisa) e os gráficos obtidos com as médias das absorbâncias são ilustrados abaixo.



**Figura 12.** Gráficos com os valores médios de absorvância medidos diariamente para as estirpes testadas em microplaca. 1 – *Neosartorya udagawe*; 2 – *Isaria takamizusanensis*; 3 – *Cladosporium cladosporioides*; 4 – *Exophiala dermatitidis*.

### 6.3.3 – Testes em Dessecadores

#### 6.3.3 – Testes em Dessecadores

Das 100 estirpes selecionadas para este estudo 80 foram testadas. Após o período de incubação nos dessecadores e secagem em estufa a 105°C foram feitas as pesagens em balança analítica. Os valores de biomassa para cada estirpe em cada tratamento pode ser consultado no apêndice que está em anexo. Para cada tratamento são apresentados abaixo os gráficos de produção de biomassa (Figura 13), no intuito de facilitar a visualização dos maiores valores obtidos e, conseqüentemente, a inferência dos fungos com maior potencial para utilização em processos de biorremediação (Tabela 9).

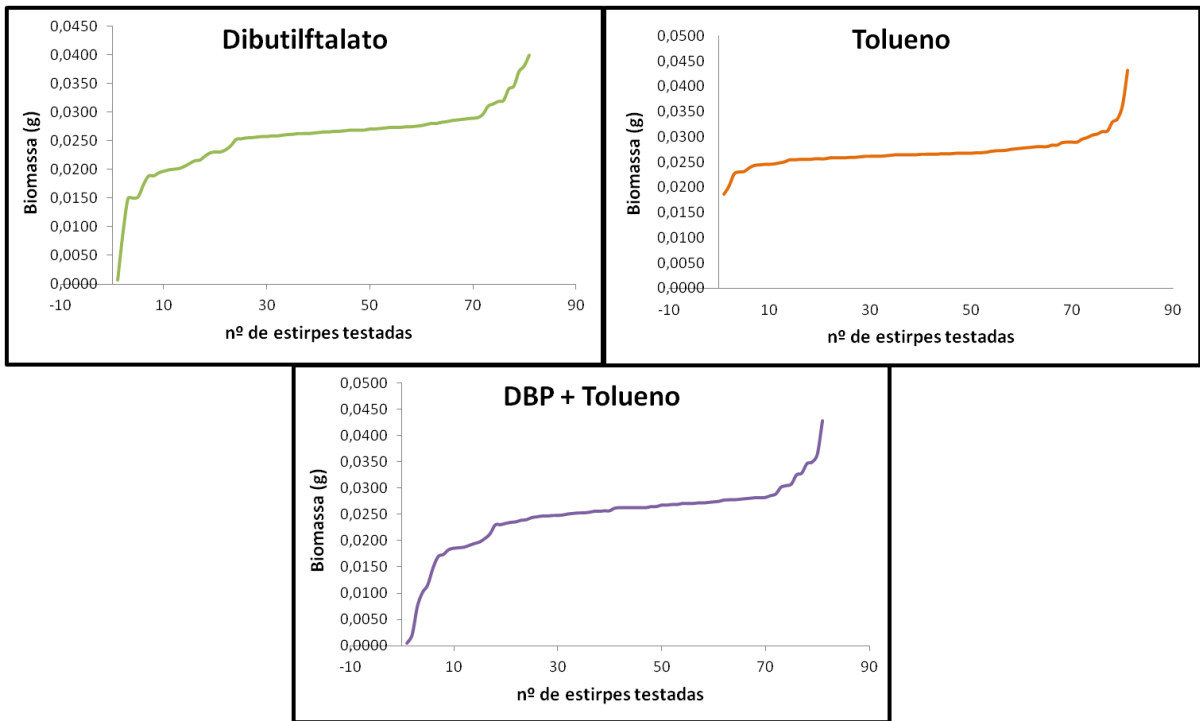
Na Tabela 10 estão dispostos os dados sobre o substrato de origem e a espécie de formiga a partir dos quais foram isolados os micro-fungos que apresentaram maior produção de biomassa no experimento utilizando-se os dessecadores.

**Tabela 9.** Identificação das estirpes que apresentaram maior produção de biomassa em cada tratamento realizado. Legenda: FNNE = Fungo Negro Não Esporulante

<b>Tratamento</b>	<b>Cód. estirpe</b>	<b>Identificação</b>	<b>Biomassa Produzida (g)</b>
Tolueno	431	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0304
	392	<i>Teratosphaeria</i> sp.	0,0306
	363	<i>Aspergillus</i> sp.	0,0311
	434	<i>Teratosphaeria</i> sp.	0,0312
	420	<i>Teratosphaeria</i> sp.	0,0330
	433	<i>Cladosporium</i> sp.	0,0336
	351	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0363
	358	<i>Neosartorya udagawe</i>	0,0432
Dibutilftalato	414	FNNE	0,0314
	390	FNNE	0,0318
	366	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,0320
	266	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,0340
	402	<i>Exophiala dermatitidis</i>	0,0345
	420	<i>Teratosphaeria</i> sp.	0,0370
	432	<i>Penicillium citrinum</i>	0,0380
	327	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,0399
Dibutilftalato + Tolueno	120	<i>Isaria takamizusanensis</i>	0,0305
	368	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,0308
	390	FNNE	0,0326
	369	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,0329
	355	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,0347
	366	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,0350
	420	<i>Teratosphaeria</i> sp.	0,0365
	391	<i>Teratosphaeria</i> sp.	0,0429

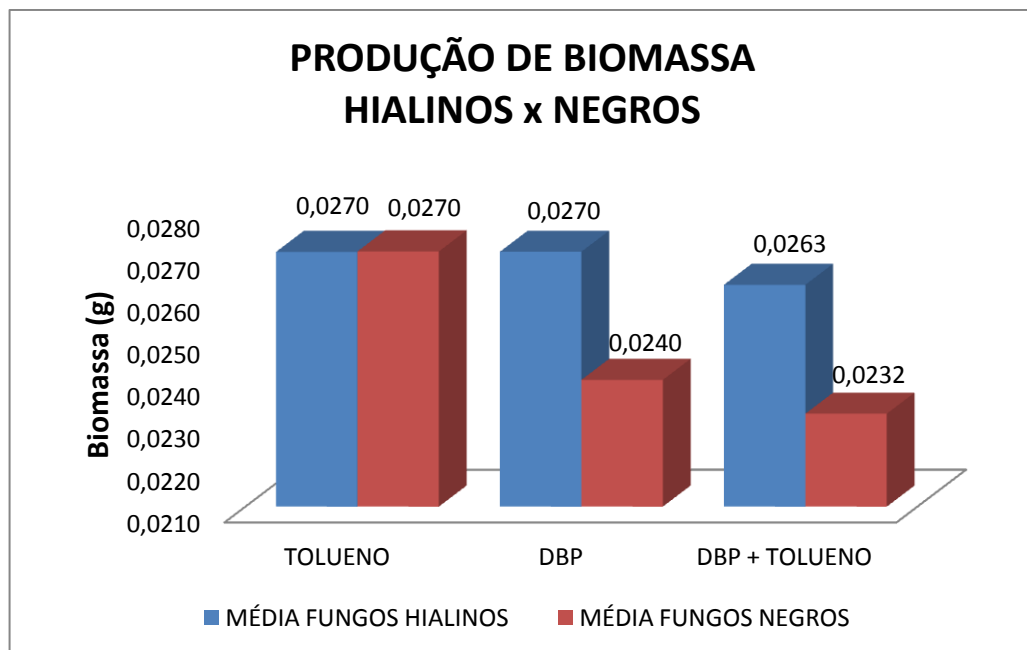
**Tabela 10.** Identificação do substrato de origem e da espécie de formiga a partir dos quais foram isolados os micro-fungos que apresentaram-se como maiores produtores de biomassa no teste em dessecadores. Legenda: FNNE = Fungo Negro Não Esporulante.

<b>Código</b>	<b>Identificação</b>	<b>Substrato</b>	<b>Formiga</b>
414	FNNE	Corpo	<i>A. capiguara</i>
390	FNNE	Corpo	<i>A. capiguara</i>
351	<i>Penicillium citrinum</i>	Corpo	<i>A. capiguara</i>
431	<i>Penicillium citrinum</i>	Pellet	<i>A. laevigata</i>
432	<i>Penicillium citrinum</i>	Pellet	<i>A. laevigata</i>
391	<i>Teratosphaeria</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
392	<i>Teratosphaeria</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
420	<i>Teratosphaeria</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
434	<i>Teratosphaeria</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
266	<i>Paecilomyces</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
327	<i>Paecilomyces</i> sp.	Corpo	<i>A. laevigata</i>
366	<i>Paecilomyces</i> sp.	Corpo	<i>A. laevigata</i>
368	<i>Paecilomyces</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
369	<i>Paecilomyces</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
355	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Corpo	<i>A. capiguara</i>
120	<i>Isaria takamisuzanensis</i>	Corpo	<i>A. capiguara</i>
363	<i>Aspergillus</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
433	<i>Cladosporium</i> sp.	Corpo	<i>A. capiguara</i>
358	<i>Neosartorya udagawae</i>	Corpo	<i>A. capiguara</i>
402	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Corpo	<i>A. capiguara</i>

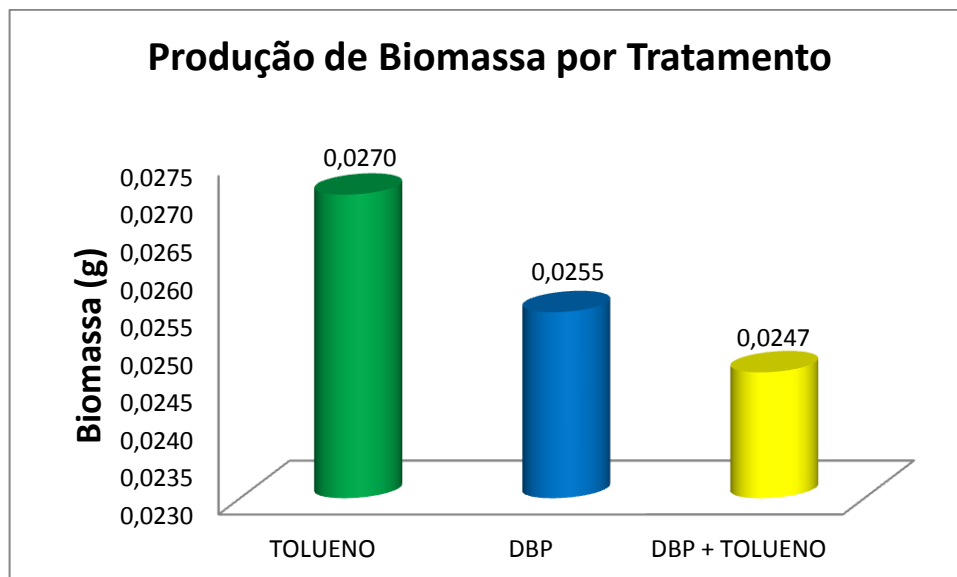


**Figura 13.** Gráficos da produção de biomassa por todos os micro-fungos testados em cada tratamento. No terceiro gráfico DBP = Dibutilftalato

Também foi avaliado o desempenho na produção de biomassa comparando-se os fungos negros e os hialinos, e a média de produção de biomassa em cada tratamento realizado. Os resultados encontram-se nas Figuras 14 e 15.



**Figura 14.** Gráfico da produção média de biomassa pelos fungos negros e hialinos testados em cada tratamento. Legenda: DBP – Dibutilftalato



**Figura 15.** Gráfico da produção média de biomassa pelo total dos fungos isolados em cada tratamento. Legenda: DBP – Dibutilftalato

#### 6.4 – Preservação dos micro-fungos

Todos os micro-fungos isolados foram preservados pela técnica de ultracongelamento como planejado. Os micro-fungos identificados foram fotografados e catalogados em fichas de identificação. Abaixo são apresentadas as fichas catalográficas de algumas das espécies encontradas.

As culturas aqui preservadas fazem agora parte do acervo particular do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. As estirpes serão posteriormente depositadas na CBMAI (Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria), localizada no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas, e agrícolas) na Unicamp, Campinas.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N272; N398

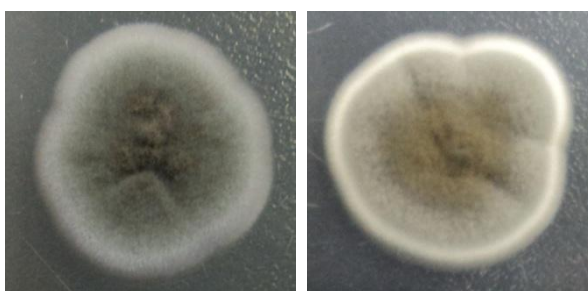
2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Cladosporium perangustum*

4) **Origem:** Corpo e pellet de içá de *A. laevigata*

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia de *C. perangustum* com 7 dias de crescimento, em M.A. 2% e PDA, respectivamente, a 25°C.



Conidióforo e conídios de *C. perangustum*..

7) **Medições:**

Conídios: 4,5 – 5,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI – HM148138.1; Coverage 100% e Max Identity 99% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1 / ITS4

```
ATCATTACAAGTGACCCGGTTTACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCC
TCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGC
AGTCTGAGTAAACTTAATTAATAAATTA AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGC
CTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGTGTCTTCTGTCCC
CTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAGAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCAT
tCTAAGGTTGACC
```

**Referências Bibliográficas:**

Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin H-D, Dugan FM, Schroers H-J, Braun U, Crous PW (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology* **67**: 1–94.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N385; N393; N421

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Teratosphaeria parva*

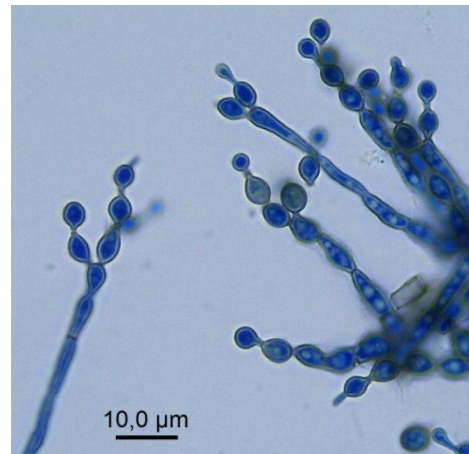
4) **Origem:** Corpo de içá de *Atta capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia de *T. parva* com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conidióforos e conídios de *T. parva*.

7) **Medições:**

Conídios: 5,5 – 6,5 μm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI – HM148138.1; Coverage 99% e Max Identity 88% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1 / ITS4

```
ATCATTACTGAGTGAGGGCGCAAGCCCGACCTCCAACCCCATGTAAATCATACCATGTTGCCTCGG
GGGCGACCCGGCCCTTTTGGGCGTCGGGGCCCCCGGTGGACCATAAACTGCATCTGTGCGTCTG
AGTGATTAATCAATCAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCCTGGCTTG
GTATTGGGCACCGCGGTCCCGCCGCGGCCCTAATGTCTCCGGGTGAGCCGTCTGTTCTCCAGCGTT
GTGGTTATATCATCCGCTGCCAGGACACGATGGTTTCATCGCCGTTAAAATCCTTTTTTCTTAAGGT
GACCTCGGATCAGGTAGGAT
```

9) **Referência Bibliográfica:**

Crous, P.W., Summerell, B.A., Mostert, L. and Groenewald, J.Z. 2008. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of Proteaceae. *Persoonia* 20, 59-86.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N402; N424; N425; N426; N429

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Exophiala dermatitidis*

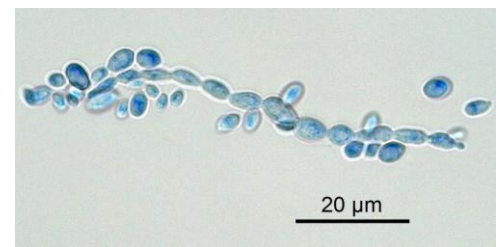
4) **Origem:** Corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônias de *E. dermatitidis* com 7 dias de crescimento, em M.A. 2% e PDA, respectivamente, a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conídios de *E. dermatitidis*.

7) **Medições:**

Células : 5,5 – 6,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI – AY66388.1; Coverage 99% e Max Identity 99% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1 / ITS4

```
ATCATTAACGAGTTAGGGTCTTCTCAGGCCCGACCTCCCACCCTTTGTTTACCCGACCCATGTTGCT
TCGGCGGGCCCCGCGTTTCGACGGCCCGGAGGACCGCTATTCAGGTCCTCTGGCCCGCGCCCCG
CCGGTAGCCAATTCTACCAAATCTCGAATCAAATCGTGTCCAATGTTCTGAGTATATTCCAAAATA
AAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGCGAATTGCAGAATCCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGCCCCCGGCTTGGTGTGGAC
GGTCTGGTCGAGCGTTTCCGCGGACCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGCCTGGTTGGACCCCG
GTACACGGAGCTTCTTCACTGAGCACGTATCGGTTTCAAGGTGTCCCCGGGACCCGGTCGACCTCT
CTTGCTCCCCTGCGGGAGTGGGAGAGAACCCCTTTTATCAAGGTTGACC
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N427; N400

2) **Data de Isolamento:** Jan/2010

3) **Identificação:** *Cladosporium cladosporioides*

4) **Origem:** Pellet e corpo de içá de *A. laevigata*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *C. cladosporioides* com 7 dias de crescimento, em M.A. 2% e PDA, respectivamente, a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conídios de *C. cladosporioides*.

7) **Medições:**

Conídios: 4,5 – 5,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - HM595523; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1/ITS4

```
ATCATTACAAGTGACCCCGGTTTACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCC
TCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACCTTGC
AGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAACACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGC
CTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCC
TAAGCGTTGTGAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAATAACAACCCCATTTT
TAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
```

9) **Referência Bibliográfica:**

Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin H-D, Dugan FM, Schroers H-J, Braun U, Crous PW (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology* 67: 1–94



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N346; N347

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Cladosporium. cf. tenuissimum*

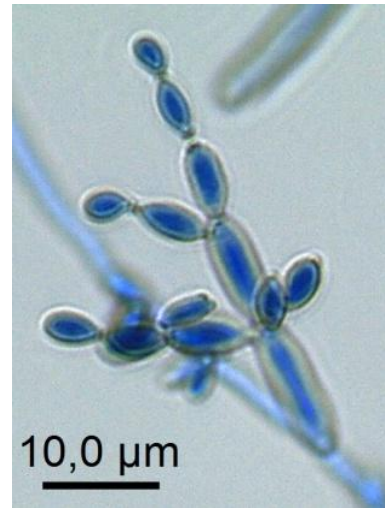
4) **Origem:** Pellet de iça de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia de *C. cf. tenuissimum* com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conidióforo e conídios de *C. cf. tenuissimum*.

7) **Medições:**

Conídios: 4,5 – 5,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI – HM148212.1; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1 / ITS4

```
ATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCGACTCTGTTGC
CTCCGGGGCGACCCTSCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTCTGCGTAACTTTGC
AGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAATTAATAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTCACCACTCAAGC
CTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCC
TAAGCGTTGTGGAAACTATTTCGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTACGCCGTA AAAACAAACCCATTTT
TAAGGTTGACCTCGGATCAGG
```

**Referência Bibliográfica:**

Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin H-D, Dugan FM, Schroers H-J, Braun U, Crous PW (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae, Capnodiales*). *Studies in Mycology* **67**: 1–94



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N413

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Teratosphaeria jonkershoekensis*

4) **Origem:** Corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia de *T. jonkershoekensis* com 7 dias de crescimento, em PDA, a 25°C.



Hifas e conídios de *T. jonkershoekensis*

7) **Medições:**

Conídios: 5,5 – 6,5 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI – EU707864.1; Coverage 95% e Max Identity 90% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1/ ITS4

```
ATCATTACTGAGTGAGGGCGCAAGCCCGACCTCCAACCCCATGTAAATCATACCATGTTGCCTCGG
GGGCGACCCGGCCCTTTTGGGCGTCGGGGCCCCCGGTGGACCCATAMCACTGCATCTGTGCGTCTG
AGTGATTAATCAATCAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCCTGGCTTG
GTATTGGGCACCGCGGTCCCGCCGCGCTCTAATGTCTCCGGCTGAGCCGTCTGTTCTCCAGCGTT
GTGGTCATATCATCCGCTGCCAGGACACGATGGTTCATCGCCGTTAAATCCTTTTTTCTTAAGGTTG
ACC
```

9) **Referência Bibliográfica:**

Crous, P.W., Summerell, B.A., Mostert, L. and Groenewald, J.Z. 2008. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of Proteaceae. *Persoonia* 20, 59-86.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N77; N119; N120; N326; N328; N365; N384

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Isaria takamizusanensis*

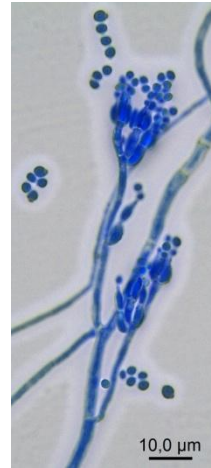
4) **Origem:** Corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *I. takamizusanensis* com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conidióforos e conídios de *I. takamizusanensis*

7) **Medições:**

Conídios: 2,5 – 3,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - EU369033.1; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
GCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCAGGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGA
GGATGCTTTTGGCGCGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCG
TCTGGTCGGACGCCTAGCCTGTGTAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCT
AAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGT
GATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAATAGTACGTGAAAATTGTTGAAAGGGAAG
CGTTGTGACCAGACTTGGGCCCGGTGGATCATCCAGCGTTCTCGCTGGTGCCTCCGCCGGGTTT
AGGCCAGCATCAGTTCGCCGCGGGGAAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTACGGGAGTGTTAT
AGCCCGTTGTATAATACCCTGGGGCGGACTGAGGTTTCGCGCTCCGCAAGGATGC
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

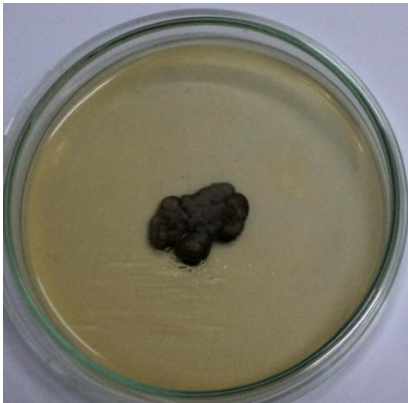
1) **Código:** N156

2) **Data de Isolamento:** Nov/2008

3) **Identificação:** *Aspergillus protuberus*

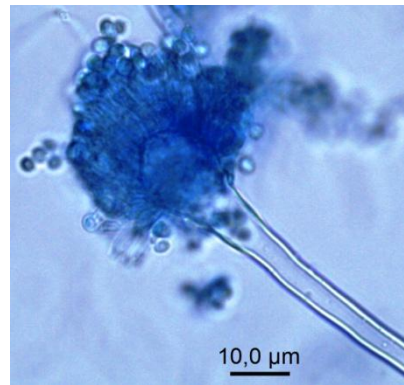
4) **Origem:** Pellet de iça de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *A. protuberus* com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conidióforo e conídios de *A. protuberus*.

7) **Medições:**

Conídios: 2,5 – 3,5 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI -FJ935999.1; Coverage 100% e Max Identity 99% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
ACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCTCCGGGGTCCGAGTTGTAATTT
GCAGAGGATGCTTCGGGTGCGGCCCTGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCAGAGAGGGTGAG
AATCCCGTCTTGGGCAGGGTGCCCGTGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGA
ATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACCGGCCGGAGACCGATAGCGCAC
AAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTG
AAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGGCCTCGGGGTTTCAGCCAGCATTTCGTGCTGGTGTACTTCC
CCGGGGCCGGGCCAGCGTCGGTTCGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCCAGGAATGTATCGTCCTCCGG
GACGTCTTATAGCCTGGGGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTCCGGCACGGA
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

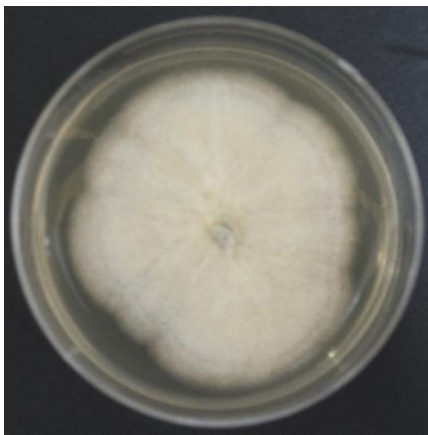
1) **Código:** N215; N214

2) **Data de Isolamento:** Nov/2008

3) **Identificação:** *Eupenicillium zonatum*

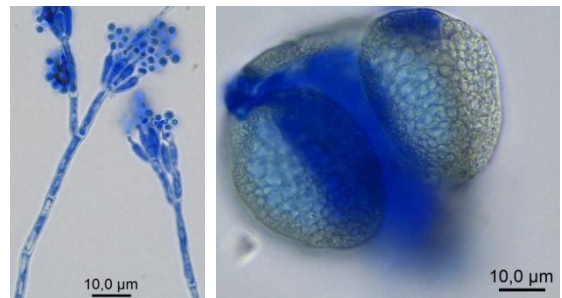
4) **Origem:** Pellet de iça de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *E. zonatum* com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

6) **Microscopia:**



À esquerda conidióforos com conídios, e à direita ascos contendo ascosporos em seu interior.

7) **Medições:**

Conídios: 2,5 – 3,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI -GQ169751.1; Coverage 100% e Max Identity 98% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
ATTGCCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTC
CGCATTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGAGTGGCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGCGTC
ATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGATGGGGTGCCACGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCG
AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGAGA
CCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTTCGACCGAGACTCGCTCGCAGGGTTCAGCCGGCATTTCGTGC
CGGTGTACTTCCCTGCGAGCGGGCCAGCGTTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTTGGGAATGTA
ACGCCCCCGGGCGTCTTATAGCCAAGGGTGCCATGCGGCCAGCCCGACCGAGGAACGCGCTT
CGGC
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

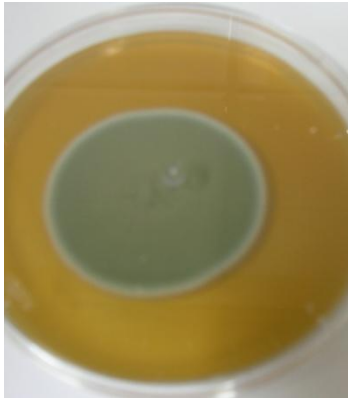
1) **Código:** N351; N342; N 350; N406; N407; N411; N431; N432;

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Penicillium citrinum*

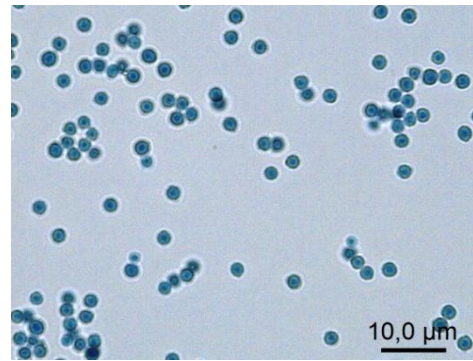
4) **Origem:** Pellet e corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *P. citrinum*. com 7 dias de crescimento, em CYA, a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conídios de *P. citrinum*.

7) **Medições:**

Conídios: 2,0 – 2,5 μm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - JF343223.1; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
GTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGCAGAGG
ATGCTTCGGGAACGGCCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGT
CTGGGATGGGGTGGCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCT
CTAATTGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAG
TGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GCGCTTGGCACCAGACTCGCCCGGGGTTTCAGCCGGCACTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGCGGGC
GGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCTCTGGAAGGTAACGCCTCTCGTGgCGTCTTA
TAGCCAGGGGTGCCATGCGGCCTGCCCCGACCGAGGAACGCGCT
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.



## FICHA CATALOGRÁFICA

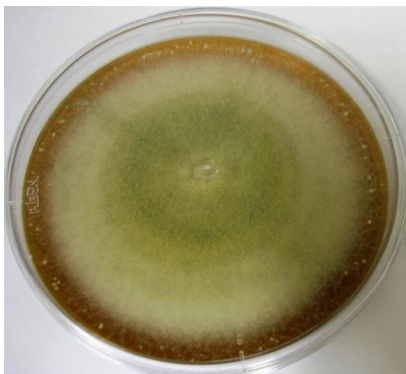
1) **Código:** N338; N341; N358

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*)

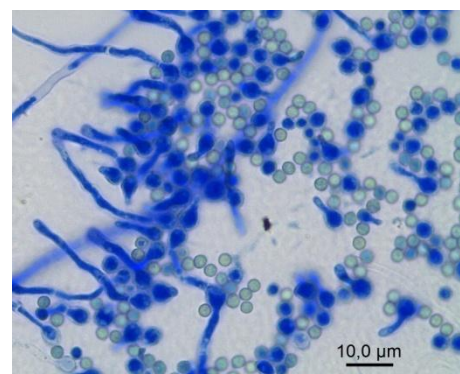
4) **Origem:** Corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *N. udagawae* com 7 dias de crescimento. em CYA. a 25°C.

6) **Microscopia:**



Ascosporos de *N. udagawae* germinando.

7) **Medições:**

Conídios: 2,5 – 3,5 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - HQ263374.1; Coverage 100% e Max Identity 99% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
GAATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAaGCGGCAaGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTTCGGGGT
CCGCGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGTGCAGCCCCGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGT
CATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGACGGGGTGTCTGCGTCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTC
GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAG
ACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCA
CGTGAAATTGTTGAAAAGGAAGCGTTTTCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCATTTCGTG
CCGGTGTACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCGGAATGT
ATCACCTCTCGGGGTTGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGcCGGCCTGCCCGGACCGAGGAACGCGC
TTCGGCTCGGA
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** N355

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Paecilomyces lilacinus*

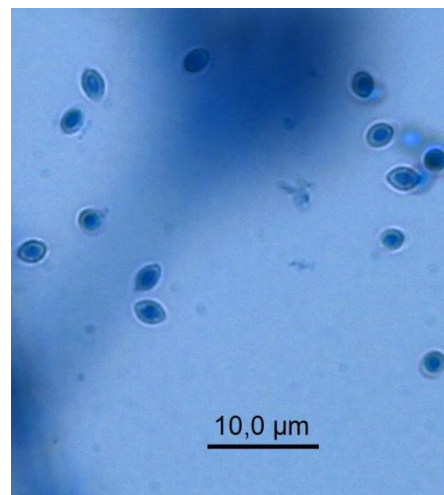
4) **Origem:** Corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de *P. lilacinus* com 7 dias de crescimento, em MA 2%, a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conídios de *P. lilacinus*

7) **Medições:**

Conídios: 2,5 – 3,0 µm

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - HQ232163.1; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
GTATTATGCAACGGGCTATAAACTCCCCTAGGAGCCACGTTCCCGAAGCCTTTTTCCCCGCGGC
GAACTGATGCTGGCCTGAACCCGGCGGAGTGCACCAGCGAGAACGCTGGATGATCCACCGGGCCC
AAGTCTGGTCACAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTAACCCTTTTTCAAAGTGCT
TTTCATCTTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGACATA
TACCTCCCATTTAGAGCAGCATTCCCAAATACTCGACTCGTCAAGGAGCTTTACACAGGCTAGG
CGTCCGACCAGACGGGGCTCTACCCTCTATGGCGTCCCCTTCCAGGGAACCTCGGAAGGCACCGCG
CCAAAAGCATCTCTGCAAATTACAATACTCGGGCCCTGGGGGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGC
CGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTT
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** 205

2) **Data de Isolamento:** Nov/2008

3) **Identificação:** *Eupenicillium* sp.

4) **Origem:** Cérebro de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia de com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Asco contendo ascosporos

7) **Medições:**

Ascosporos: 50 – 60 μm de diâmetro

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - GQ169754.1 ; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
AACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATT
TGCAGAGGATGCTTCGGGAGCGGCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGCGGCATAGAGGGTGA
GAATCCCGTCTGGGATGGGGTGCCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTTGGG
AATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCA
CAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTT
GAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAGCCGGCCTTCGGGCGGGTGTACTTC
CCCGCGGGCGGGCCAGCGTTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCGGAATGTAACGCCCCCGG
GGCGTCTTATAGCCGAGGGTGCCATGCGGCCAGCCCGGACCGAGGAACGCGCT
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** 337

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Aspergillus* sp.

4) **Origem:** Corpo de içá de *A. laevigata*

5) **Macroscopia da colônia:**



Colônia de com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a

6) **Microscopia:**



Conidióforo e conídios de *Aspergillus* sp.

7) **Medições:**

Conídios:

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - EF661404.1; Coverage 100% e Max Identity 100% em relação à espécie mais próxima.

Consensus D1/D2

```
CGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCCTCGGGGTCCGAGTTGTAATTTG
CAGAGGATGCTTCGGGTGCGGCCCGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCATAGAGGGTGAGA
ATCCCGTCTGGGACGGGGTGTCCGCGTCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCACA
AGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGA
AAGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCCC GCGGGGTT CAGCCGGCATTTCGTGCCGGTGTACTTCCC
CGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCGGAATGTAGTGCCCCTACGG
GGCACCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGG
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** 412

2) **Data de Isolamento:** Dez/2009

3) **Identificação:** *Cladophialophora* sp.

4) **Origem:** Corpo de içá de *A. capiguara*

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia estéril.

Colônia de *Cladophialophora* sp. com 14 dias de crescimento, em PDA, a 25°C.

7) **Medições:**

Conídios:

8) **Observações:**

Código de acesso NCBI - EU137293.1; Coverage 97% e Max Identity 91% em relação à espécie mais próxima.

Consensus ITS1/ITS4

```
ATCATTACCGAGTCTAGGGTCTCTCAGGCCCGAACCTCCCAACCCTTTGTTTACTGAACCTGTGTTG
CTTCGGCGGGCCCGTCTTCGGACCGCCGGAGGACCGCCTGCATGGGCGTCCTCTGGCCCGCGCCCG
CCGATGGCCCCCATCAAAAACCTCTTGTTTAAATCATGTTGTCTTGTCTGAATTACAAAAACAAATA
AAAGCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGCGAATTGCAGAATTCTAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGC
ATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGCCCCGTGCTTGGTGTGGACG
GCTTGGTTCGAGCTCCGCTCGACCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGCCTGTGGCTCCCCGGCAC
ACTGAGCTTCTCACCGAGCACGTGTCGGATCGCGGGCGTCCAGGTCCCGGTTCGGCCTCCTTGTTTCG
CAAGGACCATTTTTCTCAAGGTTGACCCTCGGATTTCAGG
```

9) **Referência Bibliográfica:**

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 – Isolamento e Identificação

A literatura menciona que a técnica de flotação em óleo mineral (SATOW, et al., 2008) favorece o isolamento de fungos negros. Os resultados obtidos também revelaram esta tendência (118 negros x 96 hialinos), como observado na Tabela 4. Das técnicas de biologia molecular utilizadas para a identificação dos isolados observou-se que o sequenciamento trouxe confiabilidade à identificação, principalmente ao nível de espécie, entretanto a técnica de microssatélite foi pouco elucidativa. A maioria dos táxons encontrados são cosmopolitas, como *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus*, mas outros menos comuns como *Exophiala* e *Cladophialophora* também ocorreram.

Neste estudo, das 12 estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Penicillium*, 10 delas pertenceram à espécie *P. citrinum*. Rodrigues (2004) relatou o mesmo fungo como contaminante dos ninhos de formiga, porém nossos resultados sugerem que o mesmo pode não ser apenas um contaminante ocasional. A espécie em questão é importante principalmente na área de alimentos pela produção de citrinina, uma micotoxina nefrotóxica para suínos (SAMSON et al, 1995). Além disso, Rodrigues et al. (2008) reportaram a ocorrência comum de *Cladosporium cladosporioides* e *Paecilomyces lilacinus* em ninhos de formigas cortadeiras, fato também observado neste trabalho. O papel destes fungos com as formigas não é bem descrito, e desta forma investigações mais profundas podem ser realizadas para a descoberta e compreensão de possíveis associações entre os mesmos.

Outras espécies de *Penicillium* incluem representantes fitopatogênicos, produtores de antibióticos (TAKAHASHI; FERREIRA-LUCAS,2008), em geral de grande aplicação industrial. Também foi registrada a presença de um de seus teleomorfos, sendo duas estirpes identificadas como *Eupenicillium zonatum* e uma estirpe de *Eupenicillium* sp. Assim como *Aspergillus* e *Paecilomyces*, o gênero *Penicillium* tem seu potencial para biorremediação reportado na literatura (SILVA; MONTEIRO, 2000; COLLA et al., 2008). *Paecilomyces* ocorre comumente no solo e um de seus teleomorfos é o gênero *Isaria*, ambos encontrados em nossa amostragem.

*Cladosporium* abriga desde espécies que participam na ciclagem de nutrientes no solo até as que causam micoses pulmonares em humanos (de HOOG et al., 2000). Também encontramos espécies fitopatogênicas e outras que são utilizadas no controle biológico de

insetos, como a mosca branca da mandioca (*Besimia argentifolii*) (FARIAS & SANTOS FILHO, 1992) e pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*) (ROBBS, 1994). Este gênero fúngico representou a maioria dos isolados (23%), o que é compatível com resultados de outras pesquisas sobre fungos filamentosos associados a formigas cortadeiras (PAGNOCCA, et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011; DUARTE, 2010; GUEDES, 2010).

O gênero *Aspergillus* ocorre comumente no solo e pode ser facilmente isolado de matéria orgânica vegetal em decomposição. Dentre as espécies deste gênero isoladas nesta pesquisa destaca-se *A. protuberus*, que teve recentemente relatada sua atividade anticancerígena e antimicrobiana contra bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (MATHAN et al., 2011).

Três estirpes de *Neosartorya udagawae*, fase teleomórfica de *Aspergillus udagawae*, foram isoladas das içás. Este táxon foi recentemente descrito como causador de aspergilose severa, muito similar a *A. fumigatus*, espécie classicamente registrada como responsável pela doença (VINH et al., 2009; SUGUI et al., 2010). Apesar do histórico clínico, a estirpe 358, isolada do corpo de içá de *A. capiguara*, apresentou um crescimento importante quando submetida à atmosfera de tolueno (Tabela 9).

Espécies de *Teratosphaeria*, são particularmente conhecidas por causar lesões foliares em *Eucalyptus* sp. (CROUS et al., 2009b; HUNTER et al., 2009). *Cladophialophora* e *Exophiala* são gêneros que compreendem espécies patógenas do ser humano, sendo responsáveis por micoses cutâneas crônicas muito severas (DE HOOG et al., 2000). Além disso, são gêneros com capacidade para biodegradação de compostos BTEX já relatada na literatura. Prenafeta-Boldú et al. (2001) isolaram estirpes dos gêneros *Cladophialophora* e *Exophiala* capazes de crescer utilizando tolueno como única fonte de carbono. Pagnocca et al. (2008) já haviam isolado um representante do gênero *Cladophialophora* a partir de içás da espécie *A. laevigata*, e de forma semelhante a este estudo, apenas uma estirpe foi obtida do isolamento. Rodrigues et al. (2011) em um trabalho no qual acompanharam a variação da microbiota dentro de formigueiros de Attini durante um ano, constataram que houve predominância de um membro da ordem Chaetothyrales bem como de espécies de *Penicillium* durante o verão em formigueiro de *Atta texana*. A Tabela 7 apresenta dados sobre a importância dos gêneros isolados.

Na Tabela 8 encontram-se os substratos de origem e a espécie de formiga dos quais foram obtidos os isolados. Pode-se notar que a espécie *A. capiguara* contribuiu com um maior número de isolados, provavelmente devido ao maior número de coletas realizado.

Como visto, uma ampla diversidade de micro-fungos pode ser relacionada com estes insetos sociais. Devido à sua grande importância, principalmente relacionada à agricultura e ao convívio em áreas urbanas, as formigas cortadeiras devem ser alvo de estudos constantes sobre a microbiota associada, dado que podem exercer grande influência sobre nossa sociedade, seja disseminando pragas, devastando lavouras ou circulando pelas casas, hospitais, com a possibilidade de atuar como veículo de doenças humanas.

## 7.2 – Testes com DCPIP

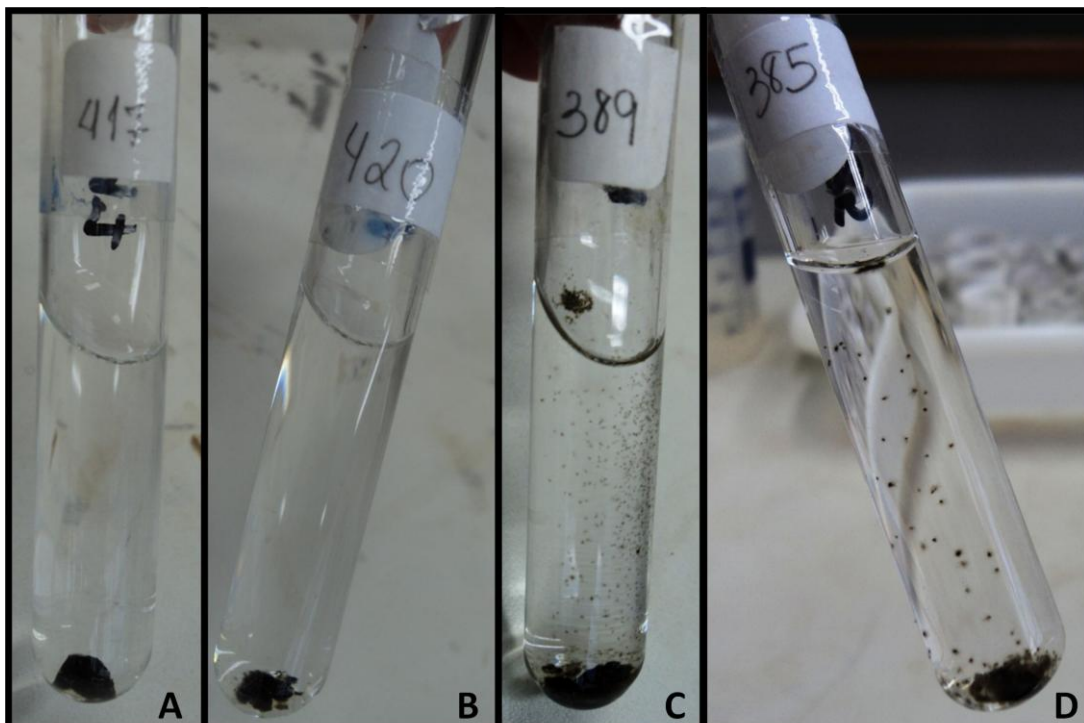
Desenvolvida por Hanson et al. em 1993, a técnica com o agente redutor DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol) foi recomendada em estudos recentes onde demonstrou ser eficiente (MARIANO *et al.*, 2008; MONTAGNOLLI *et al.*, 2008; SANCHES, 2009), porém, não trouxe resultados confiáveis em nossos experimentos. Tanto nos testes em tubos quanto em microplaca observou-se crescimento significativo de todos os fungos testados, porém, não houve a descoloração típica esperada.

Na leitura espectrofotométrica a descoloração implicaria na queda de valores refletindo a assimilação do hidrocarboneto. Os controles, negativo e positivo funcionaram corretamente, comprovando a ação do agente redox DCPIP e a viabilidade do inóculo. Entretanto, como observado nas figuras 8 e 12 a queda nos valores de absorbância para o teste, tanto em tubos quanto em microplaca, foi sempre baixa e houve momentos em que houve aumento destes valores.

Uma possível explicação para os resultados obtidos seria o teste não ter sido adequado ao metabolismo dos micro-organismos empregados. Muitos dos trabalhos envolvendo o uso do corante DCPIP utilizaram bactérias (MARIANO *et al.*, 2008; FURLAN, 2011). Além disso, pode ser que a vedação dos tubos não tenha sido suficiente para evitar a volatilização do tolueno, hidrocarboneto alvo deste estudo. Assim, os testes foram modificados, optando-se pela avaliação da produção de biomassa fúngica dentro de dessecadores com atmosfera controlada, como sugerido pelo Dr. Francesc Prenafeta-Boldú.

### 7.3 – Testes em Dessecadores

Neste teste (Etapa I), após o período de incubação e abertura dos dessecadores, houve crescimento fúngico tanto no dessecador que continha tolueno e dibutilftalato quanto no dessecador que continha apenas dibutilftalato (Figura 16). O crescimento neste último foi inesperado, já que a metodologia indica o dibutilftalato como controle negativo e não como fonte de carbono e energia.



**Figura 16.** Demonstração do crescimento observado após período de incubação do teste I nos dessecadores. A e B representam o crescimento observado no dessecador com tratamento combinado de tolueno e dibutilftalato, enquanto C e D representam crescimento observado no dessecador que continha apenas dibutilftalato.

Sabe-se que o dibutilftalato é um plastificante muito conhecido, comumente utilizado como constituinte de diversos produtos que fazem parte do nosso dia-a-dia como embalagens, adesivos, filmes de PVC, cosméticos, perfumes, esmaltes, etc. Um plastificante é um aditivo de baixa volatilidade utilizado para aumentar a processabilidade, flexibilidade ou diminuir a dureza de materiais poliméricos (BROWN et al., 1996). Bem como outros ftalatos, o dibutilftalato é obtido a partir da reação entre anidrido ftálico e o álcool correspondente, no caso, o butanol. Por sua vez, o anidrido ftálico é produzido a partir da oxidação catalítica de naftaleno ou o-xileno, advindos de alcatrão ou óleo cru, e, portanto é um derivado de petróleo que é produzido nas petroquímicas.

Por ser um derivado de petróleo, o dibutilftalato, assim como outros ftalatos, é um composto que contamina o ambiente e também é alvo de estudos de biorremediação, pois devido à sua elevada hidrofobicidade ele tende a se acumular no solo e em sedimentos bem como outros ftalatos. Os ftalatos são comumente ingeridos, inalados ou então entram em contato com a pele, pois podem ser lixiviados de embalagens onde são encontrados e acabar em rios ou no solo, podendo chegar ao homem. Outra forma de contato direto com o ser humano são bolsas de transfusão de sangue, quando causam alterações hormonais (FERREIRA, 2009; RAIMUNDO, 2007). Estudos como o de FERREIRA (2009) demonstram que os ftalatos também podem ser utilizados como fonte de carbono. Apesar da baixa volatilidade, acredita-se que o pouco de solvente que foi evaporado manteve-se concentrado na atmosfera isolada criada no interior do dessecador e foi suficiente para ser utilizado como fonte de carbono pelos micro-fungos em teste.

A constatação de crescimento de biomassa no dessecador contendo apenas dibutilftalato também conduziu à questão que se refere ao crescimento no dessecador que continha tanto tolueno quanto dibutilftalato. Como houve crescimento em ambos não era possível saber qual dos componentes do tratamento combinado era responsável pelo crescimento de biomassa. Neste contexto, o teste foi realizado novamente (Etapa II) trabalhando-se com um dessecador a mais, apenas com tolueno, sem qualquer solvente, a fim de verificar a capacidade de biodegradação deste hidrocarboneto.

Os resultados dos testes I e II foram combinados e analisados em conjunto para esta discussão. Surpreendentemente o dessecador que continha apenas tolueno também apresentou crescimento de biomassa, pois é conhecido que existe certa dificuldade em se encontrar micro-organismos capazes de crescer utilizando somente hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, especialmente monoaromáticos como o tolueno (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001). A proposta inicial do uso de dibutilftalato foi de precaver que a volatilização rápida do tolueno causasse uma exposição severa aos fungos e que a toxicidade resultante impedisse o crescimento microbiano. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que os fungos respondem tão bem à presença única de tolueno quanto à de dibutilftalato ou na combinação de ambos (Figura 15).

Na Figura 14 podemos observar a comparação da produção de biomassa entre os fungos negros e hialinos testados. Apesar das medidas de biomassa serem relativamente equivalentes, os fungos hialinos apresentaram uma tênue superioridade quanto à capacidade de crescimento nas condições criadas no interior dos dessecadores. Tal constatação foi de

certa forma inesperada, dado o caráter extremófilo característico dos fungos negros, e também levando-se em consideração dados recentes da literatura que reportam o potencial destes para a utilização de hidrocarbonetos (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002). Todavia, os micro-fungos foram isolados do exoesqueleto de formigas, onde se encontravam igualmente expostos a uma gama de hidrocarbonetos que faz parte do sistema de comunicação intra e interespecífico destes insetos, fato que pode explicar a similaridade na capacidade de assimilação dos hidrocarbonetos testados. Além disso, gêneros aqui presentes como *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Aspergillus* já tiveram seu potencial para biorremediação descritos na literatura (PEREIRA; LEMOS, 2004; SINGH 2006)

A observação dos gráficos apresentados na Figura 9 nos permite avaliar o potencial de assimilação dos hidrocarbonetos testados pelas estirpes isoladas. Apesar de praticamente todas as estirpes testadas apresentarem capacidade de crescimento em qualquer um dos três tratamentos, a biomassa produzida pela maioria se encontrou entre 0,0200 e 0,0300 gramas, sendo que em cada tratamento, apenas cerca de 10% de todas as estirpes testadas foram capazes de produzir quantidade de biomassa superior a 0,0300 gramas. Dentre estas poucas espécies, listadas na Tabela 9, podemos encontrar potenciais biodegradadores passíveis de utilização para processos de biorremediação de solos.

Segundo a avaliação dos dados, tomando por significativos os valores de biomassa acima da 0,0300g obtidos em cada tratamento, temos como maiores produtores de biomassa estirpes dos gêneros *Teratosphaeria*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Isaria* e duas estirpes de FNNE. Apesar de algumas das estirpes não apresentarem potencial para biorremediação descrito na literatura, como é o caso de *Teratosphaeria*, conhecida por ser fitopatogênica de *Eucalyptus*, o fato de ter sido capaz de suportar as condições adversas a que foi submetida mostra que as espécies de *Teratosphaeria* merecem um estudo mais aprofundado quanto ao seu potencial biotecnológico. Para os micro-fungos altamente esporulantes, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*, bem como os teleomorfos *Neosartorya* (*Aspergillus*) e *Isaria* (*Paecilomyces*) um bom desempenho nos testes corrobora os dados da literatura e reforça a grande importância destes fungos e seu potencial para a degradação de hidrocarbonetos. *Exophiala* é conhecida por sua virulência, sendo causadora de cromoblastomicoses severas (DE HOOG et al., 2000). Prenafeta-boldú et al. (2001) isolaram fungos negros de biofiltros de purificação de ar contaminado com hidrocarbonetos tóxicos. Dentre os isolados, um representante do gênero *Exophiala*,

demonstrou ser efetivo na degradação que este gênero também pode ser efetivo em processos de biorremediação.

Representantes de todos os gêneros de micro-fungos isolados apresentaram potencial para utilização em processos de biorremediação. Neste contexto, existe o indicativo de que os mesmos possuem o aparato genético que possibilita a ação na degradação de componentes orgânicos tóxicos como os BTEX. Estudos genéticos aprofundados podem ser desenvolvidos e posteriormente resultar na seleção de genes relacionados com o metabolismo de biodegradação destes componentes. Assim, *Teratosphaeria*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Isaria* e as estirpes de FNNE podem então vir a serem utilizados em técnicas de recombinação genética, na construção de micro-organismos transgênicos objetivando seus usos em processos de biorremediação.

## 8 – CONCLUSÕES

- O isolamento dos micro-fungos a partir do corpo das iças do gênero *Atta* revelou a existência de uma diversidade importante destes micro-organismos. Concluiu-se que as formigas constituíram um bom substrato de isolamento;
- a identificação dos fungos revelou a ocorrência de espécies fitopatógenas e patógenas humanas no corpo destas formigas, o que deve servir de alerta para o possível potencial para a dispersão dos mesmos por estes insetos, bem como deve servir de motivação para a continuidade de estudos da microbiota relacionada às formigas cortadeiras;
- A metodologia envolvendo a utilização do agente redox DCPIP mostrou-se insatisfatória para os fungos aqui isolados;
- Foram reconhecidas 20 estirpes com potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação, sendo estas distribuídas entre os gêneros *Teratosphaeria*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Isaria* e duas estirpes de FNNE;
- O fato de representantes de todos os gêneros isolados se enquadrarem entre as 20 estirpes que se destacaram na produção de biomassa nos experimentos indica que estes fungos podem ser portadores de um aparato genético compatível com o metabolismo de degradação de hidrocarbonetos, e, portanto, merecem ser alvo de estudos no intuito de uma possível utilização futura como fonte de DNA para recombinação com micro-organismos que possam ser mais eficazes nos processos de biorremediação;
- O depósito de culturas em acervos é a base para a estruturação das grandes coleções de culturas. Os micro-fungos aqui isolados e preservados abrirão portas para novos estudos com fins de biotecnologia ambiental.

## 9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho permitiu o crescimento da candidata para contornar problemas de metodologias, comum em muitas pesquisas. Enfrentamos neste projeto obstáculos que foram ultrapassados relacionados aos testes de biodegradação, e neste contexto notamos o quanto é importante a experiência, a capacidade de lidar com situações adversas e o contato com profissionais competentes de outras instituições que podem oferecer novas perspectivas. Assim, mencionamos o Dr. Francesc Prenafeta-Boldú, pesquisador da empresa GIRO de gestão de resíduos localizada em Barcelona, na Espanha, que nos auxiliou na metodologia do teste em dessecadores.

Ressalta-se também a grande ajuda dada pelo Dr. Luiz C. Forti e pelo pesquisador Nilson S. Nagamoto, ambos da Unesp de Botucatu, que foram responsáveis pela coleta e envio das iças utilizadas como fonte de isolamento dos micro-fungos.

## 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, 1994, 302 p.

ALMEIDA, J.M.G.C.F. Yeast community survey in the Tagus estuary. FEMS Microbiology Ecology, Oxford, n. 53, p. 295-303, 2005a.

ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. Sociobiology, Chico, v.40, n.2, p.293-306, 2002.

ANP (Agência Nacional do Petróleo). Biocombustíveis. 2011. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em 23/08/2011.

BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). Studies in Mycology v. 67, p. 1–94, 2010.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, Brazilian Journal of Microbiology, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. Química Nova, São Paulo, v.26, n.4, 2003.

BLUM, M.S. Exocrine systems. In: Fundamentals of insect physiology. Wiley-Interscience, USA, p. 535-581, 1985.

BROWN,D.; THOMPSON, R.S.; STEWART, K.M.;CROUDACE,C.;GILLINGS, E. The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. Chemosphere, v. 32, n. 11, p 2177-2187, 1996.

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. Formigas: biologia e anatomia. Rio Claro: F.H.C., 42p. 2002.

CBS – CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES. CBS yeast collections. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>>. Acesso em: 07 set. 2010.

CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS: Ciência, tecnologia e inovação. Disponível em: <[www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752](http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752)>. Acesso em: 26, jan. 2010.

COLLA, L.M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

COLLINS, C.H. Métodos microbiológicos. Zaragoza: Acribia, 410p. 1969.

CRAPEZ, M.A.C. et al. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. Ciência Hoje, v. 30, p.32-37, 2002.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. Fungal biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 269 p. 2009a.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; SUMMERELL, B.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Co-occurring species of *Teratosphaeria* on *Eucalyptus*. Persoonia, Nederland, v. 22, p.38-48, 2009b.

CROUS, P.W.; SUMMERELL, B.A.; MOSTERT, L.; GROENEWALD, J.Z. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of Proteaceae. Persoonia, v. 20, p. 59-86, 2008.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001a.

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. Oecologia, Rio de Janeiro, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001b.

DAVIES, J.S.; WESTLAKE D.W.S. Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* v. 25, p. 146–156, 1979.

DE HOOG, G. S. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology*, Washington, v.38, p.243-250, 2000.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.

DELLA-LUCIA, T.M.C., FOWLER, H.G., ARAÚJO, M.S. Castas de formigas cortadeiras. *In: DELLA-LUCIA, T.M.C. (Ed.). As formigas cortadeiras.* Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p.43 – 48, 1993.

DINIZ, E.A. Evolução dos comportamentos de preparação do substrato para o cultivo do fungo simbiote e cuidados com a cria, rainha e alados em formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae). 2008. 102f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2008

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. *Compendium of soil fungi.* London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

DUARTE, A.P.M. Fungos fitopatógenos associados às formigas cortadeiras (Formicidae: Tribo Attini). 2010. 84f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

ENDLER, A et al. Hydrocarbons aid ants in queen worship. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101: 2945, 2004.

FARIAS, A.R.N. e SANTOS FILHO, H.P. Controle de *Alerothrixus aepimcom* os fungos *Botrytis* sp. e *Cladosporium* sp. na cultura de mandioca. *In: III SICONBIOL. Simpósio de Controle Biológico, Águas de Lindóia, 1992.*

FERREIRA, I. D.; MORITA, D.M. Biodegradação de alcoóis, ftalatos e adipatos em um solo tropical contaminado. *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1686-1691, 2010.

FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; SUTTON, B.C.; PETRINI, L.E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting and *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycological Research*, Cambridge, v.100, n.5, p.541-546, 1996.

FURLAN, B. Caracterização do gene *recA* de isolados do gênero *Burkholderia* e identificação do potencial de biodegradação de compostos aromáticos. 2011. 111f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

GADD, G.M. *Fungi in Bioremediation*. British Mycological Society, Cambridge University Press, 481 pp, 2001.

GOPINATH, S.C.B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, v.46, p.119-126, 2005.

GREENE, M.J.; GORDON, D.M. Structural complexity of chemical recognition cues affects the perception of group memberships in the ants *Linepithema humile* and *Aphaenogaster cockerelli*. *Journal of Experimental Biology*, v. 210, p. 897- 905, 2007.

GUEDES, F.L.A. Fungos melanizados associados a formigas cortadeiras (Formicidae: tribo Attini). 83f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

GUTNICK, D.L.; ROSENBERG, E. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 31, p. 379 – 396, 1977.

HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, U.K., v.41, p.95-98, 1999.

HIBBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, v.3, p. 509-547, 2007.

HUNTER, G.C., et al. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. *Molecular Plant Pathology*, U.S.A., v.10, n.1, p.1-14, 2009.

JUSTI, J. Jr; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.C.; CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; ZORZENON, F.J. Formigas cortadeiras. In: *Boletim Técnico do Instituto Biológico*, São Paulo, n.4, p.5-31, 1996.

KRIEGER, H. et al. Área de Ciências Biológicas. Parcerias estratégicas. Academia Brasileira de Ciências: Edição especial. Brasília: MCT, Centro de estudos estratégicos. Disponível em: <<http://java.cgee.org.br/kmmsearch/download?doc=200806040437202.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2010.

KRUSCHEWSKY, M.C.; BEZERRA, J.L.; SOUZA, M.M. de; SILVEIRA, A. Detecção, isolamento e identificação de fitopatógenos em *Passiflora* spp. XII Seminário de Iniciação Científica da UESC, p. 118-119, 2006.

LEITÃO, A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International J. Env. Res. Public Health*, v.6, p.1393-1417, 2009.

LITTLE, A.E.F. & CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. *Ecology*, 89(5), p. 1216–1222, 2008.

LITTLE, A. E; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine –microbe symbiosis. *Biology Letters*, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. *Destruction of Hazardous Chemicals in the Laboratory*. New York; John Wiley & Sons, 501p, 1994.

MADIGAN, M.T. MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, C.P. Microbiologia de Brock. Porto Alegre, Artmed, 1128 p., 2010.

MARCONI, F.A.M. As saúvas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 167p. 1970.

MARIANO A. P., TOMASELLA R. C., OLIVEIRA L. M. DE, CONTIERO J.; ANGELIS D. DE F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 9, p.1323-1328, 2008.

MARTINS, A. et al. Biorremediação. In: III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. 2003. Disponível em: <<http://ceset.unicamp.br/lte/Artigos/3fec2401.pdf>>. Acesso em 15 abr. 2010.

MATHAN, S.; ANTHON SMITH, A.; KUMARAN, J.; PRAKASH, S. Anticancer and Antimicrobial Activity of *Aspergillus protuberus* SP1 Isolated from Marine Sediments of South Indian Coast. Chine Journal of Natural Medicines, v. 9, n. 4, p 286-292, 2011.

MELLO, S.C.M.; SILVA, J.B.T.; WETZEL, M.M.V.S. Coleções de culturas microbianas no Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária. Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 102, 41p., 2003.

MONTAGNOLLI, R., TEIXEIRA, M., LOPES, P., DOMINGUES, R., BIDOIA, E.. Persistência ambiental de óleos lubrificantes automotivos mineral e semi-sintético. Holos Environment, América do Norte, 8, set. 2008. Disponível em: <<http://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/holos/article/view/1521/1411>>.

Acesso em: 18 Jun. 2011.

MOREIRA, L.L. Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes contendo brometo de etídeo. 2010. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Burlington, USA, Elsevier Academic Press, 777 p., 2004.

MUÑOZ, S.I.S. Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: Avaliação dos níveis de metais pesados. 2002. 158f. Tese (Doutorado em Enfermagem em Saúde Pública) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

NEIVA, J. Conheça o Petróleo. 5ª edição, Maity Comunicação e Editora Ltda., Rio de Janeiro, 307 pp., 1986.

OLIVEIRA, V.M.de; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais, n.7, 2006.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. JR Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

PATTERSON, J.W.; WARREN, N.G.; KELLY, L.W. Cutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, U.S.A, v.40, n.2, p.364-366, 1999.

PEREIRA, L.T.C.; LEMOS, J.L.S. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*. In: Comunicação Técnica elaborada para a XII JIC-CETEM, Rio de Janeiro, 2004.

PRENAFETA-BOLDU, F.X.; KUHN, A.; LUYKX, D.M.A.M.; ANKE, H.; GROENESTIJN, J.W.; BONT, J.A.M. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Research*, v. 105, n. 4, p 477- 484, 2001.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J.T.C.; van GROENESTIJN, W. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene,

Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; BALLERSTEDT H., GROTENHUIS J.T.C, GERRITS J. Bioremeidiaton of BTEX hydrocarbons: Effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Biodegradation*, v.15, p. 59-65, 2004.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X., SUMMERBELL R., HOOG G.S de. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. *FEMS Microbiological Reviews* v. 30, p. 109–130, 2006.

PRYCE, T.M. Universal Detection and Identification of Fungi by PCR and DNA Sequencing. *In: CARTER, I.W.J.; SCHULLER, M.; JAMES, G.S.; SLOOTS, T.P.; HALLIDAY, C.L. (Eds.). PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective. Springer Science and Business Media B.V. 1ed, p. 397-400, 2010.*

RAIMUNDO, C.C.M. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Analítica. 126 pp, 2007.

ROBBS, C.F. Relatório de atividades fitossanitárias na MAISA (Mossoró Agroindustrial S.A., Mossoró, RN). Não publicado. 1994.

RODRIGUES, A. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2004.

RODRIGUES, A. O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas *Attini* (Hymenoptera: Formicidae). 2009. 148f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U.G.; ISHAK,H.D.; BACCI, M.Jr.; PAGNOCCA, F.C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. *Microbiology Ecology*, p. 1-12, 2011.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO, I. S. (Org.) *Microbiologia Ambiental*. Jaguariuna: Embrapa, p.307-326, 1997.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. Introduction to food- and airborne fungi. Wageningen: Ponsen & Looyen, 7ed, 389p. 2004.

SAMSON, R.A. et al. Introduction to food-borne fungi. Wageningen: Ponsen & Looyen, 4ª ed, 322p. 1995.

SAMPAIO et al. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Reading*, n. 51, p. 687-697, 2001.

SANCHES. R.J., 2009. Seleção de microrganismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e biodiesel. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Ciência, Tecnologia, Desenvolvimento Econômico e Turismo de Estado de São Paulo. Tratamento e valorização de resíduos de origem petroquímica: Relatório final nº 63073. São Paulo, 2002. Disponível em: <[http://www.desenvolvimento.sp.gov.br/recomenda/files/040300\\_Residuos\\_de\\_Origem\\_Petroquimica.pdf](http://www.desenvolvimento.sp.gov.br/recomenda/files/040300_Residuos_de_Origem_Petroquimica.pdf)>. Acesso em 27, jan. 2010.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, v.136 , p.187-195, 2005.

SATOW, M. M. “Screening” de fungos degradadores de hidrocarbonetos complexos. 2005. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado e Licenciatura)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

SATOW, M.M., ATTILI-ANGELIS, D., HOOG, G. S., ANGELIS, D.F., VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Mycology*, v. 61, p.157–163, 2008.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. *Microbiologia Ambiental (Itamar e João Lúcio)*. Embrapa Meio Ambiente, 2ªEd. Jaguariúna, SP, p. 547-570, 2008.

SILVA, J. H. & MONTEIRO R. T. R. Degradação de compostos xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. *R. Bras. Ci. Solo*, 24, 669-674 p. 2000.

SINGH, H. *Mycorremediation: fungal bioremediation*. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey, 592p, 2006.

SUDDUTH, E. J., CRUMBLEY A. J., FARRAR, W. E. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala* species: clinical spectrum of disease in humans. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v.15, p.639-44, 1992.

SUGUI, J.A. et al. *Neosartorya udagawae (Aspergillus udagawae)*, an Emerging Agent of Aspergillosis: How Different Is It from *Aspergillus fumigatus*? *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 1, p 220-228, 2010.

SUTTON, D. A., FOTHERGILL, A. W., RINALDI, M. G. *Guide to Clinically Significant Fungi*. Williams & Wilkins, Baltimore. 1ed., 1998.

TAKAHASHI, J. A. & FERREIRA-LUCAS, E. M. Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p.1807-1813, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003.

VINH, D.C. et al. Invasive aspergilosis due to *Neosartorya udagawae*. Clinical Infectious Diseases, v. 49, p 102 – 111, 2009.

VILELA, R. et al. **Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen**

***Lacazia loboi*. (2005)**. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1233932&blobtype=pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2009.

WAGNER, D.; TISSOT, M.; CUEVAS, W.; GORDON, D.M. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. Journal of Chemical Ecology, v. 26, n. 10, p. 2245 – 2257, 2000.

WAGNER, D. et al. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants *Pogonomyrmex barbatus* Journal of Chemical Ecology, v. 24, n. 12, p. 2021 – 2037, 1998.

## 11 – APÊNDICE

Neste apêndice encontra-se a tabela com todos os valores de biomassa obtidos em cada tratamento dos testes em dessecadores para cada micro-fungo testado. Estes dados foram utilizados para a elaboração da discussão apresentada neste trabalho.

### **ID – CÓDIGO DE IDENTIDADE DA ESTIRPE**

**TOL – TOLUENO:** Valores referentes às medidas de biomassa, em gramas, obtidas das estirpes que foram incubadas em dessecador que continha apenas tolueno como fonte única de carbono e energia;

**DBP – DIBUTILFTALATO:** Valores referentes às medidas de biomassa, em gramas, obtidas das estirpes que foram incubadas em dessecador que continha apenas dibutilftalato como fonte única de carbono e energia;

**DBP + TOL – DIBUTILFTALATO + TOLUENO:** Valores referentes às medidas de biomassa, em gramas, obtidas das estirpes que foram incubadas em dessecador que continha a combinação de dibutilftalato e tolueno como fontes de carbono e energia.

ID	TOL	DBP	DBP + TOL	ID	TOL	DBP	DBP + TOL
77	0,0269	0,0261	0,0263	366	0,0246	0,0320	0,0350
119	0,0267	0,0268	0,0281	367	0,0281	0,0252	0,0278
120	0,0276	0,0285	0,0305	368	0,0246	0,0290	0,0308
148	0,0266	0,0263	0,0248	369	0,0256	0,0282	0,0329
153	0,0280	0,0275	0,0263	384	0,0256	0,0272	0,0279
154	0,0187	0,0188	0,0282	385	0,0265	0,0229	0,0204
156	0,0274	0,0230	0,0271	389	0,0281	0,0260	0,0213
160	0,0284	0,0259	0,0231	390	0,0262	0,0318	0,0326
168	0,0265	0,0173	0,0173	391	0,0290	0,0264	0,0429
176	0,0266	0,0280	0,0262	392	0,0306	0,0149	0,0170
186	0,0247	0,0257	0,0230	394	0,0266	0,0197	0,0186
214	0,0260	0,0266	0,0269	395	0,0264	0,0201	0,0195
227	0,0231	0,0268	0,0263	396	0,0260	0,0152	0,0191
229	0,0265	0,0270	0,0257	397	0,0270	0,0266	0,0272
266	0,0244	0,0340	0,0247	398	0,0265	0,0149	0,0115
296	0,0273	0,0268	0,0265	399	0,0262	0,0270	0,0274
299	0,0232	0,0234	0,0240	400	0,0227	0,0274	0,0247
310	0,0259	0,0286	0,0263	402	0,0251	0,0345	0,0256
311	0,0268	0,0199	0,0183	403	0,0279	0,0268	0,0271
325	0,0263	0,0276	0,0248	406	0,0267	0,0223	0,0278
326	0,0249	0,0262	0,0257	409	0,0290	0,0287	0,0282
327	0,0239	0,0399	0,0265	410	0,0268	0,0215	0,0236
328	0,0268	0,0289	0,0263	413	0,0284	0,0255	0,0252
329	0,0261	0,0271	0,0253	414	0,0267	0,0314	0,0302
330	0,0269	0,0310	0,0280	416	0,0296	0,0188	0,0187
331	0,0257	0,0258	0,0233	416	0,0299	0,0273	0,0253
337	0,0273	0,0257	0,0249	417	0,0289	0,0274	0,0277
338	0,0290	0,0278	0,0273	418	0,0262	0,0087	0,0101
341	0,0259	0,0265	0,0235	420	0,0330	0,0370	0,0365
342	0,0256	0,0273	0,0020	421	0,0259	0,0006	0,0004
347	0,0268	0,0205	0,0197	425	0,0278	0,0210	0,0251
350	0,0259	0,0273	0,0271	426	0,0255	0,0194	0,0147
351	0,0363	0,0230	0,0244	427	0,0266	0,0265	0,0282
355	0,0257	0,0296	0,0347	429	0,0277	0,0262	0,0074
356	0,0272	0,0267	0,0268	431	0,0304	0,0280	0,0272
358	0,0432	0,0262	0,0256	432	0,0203	0,0380	0,0289
361	0,0245	0,0253	0,0269	433	0,0336	0,0200	0,0188
362	0,0281	0,0241	0,0268	434	0,0312	0,0283	0,0245
363	0,0311	0,0256	0,0263	437	0,0265	0,0258	0,0275
364	0,0257	0,0288	0,0286	440	0,0262	0,0255	0,0239
365	0,0255	0,0216	0,0254				

---

Aluna: Noemi Carla Baron

---

Orientadora: Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis

---

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro, 13 de Dezembro de 2011