

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE
E BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

Aspergillus da seção *Nigri* DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO
ISOLADOS DE SOLO E SERRAPILHEIRA

TATIANA FARIA MAIA

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

***Aspergillus* da seção *Nigri* DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO
ISOLADOS DE SOLO E SERRAPILHEIRA**

TATIANA FARIA MAIA

Sob a Orientação do Professor

Marcelo Elias Fraga

e Co-orientação do Professor

Carlos Antonio Inácio

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica - RJ
Março/2014

À *minha mãe* Mirian Araújo de Faria Maia, por todo amor, incentivo, e por dedicar parte de sua vida à minha formação pessoal e profissional.

Ao meu pai Walter Luiz Maia (*in memoriam*), por guiar os meus caminhos.

Ao meu padrasto Alejandro de La Huerta por todo apoio, força e carinho.

À minha irmã Priscila Faria Maia e ao meu cunhado Alan Pançardes da Rocha por todo amor, amizade e por sempre estarem ao meu lado.

E ao meu Amor, Wagner Martins, pelo companheirismo, incentivo, amor, compreensão e pela confiança em meu trabalho...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, sem ele nada seria,

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e o Programa de Pós- Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada por tornar possível a realização de mais uma etapa profissional importante em minha vida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão da bolsa;

Ao meu orientador Prof. Marcelo Elias Fraga, pela orientação, paciência e sugestões no decorrer desde projeto.

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Antonio Inácio, pela colaboração, atenção e conselhos realizados.

Ao professor Valdir Diola (*in memorian*) por abrir as portas de seu laboratório e me auxiliar com as análises moleculares. Perdemos um ótimo profissional que amava a pesquisa acima de tudo.

Ao professor Jean Luiz Simões de Araújo, da Embrapa Agrobiologia, Seropédica/RJ. pela realização das análises moleculares, por todo ensinamento, atenção e por confiar neste trabalho.

Às funcionárias, Tatiana e Aline, do Laboratório de Multiusuários de Biologia Molecular da Embrapa Agrobiologia, Seropédica/RJ, pela grande ajuda na realização desta etapa.

Ao colega de mestrado, Alexandre De Donato por toda ajuda na realização desde projeto, atenção e paciência.

À amiga Elizabeth Ramos, pela compreensão, apoio e amizade nos momentos de dificuldade.

Ao colega Uirá pela imprescindível ajuda com as análises estatísticas.

Aos funcionários e professores do programa de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, principalmente ao secretário Roberto Tadeu, por todo apoio, dedicação e disponibilidade.

Ao técnico do Laboratório de Micologia/ UFRRJ, Luiz Jorge pelo auxílio e apoio.

À minha mãe, padrasto, irmã, cunhado e namorado por todo amor, carinho, incentivo, compreensão, por acreditarem e confiarem em mim e por sempre estarem ao meu lado me amparando e dando suporte para que eu continuasse sempre em frente.

Aos meus familiares e amigos que mesmo à distância compreenderam os momentos difíceis.

E a todos que colaboraram para a realização deste projeto de forma direta ou indireta.

RESUMO

MAIA, Tatiana Faria. *Aspergillus* da seção *Nigri* de Interesse Biotecnológico Isolados de solo e serrapilheira. 2014. 94 p. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Seropédica, RJ, 2014.

O Brasil é o país com a maior diversidade biológica, apresentando a mais vasta biota continental da Terra. A Mata Atlântica corresponde a uma área de 13% do território brasileiro, abrigando uma grande parcela desta diversidade. Os fungos são organismos extremamente importantes para o funcionamento desses ecossistemas. Dos fungos comumente isolados do solo destaca-se as espécies de *Aspergillus*. Os integrantes da seção *Nigri* estão entre os mais importantes dentro do gênero *Aspergillus* pois são cosmopolitas e apresentam potencial econômico e biotecnológico. Sua identificação é considerada difícil e complexa devido à alta diversidade genética. Portanto, a taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri* tem sido investigada utilizando dados morfológicos, bioquímicos e moleculares. Algumas espécies são responsáveis por causar a deterioração de alimentos e produção de micotoxinas, no entanto, outras são produtoras de importantes ácidos orgânicos, antibióticos e enzimas extracelulares. Dentre as enzimas produzidas por estes fungos podemos citar as celulases, amilases, peptidases, fitase e pectinase que apresentam aplicação nos diversos setores industriais, tais como, indústria têxtil, de alimentos e bebidas, agroindústria de alimentação animal, silagem e farmacêutica. O objetivo foi identificar espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* isoladas de serrapilheira e solo através da caracterização morfológica, bioquímica e molecular, bem como avaliar o potencial enzimático desses isolados. Para este estudo foram coletadas 198 amostras de serrapilheira e solo (profundidades 0 a 5 e 5 a 10 cm) durante os dois períodos, chuvoso e seco do Bioma Mata Atlântica pertencente ao Estado de Minas Gerais. O isolamento foi realizado em meio DRBC por 7 dias a 25 °C. Após o isolamento, 42 *Aspergillus* negros foram identificados utilizando critérios macroscópicos e microscópicos em CYA 25 e 37 °C, MEA 15, 25, 33, 36 e 40 °C, por um período de 10 dias. Para a análise bioquímica utilizou-se CREA, MEA-Boscalide, por um período de 7 dias a 25 °C, e Teste de Ehrlich. A análise molecular foi realizada através do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4. O potencial enzimático foi avaliado através do índice enzimático, um parâmetro semi-quantitativo usado para avaliar a produção das enzimas hidrolíticas pelos fungos em meio sólido. O estudo revelou a existência de 6 Grupos diferentes, apresentando uma boa diversidade de espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri*. Na estação chuvosa, houve uma maior riqueza destas espécies, onde foi encontrado 92,8%, enquanto na estação seca foi encontrado apenas 7,2%. Os grupos I e II foram identificados através da caracterização morfológica e molecular como pertencentes as espécies unisseriadas *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus aculeatinus*, respectivamente, e os grupos III, IV e VI foram sugeridos morfológicamente como pertencentes as espécies bisseriadas do “agregado *Niger*”, Grupo III = *Aspergillus tubingensis*, Grupo IV = *Aspergillus niger*, Grupo VI = *Aspergillus foetidus* e Grupo V não pôde ser identificado. De acordo com o potencial enzimático, apenas a enzima pectinase não foi produzida por estas espécies, entretanto nenhuma espécie foi considerada potencialmente produtora para as enzimas testadas, pois o índice enzimático não foi satisfatório.

Palavras-chave: Fungos, Identificação morfológica, Identificação bioquímica, Identificação molecular, produção de enzimas.

ABSTRACT

MAIA, Tatiana Faria. *Aspergillus* section *Nigri* of Biotechnological interest isolated from soil and litter. 2014. 94 p. Dissertation (Post Graduate Course in Entomology and Plant Pathology and Applied Biotechnology) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Seropédica, RJ, 2014.

Brazil is the country with the greatest biological diversity, presenting the widest continental biota of the Earth. The Atlantic Forest corresponds to an area of 13% of the Brazilian territory, sheltering a large portion of this diversity. Fungi are extremely important organisms for the functioning of these ecosystems. Fungi commonly isolated from soil stand out as species of *Aspergillus*. The members of the section *Nigri* are among the most important in the genus *Aspergillus* because they are common worldwide and feature economical and biotechnological potential. Their identification is considered difficult and complex due to high genetic diversity. Therefore, the taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri* has been investigated using morphological, biochemical and molecular data. Some species are responsible for causing food deterioration and mycotoxins production, however, others are important producers of organic acids, antibiotics and extracellular enzymes. Among the enzymes produced by these fungi, we can cite cellulases, amylases, peptidases, pectinase and phytase which have applications in several industrial sectors such as textile, food and drinks, agroindustry of animal feed, silage, pharmaceutical, etc. The objective was to identify *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from litter and soil through morphological, biochemical and molecular characterization, as well as to evaluate the enzymatic potential of these isolates. For this study, 198 samples were collected from litter and soil (0-5 and 5-10 cm depth) during the two periods, rainy and dry, in the Atlantic Forest Biome belonging to the Minas Gerais State. After isolation, 42 Black *Aspergillus* were identified using macroscopic and microscopic criteria on CYA 25 and 37 °C, MEA 15, 25, 33, 36 and 40 °C for a period of 10 days. For biochemical analysis, CREA, MEA-Boscaldid for 7 days at 25 °C, and Ehrlich test were used. The molecular analysis was performed by sequencing the ITS1 and ITS4 regions. The enzymatic potential was evaluated through enzymatic index, a semi-quantitative parameter used to evaluate the production of hydrolytic enzymes by fungi in solid medium. The study revealed the existence of 6 different groups, showing a good diversity of species of *Aspergillus* section *Nigri*. In the rainy season there was a greater richness of these species, where it was found 92.8%, while in the dry season it was found only 7.2%. The groups I and II were identified through morphological and molecular characterization belonging to uniseriate species of *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus aculeatinus*, respectively, and the groups III, IV and VI were morphologically suggested to belong to bisseriate species of the "*aggregate Niger*," Group III = *Aspergillus tubingensis*, Group IV = *Aspergillus niger*, Group VI = *Aspergillus foetidus* and Group V could not be identified. According to enzymatic potential, only a pectinase enzyme was not produced by these species, but none of the species was potentially considered a producer of the tested enzymes, because the enzymatic index was not satisfactory.

Key-words: Fungi, morphological identification, biochemical identification, molecular identification, production of enzymes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas sobre o número de espécies fúngicas existentes no mundo.	5
Tabela 2. Divisão das seções do gênero <i>Aspergillus</i>	7
Tabela 3. Manuais e monografias importantes para identificação das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	10
Tabela 4. Espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> aceitas atualmente.	13
Tabela 5. Características macroscópicas dos isolados de serrapilheira e solo da Mata Atlântica de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	33
Tabela 6. Características microscópicas dos isolados de serrapilheira e solo da Mata Atlântica de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	34
Tabela 7. Produção de celulase por <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> isolados de serrapilheira e solo, avaliados pelo IE.	46
Tabela 8. Produção de peptidase por <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> isolados de serrapilheira e solo, avaliados pelo IE.	48
Tabela 9. Produção de amilase por <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> isolados de serrapilheira e solo, avaliados pelo IE.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biomas Brasileiros.	3
Figura 2. Diferentes formas de vesículas de <i>Aspergillus</i> : a) globosa ou esférica; b) piriforme; c) espatulada e d) clavada.	8
Figura 3. (a) Conidióforo de <i>Aspergillus clavatus</i> - unisseriado, apresenta apenas uma única camada de células (fiálides) que dão origem aos conídios. (b) <i>Aspergillus flavus</i> - bisseriado, apresenta duas camadas de células métulas e fiálides.	9
Figura 4. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação das diferentes regiões do rDNA de fungos.	15
Figura 5. Localização geográfica dos pontos de amostragem realizados na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.	23
Figura 6. Identificação dos 42 isolados de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	31
Figura 7. Características macroscópicas das colônias dos isolados de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> , verso e reverso em CYA e MEA, respectivamente, à 25° C após 7 dias: Grupo I (A-D); Grupo II (E-H); Grupo III (I-L); Grupo IV (M-P); Grupo V (Q-T); Grupo VI (U-X).	35
Figura 8. Características microscópicas dos isolados de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> em MEA à 25° C após 7 dias: Grupo I (A-C); Grupo II (D-F); Grupo III (G-H); Grupo IV (I-J); Grupo V (K-L); Grupo VI (M-N).	37
Figura 9. Crescimento dos 42 isolados nas temperaturas 15, 33, 36 e 40 °C em MEA a 10 dias em incubação na ausência de luz.	39
Figura 10. Crescimento no meio CREA em 25 °C a 7 dias de incubação: Grupo I ao VI (A; B; C; D; E; F), respectivamente.	39
Figura 11. Crescimento no meio MEA-B em 25 °C após 7 dias de incubação: Grupo I (A); Grupo II, III, IV e VI (B) e Grupo V (C).	40
Figura 12. Reação do Teste de Ehrlich: Grupos I, II, III e V (A); Grupo IV (B) e Grupo VI (C).	40
Figura 13. Produtos da amplificação de DNA dos isolados de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> com iniciadores ITS1 e ITS4. M = Marcador de peso molecular 1Kb <i>Plus DNA Ladder</i> (Invitrogen). (A,B,C)= Ordem das 42 Amostras em sequência. B = Branco.	42
Figura 14. Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA das espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> construída pelo método de Neighbor-joining. Valores de bootstrap (n=1000 replicatas). Barra de escala = 0,01 substituições por posição.	44

Figura 15. Observação das placas com Meio CMC com Vermelho Congo 1%. (A) Formação do halo de degradação pelo isolado A_38; (B) Isolado A_19 não produziu halo de degradação.	47
Figura 16. Teste semiquantitativo de produção da enzima peptidase. Formação do halo de degradação pelos isolados (A) A_4; (B) A_33.....	49
Figura 17. Teste semiquantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução de iodo 0,1%. Formação do halo de degradação pelos isolados (A) A_29; (B) A_39.	51
Figura 18. Teste semi-quantitativo de produção da enzima fitase (A e B). Não houve produção do halo de hidrólise, isolado A_35, porém o resultado foi positivo para a produção da enzima.....	52
Figura 19. Teste semi-quantitativo de produção da enzima pectinase. Não houve crescimento e nem produção do halo de hidrólise. (A) Verso da placa isolado A_30; (B) Reverso da placa isolado A_30.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição numérica de isolados de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> avaliados ao longo dos nove fragmentos florestais no período chuvoso e seco.....	30
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 Objetivos.....	2
1.2.1 Objetivo geral	2
1.2.2 Objetivos específicos.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Biomass Brasileiros.....	3
2.1.1 Características Gerais do Bioma Mata Atlântica.....	4
2.2 Fungos Filamentosos do Solo.....	4
2.3 Gênero <i>Aspergillus</i>	6
2.3.1 Morfologia do gênero <i>Aspergillus</i>	8
2.4 Importância de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	11
2.4.1 Taxonomia da seção <i>Nigri</i>	12
2.4.2 Identificação das espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	14
2.4.2.1 Critérios morfológicos e bioquímicos	14
2.4.2.2 Critérios moleculares	15
2.5 Enzimas	16
2.6 Fungos Produtores de Enzimas	17
2.7 Enzimas de Importância Industrial	18
2.7.1 Amilase.....	18
2.7.2 Celulase	19
2.7.3 Peptidase (Protease).....	20
2.7.4 Pectinase	20
2.7.5 Fitase.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Localização das Áreas de Coleta.....	23
3.2 Amostras.....	24
3.3 Isolamento	24
3.4 Identificação das Espécies	24
3.5 Análise Morfológica	25
3.6 Análise Bioquímica	25
3.7 Análise Molecular.....	25
3.7.1 Extração de DNA.....	25
3.7.1.1 Método CIA (modificado por VICENTE, 2000).....	26
3.7.1.2 Método Fenol-clorofórmio (RAEDER; BRODA, 1985)	26
3.7.1.3 Método CTAB, protocolo para extração de DNA de folha de planta	26
3.7.1.4 Método Kit (QIAGEN, 2006).....	27
3.7.2 PCR.....	27
3.7.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	27
3.7.4 Análise de similaridade e filogenia	28
3.8 Avaliação Semi-quantitativa do Perfil Enzimático	28
3.9 Determinação da Concentração de Esporos	28
3.10 Produção das Enzimas: Peptidase, Amilase, Celulase, Pectinase e Fitase	28
3.11 Análise Estatística	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Isolamento de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	30
4.2 Identificação Morfológica	31
4.2.1 Caracterização morfológica.....	31
4.2.1.1 Crescimento em diferentes temperaturas.....	38

4.2.2 Caracterização bioquímica	39
4.2.2.1 Crescimento no CREA	39
4.2.2.2 Crescimento no MEA-B	40
4.2.2.3 Reação do Teste de Ehrlich	40
4.3 Identificação Molecular	41
4.3.1 Extração de DNA de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	41
4.3.2 Amplificação da região ITS do rDNA através de PCR	41
4.3.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	43
4.4 Potencial Enzimático de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	45
4.4.1 Análise da enzima celulase.....	46
4.4.2 Análise da enzima peptidase (protease).....	48
4.4.3 Análise da enzima amilase	49
4.4.4 Análise da enzima fitase	51
4.4.5 Análise da enzima pectinase.....	53
5 CONCLUSÕES.....	55
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, segundo o Ministério do Meio Ambiente, esta abundante variedade de vida, se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra, elevando o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países considerados megadiversos. Dentre os diversos biomas do país, a Mata Atlântica abriga uma parcela significativa dessa diversidade biológica, sendo considerado um dos dezoito “hotspots” mundiais. Suas condições climáticas propiciam a existência de micro-organismos decompositores e degradantes da biomassa das florestas, tornando o solo desse bioma muito rico em nutrientes.

O conhecimento das comunidades microbianas e sua relação com o ambiente consistem numa importante fonte de informação para o entendimento da dinâmica do ecossistema. Dentre os micro-organismos, os fungos são extremamente importantes para o funcionamento desses ecossistemas.

Os gêneros mais frequentemente isolados do solo são: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium* e *Alternaria*. As principais funções desses organismos no solo são a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem dos nutrientes.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos, ubíquos, comumente isolados do solo, da natureza, do ar e de materiais vegetais. São causadores de degradação de alimentos, biodeterioração e patogênicos ao homem e animais. Entretanto, esses micro-organismos são muito interessantes, pois algumas espécies deste gênero são utilizadas em biotecnologia, onde produzem uma diversidade de compostos químicos como antibióticos, micotoxinas, enzimas, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outras substâncias.

Dentro do gênero *Aspergillus*, as espécies da seção *Nigri* são umas das mais importantes, pois são fontes de enzimas extracelulares. A utilização destes fungos como produtores de enzimas é reconhecida pelo FDA (United States Food and Drug Administration), onde os produtos derivados podem ser destinados ao consumo humano com segurança (SAID; PIETRO, 2002). Dessa forma algumas espécies do gênero *Aspergillus*, têm o “status” GRAS (Generally Regarded as Safe - Geralmente Considerado Como Seguro), devido à sua baixa toxicidade e ao uso histórico na preparação e produção industrial de alimentos e bebidas, bem como na produção industrial de enzimas. Um exemplo são as linhagens de *A. niger*, utilizadas na produção comercial de enzimas.

Neste contexto a tecnologia enzimática vem sendo utilizada por oferecer vantagens no estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo, sendo as enzimas hidrolíticas produzidas por diferentes espécies de *Aspergillus*, onde a ampla diversidade quanto às características dessas enzimas potencializa sua aplicação em diferentes setores na indústria, tais como, na indústria têxtil, produção de detergentes com a função de degradar compostos proteínicos, processamento de couros e indústria farmacêutica. Os principais setores que empregam um grande número dessas enzimas são os setores de alimentos e de bebidas, onde as enzimas amilases e celulasas são empregadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja. Na panificação utilizam-se as enzimas amilases e peptidases para facilitar a manipulação das massas. As pectinases são principalmente utilizadas no processamento de sucos de frutas e de vinhos, e o tratamento de silagem com a adição da fitase, pois melhora a qualidade nutricional e favorece a digestão de ruminantes e monogástricos.

Os métodos tradicionais de identificação de espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* são baseados na morfologia, incluindo a cor e tipo de crescimento da colônia, diâmetro da colônia, tamanho e ornamentação de conídios e conidióforos. Esta seção é considerada por muitos taxonomistas como uma das mais difíceis de identificar devido à alta diversidade

genética, o que dificulta a identificação baseada unicamente em caracteres fenotípicos. Sendo assim, diversas pesquisas têm relatado a importância da combinação de diferentes ferramentas de identificação, como por exemplo características morfológicas, bioquímicas e moleculares, com o objetivo de delimitar espécies do gênero *Aspergillus* seção *Nigri*. As grandes aliadas dos taxonomistas nos últimos anos são as técnicas moleculares, como PCR, RFLP e sequenciamento de DNA. Os principais alvos incluem o gene que codifica para RNA ribossomal 18S, DNA mitocondrial, região do espaço intergênico e regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS). As regiões ITS, localizadas entre os genes 18S e 28S do rDNA, são áreas de particular importância na discriminação entre espécies relacionadas ao nível intraespecífico, pois essas regiões possuem áreas de alta variabilidade.

Considerando o pouco conhecimento relativo aos fungos encontrados em áreas da Mata Atlântica, torna-se evidente a importância de estudos que venham contribuir para ampliação de dados sobre a diversidade de fungos nesse bioma tão ameaçado, bem como o uso dos fungos em processos biotecnológicos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar espécies do gênero *Aspergillus* da seção *Nigri* utilizando caracterização morfológica, bioquímica e molecular e avaliar o potencial enzimático.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* isoladas de serrapilheira e solo por características macromorfológicas, micromorfológicas, testes bioquímicos e técnica molecular, através do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4;
- b) Selecionar espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* de interesse biotecnológico potencialmente produtoras de enzimas hidrolíticas: amilase, celulase, peptidase (protease), pectinase e fitase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomas Brasileiros

Bioma é um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo agrupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, o que resulta em uma diversidade biológica própria (IBGE, 2004).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade biológica, abrigando entre 15% a 20% do número total de espécies do planeta (FAPESP, 2008), esta enorme e variada biodiversidade brasileira, dividida em seis biomas como Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal (Figura 1), acolhe a maior riqueza do planeta em organismos (DINIZ; FERREIRA, 2000).



Figura 1. Biomas Brasileiros.
Fonte: MMA (2013).

Em função da importância do conhecimento da diversidade da microbiota de solo em diferentes regiões, diversos estudos têm sido realizados em biomas brasileiros, entre eles a Mata Atlântica (TAUK-TORNISIELO et al., 2005; CARVALHO, 2012).

Assim sendo, as informações a respeito da quantificação e identificação dos micro-organismos servem como indicadores do estado do solo com aplicabilidade no seu monitoramento e conservação (DUTRA et al., 2005).

2.1.1 Características Gerais do Bioma Mata Atlântica

O bioma Mata Atlântica e seus ecossistemas associados envolvem uma área de 1,1 milhão de km², correspondendo a uma área de 13% do território brasileiro (MMA, 2013), é considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano (METZGER, 2009). Esse bioma é composto originalmente por diversas formações florestais como floresta ombrófila (densa, mista e aberta), floresta estacional decidual e estacional semidecidual, manguezais, restingas e campos de altitude associados a brejos. Como se observa este bioma é composto por muitas florestas e essas diferentes matas associam-se a outros ecossistemas, criando uma cadeia de vida com muitas e diferentes interações (RBMA, 2004).

Este bioma é considerado um “Hotspot”, os “Hotspots” são áreas que possuem um grande número de espécies, sendo algumas destas espécies ameaçadas, raras ou endêmicas, devido a essas características, são consideradas áreas de alta prioridade para conservação (MYERS et al., 2000). A Mata Atlântica é caracterizada principalmente pelo ambiente altamente úmido, sobretudo por receber pouca luz, pois a maior parte da luminosidade é absorvida pelas folhas das árvores mais altas. Além dos horizontes que compõem o solo, há também a serrapilheira, a qual não integra o solo e nem é utilizada para classificá-lo dentre suas diferentes classes. Porém esta camada recobre o solo e é essencial para a sua fertilidade, por supri-lo com nutrientes e matéria orgânica. Ela minimiza o impacto consequente das chuvas sobre o solo, e também o processo de evaporação que nele ocorre além de reter também a umidade (FIGUEIRÓ FILHO, 2003). Porém a vegetação natural deste bioma está sendo substituída, devido a diversas atividades humanas que estão reduzindo drasticamente este bioma, ameaçando assim a sua biodiversidade.

A Fundação SOS Mata Atlântica e o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) divulgaram em 2013 a taxa anual de desmatamento de 2010 a 2011 que ficou em 15 mil ha, ou seja, a área original que resta do bioma é de 8,5% – sendo, portanto o bioma mais ameaçado do Brasil. Na busca de meios para conservação deste bioma, vários estudos sobre a diversidade de espécies de plantas e animais foram realizados, porém, ainda há pouca informação acerca dos micro-organismos que compõem esse ambiente (METZGER, 2009). Portanto estudos envolvendo taxonomia, ecologia e bioprospecção de fungos provenientes da Mata Atlântica deverão ser realizados.

2.2 Fungos Filamentosos do Solo

O Brasil apresenta, indiscutivelmente, a maior biodiversidade da Terra (BRANDON et al., 2005). O solo é um meio altamente complexo, com múltiplos componentes bióticos e abióticos, consistindo de vários microambientes, sendo dessa forma a complexidade do solo determinada por diversas interações entre os componentes físicos, químicos e biológicos (BUSCOT, 2005; ZHANG; XU, 2008).

Os micro-organismos adaptam-se a esses micro-habitats e formam consórcios, interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (TORSVIK; OVERAS, 2002). Sabe-se que o tipo de solo também influencia a estrutura das comunidades microbianas, em função do tamanho de partículas, pH, capacidade de intercâmbio de íons, conteúdo de matéria orgânica etc (RODRIGUES et al., 2004).

Em relação à diversidade de micro-organismos presentes no solo, quando se fala em biodiversidade e extinção de espécies, a mídia sempre se refere às espécies vegetais e animais que vivem acima do solo. Os organismos micro e macroscópicos, os quais habitam o solo por não serem visíveis aos olhos humanos raramente são mencionados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os micro-organismos representam as formas de vida mais abundante e diversificada do planeta, sua diversidade funcional e estrutural possui certa relevância, pois estão envolvidos em mais de 80% das reações que ocorrem no solo, desempenhando um papel significativo para a manutenção e equilíbrio ecológico dos ecossistemas, uma vez que são responsáveis pela dinâmica da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes, possuindo um papel na produtividade e qualidade do solo (NANNIPIERI et al., 2003; KASANA et al., 2008).

Dentre estes micro-organismos que compõem a biomassa do solo, os fungos estão entre os organismos mais importantes deste complexo, pois são extremamente importantes para o funcionamento destes ecossistemas, no entanto existem informações limitadas e incompletas sobre a micobiota, as espécies predominantes e a interação entre elas (MUELLER; SCHMIT, 2007).

Muitos fungos que habitam o solo são considerados saprófitas, decompondo a matéria orgânica, participando de processos como agregação do solo e contribuindo para a ciclagem dos nutrientes e mineralização dos mesmos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; PFENNING; ABREU, 2006).

Devido à estreita relação com as plantas, os fungos do solo, podem ser um dos determinantes principais da estrutura das comunidades vegetais e, por outro lado, são amplamente influenciados por estas comunidades (MUMMEY et al., 2010). Sendo, portanto, provável que o efeito da vegetação sobre as comunidades de fungos esteja associado à matéria orgânica do solo, apresentando relação direta com muitos atributos físicos, químicos e biológicos desse ambiente (PÉREZ-PIQUÉRES et al., 2006).

De acordo com Simões et al. (2013a), não há um consenso sobre o número total de espécies fúngicas existentes no mundo (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas sobre o número de espécies fúngicas existentes no mundo.

Publicação	Número estimado de espécies fúngicas
Hawksworth (1991)	1.500.000
Hammond (1992)	1.000.000
Rossmann (1994)	1.000.000
Hammond (1995)	1.000.000
Cannon (1997)	9.900.000
Fröhlich e Hyde (1999)	1.500.000
May (2000)	500.000
Hawksworth (2001)	2.270.000
O’Brein et al. (2005)	3.500.000 – 5.100.000
Mueller e Schmit (2007)	712.000
Mora et al. (2011)	611.000

Fonte: SIMÕES et al. (2013a)

O início dos estudos sobre a diversidade fúngica dos solos brasileiros ocorreu por Katz (1981), onde este estudou a serrapilheira de um solo situado na região de Manaus/AM.

Gams (2007), descreve que os gêneros de fungos filamentosos mais comumente encontrados nos solos são: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*,

Rhizopus, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria*. Borges et al. (2011), confirmam em grande parte esses dados, pois *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Lecanicillium* foram os gêneros isolados de solo da Floresta Ombrófila Mista, pertencente à Mata Atlântica, e corresponderam a 64,75% do total de UFC. Silva et al. (2011a), isolaram fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais, composto por fruteiras tropicais e arbóreas nativas da Mata Atlântica, e identificaram 5 gêneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium*, dentre estes as espécies identificadas do gênero *Aspergillus* foram: *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. niveus*.

2.3 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 pelo padre-micologista e botânico Pier Antonio Micheli, sendo validado por Link em 1809. Entretanto a primeira monografia sobre o gênero e as espécies pertencentes a ele foi publicada por Tom e Church apenas em 1926, sendo a partir daí este gênero considerado um dos maiores gêneros de fungos estudados.

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos. São os mais abundantes no planeta, alimentando-se de diversos substratos, e crescendo em diversas condições abióticas (entre 6 e 55 °C) (RHODES, 2006). É considerado cosmopolita, as espécies que o compõe são amplamente distribuídas na natureza, são sapróbios, encontrados onde quer que exista matéria orgânica a ser decomposta, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (KLICH, 2002a). O sucesso desta dispersão é atribuído à sua gigantesca produção de esporos, os quais são as estruturas mais dominantes no ar, dispersando-se por longas e curtas distâncias (KRIJGSHELD et al., 2013). São causadores de degradação de alimentos, biodeterioração e patogênicos ao homem e animais. Entretanto, esses micro-organismos são muito interessantes, não só em termos de aplicação biotecnológica, mas também para a economia devido às suas propriedades metabólicas (WANG et al., 2008, DAGENAIS; KELLER, 2009).

Fungos do gênero *Aspergillus* sp. pertencem ao filo (ou divisão) *Ascomycota*, classificados como anamórficos (apresentam a fase assexuada ou mitótica), pertencem ao (subfilo ou subdivisão) dos *Pezizomycotina* e é caracterizado pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios, classe *Eurotiomycetes*, (HIBBETT et al., 2007), pertencentes à ordem dos *Eurotiales*, caracterizado pela produção de esporos assexuais, classificados na família *Trichocomaceae*, que é conhecida por apresentar impactos positivos e negativos sobre as atividades humanas, pertencente ao gênero *Aspergillus* (KIRK et al., 2008; CUOMO; BIRREN, 2010). Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam a forma sexuada caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos, classificadas como teleomorfo (KLICH, 2008). Entretanto, um novo sistema de classificação, incluindo tanto anamorfos e teleomorfos foi proposto por Houbraeken e Samson (2011). A família *Trichocomaceae* foi dividida em três famílias distintas: *Aspergillaceae*, *Thermoascaceae* e *Trichocomaceae*. Dessa forma os gêneros *Aspergillus*, *Basipetospora*, *Eladia*, *Fraseriella*, *Penicillium*, *Phialomyces*, *Phialosimplex*, *Polypaecilum*, *Thysanophora* e *Torulomyces* foram classificados nesta nova família *Aspergillaceae*, caracterizada pela presença de fiálides em forma de garrafa ou cilíndricas, produção de asco dentro do cleistotécio ou rodeado por células, ascósporos com fenda e conídios com formato cilíndricos.

Esses fungos se reproduzem por meio de esporos (conídios), formando micélios compostos por hifas septadas e ramificadas (PELCZAR, 1998). Eles possuem uma estrutura denominada conidióforo que é constituído pela cabeça aspergilar e pela estipe (FASANELLA, 2008). Os conidióforos de *Aspergillus* spp. caracterizam-se por apresentar um formato bem distinto, com o ápice de sua estipe se expandindo em uma vesícula que pode

apresentar diferentes formatos. Normalmente a temperatura para o crescimento destes fungos fica entre 15 e 35 °C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 e 30 °C, porém algumas espécies podem crescer a temperaturas acima de 35 °C. O pH em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies e a atividade de água (aw) ideal é próxima a 1,0 podendo chegar até 0,7 (PUTZKE; PUTZKE, 2004; FRAGA, 2005).

Embora a maioria das espécies de *Aspergillus* seja saprófita, algumas espécies são parasitas de insetos, plantas e animais, incluindo o homem (FASANELLA, 2008).

O crescimento pode ocorrer na forma de pellets, com as hifas emaranhadas formando pequenas esferas, ou na forma filamentosa, com as hifas dispersas pelo meio de cultura (WHITAKER; LONG, 1973). A taxa de crescimento em meios de cultura é de rápida para moderadamente rápida (PRADO, 2002).

De acordo com Bennett (2010) o gênero *Aspergillus* compreende entre 260 espécies, porém a sistemática está em permanente estado de fluxo e muitas espécies estão sendo identificadas com base em caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares.

A fim de facilitar o estudo das numerosas espécies pertencentes a este gênero, alguns autores os dividiram em subgêneros e seções baseados em características comuns, portanto este gênero é subdividido em 8 subgêneros que é posteriormente dividido em 18 seções (Tabela 2) (MACHIDA; GOMI, 2010). Uma descrição completa sobre o gênero foi inicializada por Rapper e Fennel em 1965, onde foram reconhecidas 132 espécies e 18 variedades (PITT; SAMSON, 1993).

Tabela 2. Divisão das seções do gênero *Aspergillus*.

Subgênero	Seção
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Cervini</i> <i>Clavati</i>
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>
<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>
<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i> <i>Flavipedes</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i> <i>Usti</i> <i>Sparsi</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Flavi</i> <i>Nigri</i> <i>Circumdati</i> <i>Cremeri</i>
<i>Warcupi</i>	<i>Warcupi</i> <i>Zonati</i>

Fonte: MACHIDA; GOMI, 2010.

As espécies mais estudadas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri*, são economicamente importantes, pois, algumas produzem enzimas, ácidos, antibióticos e micotoxinas (FASANELLA, 2008).

As espécies mais comuns, responsáveis por diversas doenças em plantas e produtos vegetais, são *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. alliaceus* (PERRONE et al., 2007). Esses micro-organismos contaminam produtos agrícolas em diferentes fases, como

pré-colheita, colheita, processamento e manuseio e muitas espécies são produtoras de metabólitos secundários tóxicos.

Em relação à importância econômica, *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, muitos isolados são utilizados na produção de diversos produtos, porém algumas espécies são responsáveis por diversas desordens em várias plantas onde cerca de 20 espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas patogênicas, com capacidade de causar aspergilose (VARGA et al., 2004).

2.3.1 Morfologia do gênero *Aspergillus*

Ao observar as estruturas desse gênero o micologista Pier Antonio Micheli percebeu a semelhança com a forma de um *aspergillum* (borrifador/aspergidor de água benta), dessa forma a espécie foi nomeada de acordo com o objeto (KLICH, 2002b). A taxonomia clássica do gênero baseia-se nos caracteres morfológicos e fisiológicos, bem como nas características reprodutivas observadas (RAPER; FENNERLL, 1965; KLICH, 2002a).

O gênero é de fácil identificação, porém a identificação em nível de espécie é considerada complexa. Microscopicamente, as espécies desse gênero produzem um conidióforo, usualmente asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo se desenvolve a partir da “célula pé”, podendo apresentar diferentes comprimentos. No ápice do conidióforo é formada a vesícula através da expansão do conidióforo, na qual as células conidiogênicas, fiálides são formadas. A vesícula pode possuir diferentes formas e tamanhos dependendo da espécie (Figura 2).

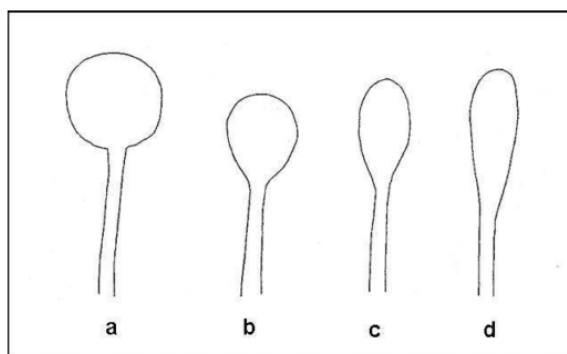


Figura 2. Diferentes formas de vesículas de *Aspergillus*: a) globosa ou esférica; b) piriforme; c) espatulada e d) clavada.

Fonte: KLICH (2002b).

Em algumas espécies, os conídios são produzidos nas fiálides que saem diretamente da vesícula, e as espécies que possuem essa forma (vesícula/fiálide) são denominadas de unisseriadas. Nas outras espécies, há uma segunda camada de células entre a vesícula e as fiálides e esta segunda camada de células, são as estruturas especializadas denominadas de métulas, e a presença dessas estruturas caracterizam essas espécies como bisseriadas, como pode ser observado na (Figura 3) (RAPER; FENNEL, 1965; KOZAKIEWICZ, 1989).

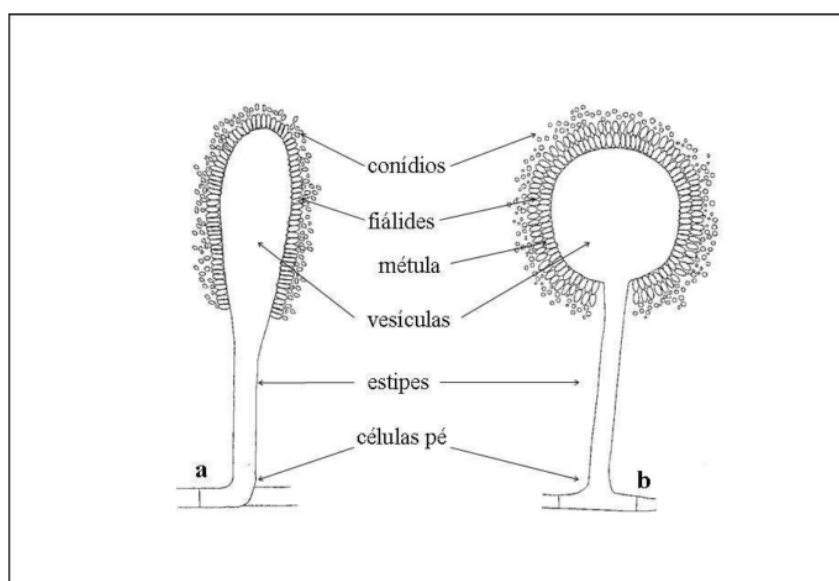


Figura 3. (a) Conidióforo de *Aspergillus clavatus* - unisseriado, apresenta apenas uma única camada de células (fiálides) que dão origem aos conídios. (b) *Aspergillus flavus* - bisseriado, apresenta duas camadas de células métulas e fiálides.

Fonte: KLICH (2002b).

Dentre as características macromorfológicas estão a coloração conidial e micelial, diâmetro da colônia, cor do reverso da colônia, produção de exsudados e pigmentos solúveis, presença de esclerócio (estrutura de resistência fúngica) e cleistotécio (KLICH, 2002b). As seções possuem diferentes colorações para as colônias, o que torna essa característica macroscópica de grande importância na diferenciação. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídios (SANTOS, 2007). As cores das colônias podem variar de vários tons como verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza. As espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* possuem conídios de cor negra, no entanto, as da seção *Fumigati*, *Nidulantes* e *Flavi* possuem conídios de cor verde (PERRONE et al., 2006; BENNETT, 2010).

Micromorfológicamente, a caracterização é principalmente dependente da seriação, forma e tamanho da vesícula, morfologia do conídio e do estipe, presença de células de Hülle, que são células de parede muito espessas e refrigentes (KLICH; PITT, 1988), são consideradas células de suporte ou de reserva nutritiva para o fungo (SAMSON et al., 1995), morfologia de esclerócio e cleistotécio (RODRIGUEZ et al., 2007). Além das características morfológicas, as espécies podem ser caracterizadas através de seus perfis de metabólitos secundários, por sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água, através de seu crescimento em diferentes meios de cultura (CYA, MEA, CREA) dentre outros (SAMSON; VARGA, 2009).

As linhagens de *Aspergillus* devem ser crescidas em meios de cultura específicos (SAMSON et al., 2007), uma vez que alterações morfológicas podem surgir de acordo com o meio utilizado.

Os metabólitos secundários podem ser utilizados para o reconhecimento de espécies devido à sua especificidade entre espécies (LARSEN et al., 2005). Praticamente todas as espécies de *Aspergillus* produzem uma combinação única de diferentes tipos de compostos orgânicos, como policetídeos, peptídeos não-ribossômicos e terpenoides, assim como muitos outros compostos de origem biossintética mista (GALAGAN et al., 2005; YU et al., 2005).

A taxonomia deste gênero recentemente tem sido re-investigada, utilizando-se uma abordagem polifásica interagindo características morfológicas, bioquímicas, ecológicas, genéticas e moleculares, a fim de examinar a variabilidade dentro da espécie e adicionar ou reclassificar as espécies dentro do gênero (PETERSON et al., 2001; ITO et al., 2001; RIGÓ et al., 2002; FRISVAD et al., 2005; PETERSON, 2008; PERRONE et al., 2008; PILDAIN et al., 2008; BENNETT, 2009; SAMSON; VARGA, 2009; KRIJGSHELD et al., 2013). Na (Tabela 3), são listados manuais e monografias importantes dedicados à taxonomia de *Aspergillus* e *Aspergillus* da seção *Nigri*.

Tabela 3. Manuais e monografias importantes para identificação das espécies de *Aspergillus* e *Aspergillus* seção *Nigri*.

Ano	Autor	Artigo/livro
1926	Thom. & Church	The <i>Aspergilli</i> (Baltimore: Williams e Wilkins)
1945	Thom & Rapper	A manual of the <i>Aspergilli</i> (Baltimore: Williams e Wilkins)
1965	Rapper & Fennell	The Genus <i>Aspergillus</i> (Baltimore: Williams e Wilkins)
1980	Al-Musallam, A.	Revision of the Black <i>Aspergillus</i> species
1985	Samson, R.A. & Pitt, J.I.	Advances in <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> Systematics (New York: Plenum).
1988a	Klich, M.A. & Pitt, J.I.	A Laboratory Guide to Common <i>Aspergillus</i> Species and Their Teleomorphs (North Ryde, Australia: Division of Food Processing).
1990	Samson, R.A & Pitt, J.I.	Modern Concepts in <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> Classification (New York: Plenum Press).
2000	Samson, R.A & Pitt, J.I.	Integration of Modern Taxonomic Methods for <i>Penicillium</i> and <i>Aspergillus</i> classification (Amsterdam: Harwood Academic Publications).
2003	Varga, J. et al.	Evolutionary relationships among <i>Aspergillus</i> species producing economically important mycotoxins.
2004	Samson, R.A. et al.	New ochratoxin A or sclerotium producing species in <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>
2002b	Klich, M.A.	Identification of Common <i>Aspergillus</i> Species (Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures).
2007	Geiser et al.	The current status os species recognition and identification in <i>Aspergillus</i> .
2007	Pitt, J.I. & Samson, R.A	Nomenclatural considerations in naming species of <i>Aspergillus</i> and its teleomorphs.

2007(a)	Samson, R.A. et al.	The species concept in <i>Aspergillus</i> : recommendations of an international panel.
2007(b)	Samson, R.A & Varga, J.	Diagnostic tools to identify black <i>Aspergilli</i> .
2008	Noonim et al.	Two new species of <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> from Thai coffee beans.
2010	Varga et al.	<i>Aspergillus</i> sect. Aeni sect. nov., a new section of the genus for <i>A. Karnatakaensis</i> sp. nov. and some allied fungi.
2011	Varga et al.	New and revisited species in <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> .
2012	Hubka, V. & Kolarik, M.	β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences
2012	Jurjevic et al.	Two novel species of <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> from indoor air.
2013	Krijghsheld et al.	Development in <i>Aspergillus</i>

Fonte: MACIEL (2013), adaptado

2.4 Importância de *Aspergillus* seção *Nigri*

Os componentes da secção *Nigri* estão entre os mais importantes dentro do gênero *Aspergillus*, esta seção abriga espécies de grande interesse biotecnológico, onde são utilizadas na produção industrial de alimentos e de produtos farmacêuticos devido ao rico perfil enzimático. São utilizados industrialmente como fonte de enzimas extracelulares: amilase, catalase, celulase, glucoamilase, lipase, pectinase, protease, xilanase e fitase, utilizadas em diversos setores industriais, bem como na produção de ácidos orgânico, cítrico e glucônico, dentre outros (PANDEY et al., 1999; PARIZA; JOHNSON, 2001; PANDEY et al., 2005; MINAFRA, 2007; SINGH et al., 2009; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

Alguns produtos obtidos a partir de *Aspergillus niger* possuem a categoria GRAS da FDA, sendo, portanto considerados como seguro e utilizados em quantidades significativas como aditivos alimentares (ABARCA et al., 2004).

Aspergillus niger obteve sua primeira importante função em 1919 na indústria de alimentos, pois apresentou uma alta produtividade na formação de ácido cítrico. Entretanto, a partir de 1960 seu uso foi expandido e se tornou uma grande fonte de produção de enzimas (SCHUSTER et al., 2002). Deste fungo, foram isolados os compostos rubrofusarem B, com atividade citotóxicas, aurasperona A com atividade antioxidante (SONG et al., 2005), e o ácido tensiuico A com atividade antimicrobial ativa contra *Bacillus subtilis* (HASEGAWA et al., 2007), dentre outros metabólitos (NIELSEN et al., 2009).

A temperatura ideal para o crescimento de *A. niger* foi relatada entre 30-37 °C (BELLÍ et al., 2004; LEONG et al., 2004).

As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* são as mais frequentemente relacionadas como contaminantes de uvas e seus derivados. Dentre estas espécies, *A. carbonarius* é reconhecido principalmente por ser um dos maiores produtores de ocratoxina A, sendo encontrado

principalmente em uvas, vinhos e cafés (SERRA et al., 2003; MITIDIERI et al., 2002; SERRA, 2005; NOOMIN, et al., 2008; SPADARO et al., 2010).

Algumas espécies desta seção são utilizadas na elaboração de alimentos e bebidas tradicionais, como por exemplo *A. awamori* usado para a produção de koji, uma massa feita a partir de grãos de leguminosas fermentadas (COOK; CAMPBELL, 1994).

2.4.1 Taxonomia da seção *Nigri*

A identificação das espécies do gênero *Aspergillus* seção *Nigri* ou Black *Aspergillus* é considerada uma das mais complexas do gênero, pois as diferenças entre estas espécies são muito sutis, as principais características são: conídios de coloração marrom-escuro a negros, conidióforos hialinos, seriação unisseriada ou bisseriada e vesícula globosa (RAPER; FENNELL, 1965; KLICH, 2002b).

Após a primeira descrição do gênero *Aspergillus* feita em 1729, muitas outras espécies começaram a ser descritas, e então em 1926, Thom e Church baseados em características morfológicas agruparam as espécies de *Aspergillus* e descreveram 13 espécies, para o que chamaram de Grupo *Aspergillus niger*. Thom e Raper (1945) baseando-se no tamanho do conídio e na presença ou ausência de métulas subdividiram o Grupo *Aspergillus niger* aumentando assim esse número proposto para 15 espécies.

Em 1965, um grande passo foi dado no sentido de esclarecer a taxonomia do gênero *Aspergillus*, com a publicação do manual de Raper e Fennell, o que reduziu para 12 o número de espécies dentro do qual eles chamaram de Grupo *A. niger*. Gams et al. (1985), reclassificaram o gênero *Aspergillus* em subgêneros e seções seguindo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica e criou a seção *Nigri* dentro do subgênero *Circundati*. Klich (2002a), em seu manual de identificação descreveu apenas as espécies mais comuns de *Aspergillus*, baseando-se em critérios morfológicos, onde foram descritas cinco espécies para a seção *Nigri*: *A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. niger* e *A. awamori*, mencionando o status taxonômico de *A. aculeatus* em discussão. Entretanto, Varga et al. (2003), através de análises filogenéticas utilizando-se de dados moleculares e morfológicos sugeriram que a seção *Nigri* seja formada pelas seguintes espécies: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus*, *A. níger* e *A. tubingensis*. *Aspergillus brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. niger* e *A. tubingensis* são morfológicamente indistinguíveis e, portanto, pertenciam ao denominado “agregado *Niger*”. *Aspergillus awamori*, *A. usarii*, *A. phoenicis* e *A. ficuum* foram reduzidas a sinônimos, das espécies *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis* e *A. foetidus*, respectivamente. Baseados na produção de metabólitos secundários, características morfológicas e o seqüenciamento do gene da β -tubulina, para algumas espécies, Samson et al. (2004), aceitaram 15 espécies pertencentes à esta seção: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger* e *A. vadensis*.

Após alguns anos de estudos, Samson et al. (2007) aceitaram 19 espécies para a seção *Nigri*, onde foram observadas características como: coloração e diâmetro da colônia, fisiologia, produção de metabólitos secundários, seqüenciamento da região ITS, do gene da β -tubulina e calmodulina. As espécies aceitas por esses autores são: *A. aculeatus*, *A. aculeatinus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. sclerotiiicarbonarius*, *A. uvarum* e *A. vadensis*.

Varga et al. (2011), estudaram a morfologia, fisiologia, ecologia e métodos moleculares na determinação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* e descreveram 8 novas

espécies: *A. acidus*, *A. fijiensis*, *A. ecalypticola*, *A. indologenus* e *A. neoniger*, *A. saccharolyticus*, *A. coreanus*, *A. violaceofuscus*, onde foi aceito 26 espécies para a seção *Nigri*.

No entanto, Jurjevic et al. (2012) e Hubka e Kolarik (2012), sugerem que *A. fijiensis*, seja considerado sinônimo de *A. brunneoviolaceus*, já conhecido, pois as sequências de multilocus analisadas são indistinguíveis, e também sugerem que *A. japonicus* deve ser tratado como um sinônimo de *A. violaceofuscus*, pois os resultados filogenéticos obtidos não confirmam a separação em duas espécies diferentes, enquanto isso, mais duas novas espécies unisseriadas foram descritas por Jurjevic et al. (2012), *A. floridensis* e *A. trinidadensis*, o que significa que atualmente são consideradas 27 espécies diferentes (Tabela 4).

Tabela 4. Espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* aceitas atualmente.

<i>A. acidus</i>	<i>A. sclerotii carbonarius</i>
<i>A. aculeatus</i>	<i>A. uvarum</i>
<i>A. aculeatinus</i>	<i>A. awamori</i>
<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brunneoviolaceus</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>A. coreanus</i>
<i>A. costaricaensis</i>	<i>A. ecalypticola</i>
<i>A. ellipticus</i> ,	<i>A. indologenus</i>
<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. neoniger</i>
<i>A. homomorphus</i>	<i>A. saccharolyticus</i>
<i>A. ibericus</i>	<i>A. violaceofuscus</i>
<i>A. niger</i>	<i>A. floridensis</i>
<i>A. tubingensis</i>	<i>A. trinidadensis</i>
<i>A. piperis</i>	<i>A. vadensis</i>
<i>A. sclerotioniger</i>	

Fonte: JURJEVIC et al. (2012); HUBKA e KOLARIK (2012).

Algumas espécies, tais como: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis* são morfológicamente indistinguíveis chamados, portanto, de “*agregado Niger*” (PARENICOVA et al., 2001), a semelhança morfológica entre tais espécies impede a sua identificação correta. Segundo Varga et al. (2011), *A. foetidus* é sinônimo de *A. niger* com base em dados moleculares e fisiológicos, portanto após esta reformulação as espécies que compõem o “*agregado Niger*” são *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. brasiliensis*.

Para uma identificação inequívoca se fazem necessárias análises moleculares e bioquímicas (FERRACIN et al., 2009). O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para a diferenciação genética das espécies resultou em avanços significativos na taxonomia, devido à sua sensibilidade e especificidade (MITIDIERI et al., 2002).

2.4.2 Identificação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*

2.4.2.1 Critérios morfológicos e bioquímicos

A identificação morfológica, como o próprio nome diz, é baseada na observação dos caracteres morfológicos do fungo, sendo, portanto as características macroscópicas e microscópicas fundamentais para a identificação. O manual de identificação do gênero *Aspergillus*, mais importante, foi baseado em caracteres morfológicos (RAPER; FENNEL, 1965). Essa identificação por meio de metodologias clássicas possui vantagens por ser econômica, entretanto, é demorada, muitas vezes limitante e laboriosa, pois necessita de uma série de técnicas de identificação, como microcultivo, crescimento em diferentes meios de cultura e temperaturas etc.

Portanto para acelerar e melhorar este processo de identificação os isolados da seção *Nigri* são também caracterizados por seus perfis de metabólitos secundários, por seu crescimento nos meios de cultura: Creatina Sacarose Agar (CREA), MEA-Boscálide (Extrato de Malte Ágar) e pelo teste bioquímico, chamado Teste de Ehrlich (SAMSON et al., 2007).

Samson et al. (2004), apresentaram algumas características morfológicas para diferenciação de *A. sclerotiicarbonarius* das demais espécies da seção *Nigri*. *Aspergillus sclerotiicarbonarius* produz esclerócios de cor amarelo-alaranjado e reverso da colônia amarelo brilhante em meio YES (Extrato de Levedura Sacarose Agar). Outro meio de cultura utilizado para diferenciar *A. sclerotiicarbonarius* das espécies *A. carbonarius*, *A. ibericus* e *A. sclerotioniger* é o meio CREA, devido a sua incapacidade de crescimento neste meio. Samson et al. (2004), também relataram a produção de esclerócios em *A. tubingensis*, *A. aculeatus*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus* e *A. piperis*, porém nem sempre é observada a produção de esclerócio nestas linhagens. Anos depois Samson et al. (2007), descobriram que as espécies *A. aculeatinus* e *A. sclerotioniger* também são espécies consideradas produtoras de esclerócios. *A. ibericus* não é considerado produtor de esclerócio segundo Serra et al. (2006). *Aspergillus niger* e *A. carbonarius* apresentam coloração da colônia negra com aspecto granuloso e o reverso cor creme podendo apresentar pregas (FISHER; COOK, 2001).

As características dos conídios também são importantes para identificação de algumas espécies, por exemplo, *A. homomorphus* e *A. ibericus* produzem conídios espinhosos, enquanto outras espécies produzem conídios variando de liso ou quase liso, incluindo *A. lacticoffeatus* e *A. vadensis*. As características dos conídios são consideradas fundamentais na identificação e diferenciação das espécies, pois suas características independem das condições de crescimento (SIMÕES et al., 2013b). *A. sclerotiicarbonarius*, *A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. sclerotioniger* e *A. homomorphus* são espécies que produzem conídios grandes, mais de 6 µm de tamanho (SAMSON et al., 2007).

As características morfológicas do fungo *A. carbonarius* o tornam uma espécie dentro da seção *Nigri* claramente diferenciada do restante das espécies (ABARCA et al., 2004). Entretanto há semelhanças muito elevadas entre outras espécies desta seção, este é o caso de *A. aculeatus*, compartilhado com *A. japonicus*. Klich (2002b), descreve *A. aculeatus* e *A. japonicus* como espécies morfológicamente semelhantes, onde foi observado que estas espécies são distinguidas apenas pelo tamanho das vesículas e a forma dos conídios, onde *A. aculeatus* possui vesículas grandes e conídios elipsoidais diferentemente de *A. japonicus*.

No entanto, não há um método de identificação que funcione perfeitamente, por isso muitos taxonomistas têm aderido à identificação molecular juntamente com a morfológica, fisiológica e bioquímica. (GEISER et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011; SILVA et al., 2011b; PERRONE et al., 2011; SIMÕES et al., 2013b).

2.4.2.2 Critérios moleculares

Os métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), sequenciamento genético, entre outros, são aplicados a questões taxonômicas, e também revelam a grande diversidade existente entre as espécies da seção *Nigri* (GUIMARAES et al., 2006; SAMSON et al., 2007; VARGA et al., 2011).

A PCR é uma técnica baseada na amplificação de uma região específica do DNA delimitada pela sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. Esta reação consiste em três passos chave: fase de desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura, geralmente em temperaturas de 94 a 96 °C; fase de anelamento, onde o par de oligonucleotídeos iniciadores se liga à sequência complementar na fita de DNA; e, finalmente, a fase de extensão da fita de DNA (CHEN; JANES, 2002). Esta técnica tem como grande vantagem, sobre outros métodos, o tempo de detecção reduzido de dias para apenas algumas horas. Resumidamente, na técnica de sequenciamento, utiliza-se um iniciador com o objetivo de alongar uma fita do DNA e além dos desoxirribonucleotídeos são utilizados também análogos chamados didesoxi, que não possuem a hidroxila - 3' marcados radioativamente ou por corantes fluorescentes, para que interrompam o alongamento da cadeia de nucleotídeos, gerando vários fragmentos de tamanhos diferentes. Atualmente o sequenciamento automático utiliza um sistema a laser que detecta fluorescência para a separação dos fragmentos (TRALAMAZZA, 2011).

Os principais alvos para a detecção, ao nível de gênero, incluem o gene que codifica para RNA ribossomal 18S, DNA mitocondrial, região do espaço intergênico e regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS). Duas regiões que flanqueiam os genes rDNA são os denominados Espaçadores Internos Transcritos, ou no inglês *Internal Transcribed Spacer*, ITS 1 e ITS 2 (Figura 4) (LARENA et al., 1999). A região ITS 1 foi descrita por possuir uma rápida evolução e a região ITS 2 uma evolução moderada para rápida (DE OLIVEIRA et al., 2005). Estas regiões estão localizadas entre os genes 18S e 28S do rDNA, são áreas de particular importância na discriminação entre espécies pois essas regiões possuem áreas de alta variabilidade. Dessa forma as regiões ITS tem sido usadas para a identificação de espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri* por ensaios de PCR (DACHOUPAKAN et al., 2009).

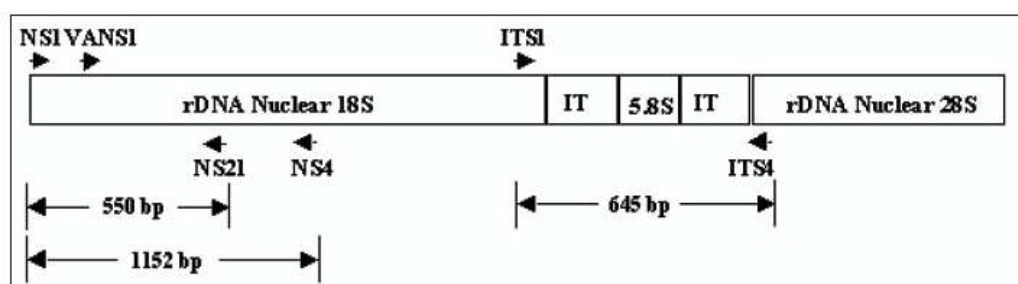


Figura 4. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação das diferentes regiões do rDNA de fungos.

Fonte: DE OLIVEIRA et al. (2005).

Parenicová et al. (2000), realizaram a análise filogenética das região ITS-5,8S e revelaram que *A. carbonarius* era claramente distinguida das outras espécies testadas, onde *A. carbonarius* formava um grupo separado dentro das espécies bisseriadas. Neste estudo encontraram diferenças de 18 e 51 pares de bases entre as sequências de ITS de *A. carbonarius* e das outras espécies.

Entretanto Samson et al. (2004), analisaram a seqüência do gene da β -tubulina, o perfil de produção de metabólitos secundários e diferentes critérios morfológicos, e concluíram que as espécies *A. japonicus* e *A. aculeatus* são duas espécies distintas. Estes resultados, em conjunto com os critérios morfológicos confirmaram a distinção das duas espécies.

Conforme já citado, Parenicová et al. (2000), propuseram a divisão do “agregado *Niger*” e esta divisão foi proposta após considerar os padrões de restrição obtidos com *KpnI* - *XhoI* e *PstI* - *Sall*. No entanto em outro trabalho, Parenicová et al. (2001) seqüenciou a região ITS-5,8S do rDNA e comprovou que as diferenças entre as quatro espécies (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis*) eram mínimas, pois as seqüências de *A. niger* e *A. tubingensis* diferiram em apenas 3 nucleotídeos, *A. foetidus* e *A. tubingensis* em 2 nucleotídeos, e as seqüências de *A. niger* e *A. foetidus* tinham 5 nucleotídeos diferentes. Dessa forma as árvores filogenéticas obtidas a partir da análise das regiões de DNA realizadas por diferentes autores (VARGA et al., 2003; ABARCA et al., 2004; SAMSON et al., 2007) mostraram que as cepas do “agregado *Niger*” são claramente diferenciadas do restante da seção.

O aumento no uso de técnicas moleculares em diagnóstico fúngico forneceu ferramentas para responder questões para a taxonomia que com a identificação morfológica somente, não era possível.

2.5 Enzimas

As enzimas são proteínas bastante ativas e versáteis e têm a propriedade de catalisar transformações de moléculas orgânicas em condições brandas de reação, são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações bioquímicas. Elas têm sido amplamente utilizadas em diversos processos industriais, desde a segunda metade do século XIX (BRUHLMANN et al., 2000; MOLINA et al., 2001; GAMA et al., 2002). Ao contrário dos catalisadores não enzimáticos que, em geral, têm ação ampla, as enzimas não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, apenas modificando a natureza do meio de reação, como, por exemplo, alterando o pH. Elas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação, são nomeadas pela adição da terminação ase ao nome do substrato com o qual realizam as reações (LAIDLER, 1954).

As enzimas podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidorredutases (catalisam reações de óxido-reduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia (SANT'ANNA JR, 2001).

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas em processos biotecnológicos oferecendo uma série de vantagens: a produção pode ser aumentada facilmente, ou seja, possibilidade de produção em larga escala, são relativamente fáceis de serem cultivadas em ambiente controlado, são altamente sensíveis à alterações genéticas, o que permite obtenção de linhagens melhoradas quanto à produção e qualidade da enzima, possuem baixo custo de obtenção, representam recurso renovável, e a diversidade destas enzimas é enorme, tendo aumentado a cada ano, devido à descoberta de novas enzimas e novas aplicações (PANDEY et al., 2005; BON et al., 2008).

Diante do exposto a tecnologia enzimática é, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES et al., 2004). As agências de proteção ambiental restringiram a liberação de compostos químicos no ambiente, portanto as enzimas foram usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agrediam o meio ambiente e provocavam o desgaste de materiais (MITIDIARI et al., 2002). Dessa forma os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e altamente específicas minimizando os efeitos indesejáveis (SANTANA, 2012).

O Brasil importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las. Essa potencialidade é evidenciada pela grande diversidade biológica, ainda pouco explorada, que serve como fonte para a obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial e pela abundância de matéria orgânica que constitui substrato de baixo custo para as fermentações (BON et al., 2008).

O mercado mundial de enzimas industriais atingiu cerca de US\$ 3,6 bilhões em 2010. A Bcc Research – Market Forecasting projeta este mercado a crescer a uma taxa de crescimento anual de 9,1% para chegar a US\$ 6 bilhões até 2016. As enzimas para alimentos e bebidas compõem o maior segmento da indústria de enzimas industriais, alcançando o faturamento de US \$ 1,2 bilhões em 2010. Segundo o último relatório de abril de 2011 da Bcc, este mercado está previsto para chegar a US \$ 2,1 bilhões em 2016 com uma taxa anal de crescimento de 10,4% (BCC RESEARCH, 2011).

Frente à demanda por novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor, as peptidases (proteases), ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases. E devido à grande demanda e perspectivas de expansão da aplicação no setor agroindustrial têm se destacado também as celulases, pectinases e fitases (UENOJO; PASTORE, 2007; BECKER et al., 2009).

A ampla diversidade quanto às características das enzimas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, tais como na indústria têxtil (celulases e amilases), detergentes (peptidase, amilase e celulase), de alimentos e bebidas (amilases, pectinases, peptidase, fitase e celulases), de couro (peptidase), e a agroindústria de alimentação animal e silagem (fitase) (NIELSEN; OXENBOLL, 1998; AGLERVOR; WEBER, 2004; SILVA et al., 2005).

A tecnologia enzimática vem sendo utilizada por oferecer vantagens no estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo, sendo as enzimas hidrolíticas os principais alvos da pesquisa biotecnológica pelo grande potencial de aplicação no setor industrial (BARATTO et al., 2011).

2.6 Fungos Produtores de Enzimas

Grande parte das proteínas sintetizadas na célula são enzimas, referidas como enzimas intracelulares, citoplasmáticas, que somente podem ser obtidas através do rompimento da célula, entretanto também existem micro-organismos que têm a capacidade de sintetizar enzimas que são excretadas para fora da célula, chamadas de enzimas extracelulares, podendo ser encontradas no meio de cultivo, onde são mais facilmente isoladas e avaliadas (KIELING, 2002). Dessa forma as enzimas microbianas produzidas comercialmente são provenientes de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo na sua maioria extracelulares, da classe das hidrolases (MITCHELL et al., 2000).

Com o avanço no conhecimento das enzimas, a utilização dos fungos filamentosos como fonte de enzimas vem adquirindo destaque nas mais variadas áreas industriais e

comerciais, em escala industrial os fungos filamentosos são preferidos, pois cerca de 90% das enzimas produzidas são extracelulares (UENOJO; PASTORE, 2007).

O sucesso para a produção de um metabólito de fungo requer um conhecimento detalhado das características de crescimento e da fisiologia do fungo em estudo. Sabe-se que não apenas a produção de diferentes metabólitos requer diferentes condições fisiológicas, mas, também, cada fungo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico (BORTOLAZZO, 2011).

Desta forma, pesquisas tem se direcionado para a seleção de novos fungos como fonte de novas enzimas, explorando assim o potencial biotecnológico da biodiversidade mundial (ABBASI et al., 2011; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, et al., 2011; MACIEL, 2013). Como forma de seleção semi-quantitativa de fungos eficientes, emprega-se a técnica de inoculação em placa de Petri em meio sólido contendo uma fonte indutora de atividade enzimática como: amido, pectina, leite desnatado, fosfato de cálcio e carboximetilcelulose (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; GOPINATH et al., 2005).

Os *Aspergillus* tem se sobressaído como o gênero mais importante para a produção comercial de enzimas extracelulares (NOVAKI, 2009), e dentre as espécies mais conhecidas, encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor* (SLIVINSKI, 2007). Dentre este gênero as espécies da seção *Nigri* têm sido extensivamente estudadas pois são boas produtoras de várias enzimas tais como amilase, celulase, protease, pectinase e fitase (AGUIAR, 2010; SALES et al., 2010; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011; REZENDE et al., 2012; MACIEL, 2013).

O conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção microbiana tornara-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização desses organismos na busca de soluções nas áreas de saúde, alimentos, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada (BURKE et al., 2011).

2.7 Enzimas de Importância Industrial

2.7.1 Amilase

As amilases, também chamadas de enzimas amilolíticas, estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande interesse biotecnológico, pois atuam na hidrólise do amido, principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, liberando resíduos de glicose (GUPTA et al., 2003). A utilização de enzimas degradantes de amido foi a primeira aplicação em larga escala de enzimas microbianas na indústria (GUIMARÃES et al., 2006). Essas enzimas foram descritas em 1811 nos extratos de trigo e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER et al., 1982).

As amilases fúngicas são carboidrases e enzimas exocelulares, sendo a maioria das carboidrases produzidas por diferentes tipos de fungos e muitas espécies produzem diferentes carboidrases (HARGER et al., 1982).

De acordo com o mecanismo de ação as enzimas amilolíticas estão classificadas em: α -amilase: é uma enzima que catalisa especificamente e ao acaso (endoenzima) a hidrólise das ligações α -1,4 do amido. Esta enzima transforma o amido em α -dextrinas de alta massa molecular. β -amilase: catalisa especificamente a hidrólise das ligações α -1,4 do amido a partir de uma extremidade não-redutora (exoenzima) produzindo apenas maltose. Glucoamilase: é uma enzima liquidificante e sacarificante, que hidrolisa completamente o amido em glucose a partir de uma extremidade não-redutora. As enzimas desramificantes: incluem diversas enzimas deste tipo, como a R-enzima, pululanase, isoamilase e oligo-1,6-glucosidase. Estas enzimas são capazes de hidrolisar apenas as ligações α -1,6 do amido, elas têm características

e especialidades diferentes, mas no geral removem as ramificações, transformando o amido em dextrinas retas. Ciclicizantes ou CGTases: diversos micro-organismos produzem estas endo-enzimas capazes ao mesmo tempo, de cortar dextrinas de 7, 8 e 9 moléculas de glucose e promover sua ciclização para formar ciclodextrinas (CORNELIS, 1987).

Dentre as enzimas amilolíticas, a mais importante é a α -amilase, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo. As enzimas amilolíticas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (SPIER et al., 2004; PANDEY et al.; 2005; SOCCOL et al., 2005).

As enzimas amilolíticas mais utilizadas são aquelas produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (PANDEY et al., 1999).

2.7.2 Celulase

A celulose é um biopolímero renovável e mais abundante do globo terrestre, possui importância mundial como matéria-prima industrial e fonte de energia renovável, é formada por unidades de glicose ligadas entre si por ligações $\beta - 1,4$ (IGARASHI et al., 2007; JOSHI; MANSFIELD, 2007).

A degradação microbiana da celulose é realizada pela atuação de um complexo enzimático, as celulases. Segundo Paris (2008), tal complexo, é dividido em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: β -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. As endoglucanases (EC 3.2.1.4): são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose (DIENES et al., 2004). As exoglucanases: participam da hidrólise primária da fibra e são divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs) (AGUIAR, 2010).

As celulases possuem grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, cervejarias, indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria farmacêutica (BHAT; BHAT, 1997). As celulases têm sido utilizadas também no processamento de ração animal. O tratamento de silagem com essas enzimas é benéfico, pois melhora a sua qualidade nutricional e favorece a digestão de ruminantes e monogástricos (BHAT, 2000), pois aumenta a sua digestibilidade (BÉGUIN; AUBERT, 1994). A utilização de celulases na indústria têxtil vem aumentando nos últimos anos e atualmente estas enzimas correspondem ao terceiro grupo mais utilizado. A principal vantagem do seu uso é a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de forma controlada, resultando em um produto de melhor qualidade (FRANCO, 2009). As celulases têm sido utilizadas também na fabricação de detergentes, pois são capazes de alterar a estrutura das fibras de celulose, facilitando a remoção da sujeira e contribui para a manutenção da maciez, brilho e cor dos tecidos (BHAT, 2000).

Existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural, e dentre eles estão o grupo das bactérias e dos fungos. (ROBSON; CHAMBLISS, 1989).

2.7.3 Peptidase (Protease)

As peptidases também são chamadas de proteases (exopeptidases), proteinases (endopeptidases) ou enzimas proteolíticas, usaremos o termo peptidase, que é o recomendado pelo Comitê de Nomenclatura Enzimática da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) - 1992). Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC), as proteases pertencem à classe 3 (hidrolases) e sub-classe 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases) (RAWLING et al., 2004).

As peptidases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas (RAO et al., 1998). A seqüência destes aminoácidos pode conferir às proteínas atividades metabólicas específicas. Segundo Campbell (2000), quanto maior forem às forças que mantêm a estrutura tridimensional das proteínas, mais difícil será a ação das peptidases. Estas enzimas têm importante papel em todos os processos fisiológicos, uma vez que conduzem funções metabólicas e essenciais, indo da quebra geral de proteína para à regulação da morte celular programada (POZA et al., 2001).

Dividem-se em três grupos: peptidases ácidas, neutras e alcalinas. As peptidases ácidas possuem atividade em pH 2,0 a 5,0 e as neutras possuem atividade em pH 6,0 a 9,0. O terceiro grupo, é formado pelas peptidases alcalinas que tem atividade em pH 9,0 a 11,0 (GUERRA, 1991). As peptidases também são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam, exopeptidases: (EC 3.4.11-19), quando clivam aminoácidos terminais, e endopeptidases: (EC 3.4.21-99), quando hidrolisam ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica (BON; VERMELHO, 2004).

Há muitas aplicações industriais para as enzimas proteolíticas, mais freqüentemente utilizadas em misturas do que purificadas, elas representam um dos três maiores grupos de enzimas de interesse industrial, especialmente na indústria de alimentos, bem como no processo de amaciamento de carnes (GERMANO et al., 2003), clarificação da cerveja, melhoramento do sabor de queijos e rações, na panificação, indústria farmacêutica, na indústria coureira para remover pelos de couro e aumentar a flexibilidade, na formulação de detergentes, adicionadas a fluídos de lavagem de lentes de contato, amplamente utilizadas como reagentes de laboratório para a digestão específica de proteínas e em processos de biorremediação (BARTHIAR et al., 2002; GERMANO et al., 2003; GHORBEL et al., 2003; RAWLINGS et al., 2004, VERMELHO et al., 2008; ORLANDELLI et al., 2012).

A maioria das peptidases é detectada qualitativamente “*in vitro*” utilizando-se como substratos meios sólidos contendo caseína, gelatina, leite desnatado, soro de albumina bovina e outras proteínas (BARATA et al., 2002).

As peptidases de origem bacteriana são muito usadas na indústria, porém requerem custo intensivo na metodologia de filtração para obter a preparação enzimática livre do micro-organismo, enquanto que, nas peptidases de origem fúngica, o micélio é facilmente removido por filtração (LUNA et al., 2002; VERMELHO et al., 2008).

Diversos fungos são descritos como produtores de enzimas proteolíticas como *Mucor circinelloides* (ANDRADE; MARTINS, 2002), *Aspergillus* sp. (SUMANTHA et al., 2005), *Penicillium* sp. (GERMANO et al., 2003) e *Fusarium* sp. (PEKKARINEN et al., 2000).

2.7.4 Pectinase

Pectinases são enzimas que degradam a pectina, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica, degradam moléculas constituídas por unidades de ácidos galacturônicos. Pectina é um polissacarídeo formado por monômeros de ácido galacturônico

unidos por ligações glicosídicas (UENOJO; PASTORE, 2007). As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são os catalisadores responsáveis pela pectólise, um fenômeno associado a muitos processos biológicos que envolvem os vegetais superiores (ROMBOUTS; PILNIK, 1980). As pectinases têm como substratos naturais as substâncias pécticas, que são polissacarídeos muito difundidos na natureza e que, juntamente com outros componentes como amido, celulose, hemicelulose e lignina, formam o material estrutural da parede celular das plantas (WHITAKER, 1984).

As pectinases (E.C. 3.2.1.15) podem ser classificadas em dois grupos de acordo com seu modo de ação: enzimas desesterificantes e despolimerizantes. As enzimas desesterificantes são denominadas pectinametilesterase (PME – E.C. 3.1.1.11). Atuam na remoção de grupos metoxílicos presentes em algumas substâncias pécticas, hidrolisando somente os grupos adjacentes a grupamentos carboxílicos livres (CELESTINO et al., 2006). As enzimas despolimerases quebram a cadeia da pectina por hidrólise (hidrolítica) ou clivagem transeliminativa (liase). São classificadas conforme alguns aspectos, tais como: especificidade pelo substrato; posição da clivagem na cadeia péctica, atuação ao acaso (endo-enzima) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora (exo-enzima) e mecanismo de reação de despolimerização (BAILEY; PESSA, 1990).

Durante meados da década de 30, quando as indústrias de frutas começaram a produzir suco, o rendimento era baixo e muitas dificuldades foram encontradas para filtrar o suco e se atingir uma clarificação aceitável. A partir de então, pesquisas utilizando pectinases fúngicas, juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, ajudaram a superar estas dificuldades (BHAT, 2000).

As pectinases são utilizadas nas indústrias de alimentos e bebidas onde a principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos e vinhos, na maceração de frutos e vegetais, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração, reduzindo a viscosidade e melhorando sua qualidade, além do grande destaque na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho (MALVESSI; SILVEIRA, 2004; UENOJO; PASTORE, 2006).

Estas enzimas representam cerca de 25% da produção mundial de enzimas utilizadas na indústria de alimentos (YADAV et al., 2009).

Os principais fungos produtores de enzimas pectinolíticas pertencem ao gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* (MALLER, 2008), sendo *Aspergillus niger* a espécie mais utilizada para a produção industrial dessas enzimas (PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2007; RANGARAJAN et al., 2010).

2.7.5 Fitase

As fitases formam um grupo de enzimas que são quimicamente definidas como mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexafosfato fosfohidrolases, são responsáveis pela hidrólise do fitato para posterior absorção do fósforo inorgânico livre (Pi) (DEBNATH et al., 2005), são definidas como fosfatases, com a capacidade, “*in vitro*”, de liberar pelo menos um grupo fosfato através da hidrólise do fitato, diminuindo a concentração de inositol fosfato (BOHN et al., 2008). O fitato possui seis grupos que podem ser liberados, dependendo da fitase utilizada, em velocidades e ordem diferentes. As fitases sintetizadas por fungos filamentosos e pela bactéria *Escherichia coli* conseguem liberar somente cinco dos seis grupos, sendo que os produtos finais são mio-inositol 2-monofosfato (WYSS et al., 1999). São enzimas exógenas que estão definidas como proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem serem elas próprias alteradas nesse processo.

De acordo com Kumar et al. (2010), em geral, as enzimas fitases são encontradas de quatro fontes possíveis: fitases vegetais, fitases microbianas (oriundas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos), fitase animal, a qual é produzida pelas células da mucosa do intestino delgado, e a fitase microbiana visceral-associada, produzida pela microflora no intestino grosso. Apesar das fontes animais e vegetais representarem avanços científicos importantes, sua aplicação prática para produção de fitase é limitada. Em compensação, fontes microbianas apresentam características que permitem um alto rendimento e ampliação de escala, tornando-se amplamente utilizadas de maneira efetiva na indústria de rações animais.

A fitase microbiana tornou-se disponível comercialmente em 1991 (Natuphos®, produzida por *A. niger*), quando a legislação introduzida nos Países Baixos amplificou seu desenvolvimento e aceitação, para controlar a poluição de fosfatos em unidades de criação de suínos e aves (KUMAR et al., 2010).

Dessa forma, as fitases têm importante aplicação na nutrição animal, sendo inserida dentre o grupo dos aditivos alimentares, tendo como objetivo aumentar a disponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos (YIN et al., 2001). Diversos tipos de processamento de alimentos e técnicas de preparação requerem à adição de enzimas exógenas, cujo objetivo é promover a redução do teor de fitato nos alimentos. A hidrólise do fitato durante o processamento dos alimentos é um resultado da degradação química pela atividade enzimática da fitase. No entanto, a capacidade de defosforilação do fitato difere grandemente entre diferentes espécies de microorganismos, devido à diferença nas suas propriedades bioquímicas em relação ao processo de hidrólise do ácido fítico (EGLI et al., 2002).

A síntese de fitase efetuada pela membrana celular de micro-organismos é comercialmente a forma mais promissora de produção da enzima, e apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são os mais utilizados (PANDEY et al., 2005).

Portanto, considerando os benefícios da fitase, vários pesquisadores têm direcionado seus esforços no isolamento e expressão heteróloga dos genes microbianos que codificam fitases. Portanto os fungos dos solos, especialmente os filamentosos, têm demonstrado particular potencial de exploração, sendo assim seus estudos intensificados a cada ano. Diversos trabalhos tem sido encontrados em literatura dentre os quais, podemos destacar, Zao et al. (2007), estudaram a expressão de genes que codificam fitases em fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. niger*, e Promdonkoy et al. (2009), estudaram esta expressão em *A. japonicus*.

Os principais fungos que possuem capacidade de produzir fitase se encontram dentro dos gêneros: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Pseudeurotium* e *Trichoderma* (LIU et al., 1998). Contudo, em termos de utilização industrial, os fungos do gênero *Aspergillus*, basicamente são representados por duas espécies (*A. niger* e *A. ficuum*) os quais se apresentam como os mais promissores.

As fitases estão sendo amplamente utilizadas em rações para aves e suínos, a fim de promover um melhor aproveitamento do fósforo naturalmente presente nos grãos destas rações, levando a uma maior economia, já que devido à falta de enzima de forma endógena nestes animais, os produtores são obrigados à adicionar fósforo inorgânico às rações, uma vez que este mineral é de extrema importância para a formação de dentes e ossos, além de participar de uma série de reações metabólicas. O uso de fitase também proporciona menor impacto ambiental, uma vez que o fósforo não aproveitado pelos animais é excretado nas fezes, causando o processo de eutrofização de rios e lagos (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, na cidade de Seropédica/RJ, em conjunto com o Laboratório de Multiusuários de Biologia Molecular da Embrapa Agrobiologia, Seropédica/RJ. Foi conduzido em conjunto com o projeto do mestrando Alexandre De Donato, do curso de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada da UFRRJ, o qual teve por objetivo estudar a biodiversidade e bioprospecção da fitase de fungos filamentosos do solo e serrapilheira, de uma floresta estacional semidecídua do bioma Cerrado da cidade de Sete Lagoas/MG.

3.1 Localização das Áreas de Coleta

As áreas de coleta das amostras de solo e da serrapilheira estão localizadas no Centro-Oeste do Estado de Minas Gerais, no município de Sete Lagoas, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, a qual possui regiões consideradas de mata estacional semidecidual, pertencente ao Bioma Mata Atlântica, na altitude média de 710m, nas seguintes coordenadas geográficas: Latitudes: 19° 26' 10" e 19° 27' 38" e Longitude: 44° 08' 52" e 44° 11' 10". A localização geográfica dos pontos de amostragem foi realizada através de dados obtidos a partir de GPS (Figura 5).

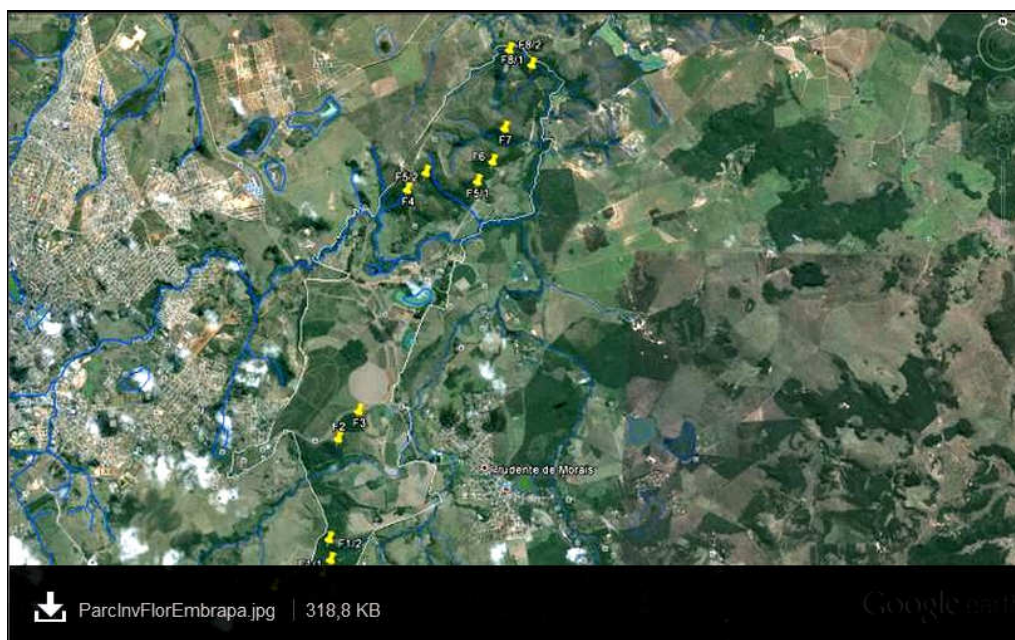


Figura 5. Localização geográfica dos pontos de amostragem realizados na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

3.2 Amostras

As amostras de solo e serrapilheira foram coletadas em dois períodos diferentes, o primeiro período, úmido, realizado no final de janeiro de 2012, após um período de quatro dias de intensa chuva, onde no total houve uma precipitação de 101,2 mm, e o segundo período, seco, realizado no início de setembro de 2012, realizada 22 dias após uma chuva atípica de 0,4 mm. Foram amostrados 8 fragmentos florestais distintos, sendo que o último foi subdividido em 2 subfragmentos, em virtude do tamanho do mesmo, totalizando 9 fragmentos. A amostragem de cada fragmento, foi realizada em 3 profundidades (serrapilheira, de 0 a 5 e 5 a 10 cm) com três repetições para cada amostra, constituindo 99 amostras por período, e 198 amostras de solo no final dos dois períodos. Foram coletadas 300g de solo em cada fragmento e em seguida as amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o laboratório em caixas térmicas com gelo, e armazenadas em câmara fria com temperatura de 4 °C até o processamento das amostras.

3.3 Isolamento

Cinco gramas de serrapilheira ou solo de cada amostra foram diluídos em 45 mL de água peptonada 1% contendo 0,1 mL de Tween. A solubilização total foi feita por meio de um agitador a 150 rpm durante 30 min. Desta suspensão homogênea, foi retirado 1 mL e colocado em um tubo de 9 mL de água peptonada, e após agitação outra alíquota de 1 mL deste tubo foi retirada e colocada em outro tubo contendo 9 mL de água peptonada, e assim sucessivamente, formando as diluições 10^{-2} à 10^{-6} . Em meio DRBC (Ágar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol) (Anexo A), foram plaqueadas 0,1 mL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Cada diluição teve três repetições e cada amostra teve três diluições plaqueadas, dando um total de 9 placas de Petri por amostra de solo. Após os plaqueamentos, os fungos foram acondicionados em câmara de crescimento a uma temperatura de 25 °C durante 7 dias na ausência de luz.

Os *Aspergillus* negros foram isolados em tubos contendo 5 mL do meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) (Anexo A). Feito o isolamento, os tubos foram acondicionados em câmara de crescimento a temperatura de 25 °C durante 7 dias. Uma vez constatado tal crescimento, os tubos contendo as colônias isoladas foram acondicionados em geladeira a uma temperatura de 4 °C, até a identificação das mesmas (MURO; LUCHI, 1989).

3.4 Identificação das Espécies

As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* foram caracterizadas através de técnicas morfológicas onde foram inoculadas em meios de cultura: CYA e MEA, e paralelamente os testes bioquímicos foram conduzidos em meios de cultura semi-seletivos: MEA-B, CREA, e Teste de Ehrlich, e em temperaturas padronizadas de acordo com manuais de identificação (KLICH, 2002b; SAMSON et al., 2004; SAMSON et al., 2007; VARGA et al., 2011). A composição de cada meio de cultura utilizado se encontra nos Anexos B e C.

Os isolados da seção *Nigri* foram também caracterizados através da técnica molecular de seqüenciamento de DNA, utilizando as regiões ITS1 e ITS4.

3.5 Análise Morfológica

Os esporos dos isolados de *Aspergillus* negros foram suspensos em 1,0 mL de uma solução contendo 0,2% de ágar e 0,05% de Tween 80. Desta suspensão, 2,0 µL foram utilizados para inoculação em três pontos da placa de Petri contendo 20 mL dos meios de cultura: CYA e MEA, em triplicata para cada meio. A inoculação ocorreu a 25 e 37 °C para CYA após 7 dias, 25 °C para MEA após 7 dias, 15 , 33 , 36 e 40 °C para MEA, após 10 dias de incubação.

Foram analisadas características macroscópicas, como: cor da superfície e reverso da colônia nos meios CYA e MEA a 25 °C, diâmetro da colônia nos meios CYA 25 e 37 °C e MEA 25 °C, presença ou ausência e cor de esclerócios. Após o preparo de lâminas foram observadas as características microscópicas, como: diâmetro e forma da vesícula, comprimento e largura das métulas e fiáides, cor, tamanho, forma e textura dos conídios e cor das hifas. Todas as espécies foram observadas com um microscópio óptico modelo OLYMPUS (CX31-P).

3.6 Análise Bioquímica

Os testes bioquímicos ocorreram nos meios de cultura específicos como: MEA-B e CREA incubados por 7 dias à 25 °C, e Teste de Ehrlich em CYA por 7 dias à 25 °C.

O meio MEA-Boscalide consiste no meio MEA adicionado de 10 mg / L Boscalide (Sigma), após a autoclavagem (Anexo C). Para cada isolado inoculou-se 0,2 mL da suspensão de esporos em 3 pontos equidistantes na placa de Petri em triplicata (SAMSON et al., 2004).

O meio Sacarose Creatina Agar (CREA) (Anexo C) é um meio semi-seletivo utilizado para dividir as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* em grupos de acordo com a capacidade de crescimento e produção ácida , ocorrendo a alteração da cor do meio de violeta para amarelo. Para cada isolado inoculou-se 0,2 mL da suspensão de esporos em 3 pontos equidistantes na placa de Petri em triplicata (FRISVAD, 1993; SAMSON et al., 2004).

O teste de Ehrlich baseia-se na detecção de alcalóides que reagem com o reagente de Ehrlich (LUND, 1995). Um anel da colônia crescida no meio CYA, de 4 mm foi cortado a partir do centro e colocado sobre o papel de filtro (Whatman N° 1) redondo de 10 cm de diâmetro umedecido com a solução de Ehrlich (Anexo C) (FRISVAD; SAMSON, 2004).

3.7 Análise Molecular

3.7.1 Extração de DNA

Para extração de DNA de 42 isolados da seção *Nigri* foram utilizados 4 diferentes protocolos conforme descritos abaixo. Os fungos foram cultivados em meio BDA sólido à 28 °C por 5 dias e cerca de 1 cm² de micélio das culturas foram coletados e utilizados para extração de DNA. Para a preparação do material, os tampões foram aquecidos em banho-maria a 60 °C, por 20 min e depois adicionados ao gral contendo o micélio do fungo e areia lavada.

3.7.1.1 Método CIA (modificado por VICENTE, 2000)

Para a maceração do micélio, 500 µL do tampão CTAB (Anexo D) foram adicionados ao gral. A solução aquosa foi transferida para microtubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 30 seg e incubados em banho-maria por 10 min à 60 °C, vertendo os tubos a cada 2 min. Em seguida foram adicionados 500 µL de CIA (Anexo D) e centrifugou-se por 7 min a 16000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* e repetiu-se o procedimento anterior. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo *ependorf* e foram adicionados 2 volumes de etanol 96% gelado incubado durante a noite no freezer (-20 °C). O DNA foi precipitado por centrifugação por 7 min a 16000 rpm, e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. O precipitado contendo o DNA foi lavado em 500 µL de etanol 70% gelado e misturou-se cuidadosamente, esta etapa foi repetida por mais 2 vezes. Deixou o DNA secar por 15 min na estufa a 37 °C.

3.7.1.2 Método fenol-clorofórmio (RAEDER; BRODA, 1985) modificado por BLANCO (1999)

Para a maceração do micélio, 1000 µL do tampão de extração (Anexo D) foram adicionados ao gral. A solução aquosa foi transferida para os microtubos de 1,5 mL, agitados em vortex por 5 min para obtenção de uma suspensão homogênea. Os tubos *ependorfs* foram incubados em banho-maria a 70° C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 1000 µL de fenol, homogeneizando-os. Foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo *ependorf*, adicionando 500 µL clorofane (Anexo D) e centrifugando-os a 5000 rpm por 15 minutos. Transferiu o sobrenadante para um novo tubo, adicionou 500 µL de CIA e centrifugou-se a 5000 rpm por 15 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para novo tubo, adicionou-se 60% do volume do tubo tipo *ependorf* de isopropanol e incubou-se no freezer por 1 hora. A suspensão foi centrifugada a 11000 rpm por 20 min e desprezou-se o sobrenadante. Em seguida o precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e os *ependorfs* permaneceram por 1 hora em estufa a 37°C para secagem.

3.7.1.3 Método CTAB, protocolo para extração de DNA de folha de planta

Para a maceração do micélio, 500 µL do tampão de extração CTAB (Anexo D) foram adicionados ao gral. A solução aquosa foi transferida para tubos tipo *ependorf* de 2,0 mL. Foi adicionado 4 µL de β-mercaptoetanol por tubo, depois incubados em banho-maria por 30 min à 60 °C, vertendo os tubos a cada 10 min. Centrifugou-se por 7 min a 16000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo *ependorf* e depois mantido no gelo por 10 mim. Em seguida foi adicionado um volume de CIA até completar os 2 mL do tubo. Misturou-se por inversão e incubou-os no gelo por 10 mim. Centrifugou-se por 7 min a 16000 rpm, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo *ependorf* e completou o volume do tudo com isopropanol 100%. E então novamente misturou-se por inversão e incubou-os no gelo por 10 mim. Centrifugou-se por 3 min a 16000 rpm e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Em seguida o precipitado foi lavado em 500 µL de etanol 100% gelado. Acrescentou 250 µL de tampão TE + 4 µL de RNase por tubo. Colocou o DNA em estufa por 30 min a 37 °C. Depois acrescentou 100 µL de CIA. Feito a inversão e mantido em gelo por 10 mim. Centrifugou-se por 3 min a 16000 rpm, coletou-se o sobrenadante cuidadosamente e colocou-o em novo tubo *ependorf* de 2,0 mL. Lavou o precipitado com etanol 100% e deixou-o secar.

Ao final de todos os protocolos o pellet foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE e armazenado em freezer (-20 °C), e o DNA foi quantificado em *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) e *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen).

3.7.1.4 Método Kit (QIAGEN, 2006)

Seguindo instruções do fabricante, o kit comercial DNeasy® Protocol: Mini Kit-For miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi da Qiagen foi o método utilizado para a extração de DNA de 4 isolados do total de 42 amostras.

3.7.2 PCR

Para a caracterização molecular, dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG-3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') descritos na literatura para amplificação da região ITS de fungos do gênero *Aspergillus* (WHITE et al., 1990).

Para a reação de amplificação (PCR) foram utilizados 2 µl de DNA (entre 100 e 200 ng); 10 µl tampão Taq para PCR (5X); 6 µl de MgCl₂ (25mM); 1 µl de dNTP (10mM); 5 µ/µL GoTaq DNA Polimerase; 1,2 µL de DMSO; 1,5 µL de cada iniciador: ITS1 f (direto) e ITS4 (reverso) (100 pmol/µL) para um volume final de 50 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (*Mastercycle 22331 Hamburg Eppendorf AG*). As condições de amplificação foram uma etapa de pré-desnaturação a 95 °C por 4 min, desnaturação a 95 °C por 45 seg, anelamento 55 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. Após 30 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por 10 min.

Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR, ao final das reações, o produto foi mantido a -20 °C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% submetidos a uma voltagem de 80 volts por 1h30min. Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹) e visualizado em transiluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação KODAK® Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. No. 172.8468), e as bandas foram comparadas com um padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Todas as amplificações foram realizadas pelo menos duas vezes nas mesmas condições para obter uma quantidade de DNA suficiente para as reações de sequenciamento.

3.7.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

As reações de sequenciamento do fragmento de 550 pares de bases amplificada utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 foram realizadas em sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) utilizando os mesmos iniciadores. Para cada reação de sequenciamento foi utilizado 300 ng do produto de PCR purificado, 5 µM de cada iniciador, 4 µL do Kit de sequenciamento Dye-terminator (*DYEnamic ET, Amersham Biosciences*) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen) para um volume final de 20 µL. Após a reação as amostras foram precipitadas adicionando 1,0 µL de acetado de amônio 7,5M e 27,5 µL de etanol 70% e incubadas a 4 °C overnight. O DNA foi precipitado por centrifugação a 14.000 rpm por 30 min sob temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70% e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 5 min a 4 °C. As sequências contíguas foram montadas a partir das sequências

diretas e reversas utilizando-se os programas Phred/Phrad/Consed (EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998).

3.7.4 Análise de similaridade e filogenia

A pesquisa por similaridade foi realizada no Genbank, pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Após identificação das sequências similares as regiões ITS1 e ITS4 foram importadas para o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) para a edição manual e alinhadas usando o programa *CLUSTAL W* (THOMPSON et al., 1994). As sequências alinhadas foram então utilizadas para a análise de filogenia. A árvore filogenética foi construída a partir da comparação de 550 pb usando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987). Para avaliar a robustez da topologia, a árvore foi avaliada pelo método de bootstrap com 1000 repetições. A distância evolucionária foi computada usando o método *Kimura 2-parameter* (KIMURA, 1980) e a análise filogenética foi conduzida no programa *Molecular Análise Genética Evolutiva-MEGA.5* (TAMURA et al., 2011). *Aspergillus flavus* foi utilizado como grupo externo nestas análises.

3.8 Avaliação Semi-quantitativa do Perfil Enzimático

O procedimento utilizado no presente trabalho foi a utilização de meios de cultura sólidos específicos para detecção de enzimas hidrolíticas: peptidase (protease), amilase, celulase, pectinases e fitase realizando ensaios semi-quantitativos para avaliar a capacidade de secreção das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*.

3.9 Determinação da Concentração de Esporos

A determinação da concentração de esporos foi realizada através da diluição em série, onde foram colocados 10 mL de água destilada no tubo de ensaio contendo o isolado, agitou-se o tubo e retirou-se 1 mL desta solução e diluiu-a em 9 mL de água destilada, esterilizada, com 0,1% de Tween 80, e assim sucessivamente, até obter a diluição de 10^{-4} . Após diluição, realizou-se a contagem dos esporos em câmara de *Neubauer* (MILES; MIRSA, 1938).

3.10 Produção das Enzimas: Peptidase, Amilase, Celulase, Pectinase e Fitase

Foi realizado o plaqueamento de 0,05 mm da solução contendo esporos na concentração de 10^{-4} . Todos os isolados foram incubados em BOD à 25 °C por um período de 5 dias em cada meio de cultura específico (Anexo E), em triplicata. Os halos foram medidos com um paquímetro, e o cálculo do índice enzimático (IE) foi realizado mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia como proposto por Stamford et al. (1998).

O halo indicativo da produção das enzimas peptidase (GOPINATH et al., 2005) e fitase (PIKOVSKAYA, 1948) podem ser vistos sem solução reveladora, com a detecção de uma zona clara ao redor das colônias.

A atividade amilolítica foi detectada após a adição de 5 mL de uma solução de iodo sobre cada colônia. A formação de uma zona amarelada ao redor da colônia fúngica e o desenvolvimento de coloração azul na superfície restante da placa de Petri indica a ocorrência da hidrólise do amido (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

A revelação do halo de hidrólise para celulase foi realizada adicionando-se 10 mL de solução corante de vermelho congo ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de vermelho congo em tampão Tris HCL 0,1 M, pH 8,0), sobre cada colônia e incubação das placas em temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, a solução de corante foi descartada e as placas de Petri foram descoradas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, por 15 min. A degradação da carboximetilcelulose ao redor da colônia fúngica é detectada através da formação de um halo amarelo ao redor da colônia (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996; POINTING, 1999).

A atividade pectinolítica foi verificada após a adição de uma solução de ácido clorídrico (HCL) 5 N, durante 5 min, o que permitiu a formação de uma zona clara ao redor da colônia (HANKIN; AGNOSTAKIS, 1975).

3.11 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Todos os testes foram realizados com três repetições, de acordo com o número de tratamentos positivos para cada enzima. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

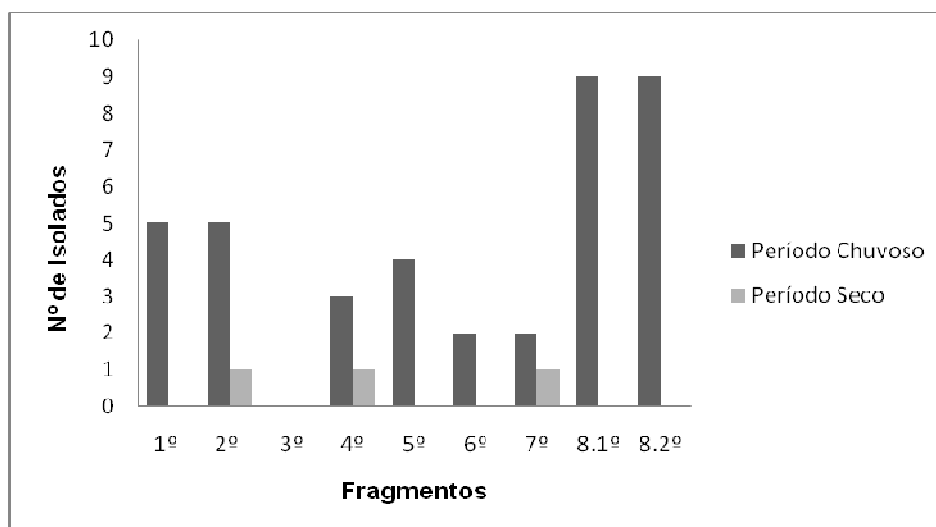
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de *Aspergillus* seção *Nigri*

Foram isolados 42 fungos do gênero *Aspergillus* da seção *Nigri*, provenientes do Bioma Mata Atlântica. Foi observado que deste total de isolados, 16,7% foram provenientes da camada de serrapilheira, 38,1% da profundidade de 0 a 5 cm, e 45,2% de 5 a 10 cm do solo.

Na primeira coleta (janeiro/2012), a média mensal das temperaturas diárias médias (Tmed) foi 22,8 °C, enquanto a média mensal das temperaturas diárias máximas (Tmax) e mínimas (Tmin) foi 29 °C e 18 °C, respectivamente. Já para a segunda coleta (setembro/2012), Tmed foi igual a 18,7 °C, enquanto Tmax e Tmin foram 26,8 °C e 12 °C, respectivamente. A temperatura máxima registrada no mês da coleta 1 foi 35,4 °C e a mínima foi 15,1 °C. Para coleta 2, tais temperaturas foram 31,8 °C e 8 °C. A precipitação pluviométrica média ao longo do mês de janeiro de 2012 foi 12,37 mm, totalizando um balanço hídrico médio de 9,95 mm. Já para a segunda coleta o balanço hídrico do mês foi negativo. Dessa forma os isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* foram encontrados em maior quantidade no período chuvoso, 92,8%, e no período seco apenas 7,2% (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição numérica de isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* avaliados ao longo dos nove fragmentos florestais no período chuvoso e seco.



Estes resultados estão alinhados com os de Serra (2005) e Pitt e Hocking (2009), onde observaram que *Aspergillus* negros se desenvolvem melhor em temperaturas elevadas, comuns em materiais em decomposição e solo, além também de crescerem melhor em locais com alta umidade, conforme observado no Gráfico 1.

Os fragmentos com maiores números de *Aspergillus* negros foram, F8.1 e F8.2, devido ao fato destes fragmentos pertencerem a uma área de transição entre o bioma Mata Atlântica e o Cerrado, favorecendo uma maior diversidade destes fungos.

4.2 Identificação Morfológica

Os isolados foram divididos em 6 grupos de acordo com as características morfológicas e bioquímicas. Grupo I: composto por 26 isolados (62%); Grupo II: 12 isolados (28,5%); e os Grupos III ao VI foram compostos por 1 isolado cada um (9,5%), totalizando 42 isolados (Figura 6).

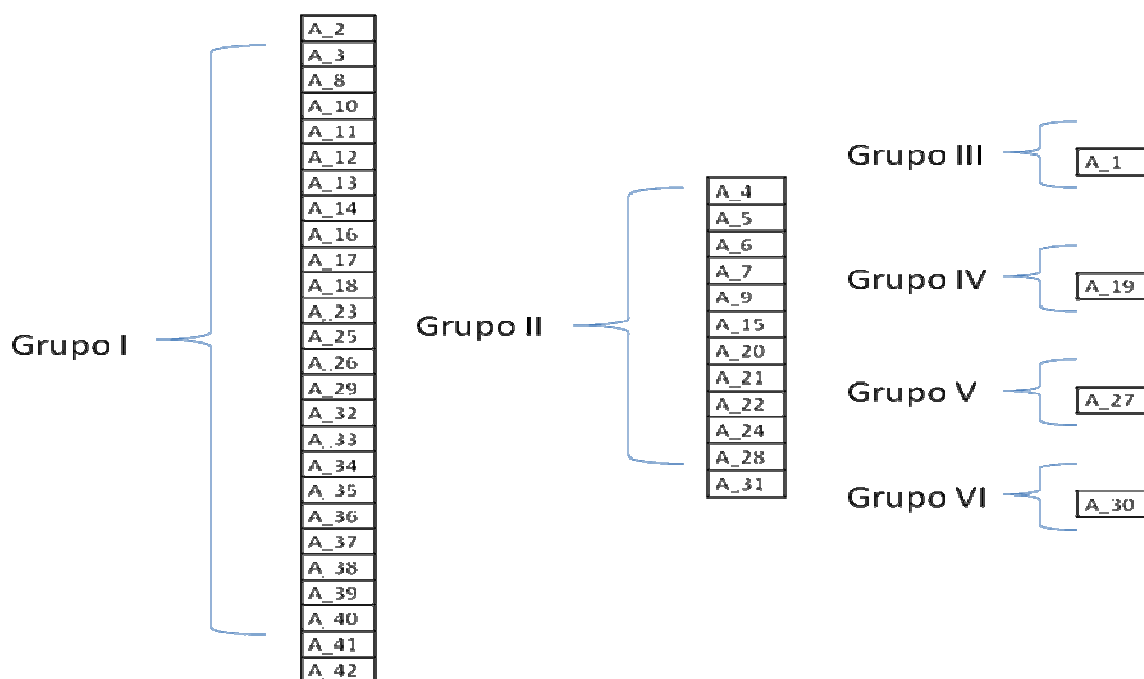


Figura 6. Identificação dos 42 isolados de *Aspergillus* seção *Nigri*.

4.2.1 Caracterização morfológica

A tabela 5 e figura 7 apresentam as características macroscópicas para as espécies isoladas de *Aspergillus* seção *Nigri* do Grupo I ao VI, onde foram avaliadas em CYA e MEA após 7 dias a 25 °C na ausência de luz. A tabela 6 e figura 8 mostram as características microscópicas das espécies isoladas de *Aspergillus* seção *Nigri* do Grupo I ao VI, após crescimento em MEA por 7 dias a 25 °C.

Os Grupos I e II foram compostos por espécies unisseriadas, que só apresentam fiálides, todas as linhagens avaliadas nestes dois grupos apresentaram conídios variando de castanho-escuro a castanho claro, equinulados de forma globosa a subglobosa e hifas hialinas.

As espécies do Grupo I apresentam: Colônia em CYA 25 °C com diâmetro superior a 80 mm, coloração marrom escuro com reverso marrom claro (Figura 7. A-B). Em MEA, coloração da colônia é negra com halo amarelado e reverso com tons amarelados (Figura 7. C-D), diâmetro de 55-75 mm. Em CYA 37 °C, crescimento em torno de 15 a 28 mm. Cabeça conidial com fiálides de 5-9 (-11) × 3-5 (-6) μm, vesículas subglobosas a elipsoidal cujos diâmetros variam de (25-) 30-60 (-85) μm, conídios com diâmetro de 4-5 μm (Figura 8. A-C). Produção de esclerócio em forma oval e cor branco/amarelado.

As espécies do Grupo II apresentam: Colônia em CYA 25 °C com diâmetro superior a 80 mm, coloração marrom escuro, com reverso amarelado (Figura 7. E-F). Em MEA,

coloração da colônia é negra e reverso incolor (Figura 7. G-H), com diâmetro de 75-85 mm. Em CYA 37 °C, crescimento em torno de 20 a 35 mm. Cabeça conidial com fiálide de 4-7 (9) × 3-4 (5) µm, vesícula globosa para subglobosa ocasionalmente elipsoidal cujo diâmetro varia de (35) 40-85 (-100) µm, conídio com diâmetro de 3-4 µm (Figura 8. D-F). Produção de esclerócio em forma oval e cor alaranjada.

Os Grupos III ao VI são compostos por espécies bisseriadas, ou seja, que apresentam métula e fiálide, hifas hialinas, não houve produção de esclerócio, todas as linhagens avaliadas nestes quatro grupos apresentaram conídios variando de castanho-escuro a preto, globoso a subgloboso.

A espécie do Grupo III apresentou: Colônia em CYA 25 °C com diâmetro de 62-74 mm, coloração marrom escuro a negra, com reverso incolor e tons acinzentados (Figura 7. I-J). Em MEA, coloração da colônia é negra e reverso incolor (Figura 7. K-L), com diâmetro de 59-68 mm. Em CYA 37 °C, crescimento em torno de 54-66 mm. Cabeça conidial com métula de 10-15 (-17) × 3-5 e fiálide de 8-10 x 3-4 (5) µm, vesícula globosa com diâmetro variando entre (45-) 50-70 (-75) µm, conídio com diâmetro de 4-5 µm e rugoso (Figura 8. G-H).

A espécie do grupo IV apresentou: Colônia em CYA 25 °C com diâmetro de 55-74 mm, coloração negra, com reverso incolor com tons acinzentados (Figura 7. M-N). Em MEA, coloração da colônia é marrom escura para negra e reverso incolor (Figura 7. O-P), com diâmetro de 45-68 mm. Em CYA 37 °C, crescimento em torno de 50-70 mm. Cabeça conidial com métula medindo (5-) 6-8 × 2-3(-4) e fiálide (9-)10 - 13 × 3-4 µm, vesícula globosa, diâmetro variando de (40-) 50-65 (-75) µm, conídio com diâmetro de 3-5 µm e liso (Figura 8. I-J).

A espécie do grupo V apresentou: Colônia em CYA 25 °C com diâmetro de 75-85 mm, coloração marrom escuro, com reverso amarelado (Figura 7. Q-R). Em MEA, coloração da colônia é marrom escura e reverso incolor (Figura 7. S-T), com diâmetro de 62-79 mm. Em CYA 37 °C, não houve crescimento. Cabeça conidial não foi possível medir. Vesícula globosa para subglobosa com diâmetro de (40-) 55-65 (-70) µm, conídio com diâmetro de 3-5 µm e equinulado (Figura 8. K-L).

A espécie do Grupo VI apresentou: Colônia em CYA 25 °C com diâmetro de 50-70 mm, coloração negra/esbranquiçada, com reverso incolor a tons levemente amarelados (Figura 7. U-V). Em MEA, coloração da colônia é negra e reverso incolor (Figura 7. W-X), com diâmetro de 44-66 mm. Em CYA 37 °C, crescimento em torno de 47-68 mm. Cabeça conidial com métula medindo (7-) 8 - 10 × 2-3 (-4) e fiálide 10 - 20 (-24) × 3-5 (-6) µm, vesícula globosa com diâmetro de (40-) 50-80 (-85) µm, conídio com diâmetro de 4-5 µm e liso (Figura 8. M-N).

Tabela 5. Características macroscópicas dos isolados de serrapilheira e solo da Mata Atlântica de *Aspergillus* seção *Nigri*.

Isolados (Grupos)	Cor da colônia			Diâmetro da colônia (mm)			Esclerócio (Cor)
	CYA verso/ reverso (25°C)	MEA verso/ reverso (25°C)	CYA (25°C)	MEA (25°C)	CYA (37°C)		
I	marrom escuro/ marrom claro	negra com halo amarelado/ incolor com tons amarelados	>80	55-75	15-28	Branco/ Amarelado	
II	marrom escuro / amarelado	negra / incolor	>80	75-85	20-35	Alaranjado	
III	marrom escuro a negra/ incolor e tons acinzentados	negra / incolor	62-74	59-68	54-66	-	
IV	negra/incolor com tons acinzentados	marrom escura para negra/ incolor	55-74	45-68	50-70	-	
V	marrom escuro/amarelado	marrom escuro/incolor	75-85	62-79	-	-	
VI	negra-esbranquiçada/ incolor a tons levemente amarelados	negra/incolor	50-70	44-66	47-68	-	

Tabela 6. Características microscópicas dos isolados de serrapilheira e solo da Mata Atlântica de *Aspergillus* seção *Nigri*.

Isolados (Grupos)	Conídio			Vesícula			Cabeça conidial			Serição
	Tamanho (μm)	Cor	Textura	Forma	Tamanho (μm)	Forma	Métula (μm)	Fíalide (μm)		
I	4-5	castanho- escuro a castanho claro	equinulado	globoso/ subgloboso	(25-) 30-60 (-85)	subglobosa/ elipsoidal	-	5-9 (-11) \times 3-5 (-6)	unisseriado	
II	3-4	castanho- escuro a castanho claro	equinulado	globoso/ subgloboso	(35-) 40-85 (-100)	globosa/subglobosa ocasionalmente elipsoidal	-	4-7 (9) \times 3-4 (5)	unisseriado	
III	4-5	castanho- escuro a castanho claro	rugoso	globoso/ subgloboso	(45-) 50-70 (-75)	globosa	10-15 (- 17) \times 3-5	8-10 \times 3-4 (5)	bisseriado	
IV	3-5	castanho- escuro a preto	liso	globoso/ subgloboso	(40-) 50-65 (-75)	globosa	(5-) 6-8 \times 2-3(-4)	(9-)10 - 13 \times 3-4	bisseriado	
V	3-5	castanho- escuro a preto	equinulado	globoso/ subgloboso	(40-) 55-65 (-70)	globosa/ subglobosa	Não foi possível medir	Não foi possível medir	bisseriado	
VI	4-5	castanho- escuro a preto	liso	globoso/ subgloboso	(40-) 50-80 (-85)	globosa	(7-) 8 - 10 \times 2-3 (-4)	10 - 20 (- 24) \times 3-5 (-6)	bisseriado	

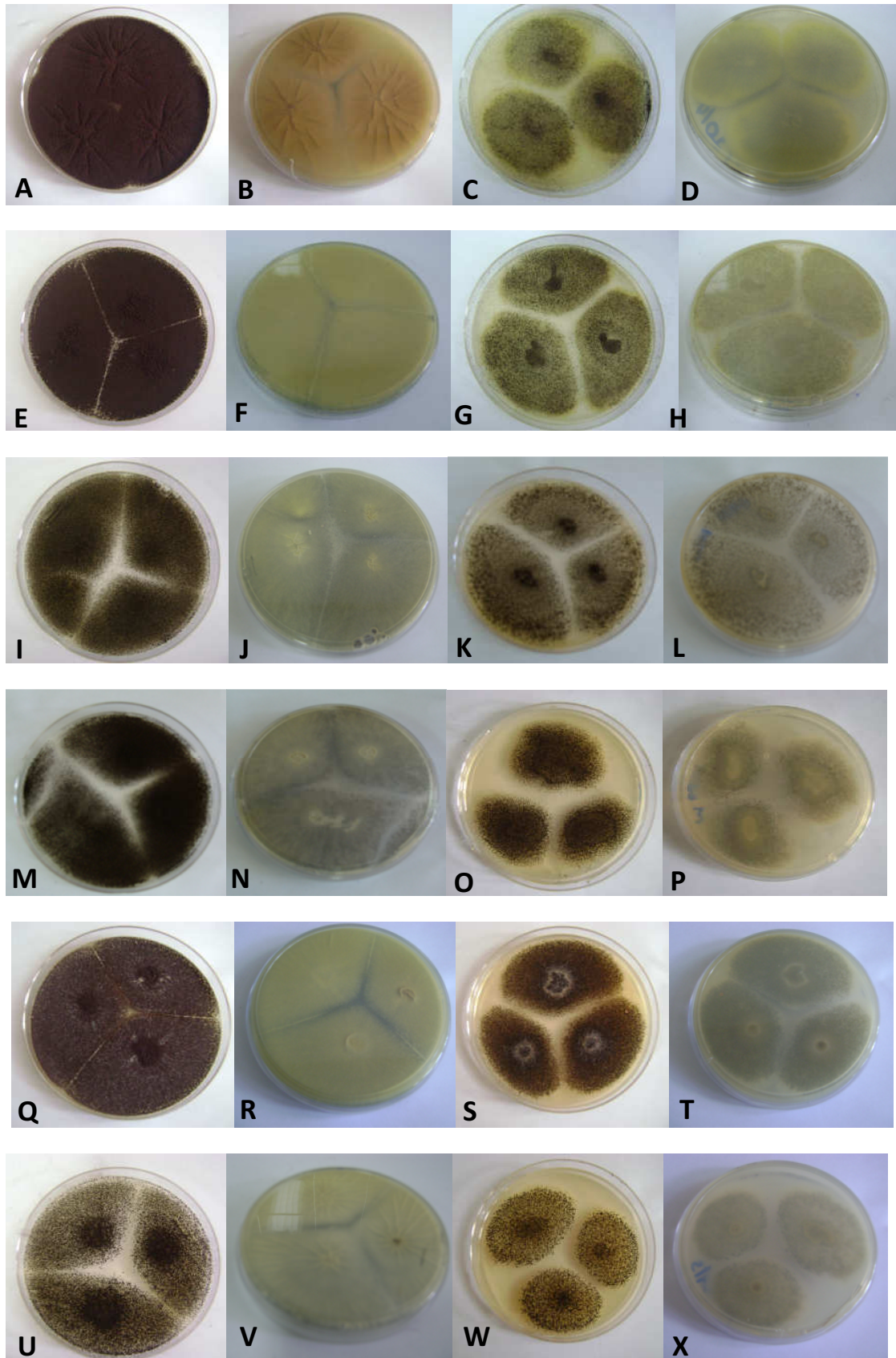
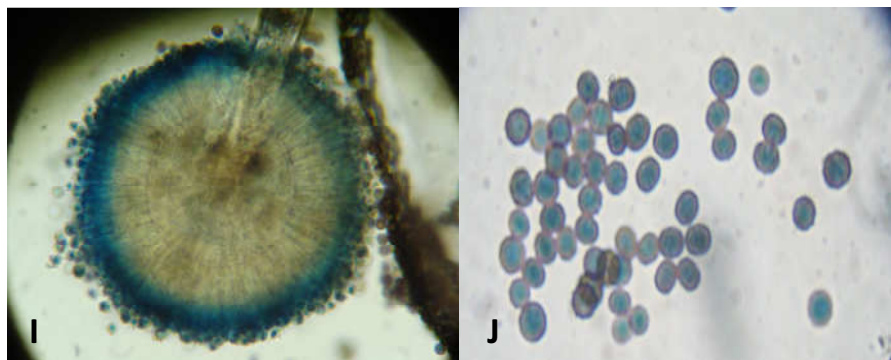
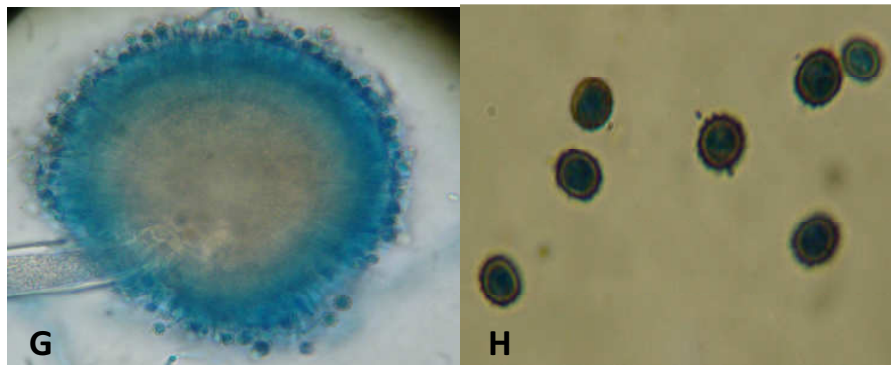


Figura 7. Características macroscópicas das colônias dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri*, verso e reverso em CYA e MEA, respectivamente, à 25° C após 7 dias: Grupo I (A-D); Grupo II (E-H); Grupo III (I-L); Grupo IV (M-P); Grupo V (Q-T); Grupo VI (U-X).



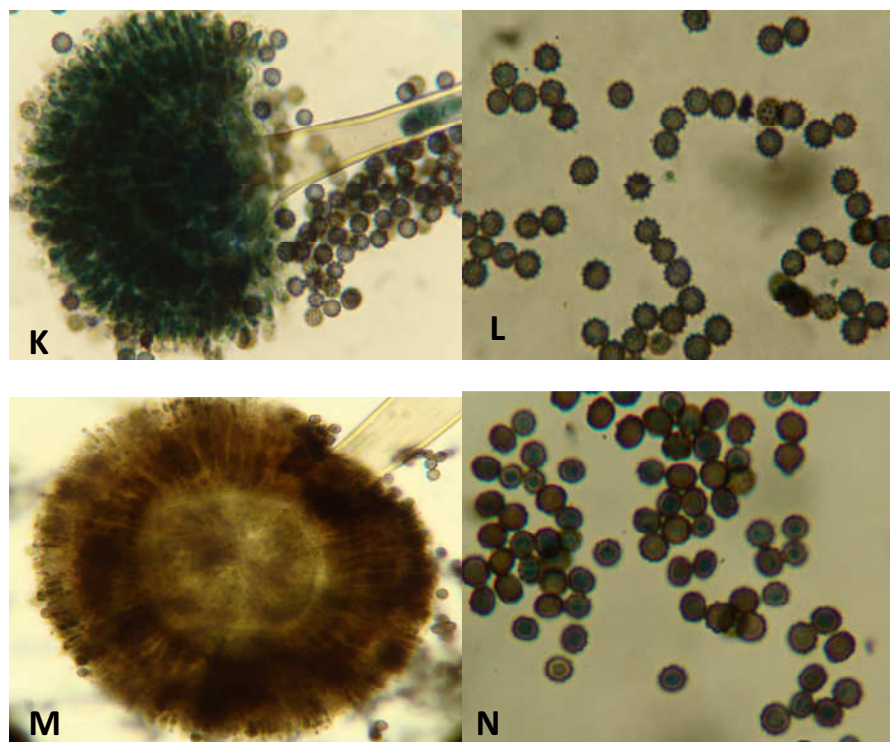


Figura 8. Características microscópicas dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* em MEA à 25° C após 7 dias: Grupo I (A-C); Grupo II (D-F); Grupo III (G-H); Grupo IV (I-J); Grupo V (K-L); Grupo VI (M-N).

Portanto, com base nos caracteres morfológicos os fungos foram caracterizados como: Grupo I = *A. aculeatus* e *A. japonicus*; Grupo II = *A. aculeatinus*, Grupo III = *A. tubingensis* e *A. lacticoffeatus*; Grupo IV = *A. niger* e Grupo VI = *A. foetidus* conforme Samson et al. (2007). A espécie pertencente ao Grupo V não pôde ser caracterizada, pois os resultados obtidos não nos direcionaram para nenhuma espécie.

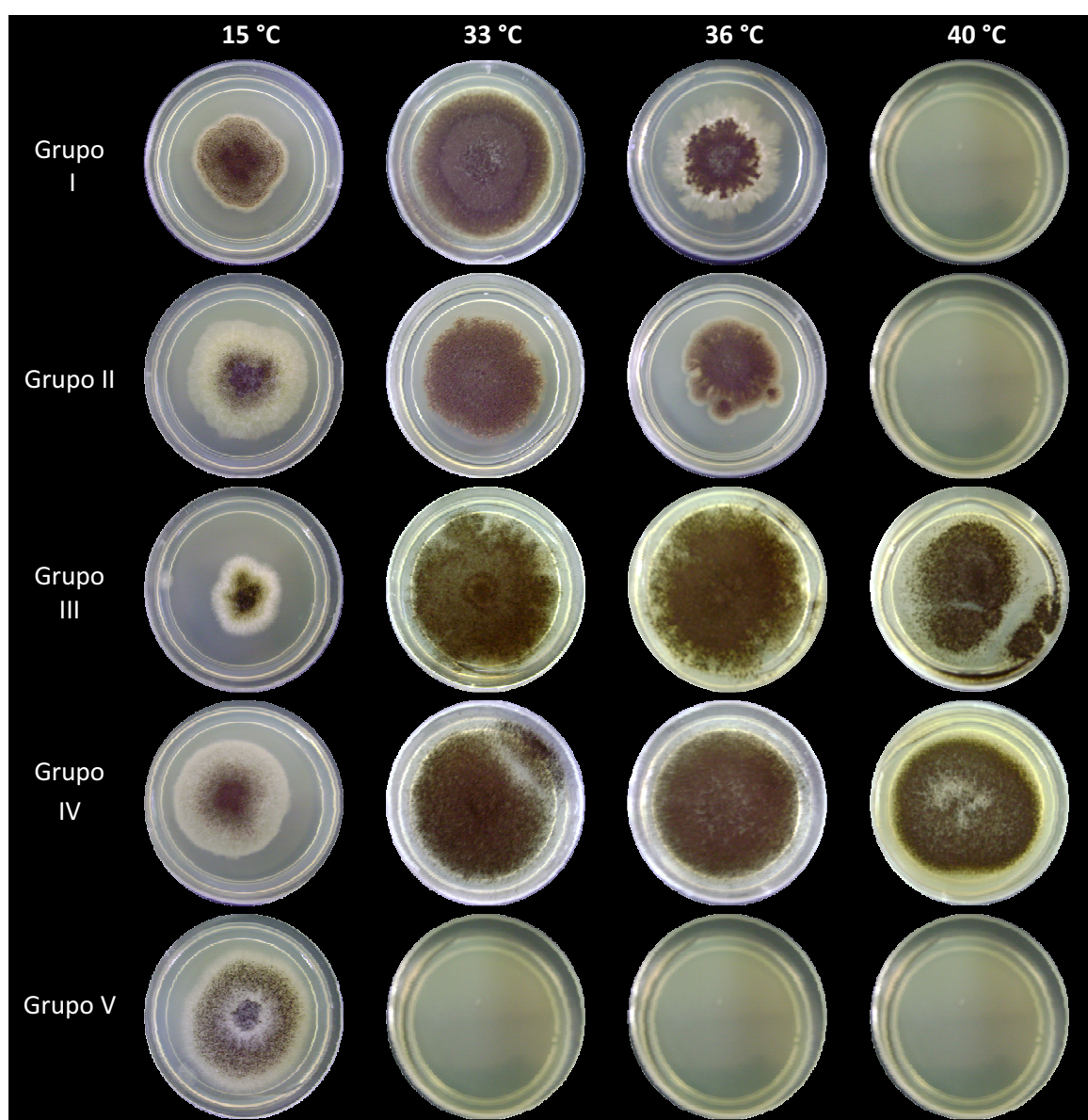
Samson et al. (2007), observaram algumas diferenças entre as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, onde *A. aculeatus* apresentou vesículas maiores variando de (15-) 25-55 (-100) μm em comparação com *A. japonicus* que apresentou vesículas menor variando de 14-30 (-47) μm . Dessa forma, as espécies do Grupo I apresentaram vesículas maiores 30-60 μm , valores estes semelhantes à espécie *A. aculeatus* encontrado por Silva et al. (2011b) e também por Samson et al. (2007). Maciel (2013), estudando este grupo de fungos também agrupou através do dendograma fenotípico as linhagens de *A. aculeatus* e *A. japonicus* no mesmo grupo. Em CYA 37 °C, o crescimento para as linhagens do Grupo I foi de acordo com o encontrado para *A. aculeatus* por Sorensen et al. (2011). Outra característica importante observada por Samson et al. (2007) e Jurjevic et al. (2012) foi a produção de esclerócio também encontrada para esta espécie. O crescimento em CYA 37 °C para a espécie do Grupo II foi de acordo com Noonim et al. (2008), onde este encontrou valores de 22-33 mm para *A. aculeatinus*. Jurjevic et al. (2012), encontrou vesículas ocasionalmente elipsoidal com diâmetro 30-70 μm para esta espécie, valores semelhantes foram encontrados neste estudo, e a produção de esclerócio em forma oval e cor alaranjada, também foi observado por Samson et al. 2007.

As espécies pertencentes ao “*agregado Niger*”, segundo Parenicová et al. (2001) e Varga et al. (2003) são morfológicamente idênticas, no entanto alguns autores descrevem algumas diferenças entres estas espécies como por exemplo, Silva et al. (2011b),

diferenciaram *A. niger* de *A. tubingensis* com base na cor dos esclerócios, que variam de branco a rosa em *A. niger* e preto em *A. tubingensis*. No entanto, Samson et al. (2004), relatam que a produção de esclerócio nem sempre é observada em *A. tubingensis*. Conforme observado no presente estudo, onde não foi encontrado esclerócio para as espécies dos Grupos III ao VI.

4.2.1.1 Crescimento em diferentes temperaturas

Todos os isolados foram incubados em diferentes temperaturas: 15, 33, 36 e 40 °C (Figura 9). Os Grupos I e II são constituídos pelas espécies que cresceram até (36 °C), os Grupos III, IV e VI cresceram até (40 °C), e o Grupo V cresceu apenas em 15 C°.



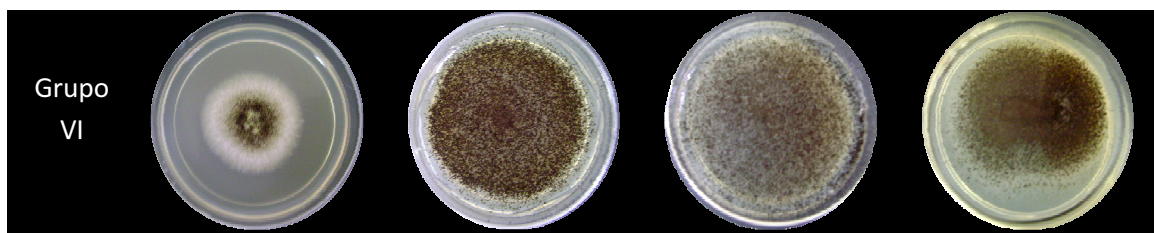


Figura 9. Crescimento dos 42 isolados nas temperaturas 15, 33, 36 e 40 °C em MEA a 10 dias em incubação na ausência de luz.

As temperaturas máximas de crescimento encontradas para as espécies deste estudo foram similares as observadas por Samson et al. (2007) e Meijer et al. (2011), onde as espécies *A. aculeatus* e *A. aculetinus* cresceram até 36 °C, enquanto as espécies do “*agregado Niger*” e *A. lacticoffeatus* cresceram até 40 °C.

4.2.2 Caracterização bioquímica

4.2.2.1 Crescimento no CREA

O meio Sacarose Creatina Agar (CREA) é um meio semi-seletivo útil para a classificação de várias culturas de fungos, portanto, ele foi utilizado para dividir as espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* em grupos de acordo com a capacidade de crescimento e produção de ácido, onde ocorre a alteração da cor do meio de violeta para amarelo.

Pode ser observado na Figura 10, que o Grupo I teve um bom crescimento e uma fraca produção de ácido, os Grupos II, V e VI tiveram um bom crescimento e produção de ácido moderada, os Grupos III e IV tiveram um bom crescimento e uma forte produção de ácido.

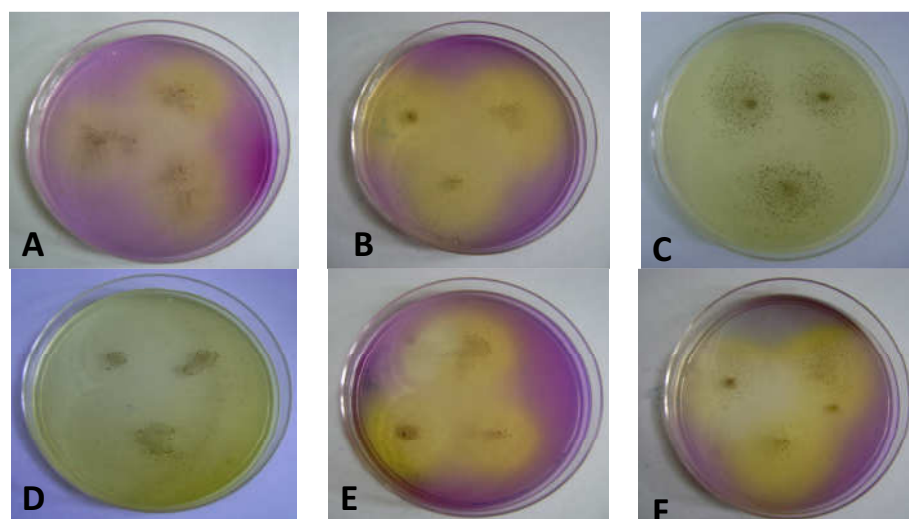


Figura 10. Crescimento no meio CREA em 25 °C a 7 dias de incubação: Grupo I ao VI (A; B; C; D; E; F), respectivamente.

Samson et al. (2007), também observaram produção de ácido no meio CREA limitada pelas espécies *A. aculeatus*, *A. japonicus* e *A. uvarum*. Para *A. niger* e *A. tubingensis* produção de ácido forte, entretanto *A. foetidus* e *A. lacticoffeatus* encontraram boa produção. De acordo

com Silva et al. (2011b), as espécies do “*agregado Niger*” apresentam a maior capacidade de crescimento neste meio em comparação com as outras espécies *Nigri*, bem como boa produção de ácido.

4.2.2.2 Crescimento no MEA-B

Pollastro et al. (2006), desenvolveram este meio semi-seletivo com base no meio MEA alterado com alguns antibióticos e fungicidas. Neste estudo, testou-se a capacidade de crescimento de todas as estirpes de *Aspergillus* seção *Nigri* neste meio MEA-B e os resultados estão apresentados na (Figura 11).

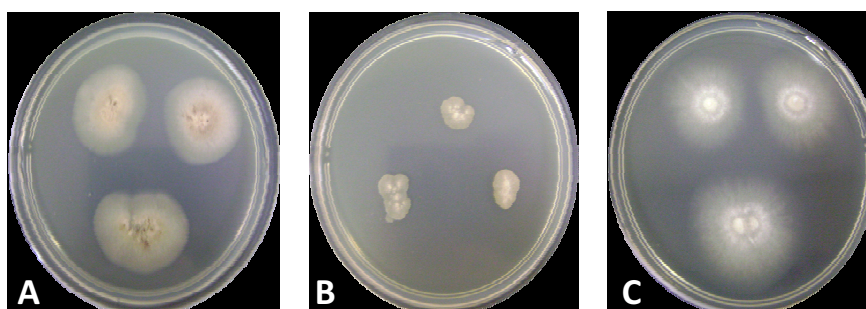


Figura 11. Crescimento no meio MEA-B em 25 °C após 7 dias de incubação: Grupo I (A); Grupo II, III, IV e VI (B) e Grupo V (C).

Grupo I e V tiveram um bom crescimento, porém os grupos II, III, IV e VI não cresceram. Samson et al. (2007), também encontraram resultados negativos para o meio MEA-B para algumas espécies encontradas no presente estudo como: *A. aculeatinus*, *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. lacticoffeatus* confirmando dessa forma que este método é útil para diferenciar as espécies.

4.2.2.3 Reação do Teste de Ehrlich

O teste de Ehrlich detecta alguns metabólitos secundários produzidos por fungos, por reação direta do reagente de Ehrlich com a colônia (FRISVAD; SAMSON, 2004). Todas as estirpes foram examinadas e os resultados mostrados na (Figura 12).

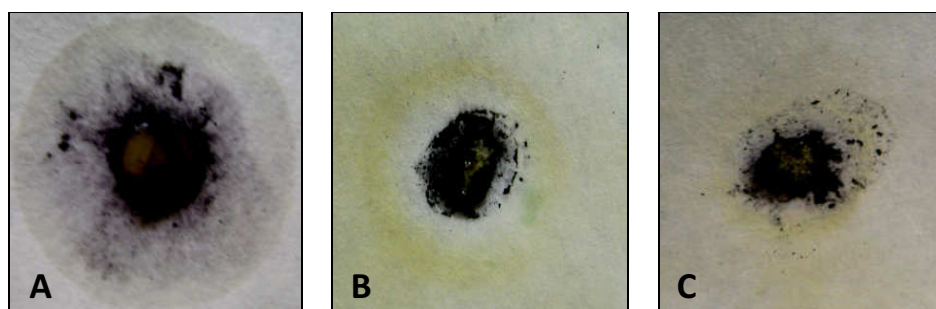


Figura 12. Reação do Teste de Ehrlich: Grupos I, II, III e V (A); Grupo IV (B) e Grupo VI (C).

As espécies dos grupos I, II, III e V apresentaram resultados negativos, ou seja, não formaram um anel amarelado em volta do disco da colônia. E os grupos IV e VI, apresentaram resultados positivos, onde observa-se a formação do anel amarelo ao redor da colônia. Os resultados em questão corroboram com os observados por Samson et al. (2007), onde *A. foetidus* e *A. niger* apresentaram resultados positivos sob a forma de uma reação amarelada ao redor da colônia, e as demais espécies apresentam resultado negativo.

Portanto com base nos caracteres macroscópicos, microscópicos e bioquímicos, os fungos foram identificados como: Grupo I = *A. aculeatus*; Grupo II = *A. aculeatinus*, Grupos III, IV e VI foram classificados como pertencentes ao “*agregado A. niger*”, Grupo III = *A. tubingensis*; Grupo IV = *A. niger* e Grupo VI = *A. foetidus* conforme Samson et al. (2007) e a espécie pertencente ao Grupo V não pôde ser confirmada, pois esta espécie diferiu das demais, mostrando características morfológicas contrastantes, como o não crescimento em CYA a 37° C, o seu crescimento em MEA apenas em 15°C, sugerindo em se tratar provavelmente de um novo táxon.

No entanto, como os fungos da seção *Nigri* são descritos como semelhantes morfológicamente, não se pôde identificar apenas com os dados morfológicos e bioquímicos as espécies isoladas, portanto para uma correta identificação foi realizada a caracterização moleculares.

4.3 Identificação Molecular

4.3.1 Extração de DNA de *Aspergillus* seção *Nigri*

Para a extração de DNA foram utilizados os micélios dos fungos crescidos no meio MEA à 25 °C por 7 dias. O método CIA (item 3.7.1.1) apresentou os melhores resultados, com a obtenção de DNA para 38 dos 42 isolados utilizados. Esse protocolo caracteriza-se por ter um baixo custo e por ser um método rápido. Apesar da realização de quatro protocolos, incluindo o método do Kit comercial, não foi possível obter DNA de boa qualidade para os 4 isolados dos Grupos III ao VI. A dificuldade de extração do DNA para esses quatro isolados, pode estar relacionada com o fato de serem espécies bisseriadas, conforme caracterizado através da identificação morfológica. E essas espécies possuem uma segunda camada de células chamada de métulas, podendo apresentar mais melanina nas paredes das hifas e esporos, dificultando assim a extração. A mesma dificuldade de extração para esse grupo também já foi observada por Bozza, (2010), ao utilizar o método CIA para extração de DNA de 13 isolados da seção *Nigri*, onde apenas 7 tiveram seu DNA extraído por esta técnica.

Dessa forma para esses isolados há necessidade de um trabalho específico para seleção do melhor protocolo para extração de DNA com qualidade suficiente para as análises moleculares.

4.3.2 Amplificação da região ITS do rDNA através de PCR

As regiões ITS1-5,8S- ITS2 e 18S do rDNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador (*Mastercycle 22331 Hamburg Eppendorf AG*), utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4. Todos os 38 isolados apresentaram o mesmo perfil de banda estimado entre 500 a 600 pb (Figura 13. A-C).

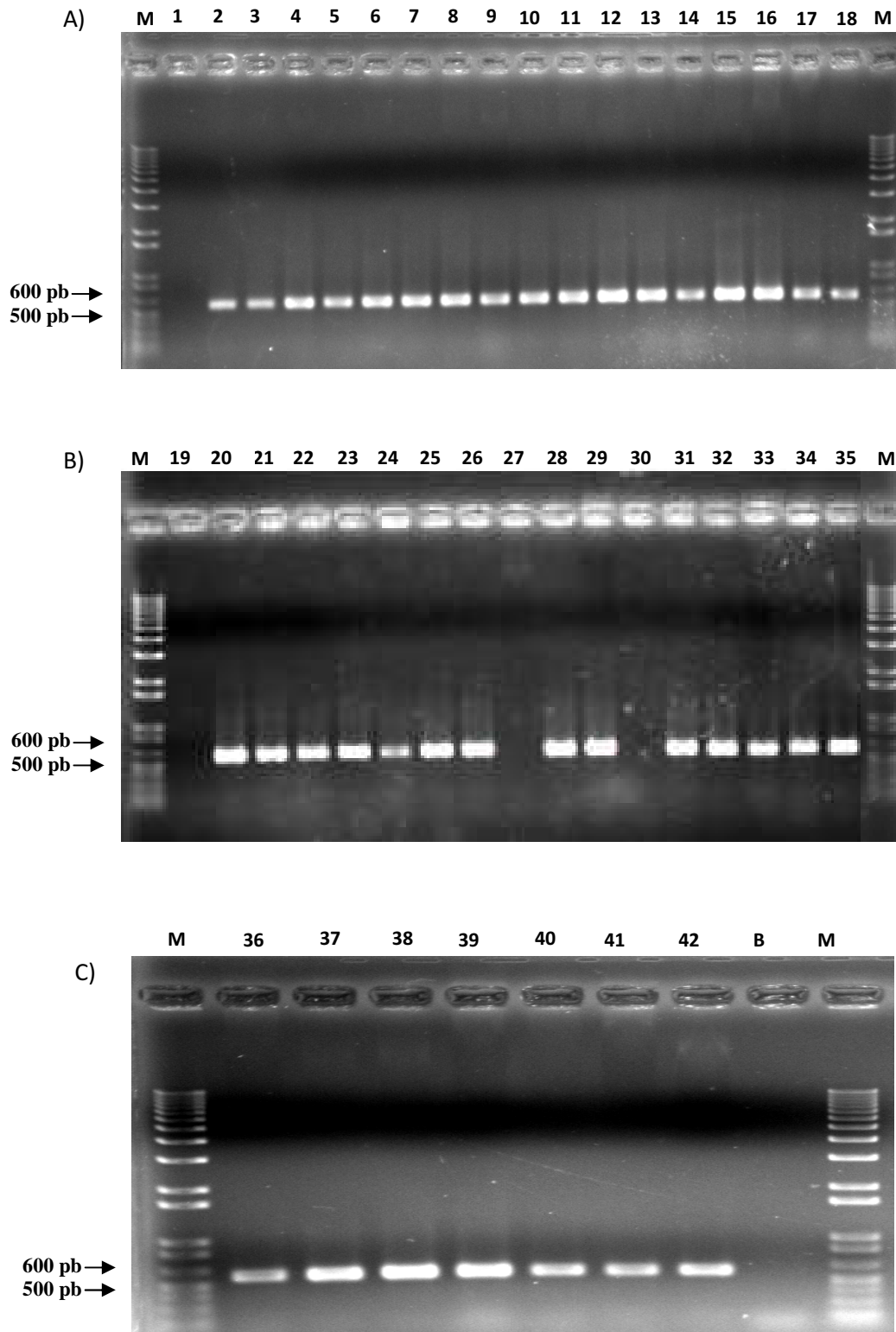


Figura 13. Produtos da amplificação de DNA dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* com iniciadores ITS1 e ITS4. M = Marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). (A,B,C)= Ordem das 42 Amostras em sequência. B = Branco.

4.3.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para a identificação das espécies da seção *Nigri*, as sequências ITS1 e ITS4 foram comparadas com banco de dados do GenBank via BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), usando o software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A árvore filogenética foi construída utilizando algumas sequências do GenBank como base para comparação. *Aspergillus awamori* foi escolhido para comparação entre a seção *Nigri*, e a espécie de *Aspergillus flavus* foi utilizado como grupo externo (Figura 14).

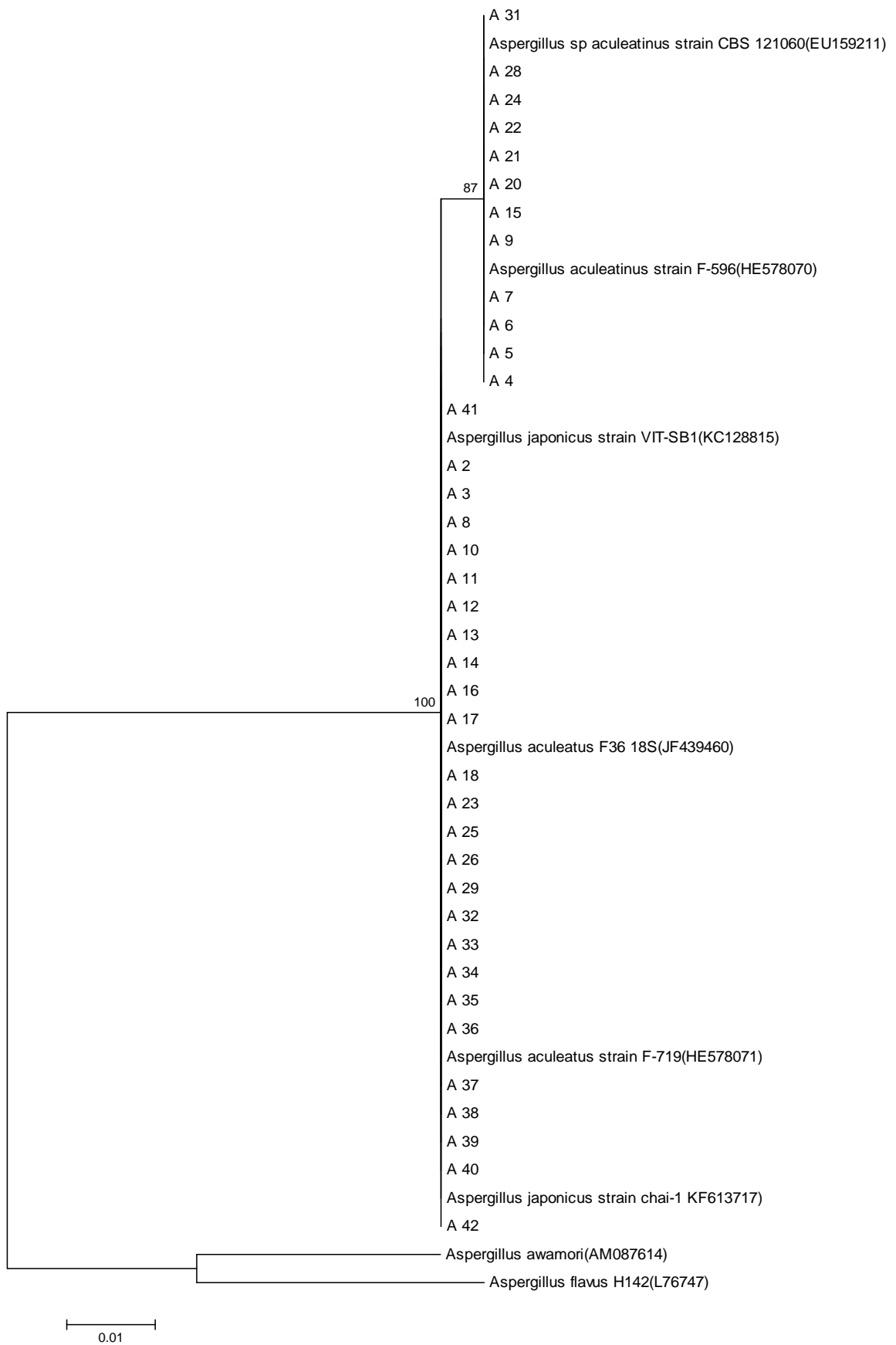


Figura 14. Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* construída pelo método de Neighbor-joining. Valores de bootstrap (n=1000 replicatas). Barra de escala = 0,01 substituições por posição.

Através do alto valor de identidade e similaridade entre as sequências (em torno de 99%), foi possível observar na árvore filogenética a formação de dois grandes grupos: Grupo I, formado por 26 isolados caracterizados como *A. japonicus* e *A. aculeatus*, e o Grupo II, formado por 12 isolados caracterizados como *A. aculeatinus* (Figura 14).

Diversos autores tem utilizado os iniciadores IT1 e ITS4 para posicionamento taxonômico de fungos como Castrillo et al. (2012) que isolaram 14 fungos da Argentina pertencentes ao gênero *Aspergillus* e identificaram algumas espécies da seção *Nigri* utilizando ITS1 e ITS4. Estes autores mostraram que esta seção é composta por dois grupos gerais, um clado contendo *A. aculeatus* e *A. homomorphus* e o outro clado contendo *A. heteromorphus* e *A. niger* que inclui também o clado *A. carbonarius*. Nugroho et al. (2013), utilizando também regiões ITS, identificaram quatro espécies como *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. aculeatus* ao isolar fungos predominantes de grãos de cacau, feijão, café e mandioca da Indonésia.

Apesar de amplamente utilizado, devido ao alto nível de sensibilidade e resolução, os métodos moleculares apresentam alguns problemas no âmbito da seção *Nigri*, devido ao alto nível de similaridade genética entre algumas espécies (RODRIGUES et al., 2011). Para a descrição das espécies e da inferência filogenética, Samson e Varga (2009) recomendaram que pelo menos duas sequências de genes devem ser examinadas, utilizando-se a abordagem de sequências multilocos (MLST). Dessa forma como já observado por Samson et al. (2007), em *Aspergillus* seção *Nigri* todas as espécies devem ser descritas utilizando sequências de outros genes como por exemplo Calmodulina e β -tubulina que possuem locos mais informativos para a classificação e são regiões ideais para a discriminação intra e interespecífica (VARGA et al., 2011). Todavia Sorensen et al. (2011), descrevem a relação das estirpes de *A. aculeatus* e *A. japonicus* com as outras espécies de Black *Aspergillus* usando a abordagem polifásica incluindo ITS, calmodulina e β -tubulina. Esses autores observaram que ocorre um agrupamento separado na árvore de β -tubulina destas duas espécies em relação as outras espécies, e concluíram que este agrupamento é devido ao fato das duas espécies *A. japonicus* e *A. aculeatus* possuírem um intron a menos no gene da β -tubulina em comparação com as outras espécies *Nigri*, como também demonstrado em outras publicações (VARGA et al., 2007; NOONIM et al., 2008; PETERSON, 2008).

Portanto com base no seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS4 os fungos do Grupo I foram identificados como *A. aculeatus* e *A. japonicus* e do Grupo II como *A. aculeatinus*.

4.4 Potencial Enzimático de *Aspergillus* seção *Nigri*

O índice enzimático (IE) é um dos parâmetros semi-quantitativos mais usados para se avaliar a produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. Dessa forma, os isolados que exibirem os maiores IE nos meios de crescimento são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al., 2006). Os autores Lealem e Gashe (1994) estabeleceram $IE \geq 2,00$, denominando o microrganismo como um produtor potencial de enzima em meio sólido. Nesse contexto, os isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* foram avaliados como produtores de celulase, peptidase, amilase, fitase e pectinase.

4.4.1 Análise da enzima celulase

Para a avaliação do potencial de produção da celulase, foram testados 42 isolados de *Aspergillus* seção *Nigri*, destes, 38 produziram celulase, ou seja, 90,4% apresentaram halo de hidrólise cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Produção de celulase por *Aspergillus* seção *Nigri* isolados de serrapilheira e solo, avaliados pelo IE.

Identificação dos fungos	Celulase			Identificação dos fungos	Celulase		
	Øc	Øh	I.E.*		Øc	Øh	I.E.*
A_15	3,83	4,30	1,12 ^c	A_8	3,13	3,87	1,24 ^b
A_4	3,63	4,10	1,13 ^c	A_23	3,07	3,80	1,24 ^b
A_22	3,60	4,07	1,13 ^c	A_29	3,57	4,43	1,24 ^b
A_32	3,63	4,10	1,13 ^c	A_34	3,40	4,27	1,25 ^b
A_26	3,57	4,10	1,15 ^c	A_3	2,90	3,63	1,25 ^b
A_24	3,03	3,50	1,15 ^c	A_20	3,30	4,17	1,26 ^b
A_14	3,23	3,77	1,17 ^c	A_21	3,30	4,17	1,26 ^b
A_7	3,80	4,47	1,17 ^c	A_41	3,43	4,37	1,27 ^b
A_40	3,70	4,37	1,18 ^c	A_28	2,77	3,50	1,28 ^b
A_6	3,63	4,30	1,18 ^c	A_11	3,33	4,27	1,28 ^b
A_12	3,00	3,53	1,18 ^c	A_18	3,23	4,17	1,29 ^b
A_39	3,63	4,30	1,18 ^c	A_2	2,57	3,30	1,29 ^b
A_5	3,60	4,27	1,18 ^c	A_16	2,80	3,67	1,31 ^b
A_35	3,57	4,23	1,19 ^c	A_42	3,10	4,23	1,36 ^a
A_17	3,37	4,03	1,20 ^c	A_13	2,57	3,50	1,37 ^a
A_10	3,27	3,93	1,20 ^c	A_9	2,63	3,57	1,38 ^a
A_25	3,53	4,27	1,21 ^c	A_36	2,67	3,67	1,38 ^a
A_31	3,53	4,27	1,21 ^c	A_1	-	-	-
A_38	3,57	4,33	1,21 ^c	A_19	-	-	-
A_37	3,33	4,07	1,22 ^c	A_27	-	-	-
A_33	3,17	3,90	1,23 ^b	A_30	-	-	-

Øc = diâmetro da colônia (cm); Øh = diâmetro do halo (cm); IE = índice enzimático; (-) = não cresceu e/ou não produziu halo.

Média Geral	1,23
**CV(%)	4,71

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

A análise estatística da produção de celulose mostrou que houve diferença entre os índices enzimáticos dos isolados analisados, formando-se três diferentes grupos (a-c). Quatro isolados se destacaram dos demais em relação ao índice enzimático: A_42 com 1,36; A_13

com 1,37; A_9 e A_36 com 1,38, e os que apresentaram resultado negativo foram A_1; A_19; A_27 e A_30 (Tabela 7).

A avaliação positiva pode ser observada pela formação de halos translúcidos ao redor da colônia, indicativos da degradação da carboximetilcelulose (CMC) (Figura 15).

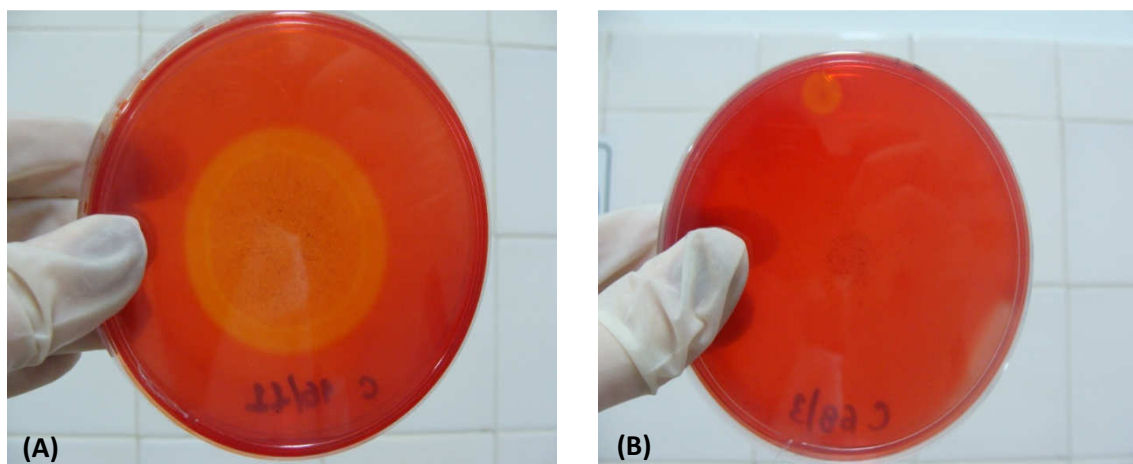


Figura 15. Observação das placas com Meio CMC com Vermelho Congo 1%. (A) Formação do halo de degradação pelo isolado A_38; (B) Isolado A_19 não produziu halo de degradação.

De acordo com Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), índices enzimáticos em torno de 1,6 são valores encontrados em fungos do gênero *Aspergillus* sp, onde esse índice pode ser utilizado como uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie. Estes mesmos autores, avaliaram a atividade de celulase de fungos isolados do solo e observaram que 45% dos isolados apresentaram atividade positiva, pois houve a formação do halo, indicando a degradação do meio, entretanto a espécie *Aspergillus niger* obteve valor de IE = 1,4, próximo aos valores encontrados no nosso estudo para as espécies da seção *Nigri*, entretanto para a espécie sugerida como *A. niger* (A_19) não houve produção da enzima.

A atividade carboximetilcelulolítica, registrada neste trabalho é semelhante aos resultados de Escobar et al. (2007), que também observaram produção da enzima celulase, determinada pelo índice enzimático, pelas espécies da seção *Nigri* como por exemplo *A. awamori*, com exceção de *A. niger* que apresentou resultado positivo. Fernandes (2009), testou 24 fungos isolados de diversas fontes para a detecção de celulases, dentre estes, 9 pertenciam ao gênero *Aspergillus* seção *Nigri*: *A. carbonarius* IE = 1,4 e 1,14; *A. niger* IE = 1,10 e 1,27; *A. foetidus* IE = 1,13 e 1,16; *A. niger agregados* IE = 1,11, onde estes últimos valores de IE foram próximos aos encontrados no presente estudo. Agustini et al. (2012) também realizaram teste qualitativo de produção de celulase, utilizando meio CMC em 553 isolados, contendo fungos e bactérias, e encontraram a espécie *Aspergillus niger* como produtor de celulase, onde índices celulolíticos variaram de 1 a 3,36 com todos os micro-organismo. Monteiro et al., (2012), selecionaram isolados produtores de celulase pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre os 135 isolados testados, apenas vinte foram produtores, e os cinco isolados que se destacaram quanto à produção qualitativa de celulase, pertencem ao gênero *Aspergillus*.

Nesse contexto, de acordo com a literatura, é notório que grande parte das espécies testadas para produção de celulase, apresentam atividade enzimática, principalmente espécies do gênero *Aspergillus*, devido ao fato destes fungos terem, frequentemente, como *hábitat*, materiais lignocelulolíticos (PEREIRA, 2012). Entretanto, poucos apresentam grande atividade celulolítica como os avaliados neste estudo.

4.4.2 Análise da enzima peptidase (protease)

A tabela 8 evidencia os resultados da produção de peptidase, nota-se que houve diferença significativa entre as médias analisadas ocorrendo a separação de seis grupos diferentes (a-e) com a variação do IE entre 1,15 a 1,40. Os isolados que apresentaram maiores índices foram: A_1 e A_27 com 1,40 e A_19 e A_30 com 1,34. Nenhum isolado apresentou resultado negativo.

Tabela 8. Produção de peptidase por *Aspergillus* seção *Nigri* isolados de serrapilheira e solo, avaliados pelo IE.

Identificação dos fungos	Peptidase (Protease)			Identificação dos fungos	Peptidase (Protease)		
	Øc	Øh	I.E.*		Øc	Øh	I.E.*
A_40	6,67	7,73	1,15 ^e	A_31	6,73	8,27	1,22 ^d
A_29	6,6	7,67	1,16 ^e	A_32	5,57	6,83	1,23 ^d
A_36	6,67	7,73	1,16 ^e	A_10	6,47	8	1,23 ^c
A_26	6,47	7,53	1,16 ^e	A_28	7,07	8,73	1,23 ^c
A_41	6,07	7,07	1,16 ^e	A_20	7,03	8,77	1,24 ^c
A_35	6,97	8,17	1,17 ^e	A_25	5,43	6,77	1,24 ^c
A_6	7,5	8,83	1,17 ^e	A_42	7	8,73	1,25 ^c
A_34	6,83	8,1	1,18 ^e	A_21	7,03	8,77	1,25 ^c
A_8	6,17	7,3	1,18 ^e	A_33	5,8	7,27	1,25 ^c
A_12	6,83	8,1	1,18 ^e	A_3	5,97	7,5	1,25 ^c
A_17	5,7	6,77	1,18 ^e	A_18	5,37	6,77	1,26 ^c
A_24	6,67	8	1,20 ^d	A_14	5,63	7,1	1,26 ^c
A_23	5,6	6,73	1,20 ^d	A_39	5,63	7,1	1,26 ^c
A_2	6,5	7,83	1,20 ^d	A_37	6,33	8	1,26 ^c
A_9	7,03	8,5	1,21 ^d	A_22	6,9	8,83	1,28 ^c
A_16	6,07	7,33	1,21 ^d	A_5	6,77	8,7	1,28 ^c
A_38	6	7,27	1,21 ^d	A_13	5,53	7,1	1,29 ^c
A_4	6,87	8,33	1,21 ^d	A_19	6,1	8,17	1,34 ^b
A_7	7,2	8,73	1,21 ^d	A_30	6,2	8,33	1,34 ^b
A_15	6,97	8,5	1,22 ^d	A_27	6,0	8,35	1,40 ^a
A_11	5,93	7,27	1,22 ^d	A_1	5,3	7,43	1,40 ^a

Øc = diâmetro da colônia (cm); Øh = diâmetro do halo (cm); IE = índice enzimático;

Média Geral	1,22
**CV(%)	2,24

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

A zona clara ao redor da colônia corresponde ao halo indicador da degradação da enzima peptidase (Figura 16).

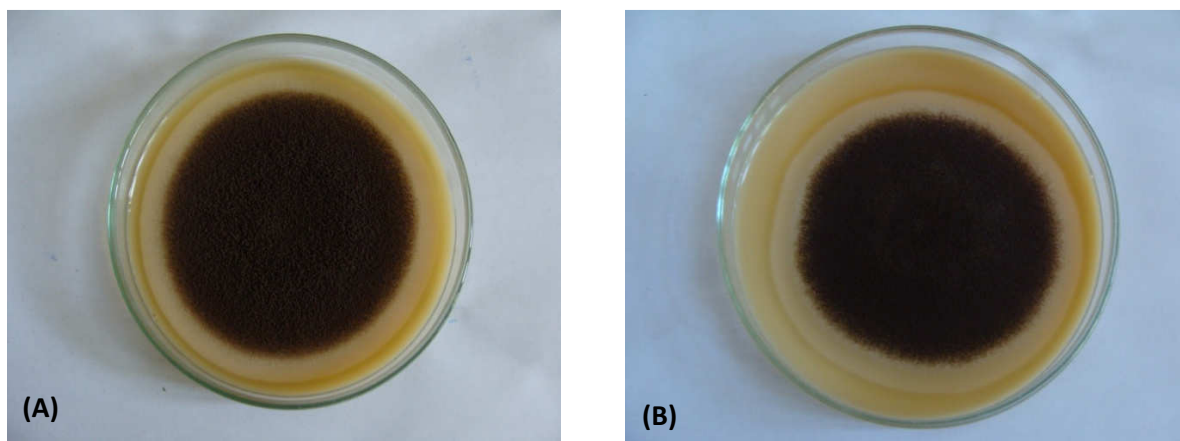


Figura 16. Teste semiquantitativo de produção da enzima peptidase. Formação do halo de degradação pelos isolados (A) A_4; (B) A_33.

Segundo Fernandes (2009) e Schuster et al. (2002), o fungo estudado *A. niger* não produziu halo de degradação indicativo para a determinação proteolítica, diferentemente do presente estudo onde as espécies da seção *Nigri* produziram halo de degradação porém com valores de $IE \leq 2,0$. Pereira (2012), também observou produção da enzima protease ao analisar 40 isolados que pertenciam à Micoteca do Ecocentro/EPAMIG e do Laboratório de Micotoxinas e Micologia da UFLA, destes, 6 pertenciam ao gênero *Aspergillus* onde estes apresentaram os mesmos resultados, $IE \leq 2,0$, não havendo valores maiores para este gênero. Diferentemente do que ocorreu com Sohail et al. (2009), onde obtiveram 81% de fungos produtores de proteases dos 160 isolados, e dentre estes fungos as espécies *A. niger* e *A. flavus* foram consideradas potenciais produtores de enzimas proteolíticas. Galvão et al. (2013), avaliaram um total de 38 isolados do solo, quanto a produção da enzima peptidase, sendo 17 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 21 de *Penicillium*, os isolados do gênero *Penicillium* apresentaram bons índices enzimáticos para protease enquanto que entre as espécies de *Aspergillus* apenas o *Aspergillus versicolor* foi capaz de degradar esta enzima.

4.4.3 Análise da enzima amilase

Para a avaliação do potencial de produção da enzima amilase foram testados 42 isolados de *Aspergillus* seção *Nigri*, desse total, 100 % apresentaram halo de hidrólise, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Produção de amilase por *Aspergillus* seção *Nigri* isolados de serrapilheira e solo, avaliados pelo IE.

Fungos	Amilase			Identificação dos fungos	Amilase		
	Øc	Øh	I.e.*		Øc	Øh	IE*
A_26	4,6	5,2	1,14 ^b	A_8	3,9	4,8	1,22 ^a
A_29	4,2	4,9	1,15 ^b	A_14	3,8	4,7	1,23 ^a
A_40	4,2	4,8	1,16 ^b	A_41	3,8	4,7	1,23 ^a
A_2	4,1	4,8	1,16 ^b	A_22	4,6	5,6	1,23 ^a
A_12	4,5	5,3	1,16 ^b	A_3	3,2	3,9	1,23 ^a
A_38	4,0	4,7	1,16 ^b	A_34	4,0	4,9	1,23 ^a
A_4	4,1	4,8	1,16 ^b	A_21	3,6	4,5	1,24 ^a
A_32	4,0	4,7	1,17 ^b	A_10	3,6	4,5	1,24 ^a
A_13	3,8	4,4	1,17 ^b	A_11	3,8	4,8	1,24 ^a
A_16	4,2	4,9	1,18 ^b	A_28	4,6	5,7	1,24 ^a
A_7	4,5	5,3	1,18 ^b	A_37	3,5	4,4	1,25 ^a
A_18	4,0	4,8	1,18 ^b	A_15	4,2	5,3	1,25 ^a
A_1	3,7	4,3	1,18 ^b	A_30	4,5	5,6	1,25 ^a
A_25	3,9	4,6	1,19 ^b	A_31	3,5	4,3	1,25 ^a
A_33	3,9	4,6	1,19 ^b	A_20	4,2	5,3	1,25 ^a
A_24	3,5	4,1	1,19 ^b	A_19	4,2	5,2	1,26 ^a
A_36	4,4	5,3	1,19 ^b	A_39	3,6	4,5	1,26 ^a
A_35	3,3	3,9	1,20 ^b	A_6	4,8	6,1	1,26 ^a
A_9	4,1	4,9	1,21 ^a	A_23	3,5	4,4	1,27 ^a
A_17	3,2	3,8	1,22 ^a	A_5	4,1	5,2	1,28 ^a
A_42	4,7	5,8	1,22 ^a	A_27	3,9	5,0	1,28 ^a

Øc = diâmetro da colônia (cm); Øh = diâmetro do halo (cm); IE = índice enzimático;

Média Geral	1,21
CV(%)	3,59

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

** CV= Coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

Através do teste estatístico para a enzima amilase, pode ser observado na Tabela 9, que houve uma pequena diferença entre as médias, formando-se dois grupos (a e b), porém não houve nenhum isolado que se destacou. Todos os resultados indicaram que as linhagens testadas são capazes de degradar o amido presente no meio de cultivo quando na ausência de glicose, porém nenhuma linhagem apresentou potencial enzimático, pois não atingiram o $IE \geq 2,0$.

A zona amarelada ao redor da colônia corresponde ao halo indicador da degradação da enzima amilase (Figura 17).

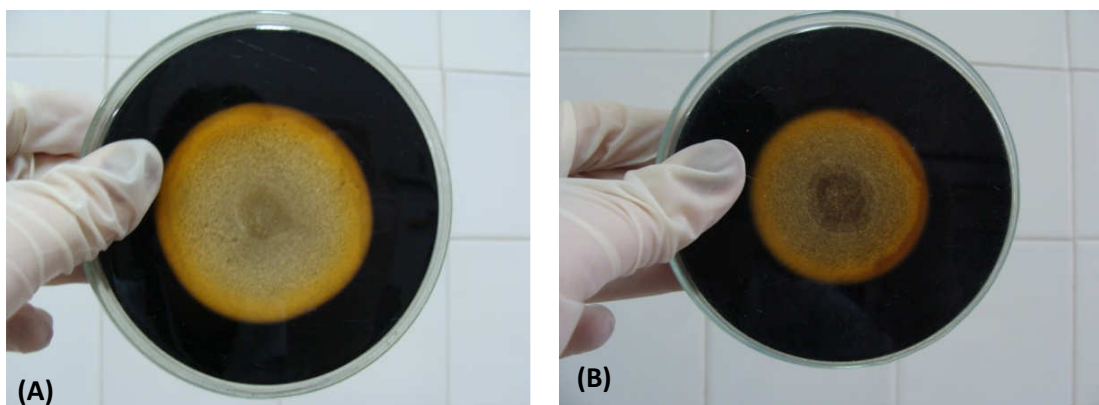


Figura 17. Teste semiquantitativo de produção da enzima amilase após revelação com solução de iodo 0,1%. Formação do halo de degradação pelos isolados (A) A_29; (B) A_39.

Teixeira (1994), constatou que os maiores halos de atividades enzimáticas foram produzidos por *A. niger* para amilases, celulasas, e pectinases. Moraes (2004), também observou que *A. niger* foi capaz de degradar α -amilase. Porém estes resultados não foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Das 34 espécies testadas, onde se encontra espécies de *Aspergillus*, por Gopinath et al. (2005) para a produção de amilase, 22 não apresentaram nenhuma atividade enzimática, 9 apresentaram baixa atividade e 3 apresentaram atividade de moderada a alta. Silva et al. (2006), não encontraram atividade amilolítica em nenhum dos 29 isolados de *Aspergillus* analisados. Soares et al. (2010), analisando linhagens mutantes do fungo *Aspergillus nidulans*, observaram halos pequenos, menores que 2,0. Pereira (2012), também estudou o gênero *Aspergillus* para a produção de amilase, entretanto, não foram produtores desta enzima pelas metodologias testadas. Desse modo, estes trabalhos corroboraram em partes com os resultados apresentados no presente trabalho, pois afirmam que a produção de amilase por *Aspergillus*, em meio de cultura sólido, pode não ser positiva ou ser de baixa atividade amilolítica.

4.4.4 Análise da enzima fitase

Todos os isolados apresentaram crescimento no meio (PIKOVSKAYA, 1948), seletivo para fitase, apresentando um diâmetro médio da colônia de 70 mm, porém não houve a formação do halo de degradação. Dessa forma, não foi possível medir os índices enzimáticos dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* (Figura 18).

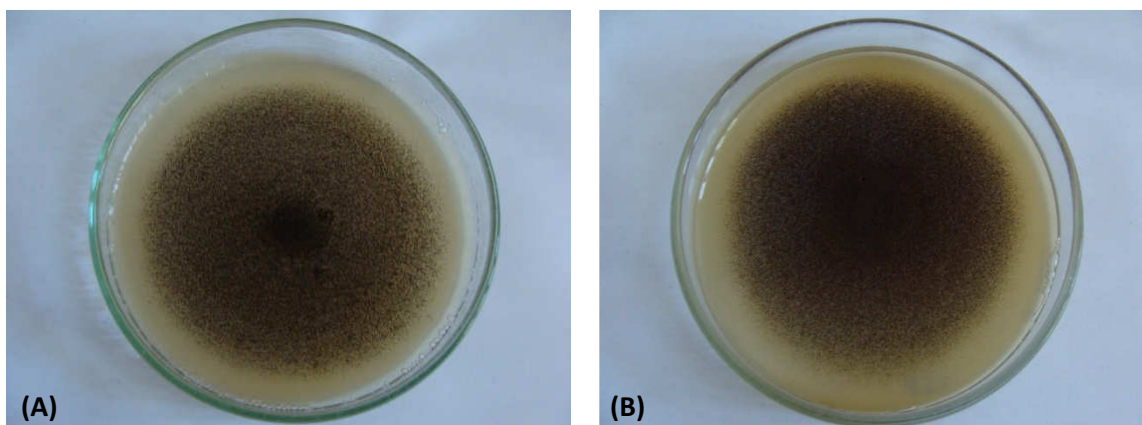


Figura 18. Teste semi-quantitativo de produção da enzima fitase (A e B). Não houve produção do halo de hidrólise, isolado A_35, porém o resultado foi positivo para a produção da enzima.

A não formação do halo de degradação pode ser devido ao amplo crescimento do fungo neste meio de cultura, após 5 dias de incubação, pois os fungos apresentaram colônia com diâmetro próximo ao tamanho da placa de Petri.

Entretanto, conforme Castro e Pereira Jr. (2010), a visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura, algumas substâncias químicas podem interferir no corante proporcionando falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos.

Dessa forma, Queiroz et al. (2009), estudaram 22 espécies do gênero *Aspergillus* da coleção URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco para a seleção de microrganismos produtores de fitase através do *screening* e posterior produção por fermentação. Os microrganismos passaram por uma seleção em meio seletivo contendo fitato de sódio como única fonte de carbono e fósforo, e eles encontraram que todas as espécies de *Aspergillus* apresentaram crescimento no meio seletivo para fitase. E a espécie que obteve maior crescimento foi *Aspergillus japonicus* que apresentou um diâmetro da colônia de 60 mm com 6 dias de incubação considerado o maior diâmetro, portanto estes resultados corroboram com os apresentados no presente estudo. Estes autores também observaram que no decorrer da produção da fitase o micro-organismo catalisava o fitato de sódio, e assim o meio seletivo apresentava halo transparente. Podendo ser uma explicação para a não formação do halo neste estudo.

Tavares et al. (2012), isolaram linhagens de leveduras e fungos de amostras do solo da Região Amazônica e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UNICAMP, e determinaram a capacidade de produção de fitase destas culturas. Para isso, os microrganismos foram testados qualitativamente em meio seletivo. Neste estudo foi possível identificar 8 colônias de fungos que possuem uma potencialidade na produção de fitase extracelular, sendo um deles identificado como do gênero *Aspergillus* e dois deles do gênero *Penicillium*. Estes autores comprovam a grande capacidade dos fungos do gênero *Aspergillus* em produzir a enzima em questão, como observado também pelos resultados deste trabalho, apesar da não obtenção de evidências para a diferenciação de qualquer linhagem que tivesse melhor atividade enzimática em relação às demais.

4.4.5 Análise da enzima pectinase

As 42 linhagens não cresceram e também não apresentaram halo de hidrólise indicativo da atividade de pectinase, conforme Figura 19.

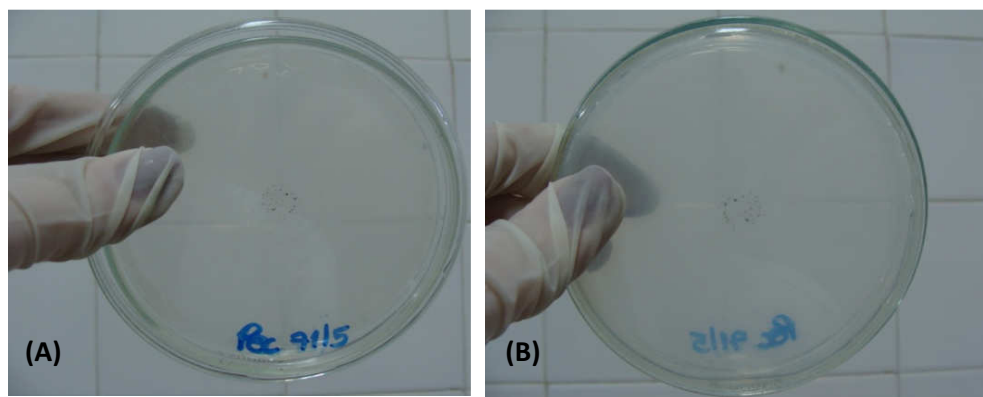


Figura 19. Teste semi-quantitativo de produção da enzima pectinase. Não houve crescimento e nem produção do halo de hidrólise. (A) Verso da placa isolado A_30; (B) Reverso da placa isolado A_30.

Oliveira et al. (2006), avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por isolados de rizóbios nativos da Amazônia Central. De um total de 67 isolados testados, 22 revelaram atividade amilolítica (32,8%); 19 proteolítica (28,4%); seis carboximetilcelulolítica (9,0%); quatro lactolítica (6,0%); três lipolítica (4,5%); e 14 isolados exibiram atividade ureolítica (20,9%). Porém, de acordo com o resultado encontrado, estes autores também não observaram a produção de pectinase em nenhum dos isolados de rizóbia testados, eles propõem que em função da reduzida atividade pectinolítica nos isolados de regiões tropicais, seja mais difícil sua observação em meio sólido.

Resende et al. (2009), também avaliaram semi-quantitativamente, a atividade pectinolítica de diferentes espécies de fungos filamentosos isolados de grãos de café, porém dos 158 fungos testados, apenas 11,39% apresentaram atividade pectinolítica, destes 18 apresentaram atividade pectinolítica ≥ 2 e 34,17% não apresentaram atividades pectinolíticas, estão representados pelas seguintes espécies: *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. sclerotiorum*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. ostianus* e “agregado *A. niger*”, entretanto 53,79% dos fungos foram produtores de enzimas pécticas, embora nenhum deles tenha apresentado atividade enzimática superior a 2, são eles: espécies de “agregado *A. niger*”, *A. ochraceus*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. wentii*, *A. tubingensis*, *A. sydowii*, *A. ostianus*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. westerdijkiae*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *Eurotium chevalieri*, *Penicillium* sp., *Penicillium funiculosum*, *P. hirsutum*, *P. roquefortii*. Fernandes e Chalfoun (2010) avaliaram o potencial de fungos filamentosos quanto à produção de poligalacturonases (pectinases), as espécies de *Aspergillus* também não atingiram o IE igual ou superior a 2,0.

Pereira (2012), testou duas metodologias para a produção de pectinase (HANKIN et al., 1971) e (MCKAY, 1988), a primeira houve baixa sensibilidade à detecção da enzima, ocorrendo assim baixos resultados, onde o valor de IE dos fungos *Aspergillus* foi de 1,3 a 1,6, comparado com a segunda metodologia IE foi de 1,6 a 4,8. No entanto, assim como os resultados obtidos no presente estudo, os trabalhos acima mostraram baixa ou nenhuma atividade de pectinase por fungos do gênero *Aspergillus*. Diferentemente dos estudos

realizados por Sandri (2010) onde avaliou 60 isolados fúngicos de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, com relação a formação de halo de degradação de pectina em meio sólido, teste semi-quantitativo e posterior produção por fermentação. Os dados mostraram que dos 30 isolados de *Aspergillus niger* apenas 6 não formaram halo de hidrólise, e o valor de IE variou de 1,2 a 2,8, e para a espécie de *Aspergillus oryzae* 5 não degradaram a pectina cítrica em meio sólido e o valor de IE foi de 1,2 a 3,6.

De acordo com os resultados aqui apresentados verificou-se neste experimento que para todas as enzimas testadas nenhum fungo isolado apresentou potencial enzimático, pois não conseguiram atingir o $IE \geq 2,00$. Dessa forma os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos micro-organismos (LIN et al., 1991). Deve-se salientar que a habilidade de um fungo em produzir enzimas varia entre espécies, como também entre isolados de uma mesma espécie e é bastante variável (GRIFFIN, 1994).

Inúmeros fatores de natureza biológica ou físico-química, como pH e temperatura, podem influenciar no número e atividade enzimática dos micro-organismos (SANOMIYA; NAHAS, 2003; MACCHERONI JR et al., 2004).

A ausência de atividade, como ocorreu com a enzima pectinase, pode ser atribuída à incapacidade de secreção, ao direcionamento da produção ao metabolismo intracelular ou à insuficiência dos métodos de detecção (VASCONCELOS et al., 2003). O halo para ser visualizado depende de diversos fatores: além dos parâmetros físicos e químicos há a interferência da presença de outras substâncias presentes no meio que podem originar resultados positivos pela reação com os corantes, ou negativos, por precipitar o corante e ainda por inibir a ligação da enzima com o substrato (COLEN, 2006).

De acordo com Ten et al. (2004), o diâmetro do halo de hidrólise é útil para auxiliar a seleção de cepas com altos níveis de atividade de degradação de polissacarídeos, onde o índice enzimático é utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial produção de enzimas.

Perreira (2012) afirma que a avaliação qualitativa da produção de enzimas, muitas vezes, não corresponde à produção real, sendo necessária a análise quantitativa para a avaliação correta.

Portanto, sugere-se, que estudos mais detalhados com as linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* sejam realizados, através de outros testes laboratoriais, para verificar melhor o potencial enzimático de tais linhagens.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Foram caracterizados 42 fungos de *Aspergillus* seção *Nigri* isolados de serrapilheira e solo do Bioma Mata Atlântica, sendo encontrado a maior porcentagem destes fungos no solo, na profundidade de 5-10 cm.
- ✓ Dentre os fungos isolados nos períodos chuvoso e seco, 92,8%, foi encontrado no período chuvoso, pois neste período foram encontradas temperaturas mais elevadas bem como maior umidade do solo, propiciando boas condições para os *Aspergillus* da seção *Nigri*.
- ✓ Dos 42 isolados, 26 foram identificados como sendo *Aspergillus aculeatus*, pertencente ao Grupo I, e 12 como sendo *Aspergillus aculeatinus* pertencente ao Grupo II, através da caracterização morfológica, bioquímica e molecular;
- ✓ A identificação morfológica e bioquímica sugere que as espécies dos Grupos III, IV e VI sejam caracterizados como pertencentes ao “*agregado Niger*”: Grupo III = *Aspergillus tubingensis*, Grupo IV = *Aspergillus niger* e Grupo VI = *Aspergillus foetidus*;
- ✓ O protocolo de extração de DNA realizado através do método CIA não foi eficiente para todos os isolados de *Aspergillus* da seção *Nigri*, onde 38 espécies (Grupos I e II) foram identificadas através da análise molecular, e 4 espécies (Grupos III ao VI) apenas pela análise morfológica e bioquímica o que sugere que espécies destes grupos são distintas das demais.
- ✓ A espécie do Grupo V não pôde ser identificada.
- ✓ Quanto ao perfil enzimático, 90,4% dos isolados produziram celulase, 100% produziram peptidase, amilase e fitase e nenhum isolado produziu pectinase.
- ✓ As espécies bisseriadas (Grupo III ao VI), 9,6% não produziram celulase.
- ✓ De acordo com o teste semi-quantitativo através do índice enzimático nenhuma espécie foi considerada potencialmente produtora para as enzimas testadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI F, C. J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.
- ABBASI, H.; SHAFIGHZADEH, H.; RAHIMI, A. Continuous production of polygalacturonases (PGases) by *Aspergillus awamori* using wheat flour in surface culture fermentation. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2011.
- AGBLERVOR, F. A.; WEBER J. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 669-679, 2004.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná.
- AGUSTINI, L.; EFIYANTI, L.; FAULINA, S. A.; SANTOSO, E. Isolation and Characterization of Cellulase and Xylanase-Producing Microbes Isolated from Tropical Forests in Java and Sumatra. **International Journal of Environment and Bioenergy**, Florida, USA, v. 3, n. 3, p. 154-167, 2012.
- AL-MUSALLAM, A. (1980). **Revision of the black *Aspergillus* species**. Ph.D. Thesis, Utrecht, The Netherlands.
- ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n.3, p. 249-253, 2002.
- BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 12, n. 4, p. 266-271, 1990.
- BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba- SC, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- BARTHIAR, S.; ANDERSSON, A. G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 525-531, 2002.
- BCC RESEARCH – MARKET FORECASTING. 2011. **Enzymes in Industrial Applications: Global Markets**. Disponível em <http://www.bccresearch.com/report/BIO030F.html>. Acesso: 16 dez. 2013.

BECKER, N. B.; BARATTO, C. M.; GELINSKI, J. M. L. N. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. **Evidência**, v. 9, n. 1-2, p. 67-82, 2009.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

BELLÍ, N. et al. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 541-546, 2004.

BENNETT, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 5-12, 2009. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/13693780802712515>. Acesso em: 10 dez. 2013.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. ***Aspergillus: Molecular Biology and Genomics***. Caister Academic Press, Portland, 2010. p. 1-17.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. (3/4), p. 583-620, 1997.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BLANCO, C. G. **Guignardia citricarpa Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. 1999. 200p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BOHN, L.; MEYER, A.; RASMUSSEN, S. Phytase: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, p. 165-191, 2008.

BON, E. P. S.; PEREIRA, J. R. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

BON, E. P.; VERMELHO, A. B. **Queratinases. Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. 1ªed., Rio de Janeiro, Legis Summa, 2004.

BORGES, L. R.; LAZZARI, S. M. N.; PIMENTEL, I. C.; NOVA, M. X. V. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 185-194, 2011.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ/USP, Piracicaba.

BRANDON, K.; DA FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; DA SILVA, J. M. C. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p 1-7, 2005.

BRUHLMANN, F.; LEUPIN, M.; ERISMANN, K.H.; FIECHTER, A. Enzymatic egumming of ramie bast fibers. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 43-50, 2000.

BURKE, J. D.; MICHAEL, A. B; WEINTRAUB, N.; CHARLOTTE, C.; HEWINS, R. Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 43, n.4, p. 795-803, 2011.

BUSCOT, F. What are soils? **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**. Heidelberg: Springer Verlag, 2005. p. 3-18.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 752.

CANNON, P. F. Strategies for rapid assessment of fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 669-680, 1997.

CARVALHO, V.G. **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica**. 2012. 204p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba/SP.

CASTRILLO, M. L.; FONSECA, M. I.; BICH, G. A.; JERKE, G.; HORIANSKI, M. A.; ZAPATA, P. D. Taxonomy and phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from yerba mate in misiones (Argentina). **Journal of Basic & Applied Genetics**, v. 23, n. 2, p. 1-9, 2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 1-12, 2010.

CELESTINO, S. M. C. et al,. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33-42, 2006.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. Second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 2002.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

COOK, P. E.; CAMPBELL, P. G. *Aspergillus* and fermented foods. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J.F. (eds). **The genus *Aspergillus*: from taxonomy and genetics to industrial application**. Plenum, New York, p 171-188, 1994.

CORNELIS, P. Microbial amylases. **Microbial Sciences**, v. 4, n. 11, p. 342-343, 1987.

CUOMO, C. A.; BIRREN, B. W. The Fungal Genome Initiative and lessons learned from genome sequencing. **Methods in Enzymology**, Guide to Yeast Genetics and Molecular Cell Biology, v. 470, n.34, p. 833-855, 2010.

DACHOUPAKAN, C.; RATOMAHENINA, R.; MARTINEZ, V.; GUIRAUD, J. P.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 14-23, 2009.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DEBNATH, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 180-187, 2005.

DE OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C., GOMES, E. A., LANNA, U. G. P., AS, N. M. H.; MARRIEL, I. E. **Otimização da metodologia de extração e amplificação do DNA de fungos do solo**. 2005. Circular Técnica (69) (INFOTECA-E). Sete Lagoas Embrapa Milho e Sorgo, 2005. p. 1-6. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 1 ed. Disponível em: www.infoteca.cnptia.embrapa.br/doc/489283. Acesso em: 3 dez. 2013.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases. **Industrial Crops and Products**, Budapest, v. 20, p. 11-21, 2004.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. Bancos Genéticos de Plantas, Animais e Microrganismos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 13 p. 34- 37, 2000.

DUTRA, P. F. F. et al. Levantamento da diversidade da microbiota fúngica de solo em matas de galeria da reserva biológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus Campo Grande. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 7., 2005, Caxambu. **Anais...** Caxambu: [s.n.], 2005.

EGLI, I.; DAVIDSSON, L.; JUILLERAT, M. A.; BARCLA, D. R.F. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 3484-3488, 2002.

ESCOBAR, I.; SANTOS, V.; VERAS, F.; ARAUJO, H.; MOTTA-SOUZA, C.; NEVES, R.; HERCULANO, P.; PORTO, A.; SAAVEDRA, G. Seleção de fungos produtores de celulase procedentes de substratos vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2007. p. 246.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. "Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I Accuracy assessment". **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FAPESP. **Conhecimento e uso sustentável da biodiversidade brasileira: o programa Biotafapesp**. São Paulo: FAPESP, 2008. 126 p.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 81p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FERRACIN, L. M.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D. SCHAPOVALOFF, M. E.; FUNGARO, M. H. P. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger aggregate*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, p. 241- 248, 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FERNANDES, A. P.; CHALFOUN, S. M. Avaliação de fungos filamentosos quanto a produção de poligalacturonase. In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 2010, Lavras. **Resumo...** Lavras:[s.n], 2010.

FIGUEIREDO FILHO, A.; et al. Avaliação estacional da deposição da serapilheira em uma Floresta Ombrófila Mista localizada no sul do Estado do Paraná. **Ciência Florestal**, v.13, n.1, p.11-18, 2003.

FISHER, F., COOK, N. B. **Micologia: fundamentos e diagnóstico**. 1ª edição. Rio de Janeiro: editora Revinter, 2001, 337p.

FRAGA, M. E. **Aspergilli Aflatoxígenos e Ocratoxígenos Isolados de Rações para Frangos de Corte**. 2005. 87p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ.

FRANCO, M. N. **Produção de Celulases por Actinomicetos em Resíduos Agro-Industriais, visando a Obtenção de Bioetanol**. 2009. 70p Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FRISVAD, J. C. Modifications on media based on creatine for use in *Penicillium* and *Aspergillus* taxonomy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, p.154-157, 1993.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-173, 2004.

FRISVAD, J. C.; SHOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p.442-453, 2005.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, n. 7, p. 977-1004, 1999.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2010-2011**. Fundação SOS Mata Atlântica/ Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo, 2013. Disponível em: www.sosma.org.br e www.inpe.br. Acesso em: 10 dez. 2013.

GALAGAN, J. E. et al. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, n.12, p.1620-1631, 2005.

GALVÃO, I. R. G. A. et al. Seleção de *Penicillium* e *Aspergillus* produtores de protease. In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, Universidade Federal de Pernambuco, 2013, Recife, **Anais...** Recife: [s.n], 2013.

GAMA, F. M; MOTA, M.; BASTOS, M.; DOURADO F. Studies on the properties of celluclast/Eudragit L-100 conjugate. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 121-131. 2002.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, p. 69-72, 2007.

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H. S.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Edited by R. A. Samson & J. I. Pitt. **Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics**, New York: Plenu Press, 1985. p. 55-61.

GATTI, M. J.; FRAGA, M. E.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. **Food Additives & Contaminants**, v. 20, n. 12, p. 1120-1126, 2003.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S.W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GHORBEL, B.; SELAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 513-518, 2003.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**. v. 46, v. 2, p. 119–126, 2005.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202. 1998.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2nd ed. New York, Willey Science Paperback Series-Liss, 1994, 472 p.

GUERRA, J. B. **Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos**. 1991. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

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

HAMMOND, P. M. Species inventory. In: Groombridge, B. (Ed.), **Global Biodiversity: status of the Earth's Living Resources**. Chapman & Hall, London, p. 17-39, 1992.

HAMMOND, P. M. The current magnitude of biodiversity. In **Global Biodiversity Assessment** (V. H. Heywood, ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 113-138, 1995.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 205-209, 1971.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**. [S.l.]: [s.n.], 1982. 56 p.

HASEGAWA, Y.; FUKUDA, T.; HAGIMORI, K.; TOMODA, H.; OMURA, S. Tensyuic Acids, New Antibiotics Produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1338-1341, 2007.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HIBBETT, D. M. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509 – 547, 2007.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A . Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families . **Studies in Mycology**. The Netherlands. v. 70,p. 1-51. 2011.

HUBKA, V.; KOLARIK, M. β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. **Persoonia**, v. 29, p. 1–10, 2012.

IGARASHI, K.; WADA, M.; SAMEJIMA, M. Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase. **FEBS Journal**, v. 274, p. 1785-1792, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Mapa de Biomas do Brasil**: primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Escala 1:5.000.000. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas_murais/biomas.pdf>. Acesso em: 20 out. 2013.

ITO, Y. et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 233-239, 2001.

JOSHI, C. P.; MANSFIELD, S. D. The cellulose paradox - simple molecule, complex biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 220–226, 2007.

JURJEVIC, Ž.; PETERSON, S. W.; STEA, G.; SOLFRIZZO, M.; VARGA, J.; HUBKA, V.; PERRONE, G. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. **International Mycological Association, IMA Fungus**, v. 3, n. 2, p. 159–173, 2012.

KASANA, R. C. et al. A Rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KATZ, B. Preliminary results of leaf litter decomposing microfungi survey. **Acta Amazônica**, v. 11, n.10, p. 410-411, 1981.

KIELING, D. D. **Enzimas: Aspectos gerais**. Trabalho (Disciplina de Engenharia Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_gerais.pdf>. Acesso em 08 nov. 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.16, p. 111-120, 1980.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, A. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. Wallingford, UK :CABI, 2008. 368 p.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guid to common *Aspergillus* species and their telemorphs**. North Ryde, Australia: CSIRO, 1988a. 116p.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. Differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, p. 99-108, 1988b.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002a.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, Netherlands: Ponsen e Looijen. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center New Orleans, Louisiana USA, 2002b, 116p.

KOZAKIEWICZ, Z. ***Aspergillus* Species on Stored Products**. Wallingford: CAB International, 1989.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G. J.; WANG, F.; MULLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, H. A. B.; WOSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food and Chemistry**, v. 120, p. 945-959, 2010.

LAIDLER, K. J. **Introduction to the Chemistry of Enzymes**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1954. 208 p.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ, V.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes, **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 187-194, 1999.

LARSEN, T. et al. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, London, v. 22, n.6, p. 675-695, 2005.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Danvers, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, p. 83-84, 2004.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechniques**, Natick, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.

LIU, B. L., RAFIQ, A., TZENG, Y. M. AND ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p. 415-424, 1998.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALVES DA SILVA, C. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Detecção do potencial biotecnológico em bactérias e leveduras isoladas de sedimentos de mangue. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

LUND, F. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 228-231, 1995.

MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MACHIDA, M.; GOMI, K. *Aspergillus*: molecular biology and genomics. Caister Academic Press, (eds), 2010.

MACIEL, M. H. C. **Abordagem polifásica para identificação de linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de poligalacturonases**. 2013. 151p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. 2008. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 693-702, 2004.

MAY, R. M. The dimensions of Life on Earth. In *Nature and Human Society: the quest for a sustainable world*, (P. H. Raven & T. Williams, eds) National Academy Press, Washington, p. 30-45, 2000.

MCKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 355-358, Dec. 1988.

MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; DALHUIJEN, R. A.; SAMSON, R. A.; VRIES, R. P. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 19-30, 2011.

METZGER, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1138-1140, 2009.

MILES, A. A.; MISRA, A. A. The estimation of the bactericidal power of blood. **Journal Hygiene**. v. 38, p. 732-749, 1938.

MINAFRA, C. S. **Produção e Suplementação com α -amilase de *Cryptococcus Flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na Dieta de Frangos de Corte de um a 21 dias de idade**. 2007. 141p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Serviço Florestal Brasileiro. **Florestas do Brasil em Resumo**. 2013: dados de 2007-2012. Brasília: SFB, 2013, 188 p. ISBN 978-85-63269-10-2. Disponível em: <http://www.florestal.gov.br/publicacoes/tecnico-cientifico/florestas-do-brasil-em-resumo-2013>. Acesso em: 5 dez. 2013.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing, **Advances in Physics Lipids**, New York, v. 16, p. 181-189, 2000.

MITIDIERI, S., et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 26, p. 56-60, 2002.

MOLINA, S. M. G.; PELISSARI, F.; VITORELLO, C. B. M. Screening and genetic improvement of pectinolytic fungi for degumming of textile fibers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 320-326, 2001.

MONTEIRO, P. S., et al. Otimização da produção, caracterização e avaliação da fitase se *Rhizopus stolonifer* na hidrólise de fitato em ração animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.18, n. 2-4, p.117-132, 2012.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G.; WORM, B. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biology**. v. 9, n.8, p. 1-8, 2011..

MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2007.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de Microrganismos**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Campinas, 1989. 92 p.

MUMMEY, D. L.; CLARKE, J. T.; COLE, C. A.; O’CONNOR, B. G.; GANNON, J. E.; RAMSEY, P. W. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1138-1147, 2010.

MYERS, N., et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme nomenclature**. San Diego: Academic Press, 1992, 862 p.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, p. 69-71, 1998.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225- 1242, 2009.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two new species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1727–1734, 2008.

NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casingii***. 2009. 56p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Paraná.

NUGROHO, A. D.; SETYABUDI, F. M. C. S.; SALLEH, B.; RAHAYU, E. S. Ochratoxigenic Black Aspergilli Isolated from Dried Agricultural Products in Yogyakarta, Indonesia. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 3, p. 472-480, 2013.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5544-5550, 2005.

OLIVEIRA, A. N.; DE OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.4, p. 853-860, 2006.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios: **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PANDEY, A., et al. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**. v.77, p. 149- 161, 1999.

PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. ed. New Delhi: asiotech Publishers. 2005. 760p.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; VISSER, J. Molecular tools for the classification of black aspergilli. In: (Samson, R. A.; Pitt, J.I.; eds). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**, Amsterdam: Harwood Academic Publishers: p. 413-424, 2000.

PAŘENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L. et al. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 521–527, 2001.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 2008. 115p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.

PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 173–186, 2001.

PELCZAR, J. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 4. ed. São Paulo: Makron Books, cap. 10. p. 258-271, 1998.

PÉREZ-PIQUERES, A.; EDEL-HERMANN, V.; ALABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. Response of soil microbial communities to compost amendments. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 460–470, 2006.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**. 2012. 111p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

PERRONE, G.; MULE, G.; SUSCA, A.; BATTILANI, P.; PIETRI, A.; LOGRIECO, A. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 680-685, 2006.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRlich, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PERRONE, G.; VARGA, J.; SUSCA, A.; FRISVAD, J.C.; STEA, G.; *ET AL.* *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.1032-1039, 2008.

PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology** (in press), 2011.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 4, p. 689-703, Apr. 2001.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, New York, v. 100, n. 2, p. 205-226, 2008.

PEKKARINEN, A., et al. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. **Journal of Cereal Science**, London, v. 31, n. 3, p. 253-261, 2000.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems**. Wallingford: CABI, v. 1, p. 184-205, 2006.

PIKOVSKAYA, R. J. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, New York, v.17, p. 362-370, 1948.

PILDAIN, M. B., et al. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 3, p. 725-735, 2008.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Species names in current use in the *Trichocomaceae* (Fungi, Eurotiales). In: GREUTER, W. **Names in current use in the families *Trichocomaceae*, *Cladoniaceae*, *Pinaceae*, and *Lemnaceae***. Königstein, Germany: Koeltz Scientific Books: Regnum Vegetabile, v.128, p.13-57, 1993.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Second edition. London: Black Academic & Professional - Chapman & Hall, 1997, 593p.

PITT, J. I.; SAMSON, R. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v.59, p. 67-70, 2007.

PITT, J. I. E.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Springer, 2009. 221 p.

POLLASTRO, S.; DE MICCOLIS, R. M.; FARETTA, F. A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, p. 107-112, 2006.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 17-33, 1999.

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916- 921, 2001.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semi piloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. 2002. 81p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PROMDONKOY, P. et al. Expression and Characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 290, n.1, p.18-24, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed., v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605 p.

QUEIROZ, A. E. S. de F. et al. Estabilidade ao pH e à temperatura de fitase produzida por *Aspergillus japonicus* URM5633. In: IX JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, 2009. VI SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009. **Resumo...** Recife, p. 1- 4, 2009.

QUIAGEN. **DNeasy Plant Mini Kit-For miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi**. DNeasy Plant Handbook, july, 2006. Disponível em: www.quiagen.com. Acesso em: 17 dez. 2013.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RANGARAJAN, V.; M. RAJASEKHARAN; R. RAVICHANDRAN; K. SRIGANESH AND V. VAITHEESWARAN. Pectinase Production from Orange Peel Extract and Dried Orange Peel Solid as Substrates Using *Aspergillus niger*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, p. 445-453, 2010.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 378, p. 705-716, 2004.

RESERVA DA BIOSFERA DA MATA ATLÂNTICA (RBMA), 2004. 56 p. - (Caderno da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica: **Mata Atlântica: bela, diversa e ameaçada**). Disponível em: <http://www.rbma.org.br/anuario/>. Acesso em: 3 dez. 2013.

REZENDE, E. DE F.; COUTO, F. A.; BORGES, J. G.; DA SILVA, D. M.; BATISTA, L. R. Potencial enzimático e toxigênico de fungos isolados de grãos de café. **Coffe Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 69-77, 2012.

RHODES, J. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. **Medical Mycology**, v. 44, p. 77-81, 2006.

RIGÓ, K. et al. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 48, n.1, p. 9-16, 2002.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 626-644, 1989.

RODRIGUES, A. S. L. et al. Effectiveness of the global protected area network in representing species diversity. **Nature**, v. 428, p. 640-643, 2004.

RODRIGUES, P.; SANTOS, C.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 877-892, 2011.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A. H., (Ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversions**. London: Academic Press, v. 5, p. 227-282, 1980.

ROSSMAN, A. Y. A strategy for an all-taxa inventory of fungal diversity. In Biodiversity and Terrestrial Ecosystems (C.-I. Peng & C. H. Chen, eds), p.169-194. [Monograph Series No. 14.] Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, 1994.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. 121 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** n. 4, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALES, M. R.; DE MOURA R. B.; PORTO, T. S.; DE MACEDO, G. R.; PORTO A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, 2010.

SAMSON, R. A.; PITT, J. I. Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Plenum Publishers, London & New York, 1985. 483 p.

SAMSON, R. A.; PITT, J. I. Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Plenum Press: New York and London, 1990. 478 p.

SAMSON, R. A. et al. Introduction to foodborne fungi. 4 ed. Baam: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 332 p.

SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. CBS Centenary: 100 Years of Fungal Biodiversity and Ecology. **Studies in Mycology**, v. 5, p. 45-61, 2004.

SAMSON, R. A.; VARGA, J.; WITIAK, S. M.; GEISER, D.M. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. **Studies in Mycology**, v.59, p. 71-74, 2007a.

SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129-145, 2007b.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. "What is a species in *Aspergillus*?" **Medical Mycology**, v. 47, p. 13-20, 2009.

SANDRI, I. G. **Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos.** 2010. 114p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Caxias do Sul.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microorganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido.** 2012. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga/BA.

SANT'ANNA, JR., G. L. **Produção de enzimas microbianas.** In: BORZANI, W.; SCHIMEDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Ed.). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Ed. Edgar Blucher, 2001. p. 351-362.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. DIJCK, P. W. M. van. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology & Biotechnology**, Berlin, n. 59, n. 4-5, p. 426-435, 2002.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 1-41, 2007.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 63-68, 2003.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A.** 2005. 330p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Lisboa, Portugal.

SERRA, R.; CABANES, F.J.; PERRONE, G.; CASTELLA, G.; VENANCIO, A.; MULE, G.; KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, v. 98, n. 2, p. 295-306, 2006.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 9, p. 859-865. 2005.

SILVA, R. L. de O. et al. Endophytic fungi of *Annona* spp.: isolation, enzymatic characterization of isolates and plant growth promotion in *Annona squamosa* L. seedlings. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SILVA, D. C. V.; TIAGO, P. V.; DE MATTOS, J. L. S.; PAIVA, L. M.; MOTTA C. M. DE S. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasil Botânica**, v.34, n.4, p.607-610, 2011a.

SILVA, D. M.; BATISTA, L. R.; REZENDE, E. F.; FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D, et al. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 761–773, 2011b.

SIMÕES, M. F.; PEREIRA, L.; SANTOS, C.; LIMA, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications, Chapter 5. In: **Management of Microbial Resources in the Environment**. MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Eds.). ISBN 978-94-007-5930-5, Springer, The Netherlands, 2013a. 410 p.

SIMÕES, M. F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural Diversity of *Aspergillus* Section *Nigri* Spores. **Microscopy Microanalysis**, v. 19, p. 1-8, 2013b.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. **International Journal of Environmental Science and Engineering**, 1:1, 2009. Disponível em: <<http://www.waset.org/journals/ijese/v1/v1-1-4.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

SLIVINSKI, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR.

SOARES, I. A. et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOCCOL, C. R. ROJAN, P. J.; PATEL, A. K.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: Enzyme Technology. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.

SOHAIL, M. et al. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. **Pakistan Journal Botany**, Lahone, v. 41, n. 5, p. 2567-2582, 2009.

SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F. W.; TAN, R. X. Characterization of Graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, and endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506-509, 2005.

SORENSEN, A.; LÜBECK, P.S.; LÜBECK, M.; NIELSEN, K.F.; AHRING, B.K.; TELLER, P. T.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a new black *Aspergillus* species isolated in Denmark. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Published online Doi: 10.1099/ijs.0.029884-0, 2011.

SPADARO, D. A.; LORÈ, A.; GARIBALDI, M. L. GULLINO. Occurrence of ochratoxin a before bottling in DoC and DOCG wines produced in Piedmont (northern Italy). **Food Control**, v. 21, p. 1294–1297, 2010.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. In: VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, Enzitec, 2004. **Anais...** Enzitec, Rio de Janeiro, 2004. v. 1. p. 116-116.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

SUMANTHA, A. et al. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 43, n. 4, p. 313-319, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TAUK-TORNISIELO, S. M. et al. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 72-82, 2005.

TAVARES, N. C.; SILVA, E. B.; MACEDO, G. A. Isolamento e seleção de microrganismos potencialmente produtores de fitase. In: XX CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP. Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. **Resumo...**São Paulo, 2012.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos.** 1994. 85p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.

TEN, L. N.; IMA, W. T.; KANGA, M. K .M. S.; LEEA, S. T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **Journal Microbiology, Methods** v.56, p.375-382, 2004.

THOM, C., CHURCH, M. 1926. **The Aspergilli.** Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA.

THOM, C., RAPER, K.B. 1945. **A manual of the Aspergilli.** Williams e Wilkins. Baltimore, Maryland, USA.

THOMPSON, J. D., et al . CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORSVIK, V.; OVERAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 240- 245, 2002.

TRALAMAZZA, S. M. **Validação da técnica de espectroscopia no infravermelho na taxonomia e sistemática do gênero *Aspergillus***. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 509-515, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2003.

VARGA, J.; JUHA SZ, A.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 627-640, 2004.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G., et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.1925-1932, 2007.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus* sect. *Aeni* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi. **IMA Fungus**, v. 1, p. 197-205, 2010.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.

VASCONCELOS, W. E.; RIOS, M. S.; SOUSA, A. H.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, G. M. C.; MARACAJÁ, P. B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.3, 2003.

VERMELHO, et al. **Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas**. Enzimas em biotecnologia. 1ª edição, Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2008, p. 273-287.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da Cromoblastomicose**. 2000. 200p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP.

WANG, H.; HYDE, K.; SOYTONG, K. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. **Journal of Zhejiang University: Science B**, Hangzhou, v. 9, n. 10, p. 835-841, 2008.

WHITAKER, A., LONG, P.A. Fungal pelleting. **Process Biochemistry**, v.8, p.27- 31, 1973.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzymes and Microbial Technology**, v.6, n.8, p.342-349, 1984.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. eds. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, p. 315-322, 1990.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; REMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 65, p. 367-373, 1999.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin Liase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2009.

YIN, Y. L.; BAIDOO, S. K.; JIN, L. Z. The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hulless barley varieties in young pigs. **Livesock Production Science**, v. 71, p.109-120, 2001.

YU, J. et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 22, n.4, p. 194-202, 2005.

ZAO, D. M.; WANG, M.; MU, X. J.; SUN, M. L.; WANG, Z.Y. Screening, cloning and over expression of *Aspergillus niger* Phytase (phy-A) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 522-528, 2007.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, Amherst, v. 8, p. 379-388, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Ágar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997):

Glicose	10 g
Peptona Bacteriológica	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Rose Bengal	25 mg
Dichloran	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 6

Batata Dextrose Ágar (BDA) (GATTI et al., 2003):

Dextrose	20 g;
NaCl	60 g;
Ágar	15 g;
Água destilada	1000 mL, pH 7

OBS: Adicionar 200 g de batata picada em 1L de água destilada, deixar por 1h na fervura em seguida filtrar e adicionar ao filtrado os outros ingredientes.

ANEXO B

Czapek Levedura Agar (CYA) (PITT; HOCKING, 1997):

K ₂ HPO ₄	1 g
Extrato de Levedura	5 g
Sacarose	30 g
-Concentrado de Czapek: (NaNO ₃ 30g; KCl 5g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 5g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,1g, 100 mL de água destilada)	10 mL
-Solução Metálica: (ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0,1g e CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,05g, 100 mL de água destilada)	1 mL
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 7

Extrato de Malte Agar (MEA) (KLICH & PITT, 1988):

Extrato de Malte	20 g
Peptona Bacteriológica	1 g
Glicose	20 g
Ágar	20g
Água destilada	1000 mL, pH 7

ANEXO C

Extrato de Malte Agar – Boscalide (MEA-B) (SAMSON et al., 2004):

	MEA
Boscalide (Sigma)	10 mg
	pH 7

Creatina Sacarose Agar (CREA) (FRISVAD, 1993):

Creatina	3 g
Sacarose	30 g
K ₃ HPO ₄	1,6 g
Bromocresol	0,05 g
Ágar;	15 g
-Solução Mineral: (KCl 5g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 5g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,1g, 100 mL de água destilada)	10 mL
-Solução Metálica: (ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.1g e CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,05g, 100 ml de água destilada)	1 mL
Água destilada	1000 mL, pH 8

Teste de Ehrlich (LUND, 1995):

4-dimetilamino-benzaldeído	2 g
Etanol (96%)	85 mL
HCl 10 N	15 mL

A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121 °C, 1 atm de pressão, durante 20min.

ANEXO D

Tampão CTAB - Método CIA

CTAB	2 g
NaCl	8,12 g
EDTA	4 mL
Tris	10 mL
PVP	2 g
Água milliQ q.s.p	100 mL

Levar em banho Maria a 60°C por 20 min.

CIA (Clorofórmio Álcool Isoamílico)

Clorofórmio	96 mL
Álcool Isoamílico	4 mL

Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1.

Tampão de extração - Método fenol-clorofórmio

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%

Tampão de extração CTAB - Método CTAB

Tampão A:

Sorbitol	6,38 g
Tris-HCL	1,21 g
EDTA	0,19 g
Água MilliQ	100 mL

Ajustar pH = 8,0 com HCL

Tampão B:

NaCl	11,69 g
CTAB	2,0 g
Tris-HCl	2,42 g
EDTA	1,86 g
Água MilliQ	100 mL

Preparo do Tampão de extração CTAB:

Tampão A	40 mL
Tampão B	40 mL

SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)	8 mL
Bissulfito de Sódio 1%	0,96 g
Carvão ativado 0,1%	0,096 g
PVP 2%	1,92 g
β-mercaptoetanol	192 μL
Preparo para 48 amostras.	

ANEXO E

Peptidase (Protease) (GOPINATH et al., 2005)	
Leite desnatado	50 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 5
Amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975)	
Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Amido solúvel	0,2 %
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 5
Celulase (RUEGGER;TAUK-TORNISIELO, 2004).	
NaNO ₃	3 g
MgSO ₄	0,5 g
KCL	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
K ₂ HPO ₄	1 g
CMC	10 g
Ágar,	20 g
Água destilada)	1000 mL, pH 5
Pectinase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975)	
Pectina cítrica (Sigma)	1,25 %
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 7
Fitase (PIKOVSKAYA, 1948)	
Extrato de levedura	0,5 g
Dextrose	10 g
Fosfato de Cálcio;	5 g
Sulfato de Amônio;	0,5 g
Cloreto de Potássio;	0,2 g
Sulfato de Magnésio;	0,1 g
Sulfato de Manganês;	0,0001 g
Sulfato Ferroso;	0,0001 g
Ágar	15 g
Água destilada)	1000 mL, pH 7