

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS  
ISOLADAS DE JARDINS DE FUNGOS DOS NINHOS DE  
FORMIGAS *Atta robusta***

**THIARA TEIXEIRA SANTOS**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO – 2015**

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS  
ISOLADAS DE JARDINS DE FUNGOS DOS NINHOS DE  
FORMIGAS *Atta robusta***

**THIARA TEIXEIRA SANTOS**

Bacharel em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Cruz das Almas - Bahia - 2011

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Luciana Cazetta

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Amélia Alves Duarte

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**AGOSTO – 2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237c	<p>Santos, Thiara Teixeira.</p> <p>Identificação e perfil biotecnológico de leveduras isoladas de jardins de fungos dos ninhos de formigas <i>Atta robusta</i> / Thiara Teixeira Santos. – Cruz das Almas, BA, 2015.</p> <p>73f.; il.</p> <p>Orientadora: Marcia Luciana Cazetta. Coorientadora: Elizabeth Amélia Alves Duarte.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1. Biologia molecular – Genética – Fungos. 2. Leveduras (Fungos) – Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.</p> <p>CDD: 576.5</p>
-------	---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
THIARA TEIXEIRA SANTOS



Profª Drª Marcia Luciana Cazetta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

(Orientadora)



Profª Drª Norma Suely Evangelista Barreto

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profª Drª. Edna Lobo Machado

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola em  
\_\_\_\_\_.”

*Á Deus, por estar sempre ao meu lado...  
Aos meus pais, Gilvanete e Deodato; às  
minhas irmãs, Jady e Ladine; e a Amilton  
Silva, pelo apoio, amor e carinho.*

**DEDICO**

## **Agradecimentos**

À Deus, por me conceder a vida, por permitir que eu completasse mais uma etapa na minha caminhada, me dando forças para superar os momentos difíceis e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho!!

Agradeço a minha mãe, Gilvanete, ao meu pai, Deodato e às minhas irmãs, Jady e Ladine por terem estado sempre presente, por serem meu porto seguro, pelo apoio constante, alegria, carinho e amor incondicional.

Agradeço especialmente a Amilton Silva, pelo apoio, incentivo, por todo carinho, compreensão e por me fazer acreditar que tudo daria certo!

À Professora Dra. Marcia Luciana Cazetta pela paciência, apoio e orientação na realização deste trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos, pela compreensão e por estar sempre disposta a solucionar as minhas dúvidas.

A minha Co-orientadora Professora Dra. Elizabeth Amélia Alves Duarte por todo apoio, ensinamentos, pela confiança e paciência na realização desse trabalho.

Ao Professor Marcos Teixeira pelo apoio na coleta dos jardins de fungos.

A Juliana Mota por todo apoio, pela paciência, por todas as horas que passamos no laboratório, por me ajudar nos momentos mais difíceis na realização desse trabalho. Muito obrigada!!

Às minhas amigas, Fernanda Borges, Tamires Almeida e Leila Leone, que mesmo longe estavam sempre me apoiando.

Aos colegas de laboratório: Patricia Lima, Liliane Andrade, Carine Mascena, Tiago Freitas, Elina, Renata, Lidi, Caroline Damasceno pelo incentivo, apoio e momentos de descontração enquanto desenvolvíamos nossos trabalhos.

Aos colegas da COOPC – UFRB, Sidinha, Debora, Ana Claudia e Joaquim, pelo apoio e compreensão.

À todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente nessa caminhada

Muito obrigada!!

“Jamais desesperes, mesmo perante as mais sombrias aflições da sua vida, pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda.”

Provérbio Chinês

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.:** Identificação das leveduras isoladas em jardins de fungo de ninhos de formiga *Atta robusta* em Aracruz, ES. Resultados obtidos a partir do sequenciamento da região D1/D7 do gene 26S do rRNA.....38

**Tabela 2.:** Perfil enzimático e assimilação de fontes de carbono de leveduras isoladas dos jardins de fungo da formiga *Atta robusta*. Número de isolados positivos.....43

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.:** Municípios onde foram coletados os jardins de fungo da formiga *Atta robusta*.....32

**Figura 2.:** Replicador estéril utilizado para o plaqueamento das leveduras em diferentes meios de crescimento.....34

# ÍNDICE

Resumo	
Abstract	
Introdução.....	1
Revisão Bibliográfica.....	3
1.1. Formigas da Tribo Attini.....	3
1.2. Formigas Cortadeiras.....	5
1.3. Associação entre microrganismos e ninhos de formigas Attini.....	6
1.4. Leveduras.....	8
1.5. Atividade enzimática nos jardins de fungo.....	10
1.6. Identificação molecular de leveduras.....	14
Referências.....	16

## Capítulo 1

Prospecção e identificação de leveduras de Jardins de Fungos de ninhos de formigas Atta robusta com potencial biotecnológico.....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e métodos.....	31
Coleta.....	31
Isolamento e manutenção das leveduras.....	32
Identificação das leveduras.....	33
Extração de DNA.....	33
Identificação molecular dos isolados de leveduras.....	33
Produção enzimática em meio sólido.....	34
Preparação do inóculo.....	34
Atividade amilolítica, celulolítica e proteolítica.....	35
Atividade inulinolítica.....	36
Atividade ligninolítica.....	36
Assimilação de fontes de carbono.....	36

Crescimento dos isolados em meios com alta concentração de NaCl e glicose.....	37
Resultado e Discussão.....	37
Identificação das leveduras isoladas.....	37
Produção enzimática.....	42
Assimilação de diferentes fontes de carbono.....	46
Leveduras osmotolerantes.....	47
Considerações Gerais.....	47
Referências.....	48
Anexo I.....	59

## RESUMO

### **Santos, TT. Identificação e perfil biotecnológico de leveduras de jardins de fungos dos ninhos de formigas *Atta robusta*.**

As formigas da tribo Attini desenvolveram uma complexa relação com diferentes microrganismos, entre eles as leveduras. Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade e a função das leveduras presentes nos ninhos destas formigas. Assim, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras dos jardins de fungos dos ninhos de formiga *Atta robusta* Borgmeier (1939) localizadas em áreas de restinga do Município de Aracruz, Espírito Santo, e analisar o seu potencial biotecnológico com relação à produção de enzimas de interesse industrial. Os jardins de fungos foram assepticamente coletados e transportados para o laboratório de Bioquímica e Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia onde foi realizado o isolamento e a purificação das leveduras em meio específico. Procedeu-se à extração do DNA e ampliações por PCR utilizando *primers* da região D1 a D7 do gene do rRNA 26S, resultando em oito gêneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kurtzmaniella*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma*, *Occultifur*, *Rhodotorula* e *Hyphopichia*). Estas estirpes de leveduras foram estudadas quanto à produção das enzimas celulase, amilase, inulinase, protease e ligninases, avaliadas quanto a capacidade de crescimento em meios contendo alta concentração de cloreto de sódio/ glicose e, observada a assimilação de diferentes fontes de carbono. Como resultado, 57% dos isolados mostram-se capazes de produzir a enzima inulinase, 40% produziram a enzima amilase, 37% a enzima celulase e 4% a enzima protease. Para os testes de tolerância osmótica, foi observado que mais de 60% dos isolados foram capazes de crescer nos meios seletivos e todos foram capazes de assimilar as fontes de carbono testadas. Quanto ao aporte biotecnológico, as leveduras estudadas e identificadas neste trabalho apresentaram características diversas que podem ser aplicadas a vários setores industriais.

**Palavras-chaves:** Saúva, restinga, rRNA 26S.

## ABSTRACT

**Santos, TT. Identification and biotechnological profile fungus gardens yeast nests ants *Atta robusta*.**

Leaf-cutting ant developed a complex relationship with different organisms, including yeasts. Little is known about the diversity and function of yeast present in the nests of ants in the Tribe Attini. This work aimed to isolate and identify yeasts from *Atta robusta* (Borgmeier 1939) nests, located in salt marsh areas in the municipality of Aracruz, Espírito Santo, and evaluate its potential for biotechnological regarding enzymes of industrial interest. The nests of ants were aseptically collected and transported to the Laboratory of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of the Federal University of Recôncavo da Bahia where was performed the isolation and purification of yeast in specific medium. It will be held extraction of DNA and amplification by PCR using primers D1 to D7 region of the 26S rRNA gene, resulting in eight genera (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kurtzmaniella*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma*, *Occultifur*, *Rhodotorula* and *Hyphopichia*). These yeast strains were evaluated for production of enzymes cellulase, amylase, protease and ligninases, evaluated the ability to grow in media containing a high concentration of sodium chloride/ glucose, and observed the assimilation of different carbon sources. Results showed that 57% of the isolates were capable of producing the enzyme inulinase, 40% amylase, 37% cellulase and 4% protease. For osmotic tolerance test, it was observed that more than 60% of the isolates were able to grow on selective media and all were able to assimilate the carbon sources tested. As for the biotechnological supply the yeasts studied and identified in this study had several features that can be applied to several industrial sectors.

**Keywords:** Leaf-cutting ant, sandbanks, 26S rRNA.

# INTRODUÇÃO

Os ambientes naturais são caracterizados por abrigar uma diversidade de organismos que, em sua maioria, continuam desconhecidos e pouco estudados, sobretudo, quanto a sua importância ecológica e aplicações biotecnológicas (RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2004). As restingas, por exemplo, são formadas por um conjunto de ecossistemas costeiros, situados em depósitos arenosos, abrangendo comunidades vegetais e animais (SCHERER et al., 2005) e, entretanto, apesar de localizar-se em uma área com elevada densidade populacional, constitui um dos ambientes menos conhecidos (ROCHA et al., 2005), especialmente do ponto de vista biológico.

A formiga *Atta robusta* Borgmeier (1939) caracteriza-se como uma espécie endêmica de áreas de restinga dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (TEIXEIRA et al., 2004), e assim como outras espécies de formigas que não invadem sistemas agrícolas, poucos estudos são desenvolvidos com enfoque na ecologia desses organismos e, principalmente, sobre a microbiota associada. Sabe-se que além do fungo mutualista, muitos outros microrganismos estão presentes nos ninhos de formigas da tribo Attini. Alguns estudos sobre o papel das leveduras presentes nos ninhos de formigas Attini tem demonstrado que esses microrganismos podem estar relacionados à produção de diferentes compostos, inclusive enzimas hidrolíticas (ARCURI et al., 2014; MELO, 2014).

A produção de enzimas por leveduras associadas às formigas e aos jardins de fungos infere que esses microrganismos podem auxiliar na degradação do material vegetal depositado por esses insetos no interior dos ninhos (ARCURI et al., 2014) participando da liberação de açúcares simples, podendo auxiliar na manutenção desses micro-ecossistemas, além de poder apresentar potencial de interesse industrial.

As leveduras são fungos unicelulares caracteristicamente ovais, esféricos ou triangulares, naturalmente encontrados em frutos ou em substratos com grande disponibilidade de matéria orgânica, especialmente açúcares. Apresentam importância econômica, sendo utilizadas por diversos setores comerciais, devido à produção de compostos microbianos de grande interesse industrial, como na

produção de alimentos, enzimas, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, entre outros.

Atualmente, é grande o interesse em obter leveduras de ambientes naturais para a utilização em processos industriais. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos com esse enfoque. Os ninhos de muitas espécies de formigas da tribo Attini, por exemplo, são caracterizados como ambientes ainda pouco estudados. Esses habitats podem abrigar uma ampla variedade de microrganismos com potencial para a produção de biocompostos com valor econômico agregado. Assim, esse trabalho teve como objetivo identificar leveduras isoladas dos jardins de fungo dos ninhos da formiga *Atta robusta*, localizadas em áreas de restinga do Município de Aracruz – ES e observar a produção de enzimas de interesse industrial.

Esse trabalho foi dividido em duas partes, sendo a primeira destinada à revisão bibliográfica, que apresenta os aspectos básicos da relação existente entre as formigas Attini, seus fungos mutualistas e a associação de diversas espécies de microrganismos em seus ninhos. É abordado, também, o papel desses microrganismos neste micro-habitat, especialmente na degradação da biomassa vegetal oferecida aos fungos cultivados.

A segunda parte compõe o Capítulo 1 e apresenta os resultados do isolamento de leveduras dos jardins de fungo das formigas *Atta robusta* coletadas em cinco ninhos localizados no município de Aracruz – ES, Brasil, as quais foram identificadas por meio de técnicas de biologia molecular e analisadas quanto à degradação de diferentes fontes de carbono/nitrogênio e assimilação de açúcares simples para tentar compreender o papel desses microrganismos neste micro-ecossistema.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 1.1. Formigas da Tribo Attini

Insetos como os cupins (térmitas), besouros (ambrosias) e formigas da tribo Attini, durante a história evolutiva da Terra, desenvolveram como hábito comum o cultivo de fungos como alimento (WEBER, 1966; CURRIE e STUART, 2001; MUELLER e GERARDO, 2002). As formigas Attini pertencem à família Formicidae e subfamília Myrmicinae (MUELLER et al., 2001). São encontradas exclusivamente no continente Americano, entre as latitudes 40° N e 44° S, não ocorrendo em algumas ilhas da América Central e no Chile (WEBER, 1966).

A tribo Attini compreende mais de 200 espécies, distribuídas em 12 gêneros (MUELLER et al., 2001). Durante a sua evolução, a tribo Attini divergiu em duas clades: Palleoattini e Neoattini. O grupo primitivo Palleoattini, compreende os gêneros *Apterostigma*, *Mycocepurus* e *Myrmicocrypta*, que apresentam diversas características em comum, entretanto, a mais impressionante é uma mancha clara nas suas asas, que ainda não possui uma função definida. Por outro lado, a clade Neoattini, apresentou três sucessivas divergências. O primeiro grupo, basal, é composto pelos gêneros *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetasoritis* e *Cyphomyrmex*. Ao grupo de transição, pertencem as Attinis superiores não cortadoras de folhas, *Trachymyrmex*, *Mycetagroicus* e *Sericomyrmex*, que possivelmente deram origem às Attinis cortadoras de folhas, constituído pelos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* (SCHULTZ e BRADY, 2008).

A associação mutualística entre as formigas e o fungo cultivado existe há mais de 50 milhões de anos, caracterizando-se como uma relação extremamente forte, sem que um possa sobreviver sem o outro (MUELLER et al., 2001; MUELLER e GERARDO, 2002; SCHULTZ e BRADY, 2008). Essa complexa relação permitiu a utilização dos fungos como parte da dieta alimentar das larvas e adultos (WEBER, 1966; MUELLER et al., 2001; MUELLER, 2002). Já as formigas fornecem aos fungos substrato, proteção contra patógenos e os distribuem em novas localidades (MUELLER, 2002; CURRIE et al., 2003; SCHULTZ e BRADY, 2008).

Algumas hipóteses são descritas para tentar entender como se originou a relação mutualista entre as formigas Attini e seus fungos. Acredita-se que,

inicialmente, a fungicultura era facultativa e evoluiu para uma relação obrigatória. Entretanto ainda não se sabe se essa relação se manteve para suprir os interesses individuais das formigas ou dos fungos cultivados. A origem dessa associação é obscura, principalmente pelo fato de que todas as formigas attines existentes serem obrigatoriamente dependentes do fungo, não existindo nenhum sobrevivente que tenha uma relação facultativa com esses microrganismos para poder exemplificar os estágios primitivos dessa relação (MUELLER et al., 2001; MUELLER, 2002).

Os ninhos das formigas da tribo Attini são formados por uma ou mais câmaras, dependendo do gênero, contendo formigas e jardins de fungos (HOLLOBLER e WILSON, 1990). Esses jardins são compostos por hifas e normalmente dominados por um único clone do fungo simbiote (MUELLER, 2002), basidiomiceto, pertencente à família Lepiotaceae, especialmente o gênero *Leucoagaricus* (tribo Leucocoprineae). O gênero *Cyphomyrmex*, é o único gênero de formiga Attini capaz de cultivar fungos pertencentes à família Lepiotaceae em forma de leveduras. Já as formigas do gênero *Apterostigma* cultivam fungos da família Pterulaceae (SCHULTZ e BRADY, 2008).

Sabe-se que as formigas fêmeas, ao saírem do ninho durante o período de acasalamento, carregam na cavidade bucal uma parte do fungo cultivado para a fundação de um novo ninho, caracterizando a propagação clonal vertical do fungo cultivado (MUELLER, 2002; CURRIE et al., 2003; SCHULTZ e BRADY, 2008).

As diferentes linhagens de formigas cultivam os fungos mutualistas em variados substratos (SCHULTZ e BRADY, 2008). As Neoattines basais cultivam seus fungos em fragmentos de flores e madeiras, carcaças de artrópodes e sementes. Já as formigas superiores cortadeiras fornecem aos seus fungos fragmentos vegetais como flores e folhas frescas (MUELLER et al., 2001) podendo causar danos às plantas silvestres e cultivadas (WETTERER et al., 1998; MUELLER et al., 2001)

O fungo mutualista caracteriza-se pela extremidade das suas hifas se apresentarem em forma de bolsa, conhecidos como gongilídeos, o qual contém os nutrientes que são oferecidos como alimento às formigas (MUELLER et al., 2001). Os gongilídeos são caracterizados como estruturas especializadas não encontradas em fungos Leococopríneos de vida livre. Acredita-se que os gongilídeos são estruturas especializadas dos fungos cultivados que evoluíram

especificamente para facilitar a colheita e o consumo das formigas (MUELLER, 2002).

As larvas utilizam o fungo como única fonte de alimento para o seu crescimento e desenvolvimento. O micélio representa uma rica fonte de proteínas e lipídios, visto que o tecido dos fungos cultivados apresenta aproximadamente 24% de proteína bruta, 2% de carboidratos e 27% de lipídios (MUELLER et al., 2001). Entretanto o consumo do fungo mutualista pelas formigas adultas representa aproximadamente 9% das suas necessidades, sendo que a maior parte é obtida através da ingestão de seivas dos vegetais (MUELLER, 2002).

## **1.2. Formigas Cortadeiras**

As formigas compreendem um grupo de organismos altamente especializado, representando o ápice da evolução dos insetos, tendo a sua complexa organização social e a comunicação química como as características mais impressionantes (HOLLDOBLER e WILSON, 1990). São considerados insetos eusociais por apresentarem cuidados cooperativos com a prole, divisão entre organismos reprodutivos e não reprodutivos e sobreposição de, pelo menos, duas gerações na mesma sociedade (WIRTH et al., 2003).

Formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, representam o grupo das formigas cortadeiras, especializadas em utilizar diversas espécies de vegetais para suprir o fungo cultivado, causando sérios prejuízos à agricultura (WEBER, 1966). Entretanto, apesar de causar danos aos sistemas agrícolas, as formigas cortadeiras desempenham papéis importantes na manutenção dos ecossistemas tropicais da América, participando especialmente da ciclagem de compostos vegetais (WIRTH et al., 2003).

Os ninhos das formigas *Atta* são subterrâneos, grandes, contendo inúmeras câmaras, abrigando milhares de formigas no seu interior. Essas formigas apresentam uma complexa organização social onde o seu tamanho determina qual atividade irá realizar dentro e fora das colônias, sendo divididos em diversas funções: jardineiros, cuidados com a prole, corte e transporte de material vegetal para os ninhos, proteção e limpeza das colônias (WIRTH et al., 2003).

Apesar das formigas do gênero *Atta* serem consideradas pragas da agricultura, algumas espécies, como a *Atta robusta* Borgmeier (1939), não

invadem os sistemas agrícolas e por isso não tem recebido atenção dos pesquisadores (FOWLER, 1995).

Endêmica dos ecossistemas de restinga dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (TEIXEIRA et al., 2003), *Atta robusta* encontra-se ameaçada de extinção devido às perturbações ambientais promovidas pelo homem (FOWLER, 1995). A derrubada da vegetação que encobre as áreas de restinga afeta a população das formigas que ali se desenvolvem. Esses organismos necessitam da cobertura vegetal para manterem a temperatura e umidade necessária para o crescimento do fungo simbiótico (TEIXEIRA e SCHOEREDER, 2003) já que, diferente de outras espécies do gênero *Atta*, os seus ninhos são superficiais, podendo ser localizados logo abaixo da serapilheira (TEIXEIRA et al., 2008).

As colônias de *Atta robusta* estão estritas à fitofisionomia das restingas denominadas de Mata de Myrtaceae (TEIXEIRA e SCHOEREDER, 2003), interagindo com diversas espécies de vegetais utilizando seus frutos e sementes, desempenhando um importante papel na dispersão e desenvolvimento de plantas nesse ecossistema (TEIXEIRA, 2007).

### **1.3. Associação entre microrganismos e ninhos de formigas Attini**

As formigas da tribo Attini necessitam que seus ninhos estejam livres de microrganismos competidores para garantir a predominância do fungo mutualista, utilizado na sua alimentação (WEBER, 1966). Diversos mecanismos foram desenvolvidos pelas formigas para tentar proteger os jardins de fungos do ataque de parasitas microbianos, como a manutenção da temperatura e umidade dos ninhos (WEBER, 1972), transferência de todo o lixo do formigueiro para lugares denominados de panelas de lixo (CURRIE e STUART, 2001) e produção de substâncias antimicrobianas por suas glândulas (POULSEN et al., 2002).

Entretanto, apesar de toda essa dinâmica desenvolvida pelas formigas, diversos microrganismos estão constantemente associados aos ninhos (WEBER, 1966; BACCI JR. et al., 1995; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2010; ARCURI et al., 2014). Fungos do gênero *Escovopsis* e vários gêneros de actinomicetos, por exemplo, são frequentemente encontrados em ninhos de formigas da tribo Attini (CURRIE et al., 1999). Muitos estudos realizados com microrganismos presentes em ninhos de formigas Attini buscam apenas compreender as relações ecológicas

estabelecidas dentro dos ninhos e poucos tentam identificar o potencial biotecnológico dos isolados associados.

Segundo Currie et al. (2003) fungos do gênero *Escovopsis* são parasitas especializados da ordem Ascomycota, isolados dos jardins e lixeiras de formigas da tribo Attini. Esses microrganismos apresentam um grande impacto sobre o desenvolvimento dos jardins de fungo cultivado e, conseqüentemente, sobre as formigas, podendo matar o ninho. Ainda de acordo com o autor, ao infectarem os ninhos os fungos *Escovopsis* conseguem se manter no ninho, sendo constantemente isolados, resultando em dramática diminuição na taxa de crescimento da colônia.

Acreditava-se que a relação mutualística existente entre as formigas Attini e o fungo cultivado envolvia apenas esses dois organismos. Entretanto recentemente foi descoberto um terceiro mutualista que é uma bactéria filamentosa do gênero *Streptomyces*. Esse microrganismo parece estar associado a todas as formigas Attini, sendo carregada no tegumento de algumas espécies, e tem como principal função a produção de substâncias antimicrobianas com elevado potencial para inibição do fungo *Escovopsis* (CURRIE et al., 2003).

Favarin (2005) estudou o potencial de diferentes linhagens de *Streptomyces* isoladas dos ninhos de formiga Attini na inibição de fungos do gênero *Escovopsis*, das espécies de leveduras (*Candida albicans*, *Cryptococcus laurentii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon cutaneum*) e das bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Foi observado que todas as linhagens de *Streptomyces* foram capazes de inibir os fungos parasitas *Escovopsis*, entretanto nem todas as linhagens foram capazes de inibir as leveduras e as bactérias testadas.

Já nos estudos realizados por Rodrigues et al. (2008), além dos fungos parasitas foram isolados 85 fungos filamentosos nos jardins de formigas do gênero *Acromyrmex*. Inclusive parece ocorrer uma relação entre a presença de formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosa* inibindo e/ou controlando a população de fungos filamentosos tanto em ninhos naturais como artificiais e tratados com algum tipo de inseticida. Estes autores observaram que a presença de açúcares simples nos jardins de fungos contribuiu para o desenvolvimento indesejável de microrganismos. Sobretudo, quando as formigas não desempenhavam o papel de remoção dos fungos dos ninhos para os lixos.

Situação similar foi observada nos estudos com leveduras negras isoladas da cutícula de formigas do gênero *Apterostigma*, cuja presença nos ninhos afeta direta ou indiretamente a população microbiana dos jardins de fungos. A presença dessas leveduras negras parece inibir a capacidade dessas formigas de protegerem seus ninhos contra o fungo parasita ao interagirem negativamente com as bactérias *Pseudonocardia*, a qual é caracterizada por protegerem o ninho do fungo *Escovopsis* (LITTLE e CURRIE, 2007).

#### **1.4. Leveduras**

As leveduras são fungos unicelulares, arredondadas, alongadas ou ovais, caracterizadas por se reproduzirem assexuadamente por brotamento ou fissão binária (TORTORA et al., 2005). Podem ser isoladas de ambientes terrestres, aquáticos ou aéreos e estão constantemente associadas a vegetais. São microrganismos que possuem notável diversidade metabólica e bioquímica, capazes de assimilar variados compostos orgânicos, garantindo grande capacidade de dispersão e adaptação a diferentes ecossistemas (PHAFF e STARMER, 1987).

As leveduras se desenvolvem em habitats bastante especializados (MORAIS e ROSA, 2000). A alta especificidade percebida entre as leveduras e seus micro-habitats pode ser influenciada por vetores, responsáveis por promoverem a dispersão de algumas espécies, e por características próprias do habitat (ARAUJO et al., 1998), como a composição de nutrientes presentes no substrato, a presença ou ausência de compostos inibitórios (MORAIS e ROSA, 2000), além da variação do pH, temperatura, atividade de água e oxigênio (FERNANDES, 2008). As leveduras podem ser isoladas da água de mares, rios e lagos, da pele e do intestino de animais, em ambientes com altas concentrações de sal e açúcar (WALKER, 1998).

As leveduras estão constantemente associadas a diversos grupos de insetos (BARRETO et al., 1998; MORAIS e ROSA, 2000; SUH et al., 2007). Essa relação pode ser apenas mecânica, quando o inseto tem a função de disseminar as leveduras no ambiente ou benéfica (nutricional) quando as leveduras ou os metabólicos produzidos são utilizados na alimentação dos insetos (PHAFF e STARMER, 1987).

Pouco se sabe sobre a diversidade e a função das leveduras presentes nos ninhos de formigas da tribo Attini. Acredita-se que as leveduras podem estar atuando de forma positiva nesses ambientes, visto que algumas espécies de leveduras têm se destacado na produção de diferentes enzimas hidrolíticas capazes de degradar substratos presentes no material vegetal, além de serem capazes de utilizar o ácido galacturônico presente nos ninhos (tóxico para as formigas e os fungos simbióticos) (ARCURI et al., 2014).

São raros os trabalhos voltados a compreensão da biologia das formigas *Atta robusta* e não existe nenhum estudo sobre leveduras associadas aos seus ninhos. A literatura destina-se especialmente a estabelecer a distribuição geográfica dessa espécie (FOWLER, 1995; TEIXEIRA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004), a importância na dispersão de sementes (TEIXEIRA, 2007), a produção de polissacarídeos e o metabolismo de substrato pelo seu fungo cultivado (BARBOSA, 2010).

Entretanto, existem alguns estudos dedicados a identificar e compreender a importância das leveduras dos ninhos de outras espécies de formigas da Tribo Attini (FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 1996; CARREIRO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009; ARCURI et al., 2014). No trabalho realizado por Carvalho (2010), por exemplo, foram isoladas 152 estirpes de leveduras em 44 ninhos de sete gêneros de formigas Attini e foi observado que existem diferenças na distribuição das espécies nos ninhos das diferentes espécies de formigas. As leveduras *Pichia caribbica* e *Candida railenensis* foram predominantes no ninho de *Myrmicocrypta* sp, *Pichia guilliermondii* foram abundantes em ninhos de formigas *Mycocepurus goeldii*, *Trachymyrmex* sp e *Acromyrmex* sp, e *Cryptococcus flavescens* nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*.

Em um estudo realizado por Rodrigues (2009), foi observada a diversidade de leveduras associadas aos jardins de fungos de ninhos de formigas *Atta texana*, isoladas em duas áreas do Texas, EUA, em diferentes estações do ano. Foram obtidos 59 isolados, distribuídos em 32 espécies e 18 gêneros. Os gêneros *Cryptococcus*, *Rodothorula* e *Kodamaea* foram mais abundantes, apesar de ocorrer variação na composição da população de leveduras dos jardins de fungos durante as estações.

As leveduras encontradas nos jardins de fungos podem ser provenientes do material vegetal fornecido pelas formigas aos fungos cultivados, visto que as

populações de leveduras isoladas se assemelham aquelas associadas ao filoplano (RODRIGUES, 2009; CARVALHO, 2010). Além disso, os vegetais representam um excelente substrato para o desenvolvimento de inúmeras espécies de leveduras (ROSA et al., 1995; LANDELL, 2006; MAUTONE, 2008; SLÁVIKOVÁ et al., 2009; THONGEKKAEW et al., 2012), visto que diversas plantas, ao florescerem, produzem, na base das suas flores, o néctar, substância rica em carboidratos, constituindo um local ideal para o desenvolvimento de leveduras, especialmente as que estão associadas a insetos polinizadores, que são os principais responsáveis pela dispersão desses microrganismos de flor em flor (RUIVO, 2005).

### **1.5. Atividade enzimática nos jardins de fungo**

Sabe-se que a maior parte dos substratos fornecidos pelas formigas aos fungos é de origem vegetal. Formigas superiores cortadoras de folhas, como as do gênero *Atta*, transportam pequenos pedaços da vegetação até os ninhos, colocando-os em diferentes regiões na câmara do jardim de fungos. Em seguida os fragmentos são cortados em pedaços menores e misturados com secreções salivares das formigas e incorporados ao jardim de fungos (WEBER, 1966). Além da saliva, as formigas podem depositar sobre o substrato oferecido aos fungos, líquido fecal, o qual é composto por diversas substâncias químicas diferentes, podendo ajudar na degradação do material vegetal. A literatura tem demonstrado que as enzimas presentes no fluido fecal das formigas tem origem do próprio fungo simbiote, especialmente dos gongilídeos que fornecem estas enzimas às formigas, para que estas sejam concentradas em seu intestino e novamente depositadas no substrato recém-trazido para o ninho (MARTIN, 1992; SCHIOTT et al., 2010).

Schiott et al. (2010) observaram que algumas proteínas atravessam o trato intestinal das formigas sem serem degradadas e muitas enzimas pectinolíticas encontradas nas gotas fecais das formigas eram codificadas por genes dos gongilídeos dos fungos cultivados. Segundo os autores essa característica é uma importante função adaptativa dos gongilídeos os quais, além de participarem da nutrição das formigas, são responsáveis por produzirem enzimas em alta concentração, auxiliando na degradação da biomassa vegetal.

O material vegetal é composto especialmente de cadeias de celulose (moléculas de glicose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas) unidas entre si por ligações de hidrogênio, recobertas por hemiceluloses (D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido galactucurônico e ácido manurônico) e ligninas (WYMAN, et al., 2005). O peso seco da biomassa contém cerca de 40-50% e 20-30% de porções celulósicas e hemicelulósicas, respectivamente, podendo ser hidrolisados a açúcares simples (OGEDA e PETRI, 2010).

Os fungos, de modo geral, são capazes de produzir uma ampla variedade de enzimas capazes de hidrolisar nutrientes e moléculas insolúveis, como o amido, a celulose e as proteínas, e transformá-los em substâncias responsáveis por promoverem o crescimento celular (TRABULSI, 2004). Entretanto, o processo de degradação do material vegetal fornecido aos jardins de fungos ainda não foi totalmente esclarecido. Estudos têm demonstrado que os fungos mutualistas não são eficientes na degradação da celulose, componente predominante na biomassa vegetal (GOMES DE SIQUEIRA et al., 1998; ABRIL e BUCHER, 2004; ERTHAL JR et al. 2009).

Gomes de Siqueira et al. (1998), para tentar entender o processo de degradação do material vegetal oferecido pelas formigas aos fungos cultivados, testaram a capacidade de assimilação de diversas fontes de carbono pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* cultivado pela formiga *Atta sexdens* L., e observaram que o fungo teve um crescimento mais rápido em xilana e amido do que em pectina e celulose. Entretanto foi observada uma maior produção das enzimas pectinases e baixa produção de amilases e xilanases.

Abril e Bucher (2004), ao realizarem um trabalho semelhante, também observaram uma alta produção da enzima pectinase pelos fungos cultivados. De acordo com os autores, a incapacidade dos fungos em degradarem alguns polímeros orgânicos afastam esses organismos do grupo de microrganismos saprófitos e os incluem no grupo dos biotróficos. Essa conclusão contraria a hipótese mais aceita sobre a origem do fungo mutualista, a qual indica que as formigas começaram a cultivar fungos saprófitas de vida livre (MUELLER et al., 2001).

Apesar de se acreditar que a maior parte do complexo enzimático utilizado na conversão da biomassa vegetal em compostos mais facilmente assimiláveis tenha origem principal nos jardins de fungos, acredita-se que as leveduras e

bactérias encontradas nos ninhos também podem contribuir na degradação (ERTHAL JR et al., 2009; MOLLER et al., 2011).

Bacci Jr et al. (1995) isolaram bactérias dos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* e testaram a capacidade dos isolados em hidrolisar diferentes biopolímeros. De acordo com os resultados as bactérias isoladas apresentaram ótimo potencial para a degradação de amido, caseína e gelatina. Poucos isolados foram capazes de utilizar a celulose como fonte de carbono, pois, em um grupo de 161 bactérias Gram-negativas, apenas 7% conseguiram hidrolisar a celulose.

Arcuri et al. (2014) isolaram leveduras associadas ao tegumento de machos da espécie de formiga *Atta sexdens rubropilosa* e observaram que os isolados foram capazes de produzir enzimas pectinases, poligalacturonase, celulase, xilanases, ligninases e lipases. Melo (2014), ao estudar a comunidade de leveduras presentes nos jardins de fungos dos ninhos de formigas *Acromyrmex balzani*, observou que os isolados também foram capazes de produzir diversas enzimas hidrolíticas, destacando-se as enzimas xilanases, representadas por 64,4% dos isolados.

A utilização de leveduras como produtoras de enzimas de interesse industrial tem ocorrido com frequência devido a sua versatilidade metabólica, facilidade de cultivo, além do menor propensão a contaminação (LOCK, 2007). No entanto, algumas indústrias têm preferido leveduras isoladas diretamente de ambientes naturais, por serem mais facilmente aceitas para a comercialização (FUENTEFRÍA, 2004). Diversas enzimas produzidas por leveduras apresentam importância em vários setores industriais tais como as celulases, proteases, amilases e inulinases. Alguns trabalhos são realizados com enfoque na produção de enzimas celulolíticas por leveduras (FUENTEFRÍA, 2004; FERREIRA, 2007; VINTILA et al., 2009; CRUZ et al., 2015). Estas apresentam uma elevada importância e muitas aplicações em vários processos nas indústrias alimentícias, têxtil, rações animais, bebidas, (SILVA, 2008) bem como nos setores energéticos (OGEDA e PETRI, 2010; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Com relação às enzimas amilolíticas, apesar de serem produzidas, na sua maioria, por fungos filamentosos, várias espécies de leveduras têm sido identificadas como produtoras (GUNDLLAPALLI et al., 2002). As amilases representam um grupo de enzimas que se encontram amplamente distribuídas na natureza, responsáveis pela degradação da molécula de amido, com grande

importância biotecnológica, sendo utilizada em diversos setores industriais. Atualmente, amilases de origem microbiana estão disponíveis comercialmente em grandes quantidades, com aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento desse carboidrato (GUPTA et al., 2003).

Proteases representam cerca de 60% da venda mundial total de enzimas e podem ser encontradas em todos os organismos vivos, tais como: as plantas, animais e microrganismos. As enzimas proteolíticas de origem microbiana encontra grande demanda industrial devido, principalmente, à sua ampla diversidade bioquímica e a sua susceptibilidade para a manipulação genética. Assim, as proteases microbianas são responsáveis por aproximadamente 40% do total mundial vendas de enzima (RAO et al., 1998) e são utilizadas em diversas atividades, como na produção de bebidas, processamento de alimentos, fabricação de detergentes, processamento de couro e pele, na produção de fármacos, entre outros (SOARES et al., 1999). Atualmente, diversos estudos têm comprovado a produção dessa enzima por muitas espécies de leveduras, algumas em quantidade significativa (LANDELL, 2006; SILVA NEVES, 2006; MAUTONE, 2008).

A inulinase é uma enzima importante na produção de xarope de frutose a partir da hidrólise enzimática da inulina (VERACHTERT e DE MOT, 1990) e é também utilizada na produção de frutooligossacarídeos (KIM et al., 1997), os quais apresentam grande aplicação na indústria de alimentos. A conversão de inulina em frutose utilizando a inulinase ocorre em uma única etapa, e apresenta um rendimento superior a 95%, obtendo um produto de boa qualidade quando comparado a outros métodos para a produção de xarope de frutose (VERACHTERT e DE MOT, 1990). Inicialmente, para a degradação de inulina, as enzimas utilizadas eram de origem vegetal, porém a quantidade obtida era insuficiente para ser usada comercialmente. A produção microbiana de inulinases têm se tornado mais viável, o que tem elevado o interesse por esta enzima (PESSONI et al., 2004), sendo as leveduras os organismos mais promissores para a sua produção (PAULA, 2007).

Alguns microrganismos são capazes de produzir enzimas capazes de quebrar a lignina da biomassa vegetal, especialmente os fungos da podridão branca, pertencentes à espécie *Phanerochaete chrysosporium*. A degradação da lignina apresenta uma elevada importância no setor industrial devido à liberação

de biomoléculas mais facilmente hidrolisáveis que podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis e nas indústrias de papel, por exemplo. As enzimas utilizadas na degradação da lignina também podem ser utilizadas na redução de poluentes em águas residuais de indústrias por conterem moléculas tão recalcitrantes quanto às ligninas (PÉREZ et al., 2002).

### **1.6. Identificação molecular de leveduras**

A identificação microbiana, durante muitos anos, baseava-se em métodos convencionais, por meio de características morfológicas e microscópicas, testes de coloração e análises bioquímicas (KURTZMAN, 2011). Apesar de serem ferramentas importantes na identificação dos microrganismos, essas metodologias demandam tempo e requerem habilidade de especialistas em identificação clássica (morfológica) que muitas vezes é insipiente e podem gerar resultados imprecisos (KURTZMAN e ROBNETT, 1998). Neste contexto, a caracterização molecular de microrganismos tem sido muito aplicada nas identificações ao nível de espécie, sendo utilizado especialmente o DNA ribossomal (rDNA) que apresentam regiões altamente preservadas, compostas pela subunidade menor (SSU) e maior (LSU), além do espaçador interno transcrito (ITS) (PORTER e GOLDING, 2012). Para o estudo filogenético molecular dos fungos a região ITS tem sido proposta como o “código de barras” para sua identificação (SCHOCH et al., 2012). Entretanto, a identificação rápida de espécies de leveduras tem se baseado na análise de sequências de nucleotídeos dos genes presentes nos domínios D1/D2 da subunidade maior do rRNA (LSU) principalmente pela predominância de sequências depositadas nos bancos públicos e privados (KURTZMAN e ROBNETT, 1998; PORTER e GOLDING, 2012).

Entretanto, muitos trabalhos reportam que o estudo somente com a região D1/D2 LSU não tem sido suficiente para identificar estirpes e espécies próximas, sobretudo às espécies crípticas como aquelas do gênero *Candida Pichia* e *Saccharomyces* (PETERSON e KURTZMAN 1991; DANIEL et al., 2001; KURTZMAN, 2014). Sugerindo o uso de regiões da subunidade maior e menor e outras regiões igualmente preservadas, como o gene que codifica actina (ACT1), proteína que é abundante em todas as células eucarióticas e principal componente de microfilamentos citoplasmáticos, sendo, portanto, altamente

conservada (HIGHTOWER e MEAGHER, 1996). Neste, aspecto, o uso de ferramentas de biologia molecular são adequados e cruciais na identificação molecular de leveduras, inclusive estão sendo aplicados na identificação de leveduras associadas a jardins de fungos de ninhos de formigas da tribo Attini (RODRIGUES et al., 2009; PAGNOCCA et al., 2010; CARVALHO, 2010; ARCURI et al., 2014; MELO, 2014).

## REFERÊNCIAS

ABRIL, A.B.; BUCHER, E.H. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants. **Applied Soil Ecology**, v. 26, n. 3, p. 243-247, 2004.

ARAUJO, F.V.; MEDEIROS, R. J.; MENDONCA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. A preliminary note on psevalent species in yeast communities of bromeliad - tank waters in different tropical ecosystems of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 118-121, 1998.

ARCURI, S.L.; PAGNOCCA, F.C.; MELO, W.G.P.; NAGAMOTO, N.S.; KOMURA, D.L.; RODRIGUES, A. Yeasts found on na ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 475-487, 2014.

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

BARBOSA, C. S. **Degradação de polissacarídeos pelo fungo simbiote de espécies pragas e não pragas de formigas cortadeiras**. 54p. Dissertação (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2010.

BARRETO, M.R.; BARRETO, E.S.; ANJOS, N. Leveduras associadas a *Spermologus rufus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). Comunicação Científica. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia do Brasil**, v. 27, n. 2, p. 295-297, 1998.

CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C., BACCI JR., M.; LANCHANCE, M.A.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.; RUIVO, C.C.C.; ROSA, C.A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf cutting ant

*Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1891-1894, 2004.

CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; BACCI JR, M.; HEBLING, M.J.A.; SILVA, O.A. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 243-248, 1997.

CARVALHO, T.F.C. **Leveduras isoladas de ninhos de formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Rio Claro, São Paulo, 2010.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR. N. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CRUZ, T.M.L.; COUTO, F.M.M.; FRANÇA, G.S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P. **Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro**. Disponível em < [www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf)> Acessado em 2015.

CURRIE, C.R.; BOT, A.N.M.; BOOMSMA, J.J. Experimental evidence of a tripartite mutualismo: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **OIKOS**, v. 101, p. 91-102, 2003.

CURRIE, C.R.; MUELLER, U.G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 7998-8002, 1999.

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

DANIEL, H.M., SORRELL, T.C., MEYER, W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.1593-1606, 2001.

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

FAVARIN, E.C. **Streptomyces** associados a formigas da tribo Attini e seus efeitos sobre os fungos *Escovopsis weberi* e outros microrganismos. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 2005.

FERNANDES, A.P.F.V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática**. 201p. Tese (Doutorado). Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 2008.

FERREIRA, E.G. **Leveduras associadas a diferentes substratos naturais com potencial de produção de enzimas e substancias bioativas**. Monografia (Graduação em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

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

FOWLER, H.G. The population status of the endangered Brazilian endemic leaf-cutting ant *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae). **Biological Conservation**, v. 74, p. 347-350, 1995.

FUENTEFRIA, A.M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. 131p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GOMES DE SIQUEIRA, C.; BACCI JR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Metabolismo of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

GUNDLLAPALLI, S.B.M.; CORDERO R.R.O.; LA GRANGE D.C.; VAN RENSBURG P.; PRETORIUS I.S Different genetic background influence the secretory expression of the LKA1-encoded *Lipomyces kononenkoae* -amylase in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 8, p. 651-656, 2002.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. p. 1-18, 2003.

HIGHTOWER, R.C., MEAGHER, R.B. The molecular evolution of actin. **Genetics**, v. 114, p.315-332, 1996.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Havard Univ. Press, 1990.

KIM, D.H.; CHOI, Y.J.; SONG, S.K.; YUN, J.W. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 369–371, 1997.

KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 325-332, 2014.

KURTZMAN, C.P. Recognition of yeast species from gene sequence comparisons. **The Open Applied Informatics Journal**, v. 5, p. 20-29, 2011.

KURTZMAN, C.P.; ROBBETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

LANDELL, M.F. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associadas ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã, Viamão, RS**. 136p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LITTLE, A.E.F.; CURRIE, C.R. Symbiotic complexity: Discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, n. 3, p. 501-504, 2007.

LOCK, L.L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* B181**. 125p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MARTIN, M.M. The evolution of insect-fungus associations: from contact to stable symbiosis. **American Zoologist**, v. 32, p. 593-605, 1992.

MAUTONE, J.N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de Figueira do Parque de Itapuã, RD, Brasil**. 124p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MELO, W.G.P. **Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do estado de Tocantins**. 164p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Rio Claro, São Paulo, 2014.

MOLLER, I.E.; LICHT, H.H.F.; HARHOLT, J.; WILLATS, W.G.T.; BOOMSMA, J.J. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. **Plos One**, v. 6, 2011.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A. Interações entre *Drosophila* e leveduras em ambiente tropicais. p. 321-336. In Martins, R. P., LEWINSOHN, T.M. E BARBEITOS, M.S (Eds). **Ecologia e comportamento de Insetos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 8, PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 2000.

MUELLER, U.G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant-fungus symbiosis. **Western North American Naturalist**, v.160, p. 67-98, 2002.

MUELLER, U.G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academic Society**, v. 99, n. 24, p. 15247-15249, 2002.

MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrolise enzimática de biomassa. **Quimica Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PAGNOCCA, F.C.; CARNEIRO, S.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J; SILVA, O.A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ant fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, v. 120, p. 317-320, 1996.

PAGNOCCA, F.C.; LEGASPE, M.F.C.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C.C.C., NAGAMOTO, N.S.; BACCI JR, M.; FORTI, L.C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarelii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1454-1459, 2010.

- PAULA, F.C. **Imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator.** 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: na overview. **International Microbiology**, n. 5, p. 53-63, 2002.
- PESSONI, R.A.B.; OLMEDO, P.M.O.; CLEMENTE FILHA, A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Produção de concentrados de frutose por inulinases de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 373-377, 2004.
- PETERSON, S.W., KURTZMAN, C.P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, v.14, p.124-129, 1991.
- PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE A.H., HARRISON, J. (Ed) **The Yeasts**, Academic Press, v. 1, p. 123- 180, 1987.
- PORTER, T.M.; GOLDING, G.B. Factores that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: Classification method, primer choice, and error. **Plos One**, v. 7, 2012.
- POULSEN, M.; BOT, A.N.M.; NIELSEN, M.G.; BOOMSMA, J.J. Experimental evidence for the cost and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 52, n. 2, p. 151-157, 2002.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

ROCHA, C.F.D.; VAN SLUYS, M.; BERGALLO, H.G.; ALVES, M.A.S. Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity corridors of Serra do Mar and of the Central da Mata Atlântica in eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 1, p. 159-168, 2005.

RODRIGUES, A. **O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 151p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R.N.; MUELLER, U.G.; BACCI JR.; PAGNOCCA, F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

ROSA, C.A.; MORAES, P.B.; SANTOS, S.R.; PERES NETO, P.R.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. **Mycological Research**, v. 9, p. 1047-1054, 1995.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação Ecológica de Juréia –Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211.

RUIVO, C.C.C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais da Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar-núcleo Picinguaba**. 91p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro, 2005.

SCHERER, A. MARASCHIN-SILVA, F. BATISTA, L.R.M. Florística e estrutura do componente arbóreo de matas de Restinga arenosa no Parque Estadual de Itapuã, RS, Brasil, **Acta Botânica Brasil**, v. 19, n. 4. p. 717-726, 2005.

SCHIOTT, M.; WRZESINSKA, A.R.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J.J. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC Biology**, v. 8, n. 156, 2010.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S. ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academic Society**, v. 105, n.14, p. 5435-5440, 2008.

SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da região Amazônica para produção de protease extracelular. **ACTA Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 299 – 306, 2006.

SILVA, L.A.D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 119p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SLAVIKOVA, E.; VADKERTIOVA, R.; VRANOVA, D. Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 419-424, 2009.

SOARES, V.F.; FERREIRA, V.S.; BON, E.P.S. **Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono.** In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1999.

SUH, S.O.; NGUYEN, N.H.; BLACKWELL, M. Yeasts isolated from plant-associated Beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 88-102, 2008.

TEIXEIRA, M.C. **Dispersão de sementes por *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Hymenoptera: Formicidae) na restinga da Ilha de Guriri-ES.** 80p. Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

TEIXEIRA, M.C. SCHOEREDER, J.H., MAYHÉ-NUNES, A.J. Geographic distribution of *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 615-623, 2003.

TEIXEIRA, M.C., SANTOS, I.A., SCHOEREDER, J.H. ***Atta robusta*: endemismo, extinção ou ausência de estudos?** In: Vilela, E.F., Santos, I.A., Schoereder, J.H., Serrão, J.E., Campos, L.A.O., Lino-Neto, J. (eds.) *Insetos Sociais da Biologia à Aplicação*. Viçosa: editora UFV, p. 359-367, 2008.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H.; LOUZADA, J.N. Occurrence of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae) in the North of Espírito Santo State, Brazil. Scientific Note. **Neotropical Entomology**, n. 33, v. 2, p. 265-266, 2004.

TEIXEIRA, M.C.; SCHOEREDER, J.H. The effect of plant cover on *Atta robusta*: (Hymenoptera: Formicidae) distribution in restinga vegetation. **Sociobiology**, v. 41, p. 615-623, 2003.

THONGEKKAEW, J.; KHUMSAP, A.; CHATSA-NGA, P. Yeasts in mixed deciduous forest areas of Phujong Nayoy National Park and their ability to produce xylanase and carboxymethyl cellulase. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 157-163, 2012.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005, 894 p.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4ª Ed., São Paulo, SP, Editora Atheneu, 2004.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Yeast: biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Decker, p. 257-296, 1990.

VINTILA, T.; DRAGOMIRESCU, M.; JURCOANE, S.; VINTILA, D.; CAPRITA, R. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. **Romanian Biotechnological Letters**, v.14, n. 2, p. 4275-4281, 2009.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley e Sons, 1998, 362 p.

WEBER, N. A. **Fungus-growing ants**. Science, Washington, v. 153, n. 3763, p. 587-604, 1966.

WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972. 146 p.

WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T.R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus –growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 42-47, 1998.

WIRTH, R.; HERZ, H; RYEL, R. J.; BEYSCHLAG, W.; HOLLDÖBLER, B. **Herbivory of leaf-cutting ants: A case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama**. Ecological Studies, Springer, v. 164, 2003.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.;  
VIKARI, L. In **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**;  
DUMITRIU, S., ed.; Dekker, 2005.

---

## **CAPITULO 1**

### **PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE JARDINS DE FUNGOS DE NINHOS DE FORMIGAS *Atta robusta* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

---

Artigo formatado nas normas da revista African Journal of Microbiology Research.

# PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DE JARDINS DE FUNGOS DE NINHOS DE FORMIGAS *Atta robusta* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

## Resumo

As formigas da tribo Attini desenvolveram uma complexa relação com vários microrganismos, os quais desempenham um papel importante na degradação de moléculas e na alimentação de larvas e adultos. As leveduras presentes nesses micro-habitats, por exemplo, são pouco estudadas e ainda não se sabe a sua diversidade e função nos ninhos de muitas espécies de formigas da tribo Attini. Assim, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras dos jardins de fungos dos ninhos de formiga *Atta robusta* Borgmeier (1939), localizadas em áreas de restinga do Município de Aracruz, Espírito Santo, e analisar o seu potencial biotecnológico com relação à produção de enzimas de interesse industrial. Os jardins de fungos de cinco ninhos de formiga *Atta robusta* foram assepticamente coletados e transportados para o laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde foi realizado o isolamento e a purificação das leveduras em meio específico. Procedeu-se a extração do DNA dos isolados e ampliações por PCR utilizando primers da região D1 a D7 do gene do rRNA 26S, resultando em oito gêneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kurtzmaniella*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma*, *Occultifur*, *Rhodotorula* e *Hyphopichia*). Com relação à produção enzimática 57% mostram-se capazes de produzir a enzima inulinase, 40% a enzima amilase, 37% a enzima celulase e 4% a enzima protease. Para os testes de tolerância osmótica, foi observado que o crescimento foi considerado moderado e todos foram capazes de assimilar as fontes de carbono testadas. As leveduras estudadas e identificadas neste trabalho apresentaram características diversas que podem ser aplicadas a vários setores industriais.

**Palavras-chaves:** Saúva, restinga, rRNA 26S.

## INTRODUÇÃO

Durante a história evolutiva da Terra alguns organismos desenvolveram a capacidade de cultivar seu próprio alimento. Nesse grupo destacam-se as formigas da Tribo Attini, besouros, cupins e o homem (Mueller, 2002). As formigas Attini são exclusivas do continente Americano, com mais de 200 espécies descritas, e apresentam como característica comum o hábito de cultivar fungos para alimentação em uma associação que pode ter mais de 50 milhões de anos (Schultz e Brady, 2008).

Acreditava-se que o mutualismo entre formigas e seus fungos cultivados envolviam apenas dois simbiossios associados, isolados de outros organismos. Entretanto, sabe-se que aos jardins de fungos e às formigas estão constantemente associados diversos microrganismos como leveduras, fungos filamentosos e bactérias (Bacci Jr. et al., 1995; Fisher et al., 1996; Carreiro et al., 1997; Rodrigues et al., 2005; Rodrigues et al., 2008; Rodrigues et al., 2009; Pagnocca et al., 2010; Arcuri, et al., 2014).

Ainda não estão totalmente esclarecidas as funções desempenhadas por esses organismos dentro dos ninhos e o seu potencial biotecnológico, especialmente na produção de enzimas de interesse industrial. Alguns estudos sugerem que espécies de bactérias e leveduras (Bacci Jr. et al., 1995; Arcuri et al., 2014; Melo, 2014) também podem auxiliar na degradação da matéria orgânica fornecida pelas formigas por meio da produção de diferentes enzimas.

A atividade enzimática realizada por leveduras presentes nos jardins de fungo de formigas Attini representa uma importante característica biotecnológica, visto que, a utilização de leveduras na produção de enzimas de interesse industrial têm sido bastante apreciados devido, principalmente, à sua versatilidade metabólica, facilidade de cultivo, além de serem menos propícias a contaminação (Lock, 2007). Além disso, muitas indústrias têm preferido leveduras isoladas diretamente de ambientes naturais, por serem mais facilmente aceitas para a comercialização (Fuentefria, 2004), indicando a necessidade de buscar novas fontes microbianas para utilização nos setores industriais.

Diversas enzimas produzidas por leveduras apresentam importância em vários setores industriais tais como as celulasas, proteases, amilases e inulinasas que são utilizadas constantemente em processos nas indústrias alimentícias,

têxtil, de papel e celulose, farmacêutica, bebidas, detergentes, ração animal, panificação, bem como nos setores energéticos (Verachtert e De Mot, 1990; Soares et al., 1999; Silva, 2008; Ogeda e Petri, 2010; Castro e Pereira Jr., 2010).

Poucos trabalhos visam à identificação de espécies de leveduras associadas aos ninhos de formigas Attini. Esses estudos se restringem apenas a poucos gêneros de formigas, especialmente aquelas que são conhecidas como pragas da agricultura (Fisher et al., 1996; Carreiro et al., 1997; Rodrigues et al., 2009; Arcuri et al., 2014). A formiga *Atta robusta* Borgmeier (1939), por exemplo, endêmica das áreas de restinga dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, não invade os sistemas agrícolas e por isso não tem recebido muita atenção dos pesquisadores. Apesar de encontrar-se na lista de espécies ameaçada de extinção, devido às perturbações ambientais promovidas pela ação do homem (Fowler, 1995), são poucos os estudos sobre a biologia dessas formigas e não existe nenhum estudo sobre a microbiota associada aos seus jardins.

Os ninhos de muitas espécies de formigas da tribo Attini podem abrigar uma ampla variedade de microrganismos, muito desses ainda não descritos na literatura, podendo apresentar elevado potencial na produção de diferentes biocompostos de interesse industrial, especialmente as enzimas. Assim, esse trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras associadas aos ninhos da formiga *Atta robusta*, bem como analisar o potencial dos isolados com relação a produção de enzimas e a capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono, visando compreender o papel desses microrganismos na degradação do material vegetal fornecido aos jardins de fungo e o seu perfil biotecnológico.

## **MATERIAL E METODOS**

### **Coleta dos jardins de fungos**

As leveduras foram isoladas dos jardins de fungos de cinco ninhos de formigas *Atta robusta* localizadas em áreas de restinga do Município de Aracruz, no estado do Espírito Santos (Figura 1). Para isso, os ninhos foram cuidadosamente escavados dirigindo-se para as câmaras em que se localizavam os jardins de fungos, impedindo ou minimizando contaminações com partículas do

solo. Os jardins e algumas formigas foram assepticamente coletados em recipientes esterilizados e transportados para o laboratório.



**Figura 1.** Município onde foram coletados os jardins de fungo da formiga *Atta robusta* (Fonte: Imagens Google).

### Isolamento e manutenção das leveduras

O material constituído pelo jardim de fungos foi separado em porções de 0,5 g e transferido para tubos contendo 4,5 mL de meio caldo malte levedura (YMB) (0,3% de extrato de malte; 0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 1,0% de D-glicose) com 0,01% de cloranfenicol e agitados em vórtex por um minuto. Posteriormente, 200 µL dessas suspensões foram semeadas em placas de Petri com os meios de isolamento YMA (0,3% de extrato de malte; 0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 1,0% de D-glicose; 2,0% de Ágar) (Yarrow, 1998), contendo 0,01% de cloranfenicol e pH ajustado para 4,0. As placas foram incubadas a 25 °C e monitoradas diariamente para isolamento das colônias. Estas foram selecionadas com base em seus diferentes morfotipos, purificadas e armazenadas em meio GYMP (2,0% de D-glicose; 1,0% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 2,0% de Agar) a 6 °C (Rosa et al., 1995) e em glicerol 20% a -80°C.

## Identificação das leveduras

### Extração de DNA

Para obtenção de massa celular suficiente para extração de DNA os isolados foram cultivados em meio GYMP durante 48 horas. Após este período procedeu-se a extração seguindo a metodologia de Sampaio et al. (2001). Em microtubos de 1,5 mL foram suspensas duas alçadas de cada isolado com 500 µL do tampão de lise TNES pH 8,0 (50 mmol Tris; 250 mmol de NaCl; 50 mmol EDTA; 0,3%, de SDS) e 200 µL de micro-esferas de 212-300 µm de diâmetro (Sigma-Aldrich®) esterilizadas. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex por 4 minutos e posteriormente incubados por 1 hora a 65 °C; esse procedimento foi repetido duas vezes e, em seguida, foi realizada a centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos, seguida da transferência do sobrenadante para novos tubos.

### Identificação molecular dos isolados de leveduras

As amplificações por PCR foram realizadas com os *primers* LROR (ACCCGCTGAACTTAAGC) e LR7 (TACTACCACCAAGATCT) da região LSU 25-28S (Large subunit RNA) do RNA ribossomal (Vilgalys e Hester, 1990). As reações foram preparadas com os seguintes reagentes e concentrações: 60 ng de DNA de cada amostra; 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase; 3,7 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,6 pmol/µL de dNTPs; 0,4 pmol/µL de cada primer; 2,5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 µL com água ultra pura. Foi incluído o controle negativo, substituindo o DNA por água ultra pura. Os ciclos de amplificações foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) sob as seguintes condições térmicas: 5 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por um minuto, 72°C por 2 minutos, 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos concluindo com o resfriamento a 8°C por 30 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 0,8% corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. Em seguida, os *amplicons* foram purificados utilizando o kit Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare

Life Sciences) para posterior identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. A edição e montagem das sequências foram realizadas com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). A identidade taxonômica dos isolados foi verificada através do banco de dados GenBank, utilizando o BLASTn “basic local alignment search tool” (BLAST) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as árvores geradas pelo programa Mega 6.

## **Produção enzimática em meio sólido**

### **Preparação do inóculo**

A fim de avaliar a produção das diferentes enzimas pelas leveduras, observar a assimilação de fontes de carbono, bem como a capacidade de crescimento em diferentes concentrações de cloreto de sódio e glicose, foi utilizado o método de alta eficiência (*high throughput screening*) (Arcuri, 2013) modificado, que consiste na utilização de um replicador estéril com 25 poços, que permite testar grande número de isolados em diferentes meios de crescimento, de forma rápida e eficaz (Figura 2).



**Figura 2.** Replicador estéril utilizado para o plaqueamento das leveduras em diferentes meios de crescimento.

Para isso, as leveduras isoladas foram plaqueadas, com o auxílio da alça de inoculação, em meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as leveduras foram transferidas para tubos contendo solução salina 0,85% até a concentração de 2 na escala de Mc Farland. Em

seguida, 200 µL da suspensão foi transferida para poços do replicador estéril e as leveduras foram plaqueadas em diferentes meios seletivos.

### **Atividade amilolítica, celulolítica e proteolítica**

Para determinar a produção das enzimas celulase, amilase e protease as leveduras isoladas foram plaqueadas, com o auxílio do replicador estéril, na superfície do meio YP (extrato de levedura 1%, peptona 2% e ágar 1,5%) contendo 1% de carboximetilcelulose e amido como únicas fontes de carbono, bem como leite em pó como fonte de proteína, respectivamente, em quadruplicata, durante 5 a 8 dias, a temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **Atividade Amilolítica**

A capacidade de degradar amido foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Após o período de incubação, acrescentou-se solução de lugol (Iodo metálico 1% + iodeto de potássio 2%) às placas e observou-se a formação de zona de hidrólise ao redor da colônia de levedura considerada positiva para a produção de amilase; o restante do meio, onde não houve a degradação de amido, a coloração permaneceu violeta.

#### **Atividade Celulolítica**

Após o período de incubação, foi adicionado às placas, aproximadamente, 5 mL de solução do corante vermelho congo a 1%. Após 15 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com solução salina a 0,85%. Esse procedimento permitiu a revelação, no meio de cultura, do halo de degradação do substrato proporcionado pela atividade da celulase.

#### **Atividade Proteolítica**

A capacidade de degradar a caseína pelas leveduras foi utilizada para avaliar a produção de enzimas proteolíticas. Após o período de incubação, as

leveduras produtoras dessa enzima apresentaram, em volta da colônia, um halo transparente indicando a hidrólise das proteínas.

### **Atividade inulinolítica**

Para a análise da produção da enzima inulinase, as leveduras foram inoculadas, com o auxílio do replicador estéril, em meio seletivo contendo 0,67% de YNB (yeast nitrogen base), 0,5% de inulina e 2% de ágar. As placas foram incubadas durante 5 dias, em temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação observou-se o crescimento das colônias e comparou-se aos controles positivo (meio YNB com 0,5% glicose) e negativo (meio YNB sem fonte de carbono).

### **Atividade ligninolítica**

A atividade ligninolítica foi avaliada utilizando o corante Azul brilhante de remazol (RBB-R). As leveduras foram plaqueadas utilizando o replicador estéril no meio utilizado composto de: 0,67% de YNB; 1,0% de glicose; 0,2% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 1,8% de Ágar; 0,03% do RBB-R. As placas foram incubadas por até 21 dias e a formação de halos claros ao redor das colônias nas placas contendo o corante RBB-R indicou a produção de ligninases (Arcuri, 2013).

### **Assimilação de fontes de carbono**

Para a análise da assimilação de diferentes fontes de carbono foi utilizada a metodologia de Arcuri (2013) com algumas modificações. As leveduras isoladas foram plaqueadas, com o auxílio da alça de inoculação, em meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as leveduras foram transferidas para tubos contendo solução salina 0,85% até a concentração de 2 na escala de Mc Farland. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  da suspensão foram transferidos para poços do replicador estéril e as leveduras foram plaqueadas em meio contendo 0,67% de YNB, 1,5% de ágar e 0,5% das respectivas fontes de carbono a serem testadas: glicose, celobiose, maltose e xilose. As suspensões também foram replicadas em placas de Petri sem a adição

de fonte de carbono (controle negativo). As placas foram incubadas a 27°C (+/- 2 °C) e as leituras foram realizadas aos 8 dias de crescimento.

### **Crescimento dos isolados em meios com alta concentração de NaCl e glicose**

Com a finalidade de avaliar a tolerância a alta concentração de cloreto de sódio e glicose, as leveduras foram plaqueadas na superfície do meio contendo 0,67% de YNB, 10% de NaCl, 5% glicose e 2% de ágar e, para o teste de tolerância a glicose 50%, os isolados foram transferidos para o meio contendo 0,67% de YNB, 50% de glicose e 2% de ágar, e incubadas durante 5 dias a temperatura de 27±2°C. Os resultados foram considerados como negativo (-), fraco (w) ou positivo (+), quando comparados aos controles positivo (meio YNB com 0,5% glicose) e negativo (meio YNB sem fonte de carbono).

## **RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **Identificação das leveduras isoladas**

Foram obtidas 49 estirpes de leveduras a partir dos cinco ninhos de formigas *Atta robusta* coletados. Após a identificação molecular por meio de *primers* da região LSU 26S, foi verificado que os isolados estão distribuídos em 8 gêneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kurtzmaniella*, *Wickerhamomyces*, *Pseudozyma*, *Occultifur*, *Rhodotorula* e *Hyphopichia*), 12 espécies e 1 isolado identificado até o nível de gênero (Tabela 1).

Para a identificação molecular de leveduras associadas a formigas Attini tem-se utilizado, especialmente, as sequências gênicas dos domínios D1/D2 da subunidade maior do rDNA e espaços internos transcritos (ITS) (Pagnocca et al., 2010; Arcuri et al., 2014). Nesse trabalho buscou-se utilizar *primers* que abrangessem os domínios D1 ao D7 (Porter e Golding, 2012), tentando obter o maior número de sequências preservadas e precisão na identificação das espécies isoladas. Foi observado que a maioria dos isolados apresentaram identidade acima de 98%, indicando que a identificação foi adequada (Hughes et al., 2009).

**Tabela 1:** Identificação das leveduras isoladas em jardins de fungo de ninhos de formiga *Atta robusta* em Aracruz, ES, a partir do sequenciamento da região D1/D7 do gene 26S do rRNA.

Isolados	Espécies de referências e número de acesso no Genbank	Similaridade	Identificação proposta
42, 47, 38, B5, 89, 96, 81, 90	<i>Candida dubliniensis</i> AF405231.2	96%	<i>Candida dubliniensis</i>
	<i>C. albicans</i> X70659.1	95%	
B14	<i>Candida keroseneae</i> FJ357699.1	97%	<i>Candida keroseneae</i>
JFL09, 56	<i>Candida intermédia</i> AY497683.1	99%	<i>Candida intermedia</i>
JFL11	<i>Candida intermedia</i> DQ377635.1	99%	<i>Candida intermedia</i>
	<i>Candida pseudointermédia</i> JX049428.1	99%	
62	<i>Candida neerlandica</i> AF245404.1	99%	<i>Candida neerlandica</i>
33, 78, 76	<i>Candida cylindraceae</i> EU011644.1	98%	<i>Candida cylindraceae</i>
B11, 93, 51, 58, 69, C2, B18, E1, 88, D3, 53, D1, 64, 98, 37, 45, 36, 61, 41, 44	<i>Cryptococcus laurentii</i> FN689393.1	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
B8, B9, B6	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i> EF550343.1	98%	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>
B10, B17, B4, 82, 63	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i> JQ689038.1	97%	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>
74	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> XR 001099828.1	99%	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
B2	<i>Occultifur externos</i> AY745723.1	96%	<i>Occultifur externos</i>
43	<i>Hyphopichia heimii</i> JQ689033.1	92%	<i>Hyphopichia heimii</i>
35	<i>Rhodotorula glutinis</i> FJ345357.1	98%	<i>Rhodotorula glutinis</i>
D4	<i>Cryptococcus sp.</i> AF44696.1	99%	<i>Cryptococcus sp.</i>

Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direções (*forward* e *reverse*). Os números de acesso correspondem às sequências descritivas dos *taxa* com identificação proposta.

Leveduras Basidiomicota apresentaram maior número de isolados (51%). O gênero *Cryptococcus* foi predominante, com 20 isolados identificados como *Cryptococcus laurentii*, e um isolado classificado somente até o nível de gênero. De acordo com Carvalho (2010), existe variação na distribuição das espécies de leveduras nos ninhos das diferentes espécies de formigas.

Leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* também têm sido isoladas e associadas a outras formigas da tribo Attini (Carreiro et al., 1997; Pagnocca et al., 2008; Rodrigues et al., 2009; Arcuri et al. 2014). Nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*, espécies do gênero *Cryptococcus* (especialmente *C. flavescens*) também foram predominantes (Carvalho, 2010). Estudando as leveduras associadas ao tegumento dos machos da formiga *Atta sexdens rubropilosa*, Arcuri et al. (2014) observou que 21% dos isolados eram do gênero *Cryptococcus*, entre eles 7 isolados classificados como *C. laurentii*.

Em um estudo realizado por Rodrigues (2009), foi observada a diversidade de leveduras associadas aos jardins de fungos de ninhos de formigas *Atta texana*, isoladas em duas áreas do Texas, EUA, em diferentes estações do ano. Apesar de ocorrer variação na composição da população de leveduras dos jardins de fungos durante as estações, o gênero *Cryptococcus* foi um dos mais abundantes.

Leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam ampla distribuição espacial podendo ser encontradas nos mais diferentes ecossistemas como água, solo, ar, superfície de animais e vegetais, entre outros (Pedroso, 2010). *Cryptococcus laurentii*, por exemplo, são normalmente encontrados associados a tecidos vegetais, como em ocos e cascas de árvores (Baltazar e Ribeiro, 2008) e filoplano de diversas espécies vegetais (Mautone, 2004; Landell, 2006). Assim, a predominância dessa espécie nos jardins de fungo pode estar relacionada aos vegetais coletados e transportados para dentro dos ninhos pelas formigas *Atta robusta*.

O gênero *Candida* foi o segundo mais abundante coletado nos jardins de fungos, com 16 isolados distribuídos em cinco espécies: *Candida dubliniensis*, *C. intermedia*, *C. keroseneae*, *C. neerlandica* e *C. cylindraceae*. A espécie *C. dubliniensis* foi representada por 8 isolados e também foi descrita sua associação a formigas attines do gênero *Myrmicocrypta* sp., isolada a partir do depósito de resíduos dos ninhos, no trabalho desenvolvido por Pagnocca et al. (2010). Embora as espécies do gênero *Candida* sejam encontradas em abundância em associação com ninhos de formigas, as espécies *C. intermedia*, *C. keroseneae*, *C. neerlandica* e *C. cylindraceae* tem seu primeiro relato de associação com jardins de fungos de formigas descrito neste trabalho.

*C. intermedia* é uma espécie encontrada em diversos tipos de frutos (Prada e Pagnocca, 1997) e em outros ambientes, como descrito no trabalho de Loureiro

et al. (2005), que isolaram esta espécie do solo e da água do mar de duas praias de Olinda-PE. Sua ampla distribuição, inclusive em material vegetal, pode explicar sua presença em associação com o jardim de fungos de *Atta robusta*.

*C. cylindraceae* também já foi isolada da superfície de frutos (Prada e Pagnocca, 1997) e apresenta elevado potencial biotecnológico, especialmente na produção de enzimas lipases (Krastanov et al., 2008). *C. Keroseneae* foi descrita por Buddie et al. (2010) como uma nova espécie contaminante de combustível de aeronaves. *C. neerlandica* foi descrita pela primeira vez por Kurtzman et al. (2001) após ser isolada de massas fermentadas na Holanda. Essa espécie também foi isolada do trato digestivo de besouros e várias espécies de insetos por Suh et al. (2008), nos EUA e no Panamá. O isolamento dessas espécies de leveduras nos jardins de fungo da formiga *Atta robusta* amplia a área de ocorrência desses microrganismos.

A espécie *Wickerhamomyces sydowiorum* foi representada por 3 isolados. Anteriormente classificada como *Pichia sydowiorum*, essa espécie foi reclassificada por Kurtzman et al. (2008) após análises de genes das regiões LSU, SSU e fatores de alongação, incluindo a espécie no gênero *Wickerhamomyces*. Essa espécie pode ser isolada de diferentes ecossistemas e fontes como no trabalho de Fell et al. (2011), que isolou *W. sydowiorum* de regiões de mangue, na Florida. Santos et al. (2015) isolaram um exemplar dessa espécie a partir do filoplano de *Mangifera indica*, coletado no campus da Universidade Federal de Minas Gerais.

Cinco isolados foram identificados como *Kurtzmaniella cleridarum*. Essa espécie também foi isolada de besouros encontrados em flores do cacto no deserto de Sonoran no sul do Arizona e no deserto de Mojave na Califórnia (Lachance et al., 2013). *K. cleridarum* caracteriza-se como a espécie teleomorfa de *Candida cleridarum* pela formação de um ascósporo em forma de chapéu (Lachance e Starmer, 2008).

Os gêneros *Pseudozyma*, *Hyphopichia*, *Occultifur* e *Rhodotorula* foram representados, cada um, por apenas um isolado. A espécie *Pseudozyma hubeiensis* já foi isolada de material vegetal, como de madeira em decomposição (Bastawde et al., 1994) e testada para a produção de dois tipos de xilanases, as quais apresentam potencial para a utilização em diversos processos industriais como na produção de alimentos funcionais e probióticos (Adsul et al., 2009).

*Hyphopichia heimii* foi descrita pela primeira vez por Kurtzman (2005) isolada de madeiras invadidas por insetos na África Equatorial.

*Occultifur externus* foi inicialmente descrita como sendo *Rhodotorula minuta* e após estudos morfológicos e moleculares foi reclassificada como pertencente ao gênero *Occultifur* (Sampaio et al., 1999). Há relatos desta espécie associada a folhas de amoreira das quais foram isoladas e testadas para o biocontrole de *Botrytis cinerea*, conhecida como uma praga agrícola (Cotes et al., 2011).

Assim como as espécies do gênero *Candida*, *Wickerhamomyces sydowiorum*, *Kurtzmaniella cleridarum*, *Occultifur externus* e *Hyphopichia heimii* também são descritas pela primeira vez em associação com ninhos de formiga neste trabalho. A maioria dessas espécies têm em comum o fato de já terem sido isoladas de material vegetal ou de insetos, o que justificaria sua presença nos jardins de fungos de *Atta robusta*, uma espécie de formiga cortadeira e que carrega material vegetal para dentro dos ninhos. Um estudo com as leveduras que compõe a mata de restinga do litoral de Aracruz seria necessário para confirmar esta hipótese.

*Rhodotorula glutinis* foi representada por apenas um isolado e também tem sido associada aos ninhos de formigas da tribo Attini (Carreiro et al., 1997; Pagnocca et al., 2008). Leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* apresentam ampla distribuição geográfica e podem ser encontradas nos mais diferentes habitats. Caracterizam-se como espécies importantes para a indústria, visto que, segundo Bonadio et al. (2011), leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* possuem habilidade em sintetizar vários tipos de pigmentos carotenóides. Squina e Mercadante (2003), ao estudarem a concentração de diferentes carotenóides em quatro espécies de leveduras pertencentes a esse gênero, observaram que a *R. glutinis* foi a que apresentou a maior concentração desse pigmento. Essa característica representa uma importante ferramenta para diversos setores industriais pois, recentemente, tem aumentado o interesse em substituir os corantes artificiais pelos biossintetizados (Bonadio et al. 2011).

## Produção enzimática

Os isolados dos ninhos de *Atta robusta* foram submetidos a testes bioquímicos para verificar seu potencial na produção de enzimas de interesse industrial. Para a produção das enzimas amilase, protease, celulase e ligninase foi observado a capacidade de formação do halo de hidrólise em meio sólido. Dentre os isolados, 40% produziram a enzima amilase, 38% produziram enzima celulase e 4% produziram a enzima protease. Com relação a inulinase, 57% dos isolados mostram-se capazes de crescer em meio cuja única fonte de carbono foi a inulina. Nenhum isolado foi capaz de degradar o corante RBB-R, indicado para a produção de enzimas ligninolíticas.

*C. laurentii* se destacou por ser a espécie que apresentou produção de todas as enzimas, exceto as ligninolíticas. A predominância desta espécie nos ninhos de *Atta robusta*, e sua capacidade de degradação de uma ampla faixa de substratos, sugere que esta espécie apresenta um importante papel nos jardins de fungos, especialmente no fornecimento de nutrientes para os ninhos. Essa espécie tem sido destacada na literatura pelo seu potencial na produção de enzimas (Silva Neves et al., 2006; Faria et al., 2014), além de apresentar potencial no controle de microrganismos que causam podridão em frutos com importância comercial (Blum et al., 2004).

A produção de inulinases foi bastante significativa, pois 28 isolados, cerca de 60% do total, foram capazes de utilizar a inulina como fonte de carbono. Dentre esses, 17 isolados da espécie *C. laurentii* foram capazes de produzir essa enzima, seguido pelas espécies do gênero *Candida* (*C. dubliniensis*, *C. neerlandica* e *Candida sp.*) com 6 isolados. Isolados pertencentes ao gênero *Kurtzmaniella*, *Wickerhamomyces* e *Pseudozyma* também foram capazes de produzir a enzima inulinase (Tabela 2).

A literatura destaca a produção de inulinases por espécies de leveduras dos gêneros *Candida*, *Sporotrichum*, *Pichia* e *Kluyveromyces* (Paula, 2007). Dentre esses, vários estudos são realizados especialmente com leveduras do gênero *Kluyveromyces*, como no trabalho realizado por Treichel et al. (2011), que buscou otimizar a produção desta enzima em diferentes meios agroindustriais pré-tratados. Gaspari et al. (1999), observou a produção por meio da imobilização da inulinase produzida por *K. marxianus* para a degradação de extratos de

*Helianthus tuberosus* L. Os resultados deste trabalho indicam o potencial de produção de inulinase por outras espécies de leveduras.

**Tabela 2:** Perfil enzimático e assimilação de fontes de carbono de leveduras isoladas dos jardins de fungo da formiga *Atta robusta*.

Espécies	IN	AM	CEL	PRO	LIG (RBB-R)	Gli 0,5%	Gli 50%	Xil	Mal	Ce	NaCl 10% e Gli 5%
<i>Candida dubliniensis</i>	3	4	0	0	0	8	7	8	8	8	6
<i>Candida keroseneae</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
<i>Candida intermedia</i>	1	1	0	0	0	3	2	3	3	32	2
<i>Candida neerlandica</i>	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>Candida cylindraceae</i>	0	1	0	0	0	3	2	3	3	31	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	17	9	16	1	0	20	8	20	20	20	12
<i>Cryptococcus sp.</i>	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>	1	1	0	0	0	3	3	3	3	3	3
<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	3	2	1	0	0	5	5	5	5	5	5
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
<i>Occultifur externus</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>Hyphopichia heimii</i>	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
Total	28	20	19	2	0	49	32	49	49	49	33

IN: Inulinase, AM: Amilase, CEL: Celulase, PRO: Protease, LIG: Ligninase, RBB-R: remazol brilliant blue R, Gli 0,5%: glicose a 0,5%, Gli 50%: glicose a 50%, Xil: xilose, Mal: maltose, Ce: celobiose,

Sabe-se que a inulina é encontrada amplamente na natureza por estar presente em mais de 30.000 espécies vegetais, como carboidrato de reserva, especialmente nas raízes de chicória (*Cichorium intybus* L.) e de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.), sendo encontrada também em alho, aspargo, cebola, dália e yacon (Oliveira et al., 2004; Apolinário et al., 2014). As inulinases representam um grupo de enzimas importantes na produção de xarope de frutose a partir da hidrólise enzimática da inulina (Verachtert e De Mot, 1990) e é também utilizada na produção de frutooligossacarídeos (Kim et al., 1997), que apresentam grande aplicação na indústria de alimentos.

Todos os isolados foram capazes de crescer no meio contendo amido como fonte de carbono, entretanto, apenas 40% foi capaz de apresentar halos de

hidrólise ao redor das colônias, indicando a produção da enzima amilase. Dentre estes, a espécie com maior número de representantes produtores desta enzima foi *C. laurentii*, seguido de *Candida dublinensis*. São raros na literatura estudos sobre a produção enzimática por leveduras associadas às formigas da Tribo Attini. No trabalho desenvolvido por Arcuri et al. (2014), foi observada a produção da enzima amilase por leveduras isoladas do tegumento das formigas machos da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e do solo dos seus ninhos, com apenas 3,7% de isolados capazes de produzir essa enzima.

Leveduras produtoras de amilases têm sido isoladas de diversos tecidos vegetais (Landell, 2006; Mautone, 2008). No trabalho realizado por Paludo e Carreiro (2014), ao analisarem a capacidade hidrolítica de leveduras isoladas de folhas em decomposição, observaram que 20% dos isolados apresentaram elevado potencial para produção de amilase. Segundo os autores, a baixa produção enzimática observada para os demais isolados foi atribuída ao fato das enzimas ficarem restritas em compartimentos celulares, sendo necessária a utilização de métodos físicos, químicos e enzimáticos para que possam ser liberadas.

Com relação à produção de celulase, mais uma vez, se destacaram as espécies de *Cryptococcus*, com 20 isolados produtores desta enzima. *Kurtzmaniella cleridarum* e *Pseudozima hubeiensis* também apresentaram resultado positivo para celulase (Tabela 2).

A produção de celulases por leveduras associadas a formigas Attini também foi observada por Arcuri et al. (2014), obtendo 37,6% dos isolados de leveduras da superfície de formigas *Atta sexdens rubropilosa* capazes de produzir a enzima celulase. Provavelmente, os jardins de fungos são um micro-habitat que induz a síntese de celulases por leveduras, uma vez que as formigas pertencentes ao gênero *Atta*, classificadas como cortadeiras, oferecem aos micro-organismos grande quantidade de material vegetal, havendo a necessidade de hidrolisar este substrato.

Esse resultado é bastante interessante, pois a produção de celulase é atribuída, geralmente, a fungos filamentosos (Queiroz et al., 2002; Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004) e bactérias (Silvia et al., 2015). Poucos são os trabalhos realizados com enfoque na produção de enzimas celulolíticas por leveduras (Fuentefria, 2004; Vintila et al., 2009; Cruz et al., 2015).

A produção de celulases tem sido descrita por leveduras isoladas de outros substratos, como no estudo realizado por Fuentesfria (2004), onde 38% dos isolados de leveduras isoladas do filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis* foram capazes de produzir a enzima, bem como no trabalho de Cruz et al. (2015) realizado em Pernambuco, em que 18 dos 46 isolados de leveduras de frutos de meloeiro produziram celulase. A produção de enzimas celulolíticas apresenta uma elevada importância em vários processos nas indústrias alimentícias, têxtil, de papel, farmacêutica e bebidas, bem como nos setores energéticos (Ogeda e Petri, 2010; Castro e Pereira Jr. 2010), uma vez que tem sido estudada sua aplicação na produção de etanol de segunda geração, a partir de material lignocelulósico.

Foi observado que apenas dois isolados foram capazes de produzir a enzima protease, identificados como *C. laurentii* e *Hyphopichia heimii*. As proteases representam 60% das enzimas industriais e são utilizadas em diversas atividades, como no processamento de alimentos e na produção de fármacos (Kumar et al., 2005).

A produção de enzimas proteolíticas por leveduras tem sido descrita na literatura, como no trabalho desenvolvido por Silva Neves et al. (2006), que ao estudarem a produção de proteases por 50 isolados de leveduras da região Amazônica, observaram que a maioria foi capaz de produzir essas enzimas, sendo a espécie *Candida intermedia* a que apresentou a maior produção, diferindo desse trabalho, no qual foi observado que nenhuma espécie do gênero *Candida* apresentou atividade proteolítica.

Nenhum isolado foi capaz de produzir enzimas ligninolíticas, uma vez que não foi observada a formação de halos de degradação ao redor das colônias no meio composto pelo corante RBB-R. Arcuri et al. (2014) e Melo (2014), observaram que apenas 0,4% e 8%, respectivamente, dos isolados de leveduras associadas a ninhos de formigas Attini foram capazes de produzir enzimas ligninolíticas. A produção de enzimas que degradam lignina por leveduras isoladas dos ninhos de formigas Attini representa uma característica muito importante desses microrganismos nesse micro-habitat. A degradação da lignina presente na biomassa vegetal fornecida aos jardins de fungos libera compostos mais facilmente assimiláveis como a celulose e hemicelulose (Ruiz-Dueñas e Martinez, 2009).

## **Assimilação de diferentes fontes de carbono**

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que todos os isolados foram capazes de utilizar as diversas fontes de carbono para crescimento (Tabela 2). Esses resultados são importantes, pois indicam que as leveduras presentes nos jardins de fungos dos ninhos de formigas *Atta robusta* também competem pelas fontes de carbono, provenientes da degradação do material vegetal, com outros microrganismos presentes nesses ecossistemas (Arcuri, 2013). Além disso, as leveduras dentro dos ninhos das formigas podem estar desempenhando um papel importante na liberação de biomoléculas simples utilizadas para seu próprio desenvolvimento e de outros microrganismos presentes no ninho, favorecendo a manutenção do equilíbrio nos jardins de fungos.

Arcuri (2013), ao testar a capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono pelas leveduras isoladas do tegumento de bitus (machos) da espécie *Atta sexdens rubropilosa* observaram que todas as leveduras foram capazes de assimilar a glicose e a maioria dos isolados assimilaram celobiose (80,5%), maltose (95,8%) e xilose (93,8%). Além das diferentes fontes de carbono testadas, o autor também observou a capacidade das leveduras em assimilar ácido galacturônico (70,6%), evidenciando a importância desses microrganismos na degradação de ácidos tóxicos produzidos no interior do ninho.

Melo (2014), ao isolar leveduras dos ninhos de *Acromyrmex balzani*, obteve um resultado semelhante ao obtido por Arcuri (2013), das leveduras isoladas 100 % das estirpes assimilaram glicose, 88,3% xilose, 87,6% celobiose, 82,5% maltose e 75,6% ácido galacturônico, respectivamente.

## **Leveduras osmotolerantes**

De acordo com as análises feitas para a tolerância osmótica, 69% das leveduras isoladas foram capazes de se desenvolver em meio contendo 10% de NaCl + 5% de glicose e 65% cresceram em meio composto por 50% de glicose. *C. laurentii* foi a espécie que apresentou maior número de isolados osmotolerantes, seguido de *Candida dubliniensis*, *Kurtzmaniella cleridarum* e *Wickerhamomyces sydowiorum*. Sabe-se que diversas espécies de leveduras conseguem tolerar e se manter ativas em altas concentrações de NaCl como, por

exemplo, *Candida sorbitophila*, e em altas concentrações de açúcar como espécie *Zygosaccharomyces rouxii* (Fernandes, 2008).

Normalmente, as linhagens de leveduras utilizadas em processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada. O estresse promovido pelo aumento da osmolaridade externa resulta na redução do crescimento e na perda de viabilidade das células, especialmente pelas interferências no gradiente osmótico da membrana plasmática (Mager e Varela, 1993). Algumas leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* são descritas na literatura como leveduras osmotolerantes (Tofalo et al., 2009).

Na indústria de alimentos, a presença de leveduras osmotolerantes é indesejável, de um modo geral, pois estas estão relacionadas à deterioração e contaminação de alimentos açucarados (Cava e Hernandez, 1994). Rocha et al. (2004), por exemplo, percebeu que leveduras dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichia*, se multiplicavam mais rápido quando presentes em refrigerantes com alto teor de açúcares e sais. No trabalho desenvolvido por Cava e Hernández (1994), ao isolarem leveduras de sucos concentrados de laranjas, observaram que todos os isolados foram capazes de crescer em meio com 50% de glicose, caracterizando-os como microrganismos osmotolerantes.

Por outro lado, leveduras osmotolerantes produtoras de enzimas, e outras substâncias de interesse industrial, são convenientes, pois podem ser cultivadas em meio de cultura com concentrações mais elevadas de sais e açúcares, diminuindo a contaminação por bactérias ou outras leveduras contaminantes, permitindo que as fermentações ocorram em condições “não estéreis” (Arruda et al., 2007).

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Os jardins de fungos da formiga *Atta robusta* apresentaram espécies de leveduras ainda não descritas em ninhos de formiga da tribo Attini.

Dentre as espécies identificadas, várias apresentaram bom potencial biotecnológico para produção de enzimas de interesse industrial.

Além disso, a atividade enzimática sugere que estas leveduras possam atuar nos ninhos participando da degradação do material vegetal fornecido aos jardins de fungos pelas formigas.

## REFERÊNCIAS

- Adsul, M.G.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V. (2009). Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6488-6495.
- Apolinário, A. C.; Damasceno, B.P.G.L.; Beltrão, N.E.M.; Pessoa, A.; Converti, A.; Silva, J.A. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 368– 378.
- Arcuri S.L. (2013). **Taxonomia e características metabólicas de leveduras isoladas de bitus de *Atta sexdens rubropilosa***. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- Arcuri, S.L.; Pagnocca, F.C.; Melo, W.G.P.; Nagamoto, N.S.; Komura, D.L.; Rodrigues, A. (2014). Yeasts found on the ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 475-487.
- Arruda, P.V.; Rodrigues, R.C.L.B.; Felipe, M.G.A. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26.
- Bacci Jr., M.; Anversa, M.M.; Pagnocca, F.C. (1995). Cellulose degradation by *Leococoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 385-386.
- Baltazar, L.M.; Ribeiro, M.A. (2008). Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 449-453.

- Bastawde, K.B.; Puntambekar, U.S.; Gokhale, D.V. (1994). Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. **Journal of Industrial**, v.13, p. 220–224.
- Blum, L.E.B.; Amarante, C.V.T.; Valdebeniyo-Sanhueza, R.M.; Guimarães, L.S.; Dezanete, A.; Hack Neto, P. (2004). *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 433-436.
- Bonadio, M.P.; Mutton, M.J.R.; Freita, L.A. (2011). **Produção de carotenoides por Rhodotorula rubra em meio de maltose e sacarose, com diferentes nutrientes**. Disponível em <prope.unesp.br/xxi\_cic/27\_35298769845.pdf>. Acessado em 2011.
- Buddie, A.G.; Bridge, P.D.; Kelly, J.; Ryan, M.J. (2010). *Candida keroseneae* sp. nov., a novel contaminant of aviation querosene. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 70-75.
- Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C.; Bacci JR, M.; Hebling, M.J.A.; Silva, O.A. (1997). Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 243-248.
- Carvalho, T.F.C. (2010). **Leveduras isoladas de ninho de formigas da Tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
- Castro, A.M.; Pereira JR. N. (2010). Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188.

- Cava, R.R.; Hernandez, S.P. (1994). Comparison of media for enumerating osmotolerant yeasts in orange concentrates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 22, p. 291-295.
- Cotes, A.M.; Zapata, J.; Diaz, A.; Garcia, M.; Medina, C.; Cristancho, D.; Rodrigues, S.; Rodrigues, F.; Uribe, D. (2011). Selección de leveduras filósfericas com potencial para el control biológico de *Batrytis cinérea*. **Fitopatologia Colombiana**, v. 35, n. 2, p. 51-56.
- Cruz, T.M.L.; Couto, F.M.M.; França, G.S.; Laranjeira, D.; Neves, R.P. (2015). **Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro**. Disponível em < [www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf)> Acessado em 2015.
- Faria, G.O.; Martins, A.G.; Penatti, M.P.A.; Pedroso, R.S. (2014). Características in vitro de isolados do complexo *Cryptococcus laurentii* em diferentes meios de cultura. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 3, p. 290-302.
- Fell, J.W.; Stazzell-Tallman, A.; Scorzetti, G.; Gutierrez, M.H. (2011). Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 533-549.
- Fernandes, A.P.F.V. (2008). **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática**. 201p. Tese (Doutorado). Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal.
- Fisher, P.J.; Stradling, D.J.; Sutton, B.C.; Petrini, L.E. (1996). Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminar study. **Mycological Research**, v. 100, p. 541-546.
- Fowler, H.G. (1995). The population status of the endangered Brazilian endemic leaf-cutting ant *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae). **Biological conservation**, v. 74, p. 347-350.

- Fuentefria, A.M. (2004). **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. 131p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Gaspari, J.W.; Gomes, L.H.; Tavares, F.C.A. (1999). Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus*. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1135-1140.
- HUGHES, K.W.; PETERSEN, R.H.; LICKEY, E.B. (2009). Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species delimitation across basidiomycete fungi. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 795-798.
- Kim, D.H.; Chol, Y.J.; Song, S.K.; Yun, J.W. (1997). Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas sp.* **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 369–371.
- Krastanov, A.; Govindarajan, A.; Daniel, D. (2008). Studies on lipase fermentation using *Candida cylindracea* NRRL-175051N a stirred tank bioreactor. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 3, p. 290-299.
- Kumar, S.; Sharma, N.S.; Saharam, M.R.; Singh, R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 1701- 1705.
- Kurtzman, C.P. (2005). New species and a new combination in the *Hyphopichia* and *Yarrowia* yeast clades. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 121-130.

- Kurtzman, C.P.; Robnett, C.J.; BASEHOAR-POWERS, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 939-954.
- Kurtzman, C.P.; Robnett, C.J.; Yarrow, D. (2001). Two new anamorphic yeast: *Candida germânica* and *Candida neerlandica*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 77-83.
- Lachance, M.A.; Perri, A.M.; Farahbakhsh, A.S.; Starmer, W.T. (2013). Genetic structure of *Kurtzmaniella cleridarum*, a cactus flower beetle yeast of the Sonoran and Mojave Deserts: speciation by distance. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 674-681.
- Lachance, M.A.; Starmer, W.T. (2008). *Kurtzmaniella* gen. Nov. and description of the heterothallic, haplontic yeast species *Kurtzmaniella cleridarum* sp. nov., the teleomorph of *Candida cleridarum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 520-524.
- Landell, M.F. (2006). **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associadas ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã, Viamão, RS**. 136p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Lock, L.L. (2007). **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. 125p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Loureiro, S.T.A.; Cavalcanti, M.A.Q.; Neves, R.P.; Passavante, J.Z.O. (2005). Yeast isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 333-337.
- Mager, W. H.; Varela, J.C.S. (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 253-258.
- Mautone, J.N. (2008). **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de Figueira do Parque de Itapuã, RD, Brasil**. 124p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Melo, W.G.P. (2014). **Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do estado de Tocantins**. 164p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Rio laro, São Paulo.
- Mueller, U.G. (2002). Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant-fungus symbiosis. **Western North American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. 67-98.
- Ogeda, T.L.; Petri, D.F.S. (2010). Hidrolise enzimática de biomassa. **Quimica Nova**, v. 33, n. 7, p.1549-1558.
- Oliveira, R. A.; Park, K.J.; Chiorato, M.; Park, K.J.B.; Nogueira, R.I. (2004). Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 131-140.

- Pagnocca, F.C.; Legaspe, M.F.C.; Rodrigues, A.; Ruivo, C.C.C., Nagamoto, N.S.; Bacci JR, M.; Forti, L.C. (2010). Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarelii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p 1454-1459.
- Pagnocca, F.C.; Rodrigues, A.; Nagamoto, N.S. Bacci JR., M; (2008). Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 517-526.
- Paludo, L.C.; Carreiro, S.C. (2014). **Produção de hidrolases por leveduras**. Em <http://eventos.uft.edu.br/index.php/sic/IX/paper/viewFile/638/230>. Acessado em maio de 2014.
- Paula, F.C. (2007). **Imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator**. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.
- Pedroso, R.S.; Penatti, M.P.A.; Maffei, C.M.L.; Candido, R.C. (2010). Infecções causadas por *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii*: implicações clínicas e identificação laboratorial. **NewsLab**, ed. 102.
- Porter, T.M.; Golding, G.B. (2012). Factors that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: Classification method, primer choice, and error. **Plos One**, v. 7.
- Prada, G.M.M.; Pagnocca, F.C. (1997). Ascomycetous yeast associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. **Folia Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 39-46.

- Queiroz, G. O.; Jordão, R.C.C.; Salgueiro, A.A. (2002). Seleção de microrganismos produtores de celulases e de lacases a partir de efluente de fábrica de papel. **Revista Química e Tecnologia**, n. 1, p. 7-10.
- Rocha, C. D.; Schmidt, H. J.; Monteiro, C.; Odebrecht, E., (2004). Deterioração de refrigerantes por leveduras, **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 95-100.
- Rodrigues, A. (2009). **O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 151p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo.
- Rodrigues, A.; Bacci, M. Jr.; Mueller, U. G.; Ortiz, A.; Pagnocca, F. C. (2008). Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614.
- Rodrigues, A.; Cable, R.N.; Mueller, U.G.; Bacci JR.; Pagnocca, F.C. (2009). Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam, v. 96, p. 331-342.
- Rodrigues, A.; Pagnocca, F. C.; Bacci, M. Jr.; Hebling, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. (2005). Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425.
- Rosa, C.A.; Morais, P.B.; Santos, S.R.; Peres Neto, P.R.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. (1995). Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of south eastern Brazil. **Mycological Research**, v. 99, n. 9, p. 1047– 1054.

- Ruegger, M.J.S.; Tauk-Tornisielo, S.M. (2004). Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação Ecológica de Juréia –Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211.
- Ruiz-Duenas, F.J.; Martinez, A.T. (2009). Microbial degradation of lignina: how a bulky recalcitrante polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 164-177.
- Sampaio, J. P.; Gaadanh, M.; Santos, S.; Duarte, F.L.; Pais, C.; Fonseca, A.; FELL, J.W. (2001). Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.687-697.
- Sampaio, J.P.; Bauer, R.; Begerow, D. (1999). Oberwinkler, F. *Occultifur externus* sp. nov., a new species of simple-pored auricularioid heterobasidiomycete from plant litter in Portugal. **Mycologia**, v. 91, n. 6, p. 1094-1101.
- Santos, A.R.; Faria, E.S.; Lanchance, M.A.; Rosa, C.A. (2015). *Ogataea mangiferae* sp. nov., a methylotrophic yeast isolated from mango leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Epub ahead of print.
- Schultz, T.R.; Bradu, S.G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academic Society**, Washington, v.105, n.14, p. 5435-5440.
- Silva Neves, K.C.; Porto, A.L.F; Teixeira, M.F.S. (2006). Seleção de leveduras da região Amazônica para produção de protease extracelular. **ACTA Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 299 – 306.

- Silva, L.A.D. (2008). **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 119p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Silvia, V.M.A.; Martins, C.M.; Martins, S.C.S. (2015). Atividade celulolítica de actinobacterias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 2026-2036.
- Soares, V.F.; Ferreira, V.S.; Bon, E.P.S. (1999). **Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono**. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Squina, F.M., Mercadante, A.Z. (2003). Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 3.
- Suh, S.O.; Nguyen, N.H.; Blackwell, M. (2008). Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 88-102.
- Tofalo, R. Chaves-Lopez, C.; Di Fabio, F.; Schione, M.; Felis, G.E.; Torriani, S.; Paparella, A.; Suzzi, G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 179-187.
- Treichel, H.; Rodrigues M.I.; Durrant, L. R.; Andretta, M.G.S.; Contierro J.; Burket, J.F.M.; Mauger Filho, F.; Curraler, I. C. B. (2011). **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pre-tratados**. Disponível em <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=51&pid=3&p=15&order=titulo](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=51&pid=3&p=15&order=titulo)> Acessado em 2011.

- Verachtert, H.; De Mot, R. (1990). **Yeast: biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Decker, p. 257-296.
- Vilgalys, R, Hester M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**. v. 172, n. 8, p. 4238-4246.
- Vintila, T.; Dragomirescu, M.; Jurcoane, S.; Vintila, D.; Caprita, R. (2009). Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. **Romanian Biotechnological Letters**, v.14, n.2, p. 4275-4281.
- Yarrow, D. (1998). **Methods for the isolation and identification of yeasts**. In: The Yeasts, a taxonomic study. 4a. Ed. Amsterdam: Kurtzman e Fell. p. 77-100.

## ANEXO I

**Tabela 3:** Identificação dos isolados de leveduras nos jardins de fungo de ninhos de formiga *Atta robusta* em Aracruz, ES. Resultados obtidos a partir do sequenciamento da região D1/D7 do gene 26S do rRNA.

Isolado	Tamanho	Cobertura	Identidade	Taxonomia	N° de acesso
<b>78</b>	559	100%	98%	<i>Candida cylindracea</i>	EU011644.1
<b>42</b>	1324	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>B11</b>	1367	77%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>76</b>	559	100%	98%	<i>Candida cylindracea</i>	EU011644.1
<b>93</b>	1349	77%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>B8</b>	1322	100%	98%	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>	EF550343.1
<b>33</b>	1310	100%	98%	<i>Candida cylindracea</i>	EU011644.1
<b>51</b>	1338	77%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>B10</b>	1320	100%	97%	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	JQ689038.1
<b>B17</b>	1315	100%	97%	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	JQ689038.1
<b>B4</b>	1319	100%	97%	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	JQ689038.1
<b>58</b>	1340	77%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>69</b>	1340	78%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>74</b>	1340	100%	99%	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	XR 001099828.1
<b>B9</b>	1299	100%	98%	<i>Wickerhamomyces</i>	EF550343.1

				<i>sydowiorum</i>	
<b>47</b>	1300	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>62</b>	249	91%	99%	<i>Candida neerlandica</i>	AF245404.1
<b>D4</b>	329	94%	99%	<i>Cryptococcus sp.</i>	AF444696.1
<b>38</b>	1072	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>B5</b>	1072	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>B6</b>	1291	100%	98%	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>	EF550343.1
<b>82</b>	1284	100%	97%	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	JQ689038.1
<b>C2</b>	1309	77%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>B14</b>	1270	77%	97%	<i>Candida keroseneae</i>	FJ357699.1
<b>JFL09</b>	1231	50%	99%	<i>Candida intermedia</i>	AY497683.1
<b>89</b>	1273	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>96</b>	1281	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>B2</b>	1328	100%	96%	<i>Occultifur externus</i>	AY745723.1
<b>81</b>	1283	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>56</b>	1242	50%	99%	<i>Candida intermedia</i>	AY497683.1
<b>JFL11</b>	720	74%	99%	<i>Candida intermedia</i>	DQ377635.1
<b>63</b>	1301	100%	97%	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	JQ689038.1
<b>B18</b>	1319	78%	96%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1

<b>E1</b>	1321	77%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>90</b>	1283	100%	96%	<i>Candida dubliniensis</i>	AF405231.2
<b>88</b>	1295	80%	97%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>35</b>	1266	99%	98%	<i>Rhodotorula glutinis</i>	FJ345357.1
<b>43</b>	1250	99%	92%	<i>Hyphopichia heimii</i>	JQ689033.1
<b>D3</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>53</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>D1</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>64</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>98</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>37</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>45</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>36</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>61</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>41</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1
<b>44</b>	1321	78%	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FN689394.1 FN689393.1