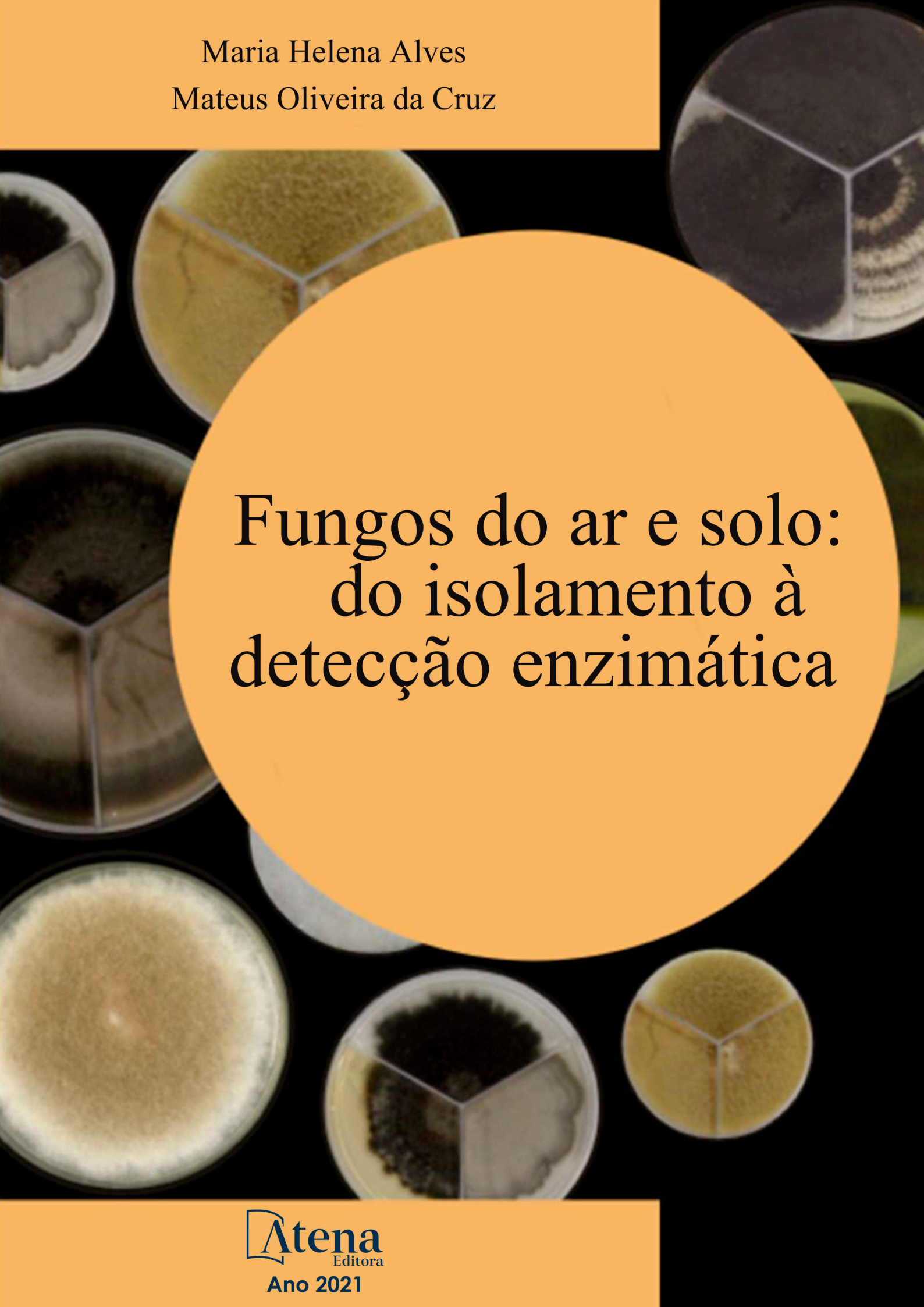



Maria Helena Alves  
Mateus Oliveira da Cruz

The background of the cover is a collage of several petri dishes containing different types of fungal cultures. The cultures vary in color, including white, yellow, green, and dark brown. Some dishes are divided into sections, showing different growth patterns or stages of a fungus. A large, semi-transparent orange circle is centered over the dishes, containing the title text.

# Fungos do ar e solo: do isolamento à detecção enzimática

Maria Helena Alves  
Mateus Oliveira da Cruz

The background of the cover is a collage of several petri dishes containing various fungal cultures. The dishes are arranged in a circular pattern around a central white circle. The cultures show different colors and textures, including dark, light, and patterned growths. The central white circle contains the title text.

# Fungos do ar e solo: do isolamento à detecção enzimática

**Editora Chefe**  
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Assistentes Editoriais**

Natalia Oliveira  
Bruno Oliveira  
Flávia Roberta Barão

**Bibliotecária**

Janaina Ramos

**Projeto Gráfico e Diagramação**

Natália Sandrini de Azevedo  
Camila Alves de Cremo  
Luiza Alves Batista  
Maria Alice Pinheiro

**Capa** 2021 by Atena Editora

Mateus Oliveira da Cruz Copyright © Atena Editora

**Edição de Arte** Copyright do Texto © 2021 Os autores

Luiza Alves Batista Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

**Revisão** Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora  
Os Autores pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

**Conselho Editorial**

**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná  
Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas  
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra  
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia  
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino  
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

#### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

#### **Linguística, Letras e Artes**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

#### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí  
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais  
Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional  
Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa  
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia  
Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco  
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa  
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eiel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein  
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Me. Fabiano Eloy Atílio Batista – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará

Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza  
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social  
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia  
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR  
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Ma. Lillian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz  
Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas  
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo  
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará  
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie  
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa  
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba  
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

# Fungos do ar e do solo: do isolamento à detecção enzimática

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Bibliotecária:** Janaina Ramos  
**Diagramação:** Mateus Oliveira da Cruz  
**Correção:** Luiza Alves Batista  
**Edição de Arte:** Os Autores  
**Organizadores:** Maria Helena Alves  
Mateus Oliveira da Cruz

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F981 Fungos do ar e do solo: do isolamento à detecção enzimática / Organizadores Maria Helena Alves, Mateus Oliveira da Cruz. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5706-737-6

DOI 10.22533/at.ed.376212201

1. Fungos. 2. Fungos anemófilos. 2. Aspergillus.  
3. Cladosporium. I. Alves, Maria Helena  
(Organizadora). II. Cruz, Mateus Oliveira da  
(Organizador). III. Título.

CDD 579.5

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

**Atena Editora**

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)



## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

# SOBRE OS AUTORES



**Maria Helena Alves**

Doutora em Ciências Biológicas na área de Botânica subárea Micologia pela Universidade de São Paulo. Professora associada III da Universidade Federal do Piauí, colaboradora da Universidade Federal do Delta do Parnaíba.



**Mateus Oliveira da Cruz**

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco.



**Ana Beatriz dos Santos Morais**

Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí.



**Clélia de Paula da Silva Costa**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí.



**Diogo Xavier Lima**

Doutor em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco.



**Jéssica Soares Barbosa**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí.



**Maria de Fátima Dutra Freitas**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí.

# Prefácio

Este livro traz uma coletânea de trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Maria Helena Alves abordando aspectos importantes sobre os fungos, organismos extremamente importantes devido, dentre outros aspectos, à sua diversidade, interações com o ecossistema, potencial biotecnológico e características bioquímicas e fisiológicas, entre outras.

As pesquisas abordam estudos realizados com fungos isolados do ar, devido à importância destes microrganismos na qualidade do ar dos ambientes fechados e fungos isolados do solo, “habitat” extremamente rico e complexo, o qual induz os espécimes a expressarem suas “capacidades” enzimáticas, considerando sua “função” de decompositores (juntamente com as bactérias), no ciclo da matéria orgânica.

Assim, o conteúdo aqui abordado contribui significativamente para o conhecimento científico sobre os fungos no Brasil além de estimular o desenvolvimento de outras pesquisas neste contexto.

Deixo aqui os parabéns aos autores dos capítulos que abordaram o assunto de forma clara, objetiva e com literatura atual, alcançando resultados significativos para os interessados em estudos que envolvem os fungos do ar e do solo, enfatizando a detecção de enzimas.

Aos interessados por esta obra tenham uma ótima leitura.

Dra. Kaoru Okada  
PhD em Medicina/Microbiologia

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
Análise dos fungos filamentosos ocorrentes no ar em setores internos e climatizados de uma universidade do estado do Piauí, Brasil	
Mateus Oliveira da Cruz	
Maria Helena Alves	
DOI 10.22533/at.ed.3762122011	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	19
Efeito da temperatura e pH na detecção de amilases e celulases por táxons de <i>Aspergillus</i> isolados do ar	
Mateus Oliveira da Cruz Diogo	
Xavier Lima	
Jéssica Soares Barbosa	
Ana Beatriz Sousa Morais	
Maria Helena Alves	
DOI 10.22533/at.ed.3762122012	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	38
Atividade amilolítica de <i>Aspergillus</i> (Eurotiales, Aspergillaceae) isolado do solo no Norte do Piauí	
Mateus Oliveira da Cruz	
Maria de Fátima Dutra Freitas	
Maria Helena Alves	
DOI 10.22533/at.ed.3762122013	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	56
Análise enzimática de <i>Rhizopus</i> Ehrenb. (Mucorales, Mucoraceae) isolado de solo em Parnaíba, Piauí	
Mateus Oliveira da Cruz	
Clélia de Paula da Silva Costa	
Maria Helena Alves	
DOI 10.22533/at.ed.3762122014	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	71
Caracterização enzimática de táxons de Mucoromycota e Mortierellomycota (Mucoromyceta) isolados do solo no Piauí	
Mateus Oliveira da Cruz	
Clélia de Paula da Silva Costa	
Maria Helena Alves	
DOI 10.22533/at.ed.3762122015	

# Capítulo 1

## Análise dos fungos filamentosos ocorrentes no ar em setores internos e climatizados de uma universidade do estado do Piauí, Brasil

Mateus Oliveira da Cruz  
Maria Helena Alves

### RESUMO

Propágulos fúngicos existentes no ar de ambientes internos podem servir como um alerta à saúde, devido ao aumento populacional de pessoas com problemas respiratórios e sistema imunológico debilitado. Este estudo objetivou analisar os fungos filamentosos presentes no ar em três setores internos e climatizados de uma universidade do estado do Piauí, Brasil. Os setores analisados foram: Laboratório de Botânica (Setor 1), Herbário (Setor 2) e Biblioteca (Setor 3), nos quais foram realizadas três coletas em Novembro/2017, Fevereiro/2018 e Maio/2018, considerando o método da técnica de exposição de placas abertas contendo meio de cultura específico, Ágar Rosa de Bengala. O isolamento para a identificação dos fungos foi realizado em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) e para a identificação considerou-se as referências clássicas. Como resultado, observou-se o desenvolvimento de 234 Unidades Formadoras de Colônias-UFCs, onde o Setor 2 apresentou um percentual maior de colônias. Destas foram identificados 10 gêneros compreendendo 17 táxons, dentre os quais, *Aspergillus* P. Micheli e *Cladosporium* Link demonstraram maior representatividade, 41% e 11%, respectivamente. Quanto à

comunidade fúngica por coleta, observou-se que as de número 2 e 3 apresentaram similaridade, assim como os setores 1 e 2. O presente estudo torna-se um alerta às pessoas que possuem, frequentemente, problemas respiratórios e/ou sistema imunológico debilitado e que ocupam setores como os analisados nesse trabalho, isso devido ao isolamento de fungos como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, espécies altamente oportunistas. A higienização dos utensílios como móveis, ar condicionado e limpeza de interiores, em ambientes fechados, são os métodos mais simples e eficazes para o controle de propágulos fúngicos. Gráficos, tabelas e dendrogramas são apresentados para melhor exposição dos resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos anemófilos; *Aspergillus*; *Cladosporium*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos indispensáveis na natureza onde desempenham várias funções além da ciclagem de carbono e nitrogênio. Considerando as diversas formas estruturais, modo de vida e reprodução, estimam-se em cerca de 2.2 a 3.8 milhões de espécies de fungos (HAWKSWORTH; LUCKING, 2017). O emprego dos fungos tem se estendido a vários setores, como indústria, agricultura e farmácia. No entanto, mesmo que muitos desses microrganismos apresentem benefícios ao homem, alguns fungos apresentam a capacidade de infectar o corpo humano, causando desde uma leve irritação na pele, devido ao contato com metabólitos secundários, até uma micose generalizada, isso por conta da propagação de estruturas fúngicas no organismo (TORTORA et al., 2017).

Na micologia médica, menciona-se, artificialmente, as designações fungos patogênicos e fungos oportunistas, estando esta classificação relacionada com a capacidade imunológica do indivíduo (MERKHOFFER; KLEIN, 2020). O ser humano, a todo momento, encontra-se exposto a fungos que podem causar doenças, isso porque o ar é um dos meios de dispersão de propágulos fúngicos, principalmente os esporos. Assim, os propágulos fúngicos que estão suspensos no ar, dos denominados fungos anemófilos, apresentam riscos para as pessoas com problemas alérgicos e patologias respiratórias, principalmente em pessoas imunodeficientes (BONGOMIM et al., 2017; MERKHOFFER; KLEIN, 2020). Em 2019, Barnes aponta que mais de 5% da população em geral, incluindo indivíduos atópicos e não atópicos, possuem sensibilização a fungos.

*Aspergillus* P. Micheli, *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link e *Penicillium* Link são gêneros que têm sido apresentados como os fungos de maior risco a humanos (CHAUDHURI et al., 2019). Por exemplo, *Aspergillus fumigatus* Fresen. é um fungo que tem o solo como substrato primário, mas que se adaptou em ambientes hostis, adquirindo a capacidade de resistir aos mecanismos de defesa do corpo humano. Também é considerado o fungo anemófilo de maior potencial patogênico sendo a aspergillose um grande problema de saúde no decorrer dos anos (LATGÉ; CHAMILOS, 2020).

O perfil de fungos anemófilos tem sido estudado em ambientes externos, onde são explorados dados meteorológicos e de dispersão dos propágulos fúngicos (ODEBODE et al. 2020), bem como a análise microbiológica do ar, em ambientes hospitalares, devido a maior sensibilização dos pacientes internados (PEREIRA; CRUZ; ALVES, 2020). Por conta do aumento de pessoas com problemas respiratórios e imunocomprometidos, os fungos são apresentados como grandes agentes de infecções (MADHWAL et al., 2020). A análise de fungos anemófilos em ambientes internos de estudo de ampla frequência, como escolas e universidades (FU et al., 2020; ZONI et al., 2020), também têm sido realizada.

No Brasil, Sobral et al. (2017) isolaram e identificaram fungos do ar de setores da Universidade Federal de Pernambuco e estudo semelhante, no Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá, Estado do Ceará, foi realizado por Moura et al. (2013) e, também na Universidade Estadual do Ceará, por Pantoja et al. (2007). Para o estado do Piauí, fungos anemófilos foram isolados por Mobin e Solmito (2006) em um hospital de Teresina e, mais recentemente, em Parnaíba, norte do estado, Pereira, Cruz e Alves (2020) avaliaram a micobiota fúngica do ar de três setores de uma instituição pública de saúde.

Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar os fungos da aeromicrobiota de três setores climatizados da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, situada no Norte do Piauí, Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A verificação da presença de fungos anemófilos teve, como área de estudo, três setores climatizados da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPar): Laboratório de Botânica, Herbário e Biblioteca, classificados neste manuscrito, como Setor 1, Setor 2 e Setor 3, respectivamente. Em cada setor foram realizadas três coletas durante os meses de Novembro/2017, Fevereiro/2018 e Maio/2018. Sendo fevereiro e maio os meses do período chuvoso, com menor e maior ocorrência de chuvas, respectivamente, e novembro, mês não chuvoso.

Para a coleta dos propágulos fúngicos foi adotado a metodologia clássica abordada por Lacaz (1998), onde as placas de Petri, contendo o meio de cultura Ágar Rosa de Bengala (RBA), foram expostas durante 15 minutos a uma altura de 1,5 metros do chão. Em seguida, as placas foram fechadas e vedadas com parafilme e/ou papel filme e levadas para o Laboratório de Micologia da UFDPar, sendo incubadas sob temperatura ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade ambientes. A observação do desenvolvimento das culturas fúngicas se deu a cada 24 horas durante cinco dias. O isolamento e armazenamento das colônias para a identificação foi realizado em meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA). Cada coleta foi carreada em triplicata.

A identificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) foi verificada tomando por base as características macro e micromorfológicas dos fungos por comparação com o auxílio da literatura especializada. Quanto às características macromorfológicas, analisou-se tamanho, forma, textura e cor do verso e reverso das UFCs nos meios de cultivo Ágar Czapek (CZA), Ágar Extrato de Malte (MEA) e Ágar Sabouraud (SA), sob incubação de temperatura ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade ambientes e estudados após 5 ou 7 dias de inóculo.

À análise micromorfológica, seguiu-se a técnica de Ridell (1950), conhecida como cultura em lâminas, para a melhor observação das microestruturas vegetativas e reprodutivas dos microrganismos, tendo o auxílio de um microscópio de luz Leica DM2000 focando nas objetivas de 40X, 80X e 100X. Azul de lactofenol foi usado para evidenciar as microestruturas fúngicas. Para a identificação e comparação dos táxons, foram adotadas as referências propostas por Pereira, Cruz e Alves (2020), Bensch et al. (2018), Tan et al. (2018), Yilmaz et al. (2014), Houbraken et al. (2011), Kimura et al. (2009), Zheng et al. (2007), Klich e Pitt (1988), Gams et al. (1984) e Ellis (1971).

Análises de estatística descritiva quantitativa como média e desvio padrão, bem como a comparação de médias (ANOVA) pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ), foram realizadas com o auxílio do programa estatístico BioEstat (5.3). A frequência de ocorrência (FO) dos táxons foi estimada de acordo com a equação  $FO = J_i/k$ , onde  $J_i$  é o número de amostras nas quais o táxon  $i$  ocorreu e  $K$  = número total de amostras. De acordo com esta equação, cada táxon foi classificado como: muito frequente ( $> 10\%$ ), frequente (5-10%), pouco frequente (1-5%), ou rara ( $< 1\%$ ) (HYDE; SARMA, 2001). A abundância relativa (AR) de cada táxon foi calculada aplicando-se a equação  $AR = (N_i/N) \times 100$ , onde  $N_i$  = número de Unidade Formadora de Colônia (UFC) do táxon  $i$  e  $N$  = número total de UFC. A comparação das comunidades fúngicas entre os locais e meses de coleta foi analisado através do índice de similaridade (ANOSIM) qualitativa de Jaccard (1908) e quantitativa de Bray-Curtis (1957), sendo a matriz de similaridade representada graficamente através da ordenação não métrica por escalonamento multidimensional (MDS), usando o programa bioestatístico Past (4.02).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das 234 UFCs foram identificados 17 táxons distribuídos entre 10 gêneros: *Aspergillus* P. Micheli, *Cladosporium* Link, *Curvularia* Boedijn, *Engyodontium* de Hoog, *Nigrospora* Zimm, *Paecilomyces* Bainier, *Penicillium* Link, *Rhizomucor* Lucet & Costantin, *Rhizopus* Ehrenb e *Talaromyces* C.R. Benj.) e um não esporulado, como demonstra a tabela 1.

Dentre as 234 UFCs, somando as três coletas, foi verificado que o setor 2 apresentou maior número de UFCs (141), seguido pelo Setor 1 e Setor 3, contabilizando com o fungo não esporulado, com 63 e 30 UFCs, respectivamente. As médias do número de UFCs apresentadas por setores e coletas não apresentaram diferenças significativas, segundo o teste de Tukey, onde o valor de  $p = 0,55$ , foi maior que 0,05, valor mínimo necessário para diferença significativa, como demonstra a tabela 1.



Com relação aos isolados, *Penicillium citrinum* apresentou maior abundância (AR= 44,8%), apresentando 105 UFCs, sendo considerada como muito frequente (FO = 40,0%). *Engyodontium* sp. (AR= 19,6%) e *Aspergillus flavus* (AR= 6,8%) estiveram posicionados como segundo e terceiro táxons de maior abundância, respectivamente, considerados muito frequente (FO= 37,0%) (Tabela 1). *Engyodontium* sp. apresentou 46 UFCs e *Aspergillus flavus*, 16 UFCs, enquanto os demais táxons apresentaram AR igual ou menor que 5,5%. Juntamente com os táxons acima citados, *Aspergillus foetidus*, *A. fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. Herbarum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizomucor pusillus* e *Talaromyces purpurogenus* foram considerados muito frequentes. *Aspergillus oryzae* foi o único táxon classificado como frequente e *Aspergillus japonicus* var. *japonicus*, *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *Curvularia brachyspora*, *Nigrospora sphaerica* e *Rhizopus arrhizus* var. *tonkinensis* foram considerados pouco frequentes. Nenhum táxon foi considerado raro neste estudo. Entre as 234 UFCs, duas colônias apresentaram fungos não esporulados (Tabela 1).

A presença de fungos no ar é algo comum já que através do ar ocorre a dispersão mais comum dos propágulos fúngicos entre um substrato e outro. A ocorrência de doenças causadas por esses propágulos está intrinsicamente relacionada com o quadro clínico das pessoas (MERKHOFFER; KLEIN, 2020). Neste estudo, o número de UFCs não apresentou diferença significativa entre os setores e coletas, todavia, como apresentado na tabela 1, alguns táxons apresentaram maior ocorrência em uma determinada coleta. Mori et al. (2019) demonstraram que a sazonalidade é um fator que influencia na concentração de fungos no ar, fazendo com que a ocorrência das espécies apresente diferença entre os meses.

No decorrer da identificação taxonômica, foi possível realizar a análise da morfocultura de *Aspergillus foetidus* Thom & Rapen, *A. japonicus* Saito var. *japonicus*, *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn, *Curvularia brachyspora* Boedijn, *Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp. 2, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) E.W. Mason, *Paecilomyces variotii* Bainier, *Talaromyces purpurogenus* (Stoll) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert e *Penicillium citrinum* Thom em diferentes meios de cultivo, como apresentado na figura 1, servindo como base para a identificação, visto que, diferenças como tamanho, textura e coloração das colônias foram observadas.

A comparação morfocultural de fungos em diferentes meios de cultivo, como realizada com alguns táxons neste estudo, é apresentada em estudos como de Ferrati et al. (2018) e Visagie et al. (2014) na forma de identificação de táxons.

Dentre os gêneros estudados, *Aspergillus* apresentou maior frequência, 41% com sete táxons e *Cladosporium* 11%, com dois táxons. Os demais gêneros apresentaram um táxon com percentual de 6% para cada, como pode ser verificado na figura 2.

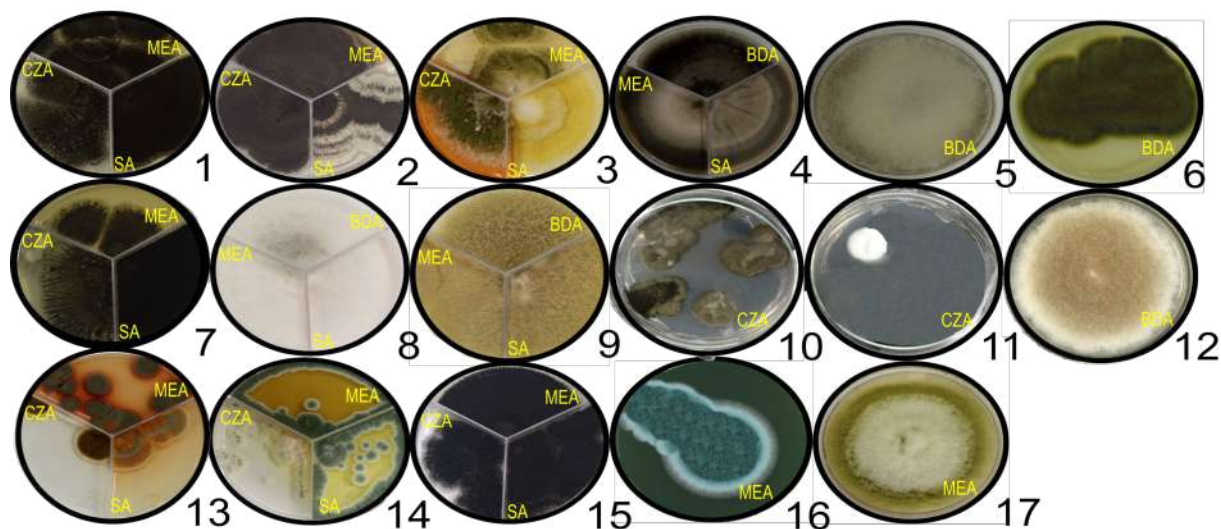


Figura 1 - Macromorfologia das culturas dos fungos isolados do ar.

1. *Aspergillus foetidus* 2. *A. japonicus* var. *japonicus* 3. *A. oryzae* 4. *Curvularia brachyspora* 5. *Rhizopus arrhizus* var. *tonkinensis* 6. *Cladosporium cladosporioides* 7. *Aspergillus* sp. 2 8. *Nigrospora sphaerica* 9. *Paecilomyces variotii* 10. *Cladosporium herbarum* 11. *Engyodontium* sp. 12. *Rhizomucor pusillus* 13. *Talaromyces purpurogenus* 14. *Penicillium citrinum* 15. *Aspergillus* sp.1 16. *Aspergillus fumigatus* 17. *Aspergillus flavus*.

Fonte: Os autores

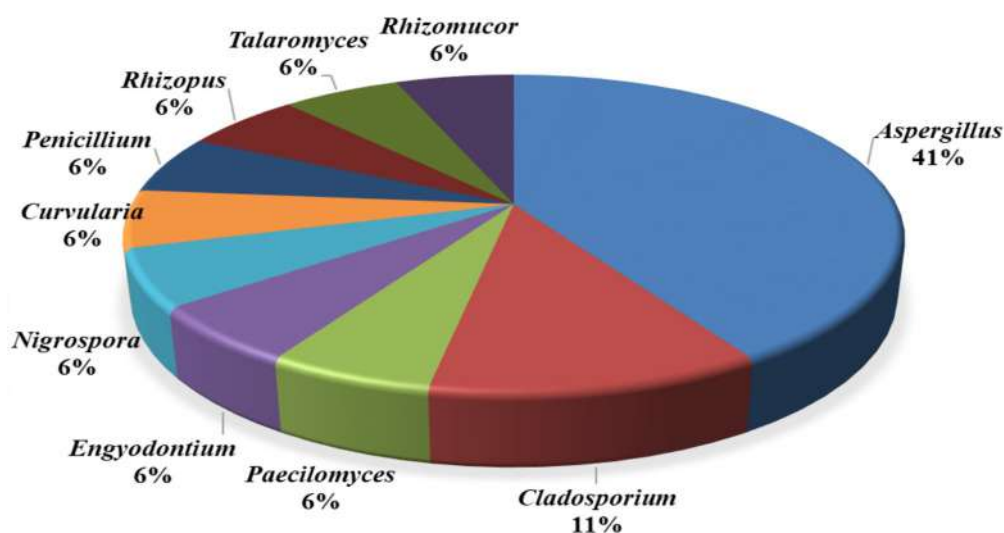


Figura 2 - Porcentagem dos gêneros observados nos três setores da UFDPAr em relação ao número de táxons.

O estudo realizado por Sobral et al. (2017), que isolaram de setores da Universidade Federal de Pernambuco fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Curvularia* e *Paecilomyces*, sendo *Aspergillus* o de maior representação de espécies (50%), corrobora com os dados aqui apresentados. Adicionalmente, Pantoja et al. (2007) isolaram 18 gêneros de fungos do ar de setores da Universidade Estadual do Ceará, entre eles: *Aspergillus*,

*Cladosporium*, *Curvularia* e *Rhizopus*, sendo *Aspergillus* o grupo de maior representatividade (78%), assim como no presente manuscrito. Moura et al. (2013) reportam oito espécies isoladas do Centro Vocacional Tecnológico de Tauá – Ceará. Entre estas estão contempladas *Aspergillus flavus* e *Cladosporium cladosporioides*, também isoladas neste trabalho. *Aspergillus* e *Cladosporium* foram os grupos mais representativos na análise de fungos do ar em uma universidade de Parma (ZONI et al., 2020), assim como no estudo microbiológico do ar em jardins de infância na Eslovênia (REJC et al., 2019) e na análise microbiológica do ar realizada por Fu et al. (2020) em escolas de ensino médio de Johor Bahru, Malásia, desta forma, corroborando com este estudo pela representatividade dos dois gêneros.

Quanto às coletas, o índice de similaridade de Jaccard foi maior (38,4%) entre as coletas 2 e 3. O índice de similaridade de Bray-Curtis demonstrou resultado semelhante, com índice de 24,1% (Figura 3-4). Segundo a análise de Jaccard, a similaridade da microflora anemófila foi maior entre os Setores 1 e 2 (54,5%). Adicionalmente, as comunidades de fungos entre estes setores apresentaram maior similaridade (16,7%), conforme a análise de Bray-Curtis (Figura 5-6).

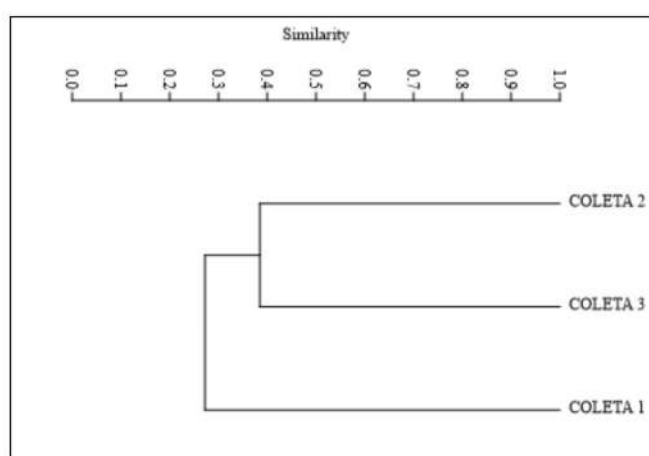


Figura 3 - Dendrograma de Similaridade de Jaccard.

Fonte: Os autores

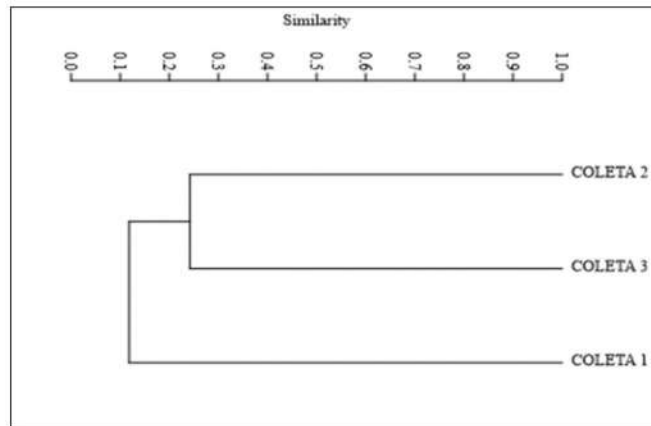


Figura 4 - Dendrograma de Similaridade de Bray-Curtis entre as coletas.  
 Fonte: Os autores

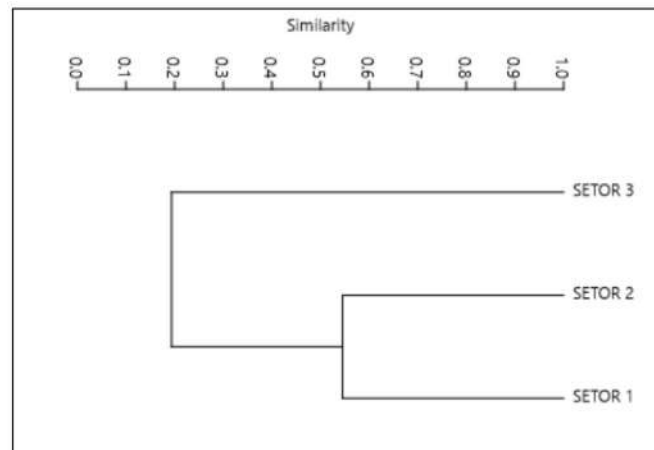


Figura 5 - Dendrograma de Similaridade de Jaccard entre os setores.  
 Fonte: Os autores

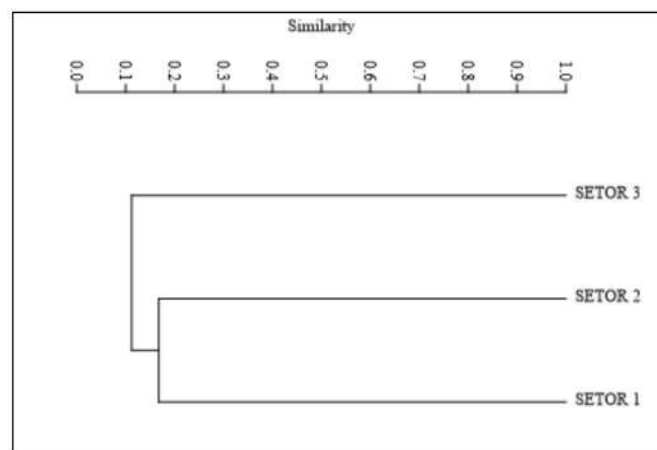


Figura 6 - Dendrograma de Similaridade de Bray-Curtis entre os setores.  
 Fonte: Os autores

Mesmo sendo a análise de similaridade um teste estatístico bastante utilizado em estudos envolvendo microrganismos, não existem estudos de microbiota fúngica anemófila usando estes testes para interpretação de dados sendo, provavelmente, este seja o primeiro trabalho sobre fungos anemófilos a comparar a composição de espécies fúngicas por análise de similaridade. Acredita-se que os setores 1 e 2 apresentaram maior similaridade entre as populações fúngicas devido ao transporte sucessivo de materiais estudados no Laboratório de Botânica e Herbário, relação esta que não ocorre entre estes setores e a Biblioteca (Setor 3). Dentre os gêneros estudados, *Aspergillus* produzem metabólitos secundários tóxicos ao homem assim ressaltado por Bongomin et al. (2017) que estimam existir mundialmente cerca de 11 milhões de pessoas com doença respiratória relacionada. Este grupo de fungos é representado por *Aspergillus fumigatus*, estando relacionado à morte por doença infecciosa entre pessoas imunodeficientes. A aspergilose ocorre através da inalação dos conídios destes fungos dispersos no ar de ambientes internos e externos (LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Após *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* é o maior agente etiológico de aspergilose invasiva apresentando alta ocorrência em países tropicais (RUDRAMURTHY et al., 2019). Os demais táxons de *Aspergillus* isolados neste estudo, não possuem incidências patológicas.

Quanto a incidência de doenças relacionadas a *Penicillium citrinum*, fungo de maior ocorrência neste estudo, pode-se mencionar tão somente o caso de pneumonia fatal reportado por Mok et al. (1997) em uma mulher com sistema imunológico debilitado. Enquanto *Engyodontium* possui espécies patógenas a humano, tendo registro etiológico causando ceratite micótica mencionado para a Índia (THAMKE et al., 2015).

O táxon *Cladosporium cladosporioides* foi apresentado como agente etiológico de infecção pulmonar em uma mulher imunocomprometida, tornando-se um alerta para pessoas que possuem o sistema imunológico crítico (CASTRO et al. 2013). Grava et al. (2016) reportaram um caso de pneumonia hemorrágica pontuando a importância patológica de *C. cladosporioides* em relação ao trato respiratório. Além do mais, esta espécie juntamente com *C. herbarum* tem sido relacionado a doenças respiratórias crônicas e já foram isoladas do seio nasal de pessoas com rinosinusites (MURR et al., 2012; KNUTSEN et al., 2012).

*Curvularia brachyspora*, *Nigrospora sphaerica* e *Talaromyces purpurogenus* são consideradas patógenas oportunistas, podendo causar infecções graves em pessoas imunocomprometidas, como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e diabéticos (MOTSWALEDI; PILLAY, 2018; KISS et al., 2020). Espécies de *Paecilomyces* causam, raramente, infecções em humanos, sendo *P. variotii* a espécie patogena mais comum estando associada a doenças infecciosas, como peritonite, pneumonia, osteomielite, endoftalmite e fungemia (MARQUES et al., 2019).

*Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus arrhizus* var. *tonkinensis* são agentes patológicos de mucoromicose, infecção causada por fungos da ordem Mucorales Fr.. Há relatos de *R. arrhizus* causando Infecções rino-órbito-cerebral, pulmonares e disseminadas. A predominância dos casos de mucoromicoses por *R. arrhizus* se dá em pacientes com sistema imunológico crítico (WALTHER et al., 2019). Enquanto *Rhizomucor pusillus* tem sido relatado como agente etiológico de infecções cerebrais em pessoas sob tratamento oncológico (CHEN et al., 2019; FEHR et al., 2020).

Quanto à similaridade entre as coletas, pode estar relacionada à fatores sazonais que possivelmente foram mais semelhantes.

#### 4. CONCLUSÃO

Espécies de fungos com histórico patológico, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*, foram isoladas de setores internos climatizados de uma universidade do Estado do Piauí, confirmando a hipótese previamente estabelecida. Desta forma, sugere-se um maior perfil de higiene nestes setores, como dos equipamentos de ar condicionados, para evitar ou amenizar ao máximo possível a propagação destes propágulos fúngicos. Posteriores estudos sobre a qualidade do ar para investigar o número de UFC/10<sup>3</sup> faz-se necessário para maior análise do risco biológico.

#### 5. REFERÊNCIAS

BARNES, C. Fungi and Atopy. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, [Totowa], v. 57, n. 3, p. 439-448, 2019.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J.Z.; MEIJER, M.; DIJKSTERHUIS, J.; JURJEVIC, Z.; ANDERSEN, B.; HOUBRAKEN, J.; CROUS, P.W.; SAMSON, R.A. *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in Mycology**, [Baarn], v. 89, p. 177-301, 2018.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of Fungi**, [Basel], v. 3, n. 4, p. 1-27, 2017.

BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, [Estados Unidos], v. 27, p. 325-349, 1957.

CASTRO, A.S.; OLIVEIRA, A.; LOPES, V. Pulmonary phaeohyphomycosis: a challenge to the clinician. **European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society**, [Copenhagen], v. 22, n. 128, p. 187–192, 2013.

CHAUDHURI, A.; BASU, C.; BHATTACHARYYA, S.; CHAUDHURI P. Development of health risk rating scale for indoor airborne fungal exposure. **Archives of Environmental & Occupational Health**, [Washington], v. [15], p. 1-9, 2019.

CHEN, Q.; CHEN, K.; QIAN, S.; WU, S.; XU, L.; HUANG, X., SHI, P.; WANG, K.; WANG, M.; WANG, X. Disseminated mucormycosis with cerebellum involvement due to *Rhizomucor pusillus* in a patient with multiple myeloma and secondary myelodysplastic syndrome: A case report. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [Atenas], v. 18, p. 4076-4080, 2019.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Surrey: Common- Wealth Mycological Institute, 1971.

FEHR, M.; CATHOMAS, G.; GRABER, A; MAKERTC, E.; GAUSC, E.; BOGGIAN, K. Multi-fungal sepsis and mucormycosis of the central nervous system in a patient treated with ibrutinib, a case report and review of the literature. **Medical Mycology Case Reports**, [Amsterdam], v. 27, p. 14-16, 2020.

FERRANTI, L.S.; FUNGARO, M.H. P.; MASSI, F.P.; SILVA, J.J.; PENHA, R.E.S.; FRISVAD, R.C.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T. Diversity of *Aspergillus* section Nigri on the surface of Vitis labrusca and its hybrid grapes. **Internacional Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 268, p. 53-60, 2018.

FU, X.; NORBÄCKC, D.; YUAN, Q.; LIB, Y.; ZHU, X.; JAMAL H. H.; HASHIMH, Z.; ALI, F.; ZHENGJ, YI-WU; LAI, XU-XIN; SPANGFORT, M. D.; DENG, Y.; SUN, Y. Indoor microbiome, environmental characteristics and asthma among junior high school students in Johor Bahru, Malaysia. **Environment International**, [Amsterdam], v. 138, p. 1-9, 2020.

GAMS, W.; HOOG, G.S.; SAMSON, R.A. The hyphomycete genus *Engyodontium* a link between *Verticillium* and *Aphanocladium*. **Persoonia**, [Leiden], v. 12, p. 135-147, 1984.

GRAVA, S.; LOPES, F.A.D.; CAVALLAZZI, R.S.; GRASSI, M.F.N.N.; SVIDZINSKI, T.I.E. A rare case of hemorrhagic pneumonia due to *Cladosporium cladosporioides*. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [Brasília], v. 42, n. 5, p. 392-394, 2016.

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity revisited: 2.2 to 3.8 millions species. **Microbiology Spectrum**, [Washington], v. 5, p. 1-17, 2017.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 70, p. 53-138, 2011.

HYDE, K.D.; SARMA, V.V. *Vismaya chaturbeeja* gen et sp. nov. from a dicotyledonous twig in Hong Kong. **Nova Hedwigia**, [Weinheim], v. 73, n. 1-2, p. 247-252, 2001.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, [Suíça], v. 44, n. 63, p. 223-270, 1908.

KIMURA, M.; UDAGAWA, S.I.; MAKIMURA, K.; SATOH, K.; TOYAZAKI, N.; ITO, H. Isolation and identification of *Rhizomucor pusillus* from pleural zygomycosis in an immunocompetent patient. **Medical Mycological**, [Oxford], v. 47, p. 869–873, 2009.

KISS, N.; HOMA, M.; MANIKANDAM, P.; MYTHILI, A.; KRIZSÁN, K.; REVATHI, R.; VARGA, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C.; KREDICS, L.; KOCSUBÉ, S. New Species of the Genus *Curvularia*: *C. tamilnaduensis* and *C. coimbatorensis* from Fungal Keratitis Cases in South India. **Pathogens**, [Basel], v. 9, n. 9, p. 1, 2020.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs**. North Ryde: Csiro, 1988.

KNUTSEN, A. P.; BUSH, R. K.; DEMAIN, J. G.; DENNING, D. W.; DIXIT, A.; FAIRS, A.; GREENBERGER, P. A.; KARIUKI, B.; KITA, H.; KURUP, V. P.; MOSS, R. B.; NIVEN, R.M.; PASHLEY, C. H.; SLAVIN, R.G.; VIJAY, H.M.; WARDLAW, A. J. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [Nova Iorque], v.129, n.2, p.280–291, 2012.

LACAZ, C.L. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LATGÉ, J.P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, [Amsterdam], v. 33, n. 1, p. 1-75, 2020.

MADHWAL, S.; PRABU, V.; SUNDRIYAL, S.; SHRIDHAR, V. Ambient bioaerosol distribution and associated health risks at a high traffic density junction at Dehradun city, India. **Environmental monitoring and assessment**, [Dordrecht], v. 192, n. 196, p. 1-15, 2020.

MARQUES, D. P.; CARVALHO, J.; ROCHA, S.; DOMINGOS, R. A case of pulmonary mycetoma caused by *Paecilomyces variotii*. **European Journal of Case Reports in Internal Medicine**, [Milão], v. 6, p. 1-3, 2019.

MERKHOFFER, R.M.; KLEIN, B.S. Advances in Understanding Human Genetic Variations That Influence Innate Immunity to Fungi. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [Lausanne], v. 10, n. 69, p. 1-20, 2020.

MOBIN, M.; SOLMITO, M.A. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [Uberaba], v. 39, n. 6, p. 556-559, 2006.



MOK, T.; KOEHLER, A. P.; YU, M.Y.; ELLIS, D.H.; JOHNSON, P.J.; WICKHAM, N.W.R. Fatal *Penicillium citrinum* pneumonia with pericarditis in a patient with acute leucemia. **Journal of Clinical Microbiology**, [Washington], v. 35, n. 10, p. 2654-2656, 1997.

MORI, T.; KIKUCHI, T.; KATO, J.; KODA, Y.; SAKURAI, M.; KIKUMI, O.; INOSE, R.; MURATA, M.; HASEGAWA, N.; NAKAYAMA, H.; YAMAZAKI, R.; OKAMOTO, S. Seasonal changes in indoor airborne fungal concentration in a hematology Ward. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [Switzerland], v. 26, n. 4, p. 363-366, 2019.

MOTSWALEDI, H. M.; PILLAY, R. T. An unusual deep fungal infection with *Nigrospora sphaerica* in HIV positive patient. **International Journal of Dermatology**, [Waldorf], v. 58, n. 3, p. 333-335, 2018.

MOURA, L.F.W.G.; OLIVEIRA, M.V.; LÔ, M.M.; MOTA, J.G.S.M.; MAGALHÃES, E.A.; LIMA, M.C.L.; MAGALHÃES, F.E.A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 2, p. 157-165, 2013.

MURR, A.H.; GOLDBERG, A. N.; PLETCHER, S.D.; DILLEHAY, K.; WYMER, L. J.; VESPER, S.J. Some Chronic Rhinosinusitis Patients Have Elevated Populations of Fungi in Their Sinuses. **The Laryngoscope**, [Washington], v. 122, p. 1438–1445, 2012.

ODEBODE, A.; ADEKUNLE, A.; STAJICH, J.; ADEONIKEKUN, A. Airborne fungi spores distribution in various locations in Lagos, Nigeria. **Environmental monitoring and assessment**, [Dordrecht], v. 192, n. 87, p. 1-14, 2020.

PANTOJA, L.D. M.; COUTO, M.S.; PAIXÃO, G.C. Diversidade de bioaerossóis presentes em ambientes urbanizados e preservados de um campus universitário. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 41-47, 2007.

PEREIRA, D. B.; CRUZ, M.O.; ALVES, M.H. Anemophilous fungi in intensive care sectors of a public hospital in the North of Piauí, Brazil. **Revista Científica INOVALE**, [Parnaíba], v. 1, p. 1-4, 2020.

REJC, T.; KUKEC, A.; BIZJAK, M.; GODIČTORKAR, K. Microbiological and chemical quality of indoor air in kindergartens in Sloveni. **International Journal of Environmental Health Research**, [Basel], v. [8], p. 1 -14, 2019.

RIDDEL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, [Lancaster], v. 42, p. 265-270, 1950.

RUDRAMURTHY, S.M.; PAUL, R. A.; CHAKRABARTI, A.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F. Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance and Management. **Journal of Fungi**, [Basel], v. 5, n. 55, p. 1-23, 2019.

SOBRAL, L. V.; MELO, K. N.; SOUZA, C. M.; SILVA S. F.; SILVA, G.L.R.; SILVA, A. L.F.; WANDERLEY, K. A.A.; OLIVEIRA, I. S.; CRUZ, ROBERTA. Antimicrobial and enzymatic activity of anemophilous fungi of a public university in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [Rio de Janeiro], v. 89, n. 3, p. 2327-2356, 2017.

TAN, Y.P.; CROUS, P.W.; SHIVAS, R.G. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. **MycKeys**, [Sofia], v. 35, p. 1–25, 2018.

THAMKE, D.C.; MENDIRATTA, D.K.; DHABARDE, A.; SHUKLA, A.K. Mycotic keratitis due to *Engyodontium album*: First case report from India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [Nova Delhi], v. 33, n. 2, p. 303-304, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, C.B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 78, p. 343-371, 2014.

WALTHER, G.; WAGNER, L.; KURZAI, O. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. **Journal of Fungi**. [Basel], v. 5, n. 4, p. 1-23. 2019.

YILMAZ, N.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 78, p. 175-341, 2014.

ZHENG, R.Y.; CHEN, G.Q.; HUANG, H.; LIU, X.W. A monograph of *Rhizopus*. **Sydowia**, [Horn], v. 59, p. 273-372, 2007.

ZONI, R.; CAPOBIANCO, E.; VIANI, I.; COLUCCI, M. E.; MEZZETTA, S.; AFFANNI, P.; VERONESI, L.; FONZO, D. D.; ALBERTINI, R.; PASQUARELLA, C. Contaminazione fungina dell'aria in un edificio universitario. **Acta Biomedica: Atenei Parmensis**, [Parma], v.91, p. 150-153, 2020.

# Capítulo 2

## Efeito da temperatura e pH na detecção de amilases e celulasas por táxons de *Aspergillus* isolados do ar

Mateus Oliveira da Cruz  
Diogo Xavier Lima  
Jéssica Soares Barbosa  
Ana Beartz Sousa Morais  
Maria Helena Alves

### RESUMO

Os fungos anemófilos têm sido poucos explorados biotecnologicamente. No entanto, muitos desses fungos, como *Aspergillus*, apresentam características fisiológicas que os tornam promissores para estudos de produção de enzimas como amilases e celulasas, que apresentam grande importância industrial para produção de um grande número de produtos relevantes ao homem. A otimização destas enzimas é essencial para a produção das mesmas em grande escala. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH e temperatura na detecção de amilases e celulasas por *Aspergillus* isolados do ar. A coleta dos propágulos fúngicos se deu em setores da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Parnaíba, Piauí, através do método de exposição de placas abertas contento meio de cultivo Ágar Martin. Os espécimes foram isolados e identificados por taxonomia clássica. Os testes enzimáticos foram realizados em meio de cultura específico: amido para amilases e carboximetilcelulose para indução de

celulasas. O experimento foi carreado em triplicata, sendo as amostras inoculadas em meio de cultivo de diferentes faixas de pH (entre 5.0 e 9.0) e incubadas sob as temperaturas de 28°C, 33°C, 38°C e 42°C. Após 120 horas de incubação, a atividade enzimática foi determinada e expressado o diâmetro do halo formado em cm. Seis táxons foram estudados: *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus* var. *japonicus* e *A. oryzae*. Todas os táxons apresentaram detecção de amilases e celulasas. Os diferentes valores de pH e temperatura influenciaram na detecção enzimática dos isolados testados. Desta forma, o presente estudo apresenta o potencial biotecnológico de fungos anemófilos do gênero *Aspergillus* quanto à detecção enzimática de amilases e celulasas, como também a importância dos parâmetros de pH e temperatura na análise qualitativa destas enzimas.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas; Fungos; Metabólitos.

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos anemófilos são aqueles cuja dispersão ocorre através do ar atmosférico. Estes fungos estão expostos a condições hostis, como alteração de temperatura e umidade, escassez de nutrientes e radiação ultravioleta (UV). Com isso, esses microrganismos apresentam mecanismos metabólicos apropriados e adaptados para diminuir os efeitos adversos do ambiente e garantir a sobrevivência sob condições adversas. Estudos, como os de Tanaka et al. (2019), vem apresentando perspectiva promissora para bioprospecção destes fungos anemófilos.

Dentre os fungos anemófilos, o gênero *Aspergillus* Micheli é o táxon de maior representatividade conforme os autores Chaudhuri et al. (2019) e Fu et al. (2020). Táxons deste gênero têm sido estudados quanto ao seu potencial biotecnológico para a produção de compostos químicos, como antibióticos (PRADO et al., 2017) e proteínas (ASRAST; GIRMA, 2018). Sobral et al. (2017) apontam que espécies de *Aspergillus* isolados do ar possuem capacidade para produzir enzimas extracelulares.

As enzimas são bastante aplicadas biotecnologicamente na produção de diversos produtos, como alimentos, remédios, roupas, cosméticos, detergentes e papel, bem como na indústria têxtil e química (ORLANDELI et al., 2012; AVENDAÑO et al., 2016). Conforme novos dados reportados pelo Global Market Insights Inc., o mercado de enzimas industriais ultrapassará um movimento de USD 9.5 bilhões até o ano de 2024 (AAL et al., 2019). Diante da diversidade de enzimas existentes, tem-se aquelas que clivam ligações químicas através da água, constituindo a classe das hidrolases, sendo o caso das amilases e celulasas.

As amilases possuem por função a catálise da hidrólise do amido produzindo dextrina e polímeros de glicose (GUPTA et al., 2003). Estas enzimas são usadas pelos fungos para quebra do amido, que é uma grande molécula formada por amilose e amilopectina. A clivagem dessa molécula libera carbono necessário para a nutrição do fungo (PEIXOTO et al., 2003). Condições, como pH, temperatura, tempo de incubação e crescimento celular, são fatores determinantes na detecção de amilases por fungos (ARAST; GIRMA, 2018).

No que diz respeito às celulasas, estas catalisam a hidrólise da celulose. Por meio das celulasas ocorre a liberação de hexoses e pentoses. Estas enzimas não conseguem individualmente hidrolisar a celulose de maneira eficiente, assim necessitando da ação conjunta de várias outras enzimas. As celulasas fúngicas têm sido as mais estudadas e exploradas biotecnologicamente quanto à aplicação industrial (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

As enzimas são produzidas pelos fungos em meio controlado, por meio da fermentação, onde o microrganismo é inoculado em um biorreator que possui o nutriente adequado. Para essa produção é necessário observar as condições físico-químicas,

bioquímicas e operacionais. A síntese de enzimas extracelulares por fungos pode ocorrer em processo submerso, semi-sólido e de superfície. Neste último, as células crescem na superfície do meio de cultura (AL-MAQTARI; AL-ANSI; MAHDI, 2019).

O cultivo de microrganismos em estado sólido torna-se mais viável por apresentar baixo custo (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; EL-BAKRI et al., 2015). A temperatura e pH são parâmetros importantes a serem avaliados para uma melhor produção de enzimas (SHAH et al., 2014). Com isso, experimentos têm sido desenvolvidos com fermentação em estado sólido sob diferentes temperaturas e diferentes faixas de pH, com o intuito de estabelecer parâmetros ótimos para produção de enzimas com potencial biotecnológico (PATEL; PATEL; SHAH, 2014; BHAVSAR et al. 2015; ABDULLAH et al., 2018).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar espécimes de *Aspergillus* isolados do ar quanto à detecção de amilases e celulases, bem como avaliar os efeitos do pH e temperatura na produção dessas enzimas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Isolamento e identificação dos fungos

Os propágulos fúngicos foram isolados do ar de setores fechados e climatizados da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPar), Campus Ministro Reis Velloso (CMRV), situada na cidade de Parnaíba, Piauí, através do método Settle plate de acordo com a metodologia de Lacaz et al. (2002), com algumas modificações. As placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Martin (MARTIN, 1950) foram expostas por 10 minutos a uma altura de um metro do chão.

Após a exposição das placas, as mesmas foram fechadas, vedadas com filme de PVC e mantidas em luminosidade e temperatura ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ambientes para observação do desenvolvimento dos fungos, sendo a observação realizada no decorrer de cinco dias de incubação. Os fungos isolados foram incubados em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) (PITT; HOCKING, 1997) e/ou Ágar Batata Dextrose (BDA) (LACAZ et al. 2002).

A identificação dos espécimes foi realizada por comparação morfológica e morfocultural dos isolados com a literatura especializada seguindo Lacaz et al. (2002), Klich e Pitt (1988) e Ellis (1971). Os isolados fúngicos estão armazenados no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – CMRV.

### 2.2. Triagem para produção de enzimas e efeito da temperatura e pH

Com o objetivo de evitar a variabilidade genética e obter uma cultura pura, foi realizado o cultivo monospórico dos espécimes selecionados usando o protocolo de Santos et al. (2009). A partir da cultura monospórica foi obtido a suspensão de esporos, da qual uma alíquota foi removida para câmara de Newbauer a fim de observar a contagem dos esporos sob microscópio óptico, resultando em suspensão de 10<sup>6</sup> esporos/mL, conforme a metodologia adotada por Alves et al. (2002).

Para detecção de amilases usou-se a metodologia proposta por Hankin e Anagnostakis (1975), com modificação, utilizando como substrato 0,2% de amido solúvel (Merck). Seguindo o método de Dingle et al. (1953), para a detecção de celulasas usou-se Carboximetilcelulose como substrato específico. Adotando a metodologia utilizada por Alves et al. (2002), 15 mL do substrato foi vertido na placa de Petri e, após solidificado, foi realizado “pocinho” central de 5mm de diâmetro no qual foi adicionado 50 µL da suspensão de esporos 10<sup>6</sup>.

Para a revelação dos halos de amilases e celulasas foi usado uma solução de iodo a 5%(m/v) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975) e vermelho congo a 5% (m/v) (DINGLE et al., 1953), respectivamente. A detecção de enzimas foi analisada através do diâmetro do halo de degradação a partir do verso da placa de Petri e representado em centímetro. Todos os testes foram realizados em triplicata. A medição dos halos ocorreu com 120 horas.

Cinco valores de pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 e 9.0) foram testados. Para a manipulação do pH dos substratos usou-se NaOH (20%) e HCl (10%) (CHANDRASEKARAN; KUMARESAN; MANAVALAN, 2015). Enquanto para a otimização de temperatura, trabalhou-se com estufa bacteriológica à temperatura de: 28°C, 33°C, 38°C e 42°C. Todos os testes seguiram-se em triplicata.

### 2.3. Análises estatísticas

Para observar diferenças nos valores médios foi utilizado ANOVA de duas vias e comparação de médias pelo teste de Tukey (p = 0,05), com o pacote estatístico SPSS (versão 7.0). Valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado foram verificados seis táxons: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, *A. flavus* Lank, *A. foetidus* Thom & Raper, *A. fumigatus* Fresen, *A. japonicus* Sait.

var. *japonicus* e *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn. Todas os táxons isolados apresentaram formação de halo por amilases e celulases. As diferenças das condições de pH e temperatura influenciaram no tamanho do halo de degradação enzimática produzida pelos estudados.

Para a detecção de amilases por *A. carbonarius*, a ANOVA de duas vias demonstrou que ocorreu efeito da temperatura no diâmetro do halo [F (3,40) = 50,801; p < 0,001] e pH [F (4,40) = 32,142; p < 0,001], como também houve efeito da interação entre temperatura e pH [F (12,40) = 3,13; p < 0,005] na detecção de amilases. O post-hoc de Tukey demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre o tamanho dos halos sob temperaturas 28°C e 33°C, e 38°C e 42°C. Além disso, as médias no pH 5.0 diferem de todos outros valores de pH e neste o maior halo, medindo 3.2 cm, foi desenvolvido. Desta forma, o melhor parâmetro para detecção de amilases por *A. carbonarius* consistiu em pH 5.0 e temperaturas 38°C ou 42°C (Figura 1).

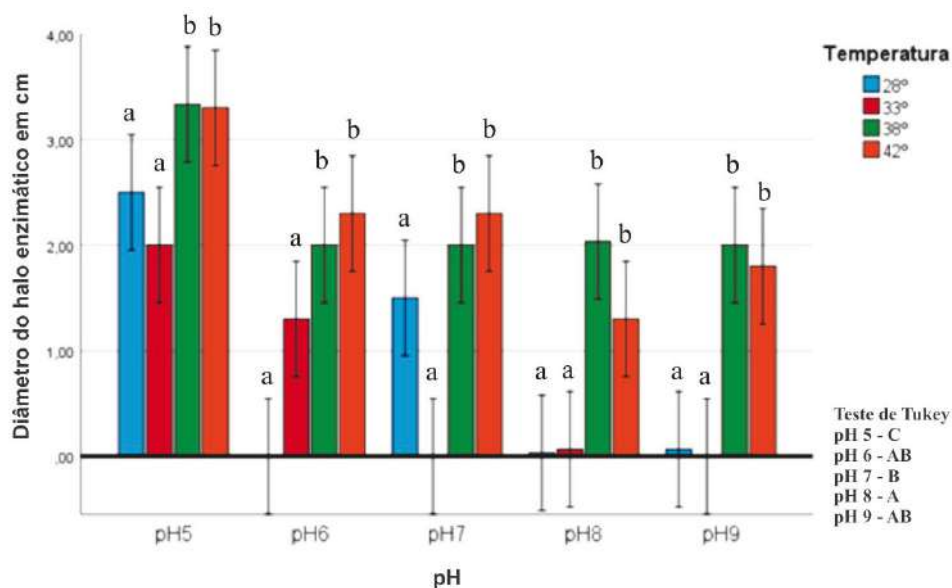


Figura 1 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Amilases por *Aspergillus carbonarius*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey (p < 0,05). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey (p < 0,05). Barras de erros: 95% CI.

Quanto aos testes para detecção de celulases, foi observado que houve efeito da temperatura [F (3,40) = 19,438; p < 0,001] e pH [F (4,40) = 11,285; p < 0,001] no diâmetro do halo, como também ocorreu efeito da interação entre temperatura e pH [F (12,40) = 12,522; p < 0,001] na detecção de celulases por *A. carbonarius*. No entanto, não ocorreu diferença significativa entre a detecção enzimática nas temperaturas 28°C e 38°C. Além

disso, as médias dos halos formados no pH 8.0 diferiram de todas as médias dos halos formados nos demais valores de pH. Os parâmetros ótimos de detecção de celulases por *A. carbonarius* foi sob as condições de temperatura 28°C e pH 8.0, onde detectou-se halo de 3.2 cm (Figura 2).

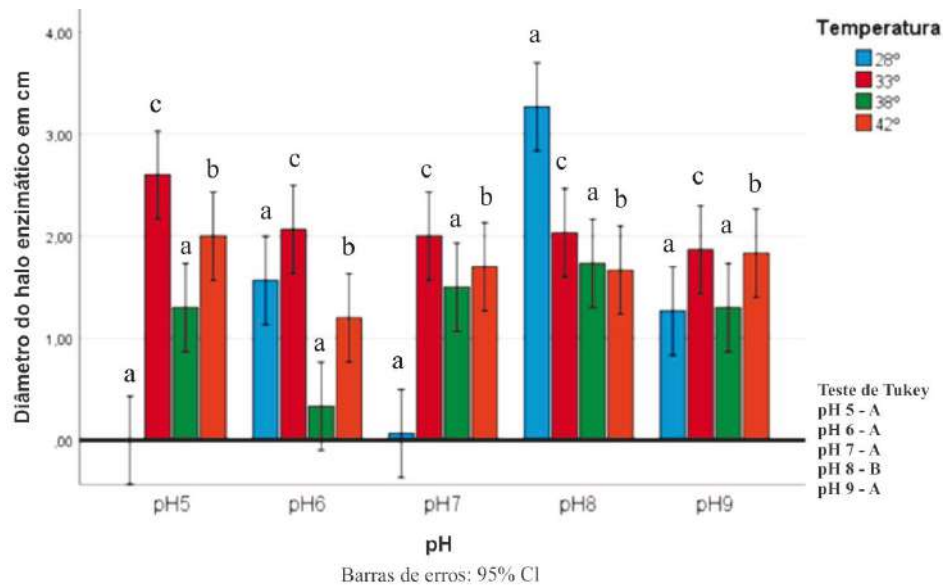


Figura 2 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Celulases por *Aspergillus carbonarius*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os testes com *Aspergillus flavus* demonstraram que houve efeito da temperatura [ $F(3,40) = 271,727$ ;  $p < 0,001$ ] e pH [ $F(4,40) = 50,344$ ;  $p < 0,001$ ] no diâmetro do halo, como também existiu efeito da interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 71,361$ ;  $p < 0,001$ ] na detecção de amilases por *A. flavus*. As médias dos halos apresentaram diferença significativa entre todas as temperaturas e também entre todos os valores de pH. Os maiores halos foram sob 38°C em pH 5.0 e 9.0 medindo 5.2 cm. Assim sendo os parâmetros ótimos para detecção de amilases por *A. flavus* em meio de cultura sólido (Figura 3). Os dados apresentaram que houve efeito da temperatura [ $F(3,40) = 64,759$ ;  $p < 0,001$ ] e pH [ $F(4,40) = 37,401$ ;  $p < 0,001$ ] no diâmetro do halo, como também existe efeito da interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 17,115$ ;  $p < 0,001$ ] na produção de celulases por *A. flavus*. Não houve diferença significativa entre as temperaturas 28°C, 33°C e 38°C. Além disso, não houve diferença significativa entre os pH 5.0 e 6.0, e 6.0 e 7.0. O maior halo (3.0 cm) foi formado em pH 8.0 sob temperatura de 33°C e 38°C, assim sendo os parâmetros ótimos para produção de celulases por este isolado de *A. flavus* (Figura 4).



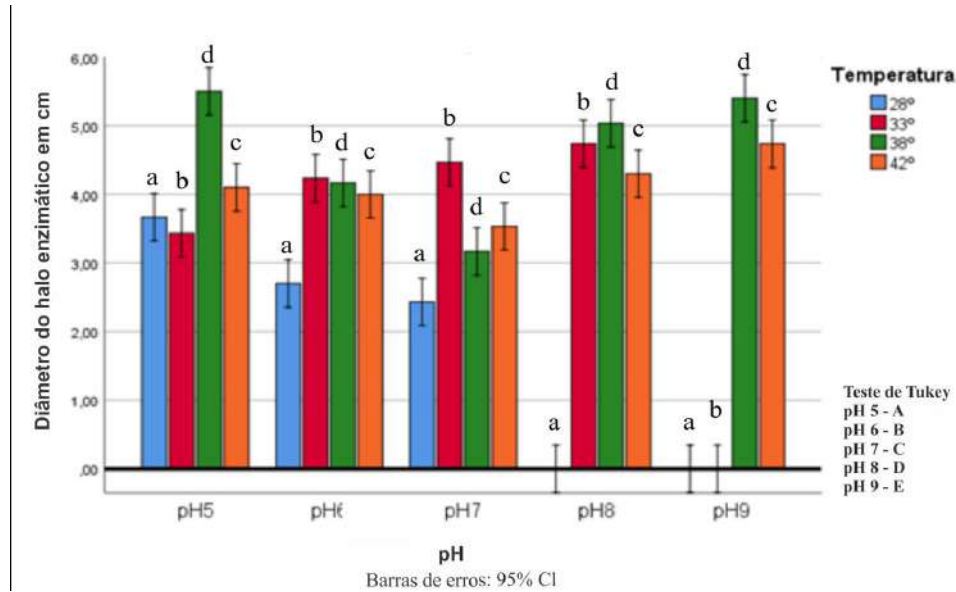


Figura 3 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Amilases por *Aspergillus flavus*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

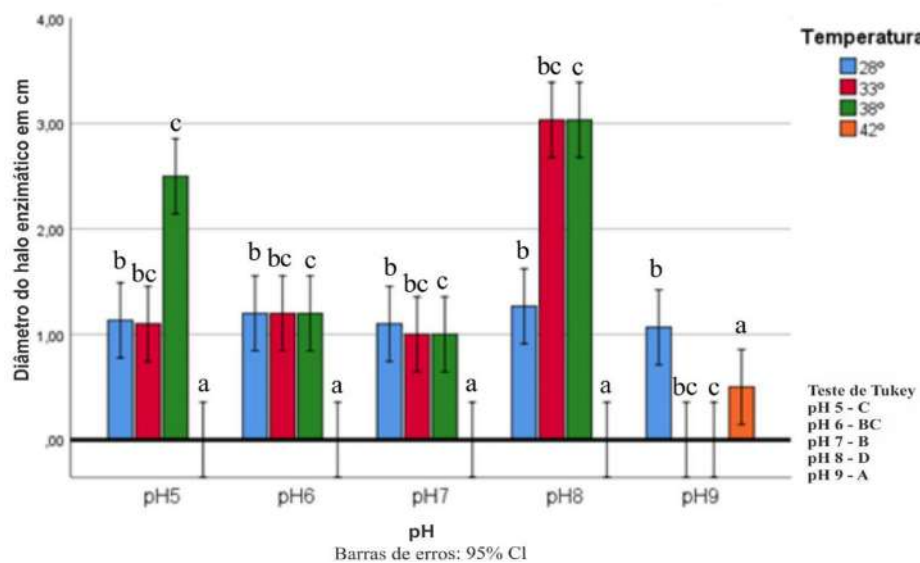


Figura 4 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Celulasas por *Aspergillus flavus*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As médias dos halos mostram que ocorreu efeito da temperatura [F (3,40) = 46,121;  $p < 0,001$ ] e pH [F (4,40) = 12,322;  $p < 0,001$ ] como também existiu efeito da interação entre temperatura e pH [F (12,40) = 36,756;  $p < 0,005$ ] na produção de amilases por *A. foetidus*. Além do mais, houve diferença significativa entre as médias dos halos sob 28°C e todas as demais temperaturas. As médias dos halos não diferem entre pH 6.0, pH 8.0 e pH 9.0, entre pH 6.0, pH 7.0 e pH 9.0 e entre pH 5.0 e pH 7.0. O maior halo apresentado foi de 5.2 cm em pH 5.0 e temperatura igual a 33°C. Tendo por base as análises estatísticas, os parâmetros ótimos para detecção de amilases por *A. foetidus* é a temperatura de 33°C tanto em pH 5.0 como em pH 7.0 (Figura 5). Quanto à detecção de celulases, os resultados apresentaram efeito da temperatura [F (3,40) = 14,912;  $p < 0,001$ ] e pH [F (4,40) = 18,407;  $p < 0,001$ ] no diâmetro do halo, como também existiu efeito da interação entre temperatura e pH [F (12,40) = 8,780;  $p < 0,001$ ] na produção de celulases por *A. foetidus*. O post-hoc de Tukey demonstrou que ocorreu diferença significativa entre as médias dos halos formados sob 42°C e todas as outras temperaturas. Além disso, não houve diferença significativa entre estas médias nos valores de pH 7.0, 8.0 e 9.0. O maior halo (5.0 cm) foi observado em pH 5.0 sob 38°C. Desta forma, sendo os parâmetros ótimos para detecção de celulases por este isolado de *A. foetidus* (Figura 6).

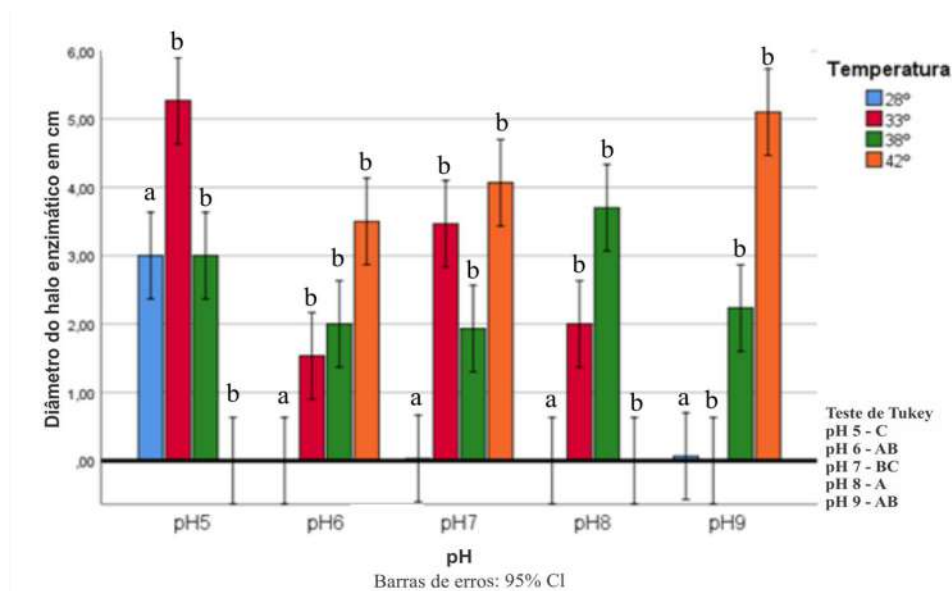


Figura 5 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Amilases por *Aspergillus foetidus*.

Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

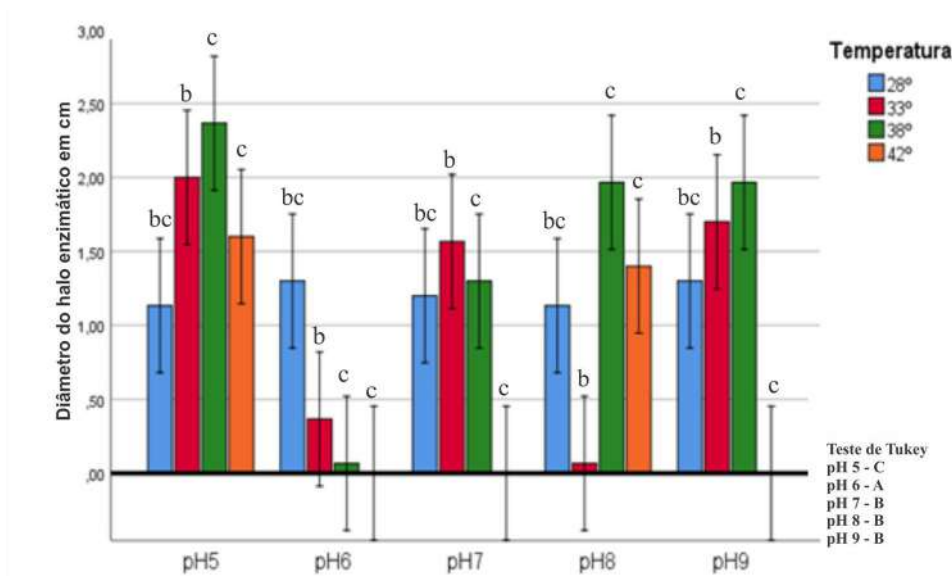


Figura 6 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Celulases por *Aspergillus foetidus*.

Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com as médias dos diâmetros de halo ocorreu efeito da temperatura [ $F(3,40) = 228,439$ ;  $p < 0,001$ ] e pH [ $F(4,40) = 9,060$ ;  $p < 0,001$ ] e da interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 26,840$ ;  $p < 0,001$ ] na detecção de amilases por *A. fumigatus*. Em contraste, não existiu diferença significativa entre as temperaturas 33°C e 42°C. As médias dos halos formados em pH 5.0 e 9.0 diferem das demais nos outros valores de pH. O maior halo de amilases mediu 8.0 cm de diâmetro sob 38°C e em pH 6.0, 7.0 e 8.0, desta forma, sendo os parâmetros ótimos para a produção enzimática (Figura 7). A detecção de celulases por *A. fumigatus* foi influenciada pela temperatura [ $F(3,40) = 34,083$ ;  $p < 0,001$ ], pH [ $F(4,40) = 21,150$ ;  $p < 0,001$ ] e pela interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 44,856$ ;  $p < 0,001$ ]. Não demonstrou diferença significativa entre os halos formados nas temperaturas 33°C e 42°C. Além disso, as médias no pH 8.0 diferiram de todas nos demais valores de pH. O maior halo de celulases formado por *A. fumigatus* teve um diâmetro de 6.9 cm em pH 8.0 e 33°C, sendo estes os melhores parâmetros na detecção de celulases por este isolado (Figura 8).

Quanto à otimização para detecção enzimática de amilases por *A. japonicus* var. *japonicus*, houve efeito da temperatura [ $F(3,40) = 46,593$ ;  $p < 0,001$ ] e pH [ $F(4,40) = 12,695$ ;  $p < 0,001$ ] no diâmetro do halo, como também ocorreu efeito da interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 15,089$ ;  $p < 0,001$ ]. O post-hoc de Tukey mostrou que não existiu diferença significativa entre o tamanho dos halos em temperaturas de 28°C e 38°C, e

que não demonstrou diferenças significativas entre os halos em pH 5.0, 6.0 e 7.0. Considerando a interação entre temperatura e pH, observa-se diferenças entre as médias em 28°C e pH 7.0, e 28°C em pH 9.0. Considerando a análise estatística, 28°C e 38°C são temperaturas ótimas para detecção de amilases por *A. japonicus* var. *japonicus* em pH 5.0, 6.0 e 7.0. O maior halo de amilases por este isolado apresentou diâmetro de 5.3 cm sob 38°C e pH 5.0 (Figura 9).

A mudança de temperatura mostrou efeito [F (3,40) = 82,164; p < 0,001], assim como o pH [F (4,40) = 31,396; p < 0,001], no diâmetro do halo de celulases por *A. japonicus* var. *japonicus*, como também verificou-se efeito da interação entre temperatura e pH [F (12,40) = 11,982; p < 0,001]. Na comparação entre temperaturas, não existiu diferença significativa entre 28°C e 38°C, e 33°C e 42°C. Além disso, não existem diferenças significativas entre os pH 5.0 e 9.0, 6.0 e 7.0. O maior halo apresentou 2.4 cm de diâmetro em 38°C; pH 5.0, não apresentando diferenças significativas com aqueles em 38°C; pH 9.0 e 28°C em pH 5.0 e 9.0, assim sendo os parâmetros para maior degradação do substrato por celulases pelo isolado de *A. japonicus* var. *japonicus* (Figura 10).

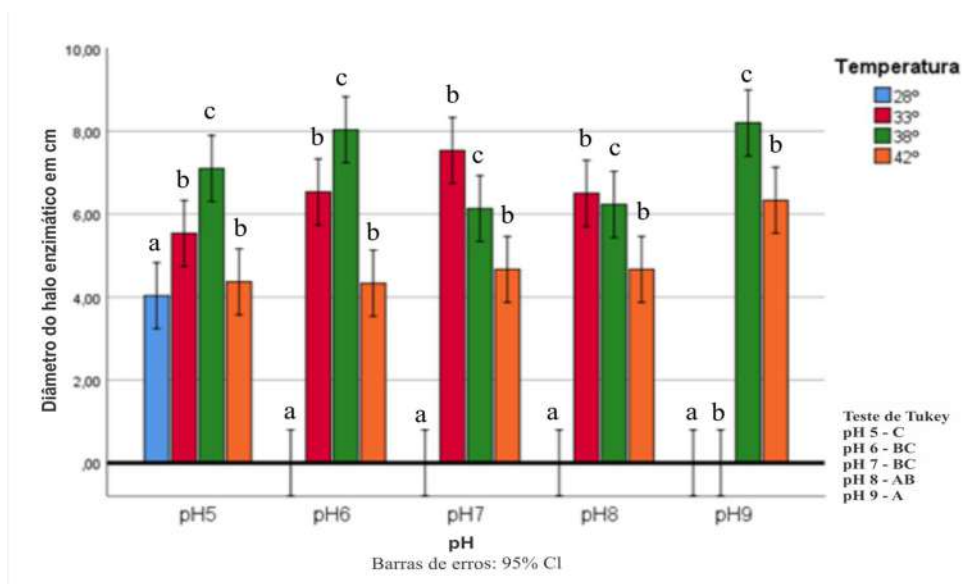


Figura 7 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Amilases por *Aspergillus fumigatus*.

Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey (p < 0,05). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey (p < 0,05).

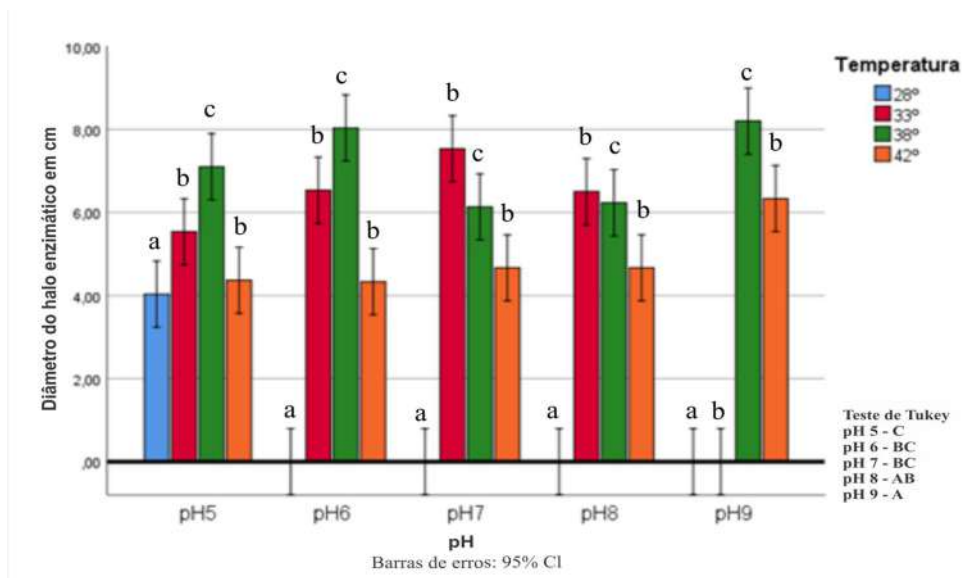


Figura 8 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Celulases por *Aspergillus fumigatus*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

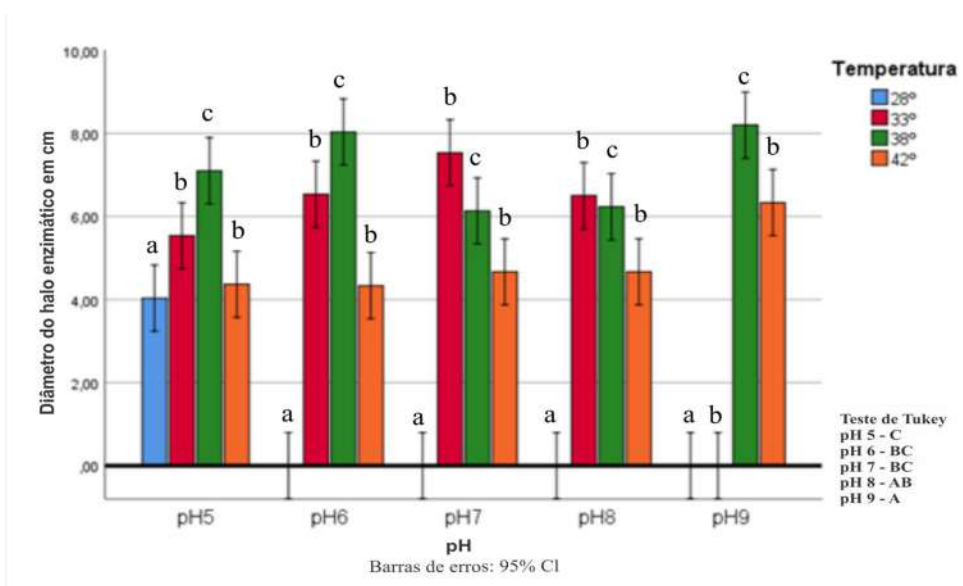


Figura 9 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Amilases por *Aspergillus japonicus var japonicus*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

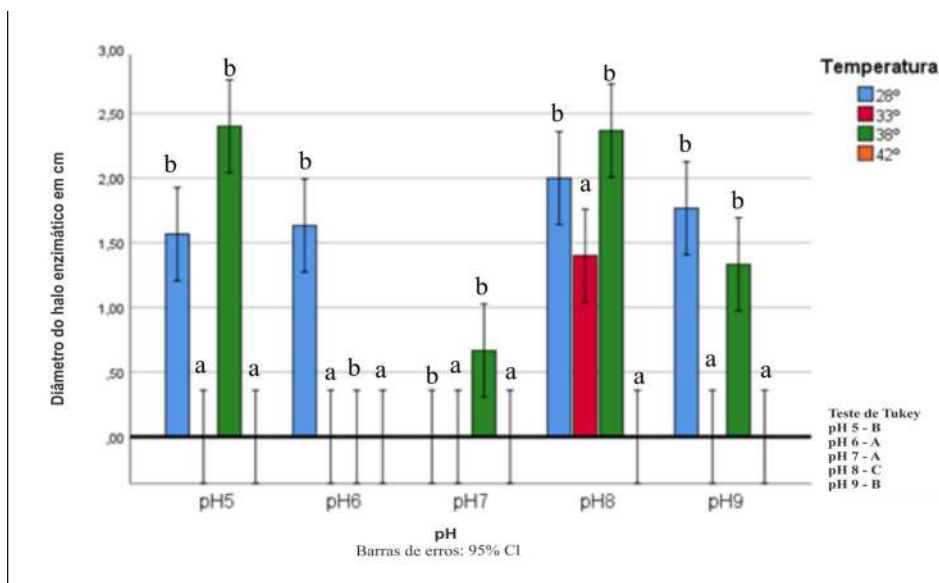


Figura 10 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Celulases por *Aspergillus japonicus* var. *japonicus*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a análise estatística, foi demonstrado efeito da temperatura [ $F(3,40) = 19,382$ ;  $p < 0,001$ ] e pH [ $F(4,40) = 142,434$ ;  $p < 0,001$ ] no diâmetro do halo, como também ocorreu efeito da interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 77,327$ ;  $p < 0,001$ ] na detecção de amilases por *A. oryzae*. Somente as médias dos halos formados sob 33°C apresentaram diferença significativa entre as demais nas outras temperaturas. Além do mais, não existiu diferença significativa entre as médias em pH 5.0 e 8.0, e entre 6.0 e 7.0. O maior halo mediu 5.2 cm de diâmetro em 33°C e pH 7.0 e não diferiu com o halo (5.0 cm) em pH 6.0, sendo assim os melhores parâmetros quanto à detecção de amilases por *A. oryzae* (Figura 11).

Quanto à produção de celulases por *A. oryzae*, a Anova de duas vias demonstrou efeito da temperatura [ $F(3,40) = 27,087$ ;  $p < 0,001$ ] e pH [ $F(4,40) = 44,496$ ;  $p < 0,001$ ] no diâmetro do halo, como também efeito da interação entre temperatura e pH [ $F(12,40) = 31,874$ ;  $p < 0,001$ ]. Entre as médias dos halos nas temperaturas 28°C e 33°C não houve diferença significativa. Além disso, as médias no pH 5.0 e 8.0 diferiram das demais nos outros valores de pH. O maior halo mediu 8,0 cm de diâmetro em temperatura de 38°C e pH 8.0, sendo os valores de temperatura e pH ótimos para produção de celulases por *A. oryzae* em meio sólido específico (Figura 12).

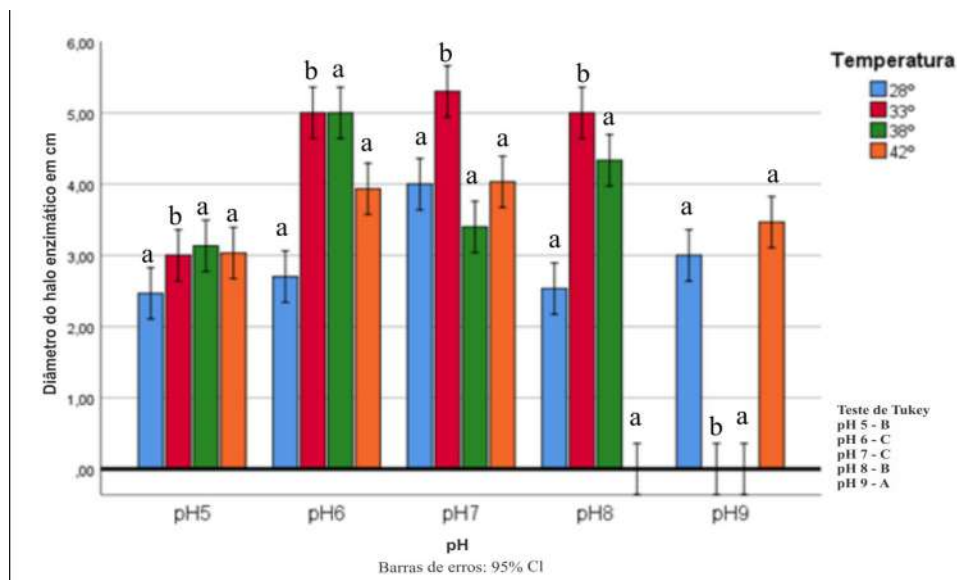


Figura 11 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Amilases por *Aspergillus oryzae*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

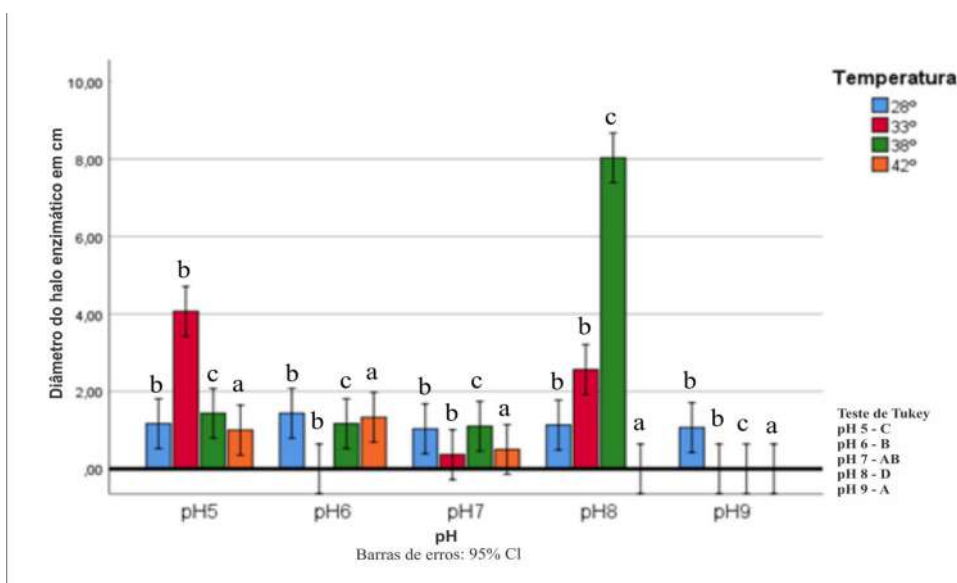


Figura 12 - Diâmetro médio do halo (cm) da atividade de Celulasas por *Aspergillus oryzae*. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente em relação ao pH de acordo com Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas não diferem significativamente em relação a temperatura segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Sobral et al. (2017), ao analisarem a detecção enzimática de *Aspergillus flavus*, *A. japonicus*, *A. parasiticus* e *A. sydowii* isolados do ar, constataram a produção de amilases por

todos os isolados, exceção feita a *A. japonicus*. O pH dos meios de cultivo e temperatura de incubação das amostras não foram apresentados no trabalho, mas considerando que as metodologias clássicas para detecção enzimática consistem em meios de cultivo com pH 6.0 – 7.0 e temperaturas de incubação das amostras igual a 30°C - 35°C, o isolado de *A. flavus* deste estudo, nas condições recém mencionadas, apresentou maior produção de amilases em comparação com o isolado explorado por Sobral et al. (2017) que relataram halo por amilases de 6.0 mm. A detecção de amilases pelo isolado de *Aspergillus japonicus* não foi detectada sob as condições de pH 8.0 e temperaturas de 28°C e pH 9.0 e 28°C e 30°C, condições estas que, provavelmente, não foram utilizadas na análise enzimática de *A. japonicus* por Sobral et al. (2017). Desta forma, o isolado utilizado neste estudo se sobressai quanto à detecção de amilases em meio de cultivo sólido específico.

Ao avaliarem a produção de amilases e celulases por cinco amostras de *Aspergillus* endofíticos, Tavares et al. (2012) detectaram a produção destas enzimas por todos os isolados inoculados em meio de cultivo sólido e mantidos sob temperatura de 25°C. A menor temperatura usada neste trabalho foi 28°C e, de forma geral, o tamanho dos halos foram menores que aqueles desenvolvidos em maiores temperaturas. Os halos por amilases e celulases formados pelos isolados explorados por Tavares et al. (2012) variaram entre 2.0 cm – 3.0 cm e 2.6 cm – 3.5 cm, respectivamente. Enquanto que os isolados aqui analisados apresentaram halos por amilases e celulases variando entre 0,1 cm – 5,1 cm e 0,1 cm – 2.0 cm, respectivamente. Comparando os resultados aqui apresentados com os de Tavares et al. (2012), a produção de amilases foi maior no presente estudo onde a temperatura de incubação foi maior. Por outro lado, halos por celulases foram menores nestas condições de temperatura ( $\geq 28^\circ\text{C}$ ).

Fonseca et al. (2017), analisaram a produção de amilases em diferentes condições de pH e temperatura por amostras de *Aspergillus* isolados do solo. O isolado de *A. flavus*, diferente do isolado explorado neste trabalho, não apresentou produção em nenhuma condição de pH e temperatura. Na avaliação de Fonseca et al. (2017), *A. tamaritii* (UCP 1261) apresentou maior halo por amilases em pH 6.0 sob temperatura de 37°C. A temperatura usada no presente estudo mais próxima de 37°C foi 38°C e nesta, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. japonicus* formaram os maiores halos por amilases. *Aspergillus* (UCP 1392) formou maior halo em pH 6.0 e 7.0 a 45°C. A maior temperatura aqui usada foi de 42°C e somente *A. carbonarius* formou maior halo de amilases nesta. Além do mais, estes dados corroboram com esta pesquisa visto que *A. fumigatus*, *A. japonicus* var. *japonicus* e *A. oryzae* formaram maiores halos por amilases em pH 6.0, e *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus* var. *japonicus* e *A. oryzae* em pH 7.0. O isolado de *A. niger* (UCP 1382), avaliado por Fonseca et al. (2017) apresentou maior halo em pH 7.0 sob temperatura de 28°C. Nesta



temperatura, entre os fungos explorados no presente estudo, somente *A. japonicus* var. *japonicus* formou maior halo por amilases.

Outros estudos como os de Akula e Golla (2018) e Arast e Girma (2018) têm ressaltados que pH e temperatura são parâmetros que influenciam a produção de amilases e celulasas por fungos do gênero *Aspergillus*, assim contribuindo com os resultados aqui relatados. Shah et al. (2014) salientam que a produção de enzimas corresponde de forma proporcional ao crescimento do fungo.

Segundo Chalfoun e Batista (2003), *Aspergillus* se desenvolve bem sob as temperaturas 25°C, 37°C e 42°C. Com isso, é comum táxons deste gênero apresentarem maior produção enzimática em alguma destas temperaturas ou em temperaturas próximas a estas, como os dados apresentados neste manuscrito. Cinco dos seis isolados avaliados quanto à detecção de celulasas apresentaram maior produção em pH alcalino, estes dados diferem daqueles de Castro e Júnior (2010) e Alves et al. (2020) que apresentaram maior atividade celulolítica de *Aspergillus* sp. em substratos com pH entre 4.0 e 5.0.

A otimização da produção de enzimas hidrolíticas, como amilases e celulasas por *Aspergillus* tem sido bastante avaliada em fermentação submersa, sendo poucos os estudos voltados para análise qualitativa como se caracteriza este estudo.

#### 4. CONCLUSÃO

A interação dos parâmetros de temperatura e pH influenciaram na formação do halo de amilases e celulasas por fungos do gênero *Aspergillus* em meio de cultura sólida específica. Este estudo aponta que a não produção ou baixa produção de amilases e celulasas, em análise qualitativa, por espécies de *Aspergillus* podem estar relacionadas, não somente à espécie e isolado, mas também ao valor de pH e temperatura utilizados que não favoreceram a produção enzimática pelo fungo. Adicionalmente, triagem da atividade enzimática com isolados do ar demonstrou que os mesmos apresentam, de forma geral, a mesma produção de amilases e celulasas que os fungos de solo e endofíticos, demonstrando assim a propriedade biotecnológica dos fungos anemófilos.

## 5 REFERÊNCIAS

- AAL, R. A. A. E.; SHETAIA, Y. M.; SHAFEI, M. S.; GOMAA, S. K.; MENOIFY, H. A. E.; EL-REFAI, H. A. Optimization of parameters for lipase production by *Aspergillus niger* NRRL-599 using response surface methodology. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, [Mumbai], v. 18, n. 2, p. 165-171, 2019.
- ABDULLAH, R.; JAFER, A.; NISAR, K.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; IFTIKHAR, T.; SALEEM, F.; NAZ, S. Process optimization for pectinase production by locally isolated fungal strain using submerged fermentation. **Biociência Journal** [Porto Alegre], v.34, n.4, p.1025-1032, 2018.
- AKULA, S.; GOLLA, N. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* isolated from forest soil. **The Open Biotechnology Journal**, [Hilversum], v. 12. p. 256-269, 2018.
- AL-MAQTARI, Q. A.; AL-ANSI, W.; MAHDI, A. A. Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry - A review. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, [Bhopal], v. 8, n. 1, p. 62-82, 2019.
- ALVES, M.H.; TAKAKI, G.M.C.; PORTO, A.L.F.; MILANEZ, A.I. Screening of *Mucor* spp. for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 33, p. 325-330, 2002.
- ALVES, R.O.; OLIVEIRA, R.L.; SANTOS, A.F.M.S.; PORTO, T.S. Produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. **Revista GEAMA – Ciências Ambientais e Biotecnologia**, [Recife], v. 6, n. 1, p. 44-50, 2020.
- ARAST, G.; GIRMA, A. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, [Nova Iorque], v.9, n.2, p.7-14, 2018.
- AVENDAÑO, K. A.; ANGUIANO, M.; LÓPEZ, C. E.; MONTAÑEZ, L. E.; SIFUENTES, L.; BALAGURUSAMY, N. Microbial enzymes Applications in food processing. **Agro FOOD Industry Hi Techv**, [Milano], v.27, n. 4, p. 63-67, 2016.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, [Barking], v. 47, n. 2, p.175-185, 2012.
- BHAVSAR, N.H.; RAOL, B.V.; AMIN, S.S.; RAOL, G.G. Production, optimization and characterization of fungal cellulose for enzymatic saccharification of lignocelulosic agro-waste. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**,

[Kancheepuram], v.4, n.3, p.30-46, 2015.

CASTRO, A.M.; JÚNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, [São Paulo], v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHALFOUN, S.M.; BATISTA, L.R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília: Informação Tecnológica, 2003.

CHANDRASEKARAN, S.; KUMARESAN, S. S. P.; MANAVALAN, M. Production and optimization of Protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thiruvavur District Tamilnadu. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, [Gwalior], v.3, n.6, p.66-69, 2015.

CHAUDHURI, A; BASU, C.; BHATTACHARYYA, S.; CHAUDHURI P. Development of health risk rating scale for indoor airborne fungal exposure. **Archives of Environmental & Occupational Health**, [Washington], v. [15], p. 1-9, 2019.

DINGLE, J.; TEID, W.W.; SOLOMONS, G.L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [Londres], v.4, p.149-155, 1953.

EL-BAKRI, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews Environmental Science and Technology**, [Boca Raton], v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.

FONSECA, T.C.S.; SILVA, P.H.; SOUZA, A.F.; BARBOSA, G.K.; MESSIAS, A.S.; SILVA, C.A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Taxonomic Approach to *Aspergillus* sp. Isolated from Caatinga Soil and Potential to Amylase Production. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [Kancheepuram], v. 6, n. 12, p. 3023-3028, 2017.

FU, X.; NORBÄCK, D.; YUAN, Q.; LIB, Y.; ZHU, X.; JAMAL H. H.; HASHIMH, Z.; ALI, F.; ZHENGJ, YI-WU; LAI, XU-XIN; SPANGFORT, M. D.; DENG, Y.; SUN, Y. Indoor microbiome, environmental characteristics and asthma among junior high school students in Johor Bahru, Malaysia. **Environment International**, [Amsterdam], v. 138, p. 1-9, 2020.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUDHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, [Londres], v.38, n.11, p.

1599-1616, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, [Lancaster], v. 67, p. 597-607, 1975.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: Csiro, 1988.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.M.; HEIS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science** [Baltimore], v. 69, n. 3, p. 215-232, 1950.

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

PATEL, K.; PATEL, H.; SHAH, G. Production and Optimization of Cellulase Enzymes from Newly Isolated Fungi. **Journal of pure and applied microbiology**, [Bhopal], v. 8, n. 5, p. 4163-4169, 2014.

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformes*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, [Nova Iorque], v.6, p. 269-274, 2003.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic and Professional, 1997.

PRADO, F. B.; ROCHA, W. C.; MARTIM, S. R.; ALECRIM, M. M.; SILVA, L. P.; SILVA, L. S. C.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. 2017. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, (Belém), v. 12, n. 1, p.37-47, 2017.

SANTOS, F.J.; FERREIRA, J.M.S.; RIBEIRO, V.J.O.; OLIVEIRA, A.C.L.; AZEVEDO, A.G.C. **Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos II- *Hirsutella thompsonii* (Fischer)**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.

SHAH, I.J.; GAMI, P.N.; SHUKLA, R.M.; ACHARYA, D.K. Optimization for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. **Basic Research Journal of Microbiology**, [Nova Iorque], v. 1, n. 4, p. 1-10, 2014.

SOBRAL, L. V.; MELO, K. N.; SOUZA, C. M.; SILVA S. F.; SILVA, G.L.R.; SILVA, A. L.F.; WANDERLEY, K. A.A.; OLIVEIRA, I. S.; CRUZ, ROBERTA. Antimicrobial and enzymatic activity of anemophilous fungi of a public university in Brazil. **Anais da**

**Academia Brasileira de Ciências**, [Rio de Janeiro], v. 89, n. 3, p. 2327-2356, 2017.

TANAKA, D.; SATO, K.; GOTO, M.; FUJIYOSHI, S.; MARUYAMA, F.; TAKATO, S.; SHIMADA, T.; SAKATOKU, A.; AOKI, K.; NAKAMUR, S. Airbone microbial communities at high-altitude and suburban sites in Toyama, Japan suggest a new perspective for bioprospecting. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [Lausanne], v. 7, n. 12, p. 1-11, 2019.

TAVARES, A.C.D.; FONSECA, J.S.F.; FONSECA, T.R.B.; BARRONCAS, J.F.B.; SOUZA, R.A.T.; SILVA, T.A.; TEIXEIRA, M.F.S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **Biochemistry and Biotechnology Reports** [Londrina], v. 1, n. 2, p. 1-6, 2012.

# Capítulo 3

## Atividade amilolítica de *Aspergillus* (Eurotiales, Aspergillaceae) isolado do solo no Norte do Piauí

Mateus Oliveira da Cruz  
Maria de Fátima Dutra Freitas  
Maria Helena Alves

### RESUMO

O solo constitui um dos principais habitats dos fungos do gênero *Aspergillus*. Os mesmos apresentam uma importante função no solo sobre a decomposição da matéria orgânica utilizando amilases para a degradação dos substratos amilolíticos. As amilases estão entre as principais enzimas aplicadas na indústria farmacêutica, têxtil e produção de alimentos. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar espécies de *Aspergillus* ocorrentes no solo do "Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí"-DITALPI, situado na cidade de Parnaíba, Norte do Piauí, bem como caracterizar os isolados quanto à detecção da produção de amilases. Para a identificação dos fungos seguiu-se a taxonomia clássica. Para detecção da produção de amilases pelos isolados, usou-se meio de cultivo sólido com adição de amido, como substrato indutor e na revelação do halo enzimático, expresso em centímetro, foi utilizada uma solução de iodo. Os resultados revelaram 57 isolados distribuídos em 10 espécies: *Aspergillus*

*aculeatus*, *A. carneus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. tubingensis* e *A. ustus*. Os isolados de *A. carneus* e *A. flavus* apresentaram os maiores halos (12,0 cm), seguido de *A. parasiticus* e *A. terreus*, com halos de 11,0 cm de diâmetro. *A. fumigatus*, *A. tubigensis* e *A. ustus* não apresentaram formação de halo por amilases nestes testes. Desta forma, o presente estudo contribui para o conhecimento da diversidade de fungos do estado do Piauí, apresentando à comunidade científica a ocorrência de dez espécies de *Aspergillus*, além de sete espécies de fungos filamentosos promissoras para futuros estudos de carácter quantitativo quanto à produção de amilases extracelulares.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodiversidade fúngica; enzimas; fungos do solo.

## 1. INTRODUÇÃO

A ordem Eurotiales compreende um grande grupo de organismos que acomoda fungos filamentosos de Ascomycotina (CASTELLANO; BEEVER; TRAPPE, 2012). Dentre os gêneros mais conhecidos da citada ordem, ressalta-se *Aspergillus* o qual tem sido acrescentado um número significativo de espécies. Thom e Raper (1945) apresentaram 89 espécies de *Aspergillus* e, posteriormente, Raper e Fennel (1965) relataram 150 espécies. Em 2014, Samson et al. consideraram que *Aspergillus* compreendia 339 espécies. Já nos últimos seis anos, ocorreu um acréscimo de 32% sobre aquele número, culminando em um total de 446 espécies no grupo (HOUBRAKEN et al., 2020).

*Aspergillus* possui um sistema de classificação infragenérico de longa tradição, composto por seis subgêneros: *Aspergillus*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Fumigati*, *Nidulantis* e *Polypaecilum*, estes compreendem 27 seções e 75 séries (HOUBRAKEN et al., 2020). Na última década, mudanças na nomenclatura aconteceram principalmente devido à descrição de novas espécies e identificação de forma incerta. Estes foram fatores, juntos ou de forma isolada, levaram a uma taxonomia inadequada de *Aspergillus* (HOUBRAKEN; VRIES; SAMSON, 2014). Identificar, descrever e publicar a diversidade deste grupo tem sido um desafio, devido à necessidade de elucidar a variação infraespecífica (VISAGIE; HOUBRAKEN, 2020).

*Aspergillus* spp. são consideradas cosmopolitas, podendo ser encontradas no solo (SUN et al., 2020), sedimento marinho (TABOONPONG et al., 2014), água (HUBKA et al., 2013), ar (PYRRI et al., 2020), vegetais (NISA et al., 2020), excrementos (MELO et al., 2020) e alimentos em gerais (HAMED; AL-WASIFY; SELIM, 2017).

Representantes de *Aspergillus* têm sido comumente isolados do solo em várias partes do mundo (KLICH; PITT, 1988; SAMSOM et al., 2007; HUBKA et al., 2013; HUBKA et al., 2014; BARBOSA et al., 2020; SUN et al., 2020). Membros deste gênero isolados do solo apresentam diferença nos padrões de biogeografia, onde seções de *Aspergillus*, *Nidulantis*, *Flavipedes* e *Circumdati* ocorrem com maior frequência em solo desértico. Para Klich (2002), adiciona-se uma maior frequência destes microrganismos em latitudes subtropicais entre 26 e 35 graus.

No contexto da diversidade de *Aspergillus* spp. no solo da floresta tropical seca brasileira (Caatinga), 58 espécies têm sido isoladas, com distribuição entre os estados de Alagoas, Bahia, Maranhão, Paraíba e Pernambuco (BARBOSA et al., 2020). O maior número de estudos voltados à diversidade de *Aspergillus* no solo brasileiro concentra-se no estado de Pernambuco, onde Oliveira et al. (2013) isolaram e identificaram 18 espécies de

*Aspergillus* do solo em área de semiárido. Também Cruz et al. (2013 e 2017) identificaram nestes dois estudos, respectivamente, 23 e 22 espécies de *Aspergillus* isoladas do solo no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco. Já em áreas de Sergipe e Alagoas, Cavalcanti et al. (2006) isolaram e identificaram 18 espécies de *Aspergillus* do solo da região Xingó. Já para o estado do Piauí, não há registro deste gênero isolado do solo (MAIA et al., 2015; BARBOSA et al., 2020).

O gênero *Aspergillus* acomoda espécies de importância ambiental, biotecnológica, econômica e médica que apresentam impactos, tanto positivo quanto negativo ao homem (TSANG et al., 2018). *Aspergillus oryzae* é a espécie mais usada para fermentação de alimentos, como arroz e soja, enquanto que *Aspergillus niger* é responsável por 99%, a nível global, de todo o ácido cítrico usado industrialmente (PARK et al., 2017). Por outro lado, espécies de *Aspergillus*, tal como *A. flavus* é considerada, dentre do grupo, sendo de muita toxigenicidade, tendo grande relevância nas contaminações de alimentos pela produção de micotoxinas fortemente prejudiciais ao homem e animais (COSTA et al., 2020). Doenças infecciosas humanas em pessoas atópicas e imunocomprometidas são causadas por fungos deste gênero, principalmente por *A. fumigatus* (LATGÉ; CHAMILOS, 2020).

A importância biotecnológica de *Aspergillus* spp. se deve à produção de compostos de aplicação industrial, por exemplo os complexos enzimáticos. Esses fungos são conhecidos por produzirem enzimas do tipo amilases, catalases, celulasas, pectinases, xilanases e inulinases (PARK et al., 2017). As amilases são enzimas abundantemente aplicadas à produção de produtos farmacêuticos, químicos, de alimentos, bebidas e derivados têxteis (MOJSOV et al., 2018).

Segundo o relatório divulgado pela BBC Research & Consulting, em 2019, o mercado global de enzimas movimentou cerca de 5,5 bilhões de dólares em 2018 e espera-se alcançar um movimento de 7,0 bilhões de dólares até 2023. A seleção de novos microrganismos produtores de enzimas de valor industrial, como as amilases, é um dos maiores entraves à comercialização de novas enzimas (GRIEBELER et al., 2015). Nesse contexto, o Brasil apresenta-se como um país consistente de possibilidades imensuráveis por apresentar uma ampla diversidade de microrganismos (ORLANDELLI et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar espécies de *Aspergillus* ocorrentes no solo do "Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí-DITALPI", situado na cidade de Parnaíba, Norte do Piauí, bem como caracterizar os isolados quanto à detecção da produção de amilases.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em áreas preservadas do DITALPI (03°01'49,91"S e 41°46'17,09"O), localizado no município de Parnaíba, Norte do Piauí (Figura 1). A vegetação preservada nesta área é de transição entre Cerrado e Caatinga (SANTOS, 2010), onde o clima consiste do tipo Tropical Chuvoso, com precipitação média anual de aproximadamente 1.000 mm (CEPRO, 2013).

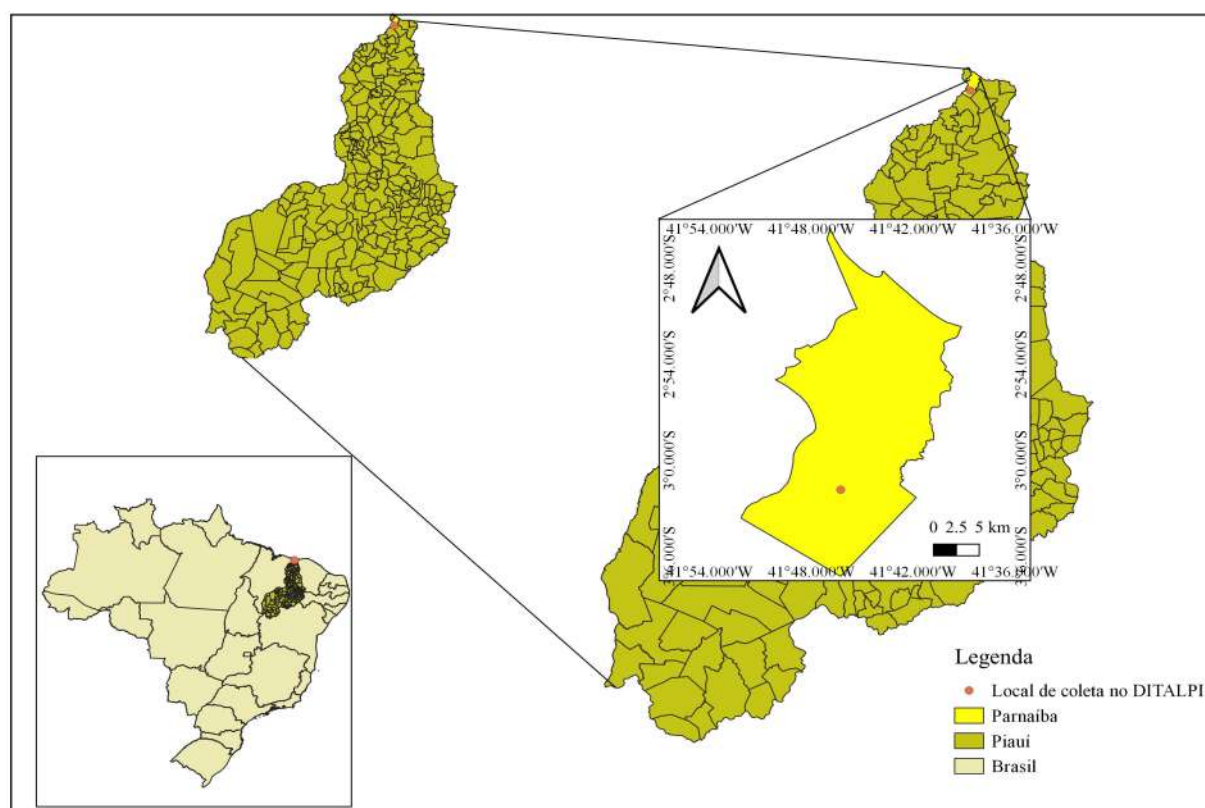


Figura 1 - Mapa de localização da área de coleta do solo.

Fonte: Os autores.

Amostras do solo foram coletadas nos meses de Março e Abril de 2013, em quatro pontos aleatórios. O solo foi perfurado a 10 cm de profundidade e retirado uma amostra com a utilização de uma espátula previamente esterilizada em álcool 70°GL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos para transporte.

No laboratório de Botânica da Universidade Federal do Piauí/Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, executou-se o método de placa de solo segundo Warcup (1950), sendo 1g de solo distribuído em placa de Petri esterilizada e vertido o meio de cultivo Ágar Martin (MARTIN, 1950), ainda quente, por volta de 40°C, sobre o solo na placa de Petri. As placas foram incubadas sob luminosidade e temperatura (28±2°C) ambientes. O acompanhamento do desenvolvimento dos fungos ocorreu de dois a sete dias. O isolamento e manutenção

fúngica foram realizados em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) (LACAZ et al., 2002).

As identificações foram efetuadas levando em consideração as observações macroscópicas tendo por parâmetro a cor, diâmetro e altura da colônia, presença ou ausência de estruturas especializadas bem como os esclerócitos. Para a análise microscópica tomou-se por base a observação do comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura das métulas e fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídios. As características dos isolados foram comparadas seguindo a literatura especializada, tais como Klich e Pitt (1988), Raper e Fennel (1977), Klich (2002), Samson et al. (2004) e Samson et al. (2007).

Para o armazenamento dos fungos, estes foram inoculados em tubos de vidro de penicilina contendo o meio de cultivo BDA e, após desenvolvimento das colônias, estas foram submersas em óleo mineral e mantidas sob refrigeração no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Piauí/CMRV, atual Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr).

A caracterização enzimática no que se refere à detecção da produção de amilases na cultura monospórica dos isolados seguiu Santos (2009), com modificações. Inicialmente foi feita uma suspensão de esporos contendo 2 ml de solução que foi homogeneizada e distribuída com auxílio da alça de Drigalski sobre a superfície do meio de cultura BDA em placa de Petri e mantida à temperatura ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade ambientes.

Após 24 horas de incubação e germinação dos esporos, estes foram observados ao microscópio estereoscópio (lupa) e realizada a remoção de um único esporo, utilizando uma agulha para transferi-lo a uma outra placa de Petri contendo o meio de cultivo BDA. Com o desenvolvimento da cultura monospórica foi vertida água destilada estéril em sua superfície e realizado a lavagem com pérolas de vidro para obtenção da suspensão de esporos, a qual foi pipetada para um tubo de ensaio, também estéril. Alíquota desta foi transferida para câmara de Neubauer e realizada a contagem dos esporos, sendo obtida uma suspensão de  $10^6$  mL de esporos.

Como substrato inductor da produção de amilases foi utilizado 0,2% de amido solúvel (Merck) e 1,0% de ágar por 1000 mL, tendo por base a metodologia de Hanking e Anagnostakis (1975). Em placa de Petri de 12 cm de diâmetro, contendo 15 mL de meio de cultivo sólido, perfurou-se no centro e removeu-se um disco de 5 mm em diâmetro, sendo o mesmo preenchido com 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de  $10^6$  esporos. Após realizado o inóculo, as placas foram incubadas sob temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade ambientes. O experimento foi carreado em triplicata.

No período de 120 horas de incubação, foi vertida sobre a superfície da colônia na placa de Petri a solução de iodo para revelação do halo de degradação por amilases. A medição do halo de degradação foi efetuada com uso de uma régua milimetrada e a atividade

amilolítica expressada em centímetro.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT 7.7 beta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram 57 isolados de *Aspergillus* distribuídos em dez espécies (Tabela 1). *Aspergillus niger* Tieghem e *Aspergillus flavus* Link (Figura 2) foram os mais abundantes, com 10 e 8 isolados, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Aspergillus* isoladas do solo do Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí-DITALP

<b>Táxons</b>	<b>Nº de Isolados</b>
<i>Aspergillus aculeatus</i> Lizuka 1953	6
<i>A. carneus</i> (Tieghem) Bloc hwitz 1933	4
<i>A. flavus</i> Link 1809	8
<i>A. fumigatus</i> Fresenius 1863	7
<i>A. niger</i> Tieghem 1867	10
<i>A. parasiticus</i> Speare 1912	5
<i>A. tamarü</i> Kita 1913	5
<i>A. terreus</i> Thom 1918	5
<i>A. tubingensis</i> Mosseray 1934	4
<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom & Church 1926	3

Fonte: Os autores

*Aspergillus niger* (subgênero *Circumdati*, secção *Nigri*) é caracterizada, principalmente por seus conídios negros de forma equinulada e vesícula bisseriada, descrito por Klich (2002) e Simões, Santos e Lima (2013). Esta espécie tem sido isolada do solo no Maranhão, Pernambuco, Bahia e Alagoas (BARBOSA et al., 2020). A distribuição de *A. niger* no Brasil também está atribuída aos estados do Amazonas, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo, isolados de folhedeo ou solo (PEFNING; GUSMÃO, 2015).

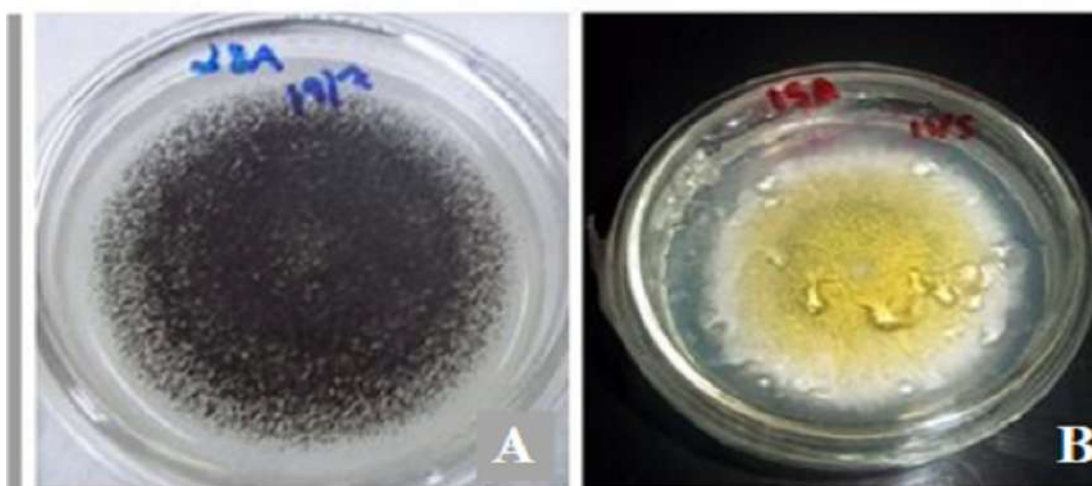


Figura 2. *Aspergillus* em meio de cultivo BDA.  
A- *Aspergillus niger*, B- *Aspergillus flavus*. Colônias com sete dias de crescimento.  
Fonte: Os autores

Biotecnologicamente, *Aspergillus niger* apresenta grande importância na ciência, sendo explorado há mais de 100 anos, com 7.897 publicações no PubMed entre 1978 e 2017. Esta espécie produz alta concentração de ácido cítrico, bastante utilizado para produção de alimentos e bebidas. Além de ampla diversidade de proteínas e metabólitos secundários, também se destaca por apresentar seu genoma sequenciado em 2007, sendo manipulado com ferramentas de edição da nova era genética, como a CRISPR/Cas (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018).

*Aspergillus flavus*, subgênero *Circumdati*, seção *Flavi*, é caracterizada, entre outras características, por seus conídios verde-amarelo, lisos, vesícula bisseriada e produção de esclerócitos largos e escuros, segundo descrição de Klich (2002) e Frisvad et al. (2019). *Aspergillus flavus* tem sido isolada do solo no Maranhão, Alagoas, Bahia e Pernambuco (BARBOSA et al., 2020). Pefnning e Gusmão (2015) reportam a ocorrência de *A. flavus* para o Amazonas, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo, isolados de solo ou folhedo.

Estudos têm demonstrado *Aspergillus flavus* como um fungo saprófito oportunista, sendo a segunda espécie do gênero de maior potencial patogênico a humanos (HEDAYAT et al., 2007) e como produtor de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, substâncias de efeito tóxico aditivo ou sinérgico a humanos (GONÇALEZ et al., 2013). *Aspergillus flavus* tem sido explorada biotecnologicamente em aplicações no desenvolvimento de drogas farmacêuticas, culturas resistentes nas atividades de agricultura e como biocombustíveis, sendo também relevante a produção de enzimas hidrolíticas de aplicação industrial (CLEVELAND et al., 2009).

Fungos do gênero *Aspergillus* são comumente isolados do solo e normalmente dominantes em números de isolados. *Aspergillus* já fora isolado do solo de cultivo agrícola de

Citrus por Prade et al. (2007); girassol, por Souza-Motta et al. (2003); uva-do-japão, por Prade et al. (2006) e; cataúba e mata nativa, por Morgana et al. (2013). Adicionalmente, o presente estudo relata o isolamento desse grupo de fungo do solo em geral em área preservada.

Cavalcanti et al. (2006), ao estudarem a diversidade de fungos do solo na região de Xingó, Nordeste do Brasil, isolaram 1.230 UFCs de 96 fungos filamentosos. O maior número de isolados (518) correspondeu ao gênero *Aspergillus*, segundo gênero melhor representado, apresentando 18 espécies. Coincidindo com o presente estudo, aqueles autores também isolaram *A. aculeatus*, *A. carneus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tamaritii*, *A. terreus* e *A. ustus*, estando *A. niger* entre as espécies mais abundantes nesse trabalho.

O dados de Borges et al. (2011) também convergem com o presente estudo, quando apresentam a prevalência de *Aspergillus* ao realizarem 11 coletas de amostras de solo em Santa Catarina e isolarem 363 UFCs de *Aspergillus*, representando um percentual de 27,92%. Os citados autores ressaltam que espécies de *Aspergillus* persistiram no solo avaliado por todas as estações do ano.

Cruz et al. (2013), em estudo sobre a diversidade de fungos filamentosos em área da Caatinga, coletaram seis amostras de solo do Parque Nacional do Catimbau resultando em 4.711 isolados fúngicos representados por 18 gêneros distribuídos em 66 espécies, onde *Aspergillus* foi o maior gênero quanto ao número de isolados (3.731) e segundo maior gênero em representação, 23 espécies. Ainda corroborando com os dados aqui apresentados, exceção feita à *A. tubingensis*, os citados autores isolaram todas as espécies relatadas nesta pesquisa, sendo *A. flavus* o de maior abundância de isolados.

Ainda em área do Parque Nacional do Catimbau, Cruz et al. (2017) realizaram coleta de 12 amostras do solo obtendo um total de 4.488 UFCs, representadas por 15 gêneros e 48 espécies. *Aspergillus* apresentou o maior número de UFCs (2.437) e foi o segundo maior gênero em representação, com 22 espécies. Aqueles autores, isolaram todas as espécies apresentadas neste estudo, exceção feita à *A. tubingensis*. Ainda, diferentemente do resultados deste estudo, *A. niger* e *A. flavus* não estiveram entre as espécies com maior número de isolados naquele. Estas observações coincidem com os resultados obtidos em relação ao número de isolados de *Aspergillus* e sua comum ocorrência no solo do DITALPI.

Segundo Klich e Pitt (1988), *Aspergillus aculeatus*, *A. parasiticus*, *A. tamaritii*, *A. terreus* e *A. ustus* são predominantemente de solos. *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus* podem ser encontradas em diversos substratos, tais como solo, planta, semente e outros. Todas as espécies citadas, exceto *A. tubingensis*, têm sido isoladas de solo no Nordeste, entretanto não ocorre catalogação para o estado do Piauí (BARBOSA et al., 2020). *Aspergillus tubingensis* não está inserida na plataforma Flora do Brasil (2020), mas estudos apresentam o seu

isolamento a partir de amostras de café no Brasil (FERRACIN et al., 2009). Este estudo é o primeiro a reportar *A. tubingensis* no solo do nordeste brasileiro. Quanto à detecção de produção de amilases pelos isolados, dentre as dez espécies testadas sete testaram positivo para amilases. *Aspergillus carneus* e *Aspergillus flavus* apresentaram os maiores halos por amilases, com diâmetro de 12,0 cm, seguido de *A. parasiticus* e *A. terreus*, com diâmetro de 11,0 cm (Tabela 2).

Tabela 2. Índice Enzimático (IE) de *Aspergillus* spp. isolados de solo do Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí-DITALPI

Táxons	Diâmetro do halo por amilases (em centímetro)
<i>Aspergillus aculeatus</i> Lizuka 1953	10,3 c
<i>A. carneus</i> (Tieghem) Blochwitz 1933	12,0 a
<i>A. flavus</i> Link 1809	12,0 b
<i>A. fumigatus</i> Fresenius 1863	0,00 e
<i>A. niger</i> Tieghem 1867	8,0 d
<i>A. parasiticus</i> Speare 1912	11,0 bc
<i>A. tamarii</i> Kita 1913	10,3 c
<i>A. terreus</i> Thom 1918	11,0 bc
<i>A. tubingensis</i> Mosseray 1934	0,00 e
<i>A. ustus</i> (Bainier) Thom & Church 1926	0,00 e

Legenda: Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Os autores

Atividade amilolítica por fungos filamentosos em meio de cultura sólido em substrato específico é detectada pela formação de halo translúcido ao redor da colônia, como pode ser observado na detecção de amilases por *Aspergillus carneus* na Figura 3. A solução de iodo em contato ao amido torna o substrato de cor arroxeadada, o translúcido indica a degradação do amido por amilases (PEREIRA, 2012).



Figura 3. Halo por amilases de *Aspergillus carneus*.

Os resultados obtidos da atividade amilolítica assemelham-se com os resultados de Saleem e Ebrahim (2014), que detectaram atividade nas espécies, *Aspergillus carneus* (1,7 cm), *A. flavus* (3,3 cm), *A. niger* (3,6 cm) e *A. terreus* (2,2 cm), isoladas de sementes leguminosas, com respectivo diâmetro do halo enzimático. Todas as espécies citadas pelos autores apresentaram menor halo enzimático do que os isolados analisados neste estudo. Mukunda, Onkarappa e Prashith (2012) também detectaram a produção de amilases por *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, isolados do solo, assim como Fifendy et al. (2019), por *A. niger* isolado de arroz.

Adeniran e Abiose (2009) apresentam halo de degradação por amido em meio de cultivo sólido por isolados de *A. flavus* (2,04 cm; 2,21 cm) e *A. niger* (2,14 cm). Os diâmetros dos halos apresentados pelos fungos deste estudo foram maiores. Silva et al. (2011) também reportaram atividade amilolítica por *A. flavus* e *A. niger*, estando *A. flavus* entre os de maior índice enzimático. Guimarães et al. (2006) isolaram, do solo ou material em decomposição no estado de São Paulo, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, relatando a produção de amilases somente por *A. flavus*. Fernandes (2009) também detectaram amilases por *A. flavus* e *A. tamarii*, isolados de amendoim e café, respectivamente. Fonseca et al. (2017), isolaram *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus tamarii* do solo da Caatinga, prosseguindo-os à análise de produção amilolítica em meio de cultivo sólido, com resultados de menor produção de amilases que os registrados neste trabalho.

Na análise qualitativa por Gopinath, Anbu e Hilda (2005), *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. terreus* não apresentaram produção de amilases, semelhante aos resultados para *A. fumigatus* neste estudo. Pereira (2012) também não detectou amilases por

*A. fumigatus*, no entanto, Adeniran e Abiose (2009) demonstraram a produção de amilases por *A. fumigatus* em análise qualitativa, assim como Mukunda, Onkarappa e Prashith (2012), Ratnasri et al. (2014) e, Saleem e Ebrahim (2014). Diferente da presente análise, *Aspergillus ustus* apresentou-se como produtor de amilases por Saleem e Ebrahim (2014) e Fifendy et al. (2019). As espécies *A. aculeatus* e *A. niger* apresentaram halo de degradação por amilases no estudo de Khokhar, Mukhtar e Mushtaq (2011).

*Aspergillus parasiticus* tem sido reportada como produtora de amilases na análise quantitativa de Araújo et al. (2019) e na avaliação qualitativa realizada por Sobral et al. (2017), corroborando, de forma efetiva, com o resultado positivo da produção de amilases por *A. parasiticus* neste estudo. Quanto aos isolados de *A. fumigatus*, *A. tubingensis* e *A. ustus*, que não apresentaram atividade amilolítica nesta avaliação, Griffin (1994) elucidou que a produção de amilases por fungos filamentosos varia de acordo com os isolados, além da temperatura e do substrato onde está inserida a espécie.

#### 4. CONCLUSÃO

Espécies de *Aspergillus* foram isoladas do solo no estado do Piauí pela primeira vez, através deste estudo. Adicionalmente, este contribui com informações sobre o potencial amilolítico de membros deste gênero. Ao mesmo tempo, destaca também a produção de amilases em análise qualitativa, apontando a necessidade de posteriores análises quantitativas.

#### 5. REFERÊNCIAS

ADENIRAN, A. H.; ABIOSE, S. H. Amylolytic potentiality of fungi isolated from some Nigerian agricultural wastes. **African Journal of Biotechnology**, [Nairobi], v. 8, p. 667-672, 2009.

ARAÚJO, J. A.; FERREIRA, N. R.; SILVA, S. H. M.; OLIVEIRA, G.; MONTEIRO, R. C.; ALVES, Y. F. M.; LOPES, A. S. Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. **Annals of Microbiology**, [Milano], v. 69, p. 975-987, 2019.

BARBOSA, R.N.; BEZERRA, J.D.P.; SANTOS, A.C.S.S.; MELO, R.F.R.; HOUBRAKEN, J.; OLIVEIRA, N.T.; SOUZA-MOTTA, C.M. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. **Acta Botanica Brasilica**, [São Paulo], v. 34, n. 2, p. 409-429, 2020.



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.

CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, [Londres], v. 5, n. 3, p. 1-14, 2018.

CASTELLANO, M. A.; BEEVER, R. E.; TRAPPE, J. M. Sequestrate fungi of New Zealand: *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales, Elaphomycetaceae). **New Zealand Journal of Botany**, [Reino Unido], v. 50, n. 4, p. 423-433, 2012.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [São Paulo], v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CEPRO (CENTRO DE PESQUISAS ECONÔMICAS E SOCIAIS DO PIAUÍ). **Diagnóstico Socioeconômico: Parnaíba**. Governo do Piauí, 2013. Disponível em: <http://www.cepro.pi.gov.br/diagsococo.php>. Acesso em 20 set. 2020.

CLEVELAND, T. E.; YU, J.; FEDOROVA, N.; BHATNAGAR, D.; PAYNE, G. A.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, [Solapur], v. 27, n. 3, p. 151-157, 2009.

COSTA, B. E. G. N.; OLIVEIRA, B. S.; CORREIA, D. C. S.; FERNANDES, K. L. A.; COELHO, L. B. M.; LEAL, M. M. F. V.; GUIMARÃES, M. A. L.; SILVA, P. M. F. S.; ALVES, Y. L. C.; LOCATELLI, G. O. Contaminações alimentares por *Aspergillus* spp. e o papel do nutricionista: uma revisão. **Evidência – Biociências, Saúde e Inovação**, [Joaçaba], v. 20, n. 1, p. 69-80, 2020.

CRUZ, R.; LIMA, J. S.; FONSECA, J. C.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. S.; DUDA, G. P.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Diversity of filamentous fungi of area from Brazilian Caatinga and high-level tannase production using mango (*Mangifera indica* L.) and surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) leaves under SSF. **Advances in Microbiology**, [Irvine], v. 3, n. [8], p. 52-60, 2013.

CRUZ, R.; RAMOS, S. M. S.; FONSECA, J. C.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MOREIRA, K. P. Anthropization Effects on the Filamentous Fungal Community of the Brazilian Catimbau National Park. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, [Campinas], v. 41, p. 1-13, 2017.

EL-HAWARY, S. S.; MOAWAD, A. S.; BAHR, H. S.; ABDELMOHSEN, U. R.; MOHAMMED, R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. **RSC Advances**, [Cambridge], v. 10, n. [37], p. 22058–22079, 2020.

FERNANDES, Ana Paula. **Avaliação do Potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009.

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**, [Curitiba], v. 5, n. special, p. 241-248, 2009.

FIFENDY, M.; PERIADNADI; INDRIATI, G.; OSNITA, S.; ANNISA, L. Isolation and activity of amylase enzyme in isolates of fungi from black rice lemong (*Oryza sativa* Siarang). **Advances in Biological Sciences Research**, [Amsterdam], v. 10, p. 46-50, 2019.

**FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 10 out. 2020.

FONSECA, T. C. S.; SILVA, P. H.; SOUZA, A. F.; BARBOSA, G. K.; MESSIAS, A. S.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Taxonomic Approach to *Aspergillus* sp. Isolated from Caatinga Soil and Potential to Amylase Production. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [Kancheepuram], v. 6, n. 12, p. 3023-3028, 2017.

FRISVAD, J. C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C. N.; HONG, S. B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A. J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T. O.; SKALENÁR, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 93, p. 1-63, 2019.

**GLOBAL markets for enzymes in industrial applications**. BBC Research & Consulting. Disponível em: <http://bbcresearch.com/>. Acesso em: 10 de set. de 2020.

GONÇALEZ, E.; SILVA, J. L.; REIS, T. A.; NAKAI, V. K.; FELICIO, J.D.; CORRÊA, B. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto de Biologia**, [São Paulo], v. 80, n. 3, p. 312-317, 2013.

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

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, [Fortaleza], v. 13, p. 13-22, 2015.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. Nova Jersey: John Willey & Sons Incorporation, 1994.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 37, p. 474-480, 2006.

HAMED, S.; AL-WASIFY, R. S.; SELIM, M. S. Bioassay of Mycotoxins from Toxicogenic Fungi Isolated from Food Stuff. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, [Índia], v. 8, n. 3, p. 322-327, 2017.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, [Lancaster], v. 67, p. 597-607, 1975.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO A. C.; WARN, P. A.; BOWER, P.; DENNING D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, [Philadelphia], v. 153, n. [6], p. 1677-1692, 2007.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; WANG, X. C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 95, p. 5-169, 2020.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, [Washington], v. 86, p. 199-249, 2014.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLAŘÍK, M.; JURJEVIĆ, Ž.; PETERSON, S. W. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. **Mycology**, [Abingdon], v. 107, n. 1, p. 169–208, 2015.

HUBKA, V.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C.; YAGUCHI, T.; KUBÁTOVÁ, A.; KOLARÍK, M. *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section *Fumigati*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [Reading], v. 63, p. 783-789, 2013.

KHOKHAR, I.; MUKHTAR, I.; MUSHTAQ, S. Isolation and Screening of Amylolytic Filamentous Fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, [Port Harcourt], v. 15, n. 1, p. 203-206, 2011.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Utreque: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: CSIRO, 1988.

KLICH, M. Biogeography of *Aspergillus* Species in Soil and Litter. **Mycology**, [Abingdon], v. 94, n. 1, 2002.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: Csiro, 1988.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.M.; HEIS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LATGÉ, J.P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, [Amsterdam], v. 33, n. 1, p. 1-75, 2020.

MAIA, L. C.; CARVALHO JR, A. A.; CAVALCANTI, L. D. H.; GUGLIOTTA, A. M.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; SANTIAGO, A. L. M. A.; CÁCERES, M. E. S.; GIBERTONI, T. B.; APTROOT, A.; GIACHINI, A. J.; SOARES, A. M. S.; GOMES-SILVA, A. C.; MAGNAGO, A. C.; GOTO, B. T.; LIRA, C. R. S.; SALVADOR-MONTOYA, C. A.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SILVA, D. K. A.; SOARES, D. J.; REZENDE, D. H. C.; LUZ, E. D. M. N.; GUMBOSKI, E. L.; WARTCHOW, F.; KARSTEDT, F.; FREIRE, F. M.; COUTINHO, F. P.; MELO, G. S. N.; SOTÃO, H. M. P.; BASEIA, I. G.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, J. J. S.; SOUZA, J. F.; BEZERRA, J. L.; ARAUJO N, L. S.; PFENNING, L. H.; GUSMÃO, L. F. P.; NEVES, M. A.; CAPELARI, M.; JAEGER, M. C. W.; PULGARÍN, M. P.; MENOLLI JR, N.; MEDEIROS, P. S.; FRIEDRICH, R. C. S.; CHIKOWSKI, R. S.; PIRES, R. M.; MELO, R. F.; SILVEIRA, R. M. B.; URREA-VALENCIA, S.; CORTEZ, V. G.; SILVA, V. F. Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia**, [Rio de Janeiro], v. 66, n.4, p. 1033-1045. 2015.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, [Reino Unido], v. 69, n. 3, p. 215-232. 1950.

MELO, R. F. R.; GONDIM, N. H. B.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; MAIA, L. C.; MILLER, A. N. Coprophilous fungi from Brazil: updated identification keys to all recorded species. **Phytotaxa**, [Auckland], v. 436, n. 2, p. 104-124, 2020.

MOJSOV, K. D.; ANDRONIKOV, D.; JANEVSKI, A.; JORDEVA, S.; KERTAKOVA, M.; GOLOMEOVA, S.; GABER, S.; IGNJATOV, I. Production and application of  $\alpha$ -amylase enzyme in textile industry. **Tekstilna Industrija**, [Serbia], v. 66, n. 1, p. 23-28, 2018.

MORGANA, R.; PANSEIRA, M. R.; SARTORI, V. C.; RIBEIRO, R. T. S. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [Porto Alegre], v. 8, n. 3, p. 141-151, 2013.

MUKUNDA, S.; ONKARAPPA, R; PRASHITH, K . T. R. Isolation and Screening of Industrially Important Fungi from the Soils of Western Ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. **Science Technology and Arts Research Journal**, [Nekemte], v. 1, n. 4, p. 27-32, 2012.

NISA, S.; KHAN, N.; SHAH, W.; SABIR, M.; KHAN, W.; BIBI, Y.; JAHANGIR, M.; HAQ, I. U.; ALAM, S.; QAYYUM, A. Identification and Bioactivities of Two Endophytic Fungi *Fusarium fujikuroi* and *Aspergillus tubingensis* from Foliar Parts of *Debregeasia salicifolia*. **Arabian Journal for Science and Engineering**, [Berlin], v. 45, p. 4477–4487, 2020.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, [Londres], v. 95, p. 49-54, 2013.

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

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, [Nova Iorque], v. 100, p. 161-202, 2017.

PEFNING, L.; GUSMÃO, L. F. P. **Eurotiales in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB93053>> Acesso em 20 set. 2020.

PEREIRA, D. B.; CRUZ, M. O.; ALVES, M. H. Anemophilous fungi in intensive care sectors of a public hospital in the North of Piauí, Brazil. **Revista Científica INOVALE**, [Parnaíba], v. 1, n. 1, p. 1-4, 2020.

PEREIRA, Vanessa Maria. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2012.

PRADE, C. A.; MATSUMURA, A. T. S.; GUERRERO, R. T.; PORTO, M. Diversidade de fungos filamentosos e microscópicos do solo em uma plantação de *Hovenia dulcis* Thumb. **Biociências**, [Porto Alegre], v. 14, n. 2, p. 101-106, 2006.

PRADE, C. A.; MATSUMURA, A. T.; OTT, A. P.; PORTO, M. L. Diversidade de fungos do solo em sistemas agroflorestais de Citrus com diferentes tipos de manejo no município de Roca Sales, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, [Porto Alegre], v. 15, n. 1, p. 73-81, 2007.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Malabar: Robert & Krieger publishing company, 1977.

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

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, [Taibah], v. 8, p. 90-97, 2014.

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 of *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 50, p. 45–61, 2004.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, P.; HOUBRAKEN, L.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilla. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 59, p. 129-145, 2007.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUSHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 78, p. 141-173, 2014.

SANTOS, F. J.; FERREIRA, J. M. S.; RIBEIRO, V. J. O.; OLIVEIRA, A. C. L.; AZEVEDO, A. G. C. **Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos II- *Hirsutella thompsonii* (Fischer)**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.

SANTOS, Valdinar Bezerra dos Santos. **Atributos de solos sob cultivo de frutíferas em sistemas de manejo convencional, em transição e orgânico no norte do estado do Piauí**. 2010. Tese (Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2010.

SILVA, D. C. C., TIAGO, P. V., MATTOS, J. L. S., PAIVA, L. M., SOUZA-MOTTA, C. M. 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 Brasileira de Botânica**, [São Paulo], v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011.

SIMÕES, M. F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) Spores. **Microscopy and Microanalysis**, [Nova Iorque], v. [19], n. [5], p. 1-8, 2013.

SOBRAL, L. V.; MELO, K. N.; SOUZA, C. M.; SILVA S. F.; SILVA, G.L.R.; SILVA, A. L. F.; WANDERLEY, K. A. A.; OLIVEIRA, I. S.; CRUZ, R. Antimicrobial and enzymatic activity of anemophilous fungi of a public university in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [Rio de Janeiro], v. 89, n. 3, p. 2327-2356, 2017.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. C.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M.; NASCIMENTO, J. P.; LARANJEIRA, D. Identification and characterization of filamentous fungi isolates from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyze insulin. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 34, n. 3, p. 273-280, 2003.

SUN, B.; HUANG, P.; WEI, H.; CAI, W.; WANG, L.; LIU, S.; JIANG, X.; CHEN, A. *Aspergillus telluris*, a new soil derived species belonging to *Aspergillus* subgenus *Polypaecilum*. **Phytotaxa**, [Auckland], v. 455, n. 2, p. 137-151, 2020.

TABOONPONG, K.; MANOCH, L.; CHAMSWARNG, C.; PIASAI, O. Diversity of Microfungi in Marine Sediments from the Gulf of Thailand and Andaman Sea and The In Vitro Antagonistic Activity Against Plant Pathogenic Fungi. **Thai Journal of Agricultural Science**, [Bangkok], v. 47, n. 2, p. 99-108, 2014.

THOM, C.; RAPER, K. B. **A manual of the *Aspergilli***. Baltimori: Williams e Wilkins, 1945.

TSANG, C. C.; TANG, J. Y. M.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era: Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [Gothenburg], v. 16, p. 197-210, 2018.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. **Studies in Mycology**, [Utrecht], v. 95, p. 253-292, 2020.

WARCUP, J. H. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. **Nature**, [Reino Unido], v. 166, n. 4211, p. 117-118. 1950.

# Capítulo 4

## Análise enzimática de *Rhizopus* Ehrenb. (Mucorales, Mucoraceae) isolado de solo em Parnaíba, Piauí

Mateus Oliveira da Cruz  
Clélia de Paula da Silva Costa  
Maria Helena Alves

### RESUMO

Microrganismos, como fungos do gênero *Rhizopus*, habitam o solo atuando na decomposição de matéria morta, sendo as enzimas mediadoras na decomposição e degradação de substratos específicos. As mesmas enzimas, por sua vez, podem ser aplicadas biotecnologicamente na produção de alimentos, bebidas, roupas, cosméticos e produtos farmacêuticos. Dessa forma, esta pesquisa objetivou a identificação e triagem de espécies de *Rhizopus* isoladas do solo de uma área da cidade de Parnaíba, Piauí, para detecção das enzimas: amilases, lipases e proteases. A área de coleta situa-se no Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí (DITALPI), onde o solo foi coletado seguindo métodos clássicos de análise do solo. O meio de cultura, Ágar Martin, foi vertido sobre o solo em placas de Petri para o desenvolvimento das colônias e posterior isolamento. A identificação dos isolados seguiu-se a taxonomia clássica e molecular. Para a análise qualitativa da detecção de enzimas foi adotado o meio sólido com substrato específico. Os resultados revelaram seis isolados de

*Rhizopus*, os quais apresentaram diferenças morfológicas. No entanto, a identificação por análise molecular demonstrou que os seis isolados corresponderam a *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, táxon com ocorrência no Brasil somente para São Paulo e Pernambuco. Todos os isolados de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* apresentaram halo de degradação por amilases, lipases e proteases, sendo seus maiores halos de 8.1 mm, 8.1 mm e 8.6 mm, respectivamente. Com este estudo, registra-se a primeira ocorrência de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* para o Estado do Piauí apresentando isolados promissores quanto à produção de enzimas de alto valor biotecnológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** biodiversidade fúngica; biotecnologia; fungos do solo.



## 1. INTRODUÇÃO

O solo é um dos principais habitats de microrganismos, incluindo os fungos que o ocupam e contribuem para a manutenção dos ecossistemas através da ciclagem de nutrientes (CAVALCANTI et al., 2006). Entre os fungos isolados do solo encontram-se *Rhizopus* Ehrenb. (Mucorales, Mucoraceae), gênero que acomoda 13 táxons (WIJAYAWARDENE et al., 2020), caracterizado morfológicamente por seus esporângios apofisados, rizoides opostos ao esporangióforo e esporangiosporos ornamentados, além de outras características de Mucorales. *Rhizopus* é ressaltado como sendo de importância econômica pós-colheita em morango e batata por causar doenças, bem como a relevada importância médica devido a propriedade patogênica a humanos causando mucoromicoses (BENNY et al., 2016).

*Rhizopus arrhizus* foi descrito por Fischer em 1892, no entanto, Scholer (1970), baseado na semelhança morfológica, tornou *R. arrhizus* sinônimo de *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerl. Como a descrição de *R. arrhizus* possuía poucas informações de forma resumida, sem figuras, a maioria dos autores deram preferência à *R. oryzae* (WALTHER; WAGNER; KURZAI, 2019). Em 1985, Ellis designou um isolado ex-neótipo legitimando *R. arrhizus*. Por ser *R. arrhizus* a denominação mais antiga, esta possui prioridade e, conseqüentemente, *R. oryzae* tornou-se sinônimo de *R. arrhizus* (DOLATABADI et al., 2014).

Os trabalhos de Kocková-Kratochvílová e Palkoska (1958), Schipper (1984) e Schipper e Stalpers (1984) apresentam a classificação do gênero *Rhizopus* por taxonomia clássica baseando-se em características morfológicas, como crescimento das colônias, tamanho dos esporângios e ramificação dos rizoides. Schipper e Stalpers (1984) organizaram *Rhizopus* em três grupos: *R. microsporus*, *R. oryzae* e *R. stolonifer*. O estudo filogenético molecular realizado por Abe et al. (2006) consolida a organização deste gênero nos três grupos.

Zheng et al. (2007) reconhecem três variedades em *R. arrhizus*: var. *arrhizus*, var. *delemar* e var. *tonkinensis*. A var. *tonkinensis* não foi suportada pelo estudo molecular de Dolatabadi et al. (2014). *Rhizopus arrhizus* var. *delemar* se diferencia de *R. arrhizus* var. *arrhizus* morfológicamente e, principalmente, pela dilatação no esporangióforo, bastante comum na metade superior ou logo abaixo da hipófise, e esporangiosporos variando em forma e tamanho (ZHENG et al., 2007). O termo variedade é empregado na classificação para diferenciar indivíduos que se diferenciam dentro da espécie (ABE; ASANO; SONE, 2010).

Estudos filogenéticos moleculares separam as variedades de *Rhizopus arrhizus* em dois clados, *R. arrhizus* var. *arrhizus* e *R. arrhizus* var. *delemar*. A ausência do gene lactase desidrogenase A em *R. arrhizus* var. *delemar* é um dos fatores que fundamentam esta separação. Porém, a formação de zigósporos entre indivíduos dessas variedades, falta de

diferença na ecologia, epidemiologia e distribuição geográfica levam a continuidade das duas variedades em *R. arrhizus* (WALTHER; WAGNER; KURZAI, 2019). Outros estudos, como de Gryganskyi et al. (2018) adotam a classificação com os clados *R. arrhizus* e *R. delemar*. Tomando por base o estudo taxonômico de Mucorales realizado por Walther, Wagner e Kurzai (2019), foi adotado *R. arrhizus* var. *arrhizus* neste estudo.

Estudos sobre a classificação específica do gênero *Rhizopus* apresentam contradições. Em 2007, Zheng et al., considerando os aspectos morfológicos e a sistemática molecular, sinonimizaram e excluíram táxons culminando dez espécies e sete variedades no gênero *Rhizopus*. Em estudo posterior, Dolatabadi et al. (2014), baseados em análise molecular, morfológica e fisiológica, tornaram sinonímia todas as variedades de *R. microsporus* apresentadas por Abe et al. (2006) e Zheng et al. (2007). Apesar de ser um gênero de ampla distribuição e prevalência, a evolução das espécies de *Rhizopus* ainda é pouco esclarecida (GRYGANSKYI et al., 2018).

Para o Brasil são conhecidas quatro espécies (*Rhizopus arrhizus* A. Fisch., *Rhizopus homothallicus* Hesselt. & J.J. Ellis, *Rhizopus microsporus* Tiegh, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill) e duas variedades (*Rhizopus arrhizus* A. Fisch. var. *arrhizus*, *Rhizopus arrhizus* var. *delemar* (Wehmer & Hanzawa) J.J. Ellis) isoladas de excremento (SOUZA et al., 2017), solo, folheto (SANTIAGO, 2015) ou morango (LOPES et al., 2010). No Estado do Piauí não há registros de ocorrência de táxons do gênero *Rhizopus* (SANTIAGO, 2015).

Os fungos, como fonte para a produção de enzimas com fins biotecnológicos, possuem preferência sobre as plantas e os animais devido a facilidade e economia do processo (RAVEENDRAN et al., 2018). Alguns estudos têm analisado a produção de enzimas de interesse biotecnológico, como amilases, proteases (BENABDA et al., 2019) e lipases (ZHAO et al., 2019) por isolados de *Rhizopus*. Diante da grande importância biotecnológica das enzimas, Silva et al. (2017) ressaltam que a busca por microrganismos com potencial para a produção destas proteínas torna-se necessária.

As enzimas amilases, lipases e proteases apresentam grande aplicação industrial, sendo utilizadas para a produção de alimentos laticínios e bebidas (suco, vinho, cerveja), além de serem utilizadas no processo de panificação, produção de ração e de detergentes. Também têm sido aplicadas na indústria farmacêutica, têxtil, papel e em processos de recuperação ambiental (ORLANDELI et al., 2012; GUERRAND et al., 2017; RAZZAQ et al., 2019).

Amilases são enzimas que degradam a molécula de amido através da clivagem das ligações  $\alpha$ -glicosídicas, sendo classificadas em  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e amiloglucosidase (SILVA et al., 2017). Já as lipases são enzimas que aceleram a hidrólise de triglicerídeos (GUERRAND, 2017). Enquanto as enzimas proteases são aquelas dotadas da capacidade de

quebrar ligações peptídicas degradando proteínas (SOUZA et al., 2015) e são classificadas de acordo com a posição dos peptídeos que sofrem ação proteolítica, tipo do sítio ativo e pH de atividade (PIRES; FONSECA; SERUDO, 2019).

Dessa forma, esta pesquisa objetivou a identificação e triagem de espécies de *Rhizopus* isoladas do solo de uma área da cidade de Parnaíba, Piauí, para detecção das enzimas: amilases, lipases e proteases.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Coleta e isolamento

A área de estudo está localizada no Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí (DITALPI), na cidade de Parnaíba, Estado do Piauí, (3°01'49.91"S 41°46'17.09"O) (Figura 1). A área possui solo do tipo latossolo amarelo, argissolo vermelho amarelo e neossolo quartzarênico (SANTOS et al., 2013). Os sistemas de irrigação utilizados no perímetro da área são: micro-aspersão (47,35%), gotejamento (34,05%) e pivô-central (18,60%) (DENOCS, 1998).

As amostras de solo foram coletadas em pontos aleatórios, tanto nas áreas preservadas como de plantio de acerola e coco. Três Amostras de solo foram retiradas da superfície do solo e também à profundidade de 20 cm durante os períodos chuvosos (janeiro a março) de 2013. O solo foi coletado com auxílio de espátula/colher previamente esterilizada em álcool 70° GL e armazenado em sacos plásticos etiquetados contendo os dados de coleta, como superfície ou a 20 cm do solo, data e local de coleta. Após procedimentos de coleta, as amostras de solo foram transportadas para o laboratório de Botânica do Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, da Universidade Federal do Piauí (UFPI), atual Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr).

No laboratório, as amostras do solo foram homogeneizadas e distribuídas em placas de Petri seguindo o método placa de solo de Warcup (1950), sendo carreado em triplicata. Seguindo este método, 1g do solo foi depositado em placa de Petri esterilizada e vertido 15 mL do meio de cultura Ágar Martin (MARTIN, 1950) para cada placa.

O crescimento das colônias foi acompanhado por 72 horas à temperatura de 28±2°C e luminosidade ambientes. O isolamento e posterior purificação dos isolados, fragmentos das colônias de *Rhizopus*, foram transferidos separadamente para o meio Ágar Extrato de Malte (MEA) contido em placa de Petri e, após confirmada pureza, armazenado em tubos de ensaio contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) (LACAZ et al., 2002) para posterior identificação.

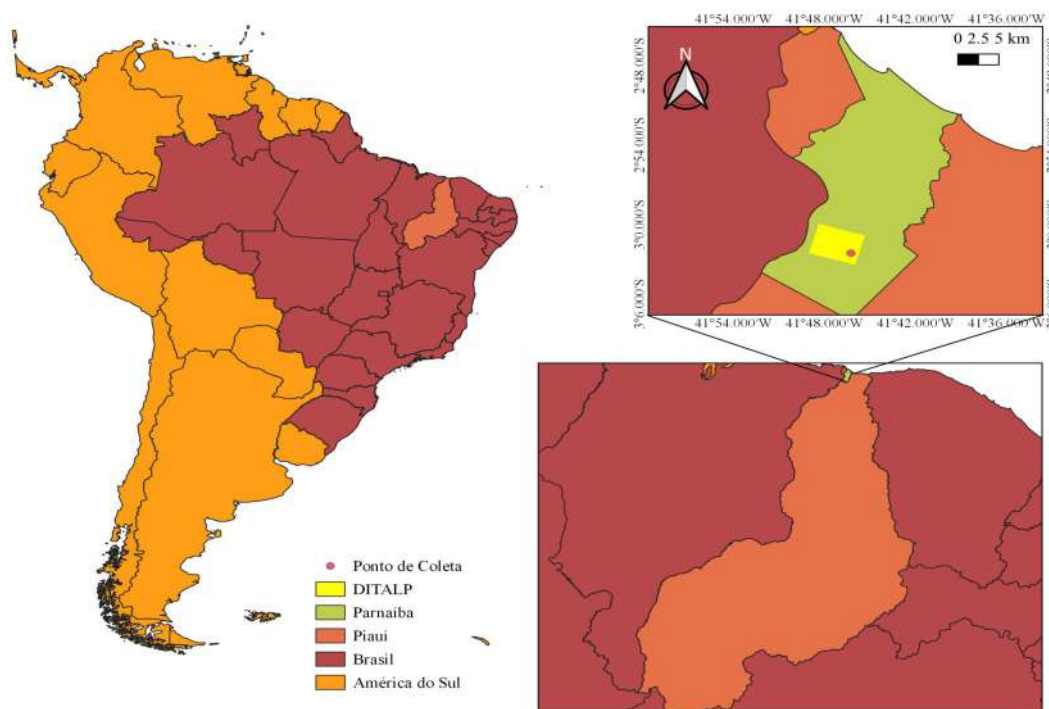


Figura 1 - Mapa de localização da área de coleta do solo.

Fonte: Os autores

## 2.2. Identificação morfológica dos isolados

A identificação clássica dos isolados foi realizada em culturas com cinco dias de desenvolvimento em MEA, sob temperatura ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade ambientes. Características macromorfológicas, como tamanho, cor e textura das colônias foram analisadas. Na análise micromorfológica, como forma, coloração e tamanho das microestruturas de esporangióforos, esporângios e esporangiosporos foram observados com auxílio de um microscópio de luz Leica DM2000 usando objetiva de 40X, 80X e 100X. Azul de lactofenol foi usado em algumas observações para evidência das microestruturas. Os espécimes foram identificados seguindo as chaves de identificação e informações contidas na literatura pertinente ao gênero *Rhizopus*, como: Kocková-Kratochvílová e Palkoska (1958), Schipper (1984) e Zheng et al. (2007).

## 2.3. Identificação molecular dos isolados

### 2.3.1. Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

A extração do DNA foi realizada a partir da transferência de fragmentos de micélio de culturas puras para microtubos de 2 ml, acrescentado 0,5 g de pérolas de vidro para

trituração do micélio, por meio de agitação em alta velocidade, em vórtex. Após a trituração do micélio, o DNA foi extraído seguindo a metodologia de Góes-Neto et al. (2005). A região ITS do rDNA foi amplificado utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 (SANTIAGO et al., 2013). Os resultantes amplificados foram purificados com PureLink – PCR Purification Kit (Invitrogen). As amostras foram enviadas para a Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campus de Rio Claro, para o sequenciamento. As sequências foram alinhadas no CLUSTALX (LARKIN et al., 2007), editadas no software BioEdit (HALL, 1999) e comparadas com dados depositados no CBS Database (Fungal Biodiversity Centre).

#### 2.4. Caracterização enzimática

Para a determinação do potencial enzimático dos isolados em estudo, utilizou-se o método qualitativo que consiste em cultivar os fungos em meio sólido específico para a produção da enzima e mensuração do halo quando formado.

As amostras fúngicas foram inoculadas em placas de Petri contendo BDA (LACAZ et al., 2002) para realização do cultivo monospórico, segundo metodologia proposta por Santos (2009). Após a obtenção da cultura monospórica, o micélio foi lavado com água destilada esterilizada e a suspensão assepticamente depositada em tubo de ensaio. Alíquota dessa suspensão foi removida para contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico obtendo-se uma suspensão de  $10^6$  esporos/mL.

Para a verificação enzimática, uma alíquota da solução de esporos (50  $\mu$ l) foi transferida para poços de aproximadamente 5 mm nas placas contendo meios específicos para detecção das atividades enzimáticas tendo por base a metodologia abordada por Alves et al. (2002). As amostras foram armazenadas sob temperatura ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade ambientes.

O substrato específico para detecção de amilases, lipases e proteases foi 0,2% de amido solúvel (Merck), Tween 80 e 0,4% de gelatina-leite, respectivamente (HANKING; ANAGNOSTAKIS, 1975). A revelação do halo de amilases ocorreu com solução de lugol a 5% (m/v) vertido sobre a cultura. O halo de lipases e proteases são revelados sem o uso de solução. Com o auxílio de uma régua milimetrada, o diâmetro dos halos foi mensurado em colônias com 4 dias de desenvolvimento. Cada experimento foi carreado em triplicata. Análise estatística foi realizada usando o software Past (4.02).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado foram obtidos seis isolados do gênero *Rhizopus* presentes no solo de

áreas do Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí (DITALPI). Os isolados foram previamente nomeados de 01–06 e apresentaram características morfológicas diferentes entre si. O isolado 04 apresentou esporangióforos mais curtos e o isolado 03 esporangióforos mais longos. Nos isolados 02 e 05 foram verificados esporangióforos de maior e menor diâmetro de largura, respectivamente. Enquanto os isolados 01 e 06 revelaram características semelhante e consideradas dentro do padrão apresentado pelo táxon.

A descrição dos esporangióforos variaram quanto ao padrão bifurcado e isolado, mas a coloração marrom e presença de dilatação no esporangióforo foram características de todos os isolados. Os esporangiosporos pouco variaram entre os isolados, medindo (5,0 – 6,0  $\mu\text{m} \times$  3,0 – 3,5  $\mu\text{m}$ ), sendo ovoides e de parede estriada. Apenas o isolado 02 apresentou esporângio obovoide, os demais esporângios, globosos. Quanto ao tamanho, os esporângios pouco variaram, medindo 51–146  $\times$  51–106  $\mu\text{m}$ . A parede dos esporângios também diferiu entre os isolados, sendo que os isolados 02 e 04 apresentaram parede lisa e os demais parede espinulada (Quadro 1).

AMOSTRA	COMPRIMENTO DO ESPORANGIOFORO ( $\mu\text{m}$ )	LARGURA DO ESPORANGIOFORO ( $\mu\text{m}$ )	DESCRIÇÃO DO ESPORANGIOFORO	COMPRIMENTO DOS ESPORANGIOSPOROS ( $\mu\text{m}$ )	LARGURA DOS ESPORANGIOSPOROS ( $\mu\text{m}$ )	DESCRIÇÃO DOS ESPORANGIOSPOROS	COMPRIMENTO DO ESPORÂNGIO ( $\mu\text{m}$ )	LARGURA DO ESPORÂNGIO ( $\mu\text{m}$ )	DESCRIÇÃO DO ESPORÂNGIO
01	525	8.0	Marrom com dilatação, bifurcado	5.0	3.0	Lim oniformes e estriados	79	79	Globo a subglob. espinulado
02	603	9.0	Marrom, com dilatação, isolado	6.0	3.0	Lim oniformes e estriados	146	106	Obovoide, liso
03	495	8.0	Marrom, com dilatação, bifurcado e isolado	5.0	3.0	Lim oniformes e estriados	70	70	Globo a subglob. espinulado
04	150	7.0	Marrom, com dilatação, bifurcado	5.0	3.0	Lim oniformes e estriados	51	51	Globo a subglob., liso
05	315	6.0	Marrom, com dilatação, bifurcado e isolado	5.0	3.0	Lim oniformes e estriados	63	63	Globo a subglob. espinulado
06	472	7.0	Marrom, com dilatação, bifurcado	6.0	3.0	Lim oniformes e estriados	72	72	Globo a subglob. espinulado

Quadro 1. Características morfológicas de *Rhizopus* isolado do solo de áreas do Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí.

Fonte: autores.

Diante das diferenças morfológicas demonstradas pelos isolados em suas características, considerou-se necessária a análise molecular dos mesmos, sendo revelado similaridade de 100% entre os isolados analisados (Figura 2) e, quando comparados com sequências moleculares em bancos de dados públicos, o CBS Database (Fungal Biodiversity Centre) indicou similaridade com *Rhizopus arrhizus* Fisch. var. *arrhizus*.

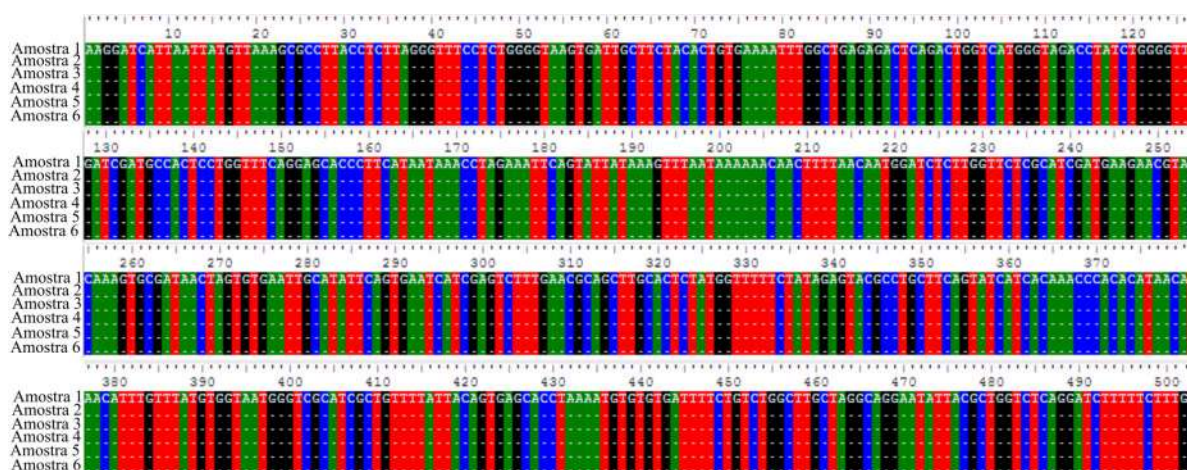


Figura 2. Sequências das amostras 01 – 06, com 100% de similaridade entre si.  
Fonte: autores.

Na descrição morfológica apresentada por Kratochvílová e Palkoska (1958) de forma resumida, *Rhizopus arrhizus* apresenta esporangióforo com mais de 150  $\mu\text{m}$  de comprimento e esporangiosporos com 5–7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, assim como os isolados identificados neste estudo. Além do mais, os isolados 01–06, assemelham-se com a descrição apresentada na Monografia de *Rhizopus* por Zhen et al. (2007), que descrevem *R. arrhizus* var. *arrhizus* com esporangióforo medindo (117–)293–950(–1740)  $\mu\text{m}$  em comprimento e (7–)9–18(–23)  $\mu\text{m}$  diâm. em largura, apresentando coloração marrom; esporângio globoso a subgloboso medindo (47–)71–176(–224)  $\mu\text{m}$  diâm; esporangiosporos ovóides, estriados medindo (4–) 5–8 (–9)  $\times$  (3,5–) 4–7 (–8)  $\mu\text{m}$ .

Isolados de um mesmo táxon de fungo podem variar morfológicamente dificultando a identificação por taxonomia clássica, assim como apresentado neste trabalho. Com isso, a análise molecular é uma contribuição para esta taxonomia, sendo bastante usada nos estudos sobre aspectos taxonômicos de fungos filamentosos, como do gênero *Rhizopus* (GRYGANSKYI et al., 2018).

*Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* está entre os táxons com maior número de isolados identificados segundo bancos de dados, como Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, GenBank e PubMed (GRYGANSKYI et al., 2018). No Brasil, este táxon tem sido isolado de

folheto (SCHOENLEIN-CRUSIUS; MILANEZ, 1997), solo (SANTIAGO; SANTOS; MAIA, 2013) e excremento (SOUZA et al., 2017). No que se refere a distribuição geográfica para o Brasil, o referido táxon apresenta ocorrência somente para São Paulo (Sudeste) e Pernambuco (Nordeste) (SANTIAGO, 2015).

Quanto à caracterização enzimática, tabela 1, todos os isolados apresentaram halo de degradação por amilases, lipases e proteases. Os maiores halos de amilases foram apresentados pelos isolados 03 (8.1 mm diâm.), 06 (7.9 mm diâm.) e 04 (7.4 mm diâm.). Alguns dos resultados para amilases diferenciaram entre si estatisticamente. Os maiores halos de degradação por proteases foram apresentados pelos isolados 01, 04 (8.1 mm diâm.) e 03 (8.0 mm diâm.). Os resultados para proteases também não apresentaram diferença segundo o teste Tukey. Quanto à detecção da produção de lipases, os isolados 03, 04 e 06 apresentaram os maiores halos (8.6 mm diâm., 8.2 mm diâm. e 7.8 mm diâm., respectivamente).

Tabela 1 - Caracterização enzimática do halo em milímetro (mm) de *Rhizopus arrhizus*

TÁXON	ISOLADO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA		
		AMILASES	PROTEASES	LIPASES
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	1	5.0 b	8.1 a	6.6 bc
	2	7.3 a	7.8 a	5.5 c
	3	8.1 a	8.0 a	8.6 a
	4	7.6 a	8.1 a	8.2 a
	5	6.6 ab	7.0 a	5.8 c
	6	7.9 a	7.4 a	7.8 ab

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Fonte: autores.

No estudo sobre produção de enzimas extracelular por *Rhizopus* e *Mucor*, de Thompson e Eribo (1984), o isolado de *R. arrhizus* não apresentou halo de degradação por amilases e proteases, diferindo dos isolados aqui testados que formaram halo por estas enzimas. O isolado de Thompson e Eribo (1984) apresentou produção de lipases com halo menor (1–2,5 mm) que os formados pelos isolados deste estudo, sendo considerada baixa produção pelos mesmos autores.

A análise qualitativa sobre a produção de enzimas, que corresponde a detecção da formação de halo enzimático, é pouco explorada. No entanto, a análise qualitativa é primordial para a seleção de produtores de enzimas promissores para consequente análise quantitativa. Estudos quantitativos sobre bioprospecção de *Rhizopus* utilizando resíduos industriais e alternância entre fonte de carbono tem apresentado a produção de amilases



(FREITAS et al., 2014), lipases (KOTOGÁN et al., 2014) e proteases (KUMAR et al., 2005).

Fungos do gênero *Rhizopus* são pouco explorados com relação a detecção de enzimas extracelulares. No entanto, a facilidade de manipulação desses fungos e o rápido desenvolvimento dos mesmos são aspectos promissores para maior exploração dos mesmos quanto à produção de enzimas de interesse biotecnológico.

#### 4. CONCLUSÃO

Um táxon de Mucorales já conhecido para a ciência, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, é registrado pela primeira vez para o estado do Piauí, contribuindo para o conhecimento da diversidade de fungos para o estado, assim como para o Brasil. A formação de halo de degradação por amilases, lipases e proteases produzida por *R. arrhizus* var. *arrhizus* vem contribuir para o conhecimento do potencial biotecnológico de fungos filamentosos. Enquanto a análise qualitativa da detecção de enzimas por *R. arrhizus* var. *arrhizus* demonstrou que os isolados são promissores para que haja posteriores estudos quantitativos e de purificação enzimática.

#### 5. REFERÊNCIAS

ABE, A., ODA, Y.; ASANO, K.; SONE, T. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [Tokyo], v. 70, p. 2387-2393, 2006.

ABE, A.; ASANO, K.; SONE, T. A Molecular Phylogeny-Based Taxonomy of the genus *Rhizopus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [Tokyo], v. 74, n. 7, p. 1325-1331, 2010.

ALVES, M. H.; TAKAKI, G. M. C.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 33, p. 325-330, 2002.

BENABDA, O.; M'HIR, S.; KASMI, M.; MNIF, W.; MOKTAR, H. Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation. **Journal of Chemistry**, [Nova Iorque], v. 2019, p. 1-9, 2019.

BENNY, G. L.; SMITH M. E.; KIRK, P. M.; TRETTER, E. D.; WHITE, M. M. **Challenges and Future Perspectives in the Systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina**. In: LI, D.W. (org.). *Biology of Microfungi, Fungal Biology*. 1. Ed. Switzerland: Springer International Publishing, p. 65–126, 2016.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos

filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [São Paulo], v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006

DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA AS SECAS - DNOCS. **Distrito de Irrigação Tabuleiros: Litorâneos do Piauí**. 1998. Disponível em: [https://www.dnocs.gov.br/~dnocs/doc/canais/perimetros\\_irrigados/pi/tabul\\_litoraneos](https://www.dnocs.gov.br/~dnocs/doc/canais/perimetros_irrigados/pi/tabul_litoraneos). Acesso em: 28 jul. 2020.

DOLATABADI, S.; WALTHER, G.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; HOOG, G. S. Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. **Fungal Diversity**, [Hong Kong], v. 64, p. 145-163, 2014.

ELLIS, J. J. Species and varieties in the *Rhizopus arrhizus-Rhizopus oryzae* group as indicated by their DNA complementarity. **Mycologia**, [Lancaster], v. 77, n. 2, p. 243-247, 1985.

FREITAS, A. C.; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G.; OLIVANETO, P. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. **Chemical paper**, [Switzerland], v. 68, n. 4, p. 442-450, 2014.

FISCHER, A. **Die Pilze Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz**. 1 ed. Londres: Johnson Reprint. 1892.

GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERRERO, R. T. DNA extraction from frozen field collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB- base methods. **Biotemas**, [Florianópolis], v. 18, p. 19-32, 2005.

GRYGANSKYI, A. P.; GOLAN, J.; DOLATABADI, S.; MONDO, S.; ROBB, S.; IDNURMA.; MUSZEWSKA, A.; STECZKIEWICZ, K.; MASONJONES, S.; LIAO, H.; GAJDECZKA, M. T.; ANIKE, F.; VUEK, A.; ANISHCHENKO, I. M.; VOIGT, K.; HOOG, S. G.; SMITH, M. E., HEITMAN, J., VILGALYS, R., STAJICH, J. E. Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. **PLoS One**, [São Francisco], v. 5, p. 1-41, 2018.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 3-7, 2017.

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

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, [Lancaster], v. 67, p. 597-607, 1975.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.; PALKOSKA, V. A. Taxonomic Study of the Genus

*Rhizopus* Ehrenberg. **Preslia**, [Praga], v. 30, p. 150-164, 1958.

KOTOGÁN, A.; NÉMETH, B.; VÁGVÖLGYI, C.; PAPP, T. TAKÓ, M. Screening for Extracellular Lipase Enzymes with Transesterification Capacity in Mucoromycotina Strains. **Food Technology & Biotechnology**, [Zagreb], v. 52, n. 1, p. 73-82, 2014.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, [Essex], v. 40, p. 1701-1705, 2005.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. M.; HEIS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal Wand Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, [Oxford], v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LOPES, U. P.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; PEREIRA, O. L.; LOPES, U. N.; RICCI, P. C; COSTA, A. F. Doenças em pós-colheita de morango na região serrana do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, [Brasília], v. 28, p. 1066-1072, 2010.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, [Reino Unido], v. 69, n. 3, p. 215-232. 1950.

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

PIRES, C. B. A.; FONSECA, J. S.; SERUDO, R. L. Proteases produzidas por microorganismos na região amazônica. **Scientia Plena**, [Aracajú], v. 8, n. 1, p.15-33, 2019.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; REBELLO, S.; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology & Biotechnology**, [Zagreb], v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [Lausanne], v. 7, n. 110, p. 1-20, 2019.

SANTIAGO, A. L. C. M. A. **Mucorales**. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em:  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=1&familia=null&ordem=null&genero=>

Rhizopus&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP\_VAR&opcoesBusca=TODOS\_OS\_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica. Acesso em: 03 ago. 2020.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; HOFFMANN, K.; LIMA, D. X.; OLIVEIRA, R. J. V.; VIEIRA, H. E. E.; MALOSSO, E. MAIA, L. C.; SILVA, G. A. A new species of *Lichtheimia* (Mucoromycotina, Mucorales) isolated from Brazilian soil. **Mycological Progress**, [Londres], v. 13, p. 343-353, 2013.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SANTOS, P. J. P.; MAIA, L. C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. [Rio de Janeiro], v. 44, n. 1, p. 1678-4405, 2013.

SANTOS, F. J.; FERREIRA, J. M. S.; RIBEIRO, V. J. O.; OLIVEIRA, A. C. L.; AZEVEDO, A.G.C. **Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos II- *Hirsutella thompsonii* (Fischer)**. 1 ed. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T.; JARBAS, F. OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, 2013.

SCHIPPER, M. A. A. A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in Mycology**, [Baarn], v. 25, p. 1-34, 1984.

SCHIPPER, M. A. A.; STALPERS, J.A. A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rhizopus microsporus*-group. **Studies in Mycology**, [Baarn], v. 25, p. 20-34, 1984.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Mucorales (Zygomycotina) da Mata Atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. **Acta Botânica Brasileira**, [São Paulo], v. 11, n. 1. p. 95-101. 1997.

SCHOLER, H. J. **Mucormykosen bei Mensch und Tier. Taxonomie der Erreger. Chemotherapie im Tierexperiment und in der Klinik**. 1970. Tese de Doutorado – Universidade de Basel, Suíça. 1970.

SILVA, L. A. F.; CARVALHO, S. A.; FILHO, D. F., ALVES, M. F.; SILVA, N. L. T.; GOMES, J. R.; SANTOS, K. S. Produção de amilase por fungo filamentoso endofítico em fermentação submersa. **Caderno de Ciências Agrárias**, [Montes Claros], v. 9, n. 3, p. 49-53, 2017.

SOUZA, C. A. F.; LIMA, D. X.; GURGEL, L. M. S.; SANTIAGO, A. L. C. M. A. Coprophilous Mucorales (ex Zygomycota) from three areas in the semi-arid of Pernambuco,

Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 48, p.79-86, 2017.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C., FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X.F., JUNIOR, A. P., MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

THOMPSON, D. P.; ERIBO, B. E. Extracellular enzyme production by *Rhizopus* and *Mucor* species on solid media. **Canadian Journal of Microbiology**, [Ottawa], v. 30, p. 126-128, 1984.

WALTHER, G.; WAGNER, L.; KURZAI, O. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. **Journal of Fungi**, [Basel], v. 5, n. 106, p. 2-23, 2019.

WARCUP, J. H. **The soil-plate method for isolation of fungi from soil**. Nature, [Reino Unido], v. 166, n. 4211, p. 117-118. 1950.

WIJAYAWARDENE, N. N.; HYDE, K. D.; AL-ANI, L. K. T.; TEDERSOO, L.; HAELEWATERS, D.; RAJESHKUMAR, K. C.; ZHAO, R. L.; APTROOT, A.; LEONTYEV, D. V.; SAXENA, R. K.; TOKAREV, Y. S.; DAI, D. Q.; LETCHER, P. M.; STEPHENSON, S. L.; ERTZ, D.; LUMBSCH, H.T.; KUKWA, M.; ISSI, I.V.; MADRID, H.; PHILLIPS, A. J. L.; SELBMANN, L.; PFLIEGLER, W. P.; HORVÁTH, E.; BENSCH, K.; KIRK, P. M.; KOLAŘÍKOVÁ, K.; RAJA, H. A.; RADEK, R.; PAPP, V.; DIMA, V.; MA, J.; MALOSSO, E.; TAKAMATSU, S.; RAMBOLD, G.; GANNIBAL, P. B.; TRIEBEL, D.; GAUTAM, A. K.; AVASTHI, S.; SUETRONG, S.; TIMDAL, E.; FRYAR, S.C.; DELGADO, G.; RÉBLOVÁ, M.; DOILOM, M.; DOLATABADI, S.; PAWŁOWSKA, J. Z.; HUMBER, R. A.; KODSUEB, R.; SÁNCHEZ-CASTRO, I.; GOTO, B. T.; SILVA, D. K. A.; SOUZA, F. A.; OEHL, F.; SILVA G. A.; SILVA, I. R.; BŁASZKOWSKI, J.; JOBIM, K.; MAIA, L. C.; BARBOSA, F. R.; FIUZA, P. O.; DIVAKAR, P. K.; SHENOY, B. D.; CASTAÑEDA-RUIZ, R. F.; SOMRITHIPOL, S.; LATEEF, A. A.; KARUNARATHNA, S. C.; TIBPROMMA, S.; MORTIMER, P. E.; WANASINGHE, D. N.; PHOOKAMSAK, R.; XU, J.; WANG, Y.; TIAN, F.; ALVARADO, P.; LI, D. W.; KUŠAN, I.; MATOČEC, N.; MEŠIĆ, A.; TKALČEC, Z.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; PAPIZADEH, M.; HEREDIA, G.; WARTCHOW, F.; BAKHSHI, M. B.; OEHM, E.; YOUSSEF, N.; HUSTAD, V. P.; LAWREY, J. D.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; FIRMINO, A. L.; TIAN, Q.; HOUBRAKEN, J.; HONGSANAN, S.; TANAKA, K.; DISSANAYAKE, A. J.; MONTEIRO, J. S.; GROSSART, H. P.; SUIJA, A.; WEERAKOON, G.; ETAYO, J.; TSURYKAU, A.; VÁZQUEZ, V.; MUNGAI, P.; DAMM, U.; LI, Q.R.; ZHANG, H.; BOONMEE, S.; LU, Y. Z.; BECERRA, A. G.; KENDRICK, B.; BREARLEY, F. Q.; MOTIEJŪNAITĖ, J.; SHARMA, B.; KHARE, R.; GAIKWAD, S.; WIJESUNDARA, D. S. A.; TANG, L. Z.; HE, M. Q.; FLAKUS, A.; RODRIGUEZ-FLAKUS, P.; ZHURBENKO, M. P.; MCKENZIE, E. H. C.; STADLER, M.; BHAT, D. J.; LIU, J. K.; RAZA, M.; JEEWON, R.; NASSONOVA, E. S.; PRIETO, M.; JAYALAL, R. G. U.; ERDOĞDU, M.; YURKOV, A.; SCHNITTLER, M.; SHCHEPIN, O. N.; NOVOZHILOV, Y. K.; SILVA-FILHO, A. G. S.; GENTEKAKI,

E.; LIU, P.; CAVENDER, J. C.; KANG, Y.; MOHAMMAD, S.; ZHANG, L. F.; XU, R. F.; LI, Y. M.; DAYARATHNE, M. C.; EKANAYAKA, A. H.; WEN, T. C.; DENG, C. Y.; PEREIRA, O. L.; NAVATHE, S.; HAWKSWORTH, D. L.; FAN, X. L.; DISSANAYAKE, L. S.; KUHNERT, E.; GROSSART, H. P.; THINES, M. Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, [Chiang Rai], v. 11, n. 1, p. 1060-1456, 2020.

ZHAO, J. F.; LIN, J. P.; YANG, L. R. WU, M. B. Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase by Reasonable Immobilization on Magnetic Nanoparticles and Its Application in Synthesis 1,3-Diacylglycerol. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [Clifton], v. 188, n. 3, p. 677-689, 2019.

ZHENG, R. Y.; CHEN, G. Q.; HUANG, H.; LIU, X. Y. A monograph of *Rhizopus*. **Sydowia**, [Horn], v. 59, p. 273-372, 2007.

# Capítulo 5

## Caracterização enzimática de táxons de Mucoromycota e Mortierellomycota (Mucoromyceta) isolados do solo no Piauí

Mateus Oliveira da Cruz  
Clélia de Paula da Silva Costa  
Maria Helena Alves

### RESUMO

O solo é o principal reservatório da biodiversidade, sendo um dos habitats de fungos do Mucoromycota e Mortierellomycota (Sub-reino Mucoromyceta), táxons basais que apresentam grande importância como decompositores e na aplicação biotecnológica onde o homem é beneficiado pela ampla aplicação dos microrganismos desses grupos na produção de vários produtos. Entre as substâncias excretadas pelos fungos durante seu metabolismo, tem-se as enzimas amilases, lipases e proteases, enzimas essas de grande relevância no uso industrial. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar fungos de Mucoromycota e Mortierellomycota do solo em áreas da região Norte do Piauí, bem como realizar a caracterização enzimática quanto à produção de amilases, lipases e proteases. Amostras do solo foram coletadas e o isolamento dos fungos realizado de acordo com a metodologia clássica em microbiologia do solo. Para a identificação dos isolados foi adotado a taxonomia clássica e posteriormente realizado a análise qualitativa da produção de

enzimas. Como resultado, foram identificados *Lichtheimia ramosa*, *Cunninghamella echinulata*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor plumbeus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Mortierella* sp. 1 e *Mortierella* sp. 2. Dentre os sete táxons, cinco ao nível específico foram submetidos à detecção enzimática e todos sinalizaram positivos para a produção de ao menos duas enzimas. O isolado de *R. arrhizus* apresentou halo de degradação para amido, lipídio e proteína, sendo os mesmos maiores que os formados pelos demais. O presente estudo corrobora com o conhecimento da diversidade de fungos no estado do Piauí, apresentando cinco táxons promissores para aplicação industrial. Entretanto, se faz necessário estudos posteriores para maior exploração enzimática destes fungos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia de fungos; Fungos zigospóricos; Microbiologia do solo.

## 1. INTRODUÇÃO

O solo, principal reservatório da diversidade biológica na biosfera, é um sistema heterogêneo, complexo e dinâmico, tendo os microrganismos a sua fração viva desempenhando processos essenciais a sua manutenção e funcionalidade. Tais características do solo o proporcionam a formação de micro-habitats que variam em função das propriedades químicas, físicas e da disponibilidade de nutrientes. A formação destes micro-habitats está intrinsecamente relacionada à agregados do solo que consiste em um complexo de areia, argila, silte e matéria orgânica que favorece suporte físico de aderência aos microrganismos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Entre os microrganismos disponíveis no solo encontram-se os fungos, fundamentais na decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A microbiota do solo é amplamente representada pelos filos Deuteromycota, Mucoromycota e Mortierellomycota, sendo que os dois últimos fazem parte do Sub-reino Mucoromycota Tedersoo et al., os quais são caracterizados pela formação de zigósporos produzidos na reprodução sexuada por conjugação gametangial e por apresentarem esporângio, esporângio, esporangiosporos e clamidosporos, estruturas especializadas na reprodução assexuada. Estes fungos apresentam hifas irregularmente septadas e hifas especializadas, como rizoides e estolões, que atuam na absorção de nutrientes e dispersão de estruturas reprodutivas, respectivamente (KIRK et al., 2008).

Mucoromycota acomoda Mucorales Fries, a mais diversa ordem de Mucoromycota, constituída de 55 gêneros (WIJAYAWARDENE et al., 2020). Os gêneros *Absidia* Tieghem, *Lichtheimia* Vuillemin, *Mucor* Fresen, *Rhizopus* Ehrenberg e *Syncephalastrum* J. Schröter são os mais comuns em estudos sobre Mucoromycota (LIMA; SANTIAGO; SOUZA-MOTTA, 2015; LIMA et al., 2018). Representantes de Mucorales, em sua maioria, são considerados saprófitos, mas também podem ser parasitas de outros fungos, patógenos de plantas e causadores de doenças infecciosas a humanos, as mucoromicoses (HOFFMANN et al., 2013).

Em Mortierellomycota tem-se Mortierellales Cavalier-Smith, ordem que apresenta *Mortierella* Coemans, táxon tipo e o mais conhecido deste filo. Representado atualmente por 112 espécies descritas (WIJAYAWARDENE et al., 2020), sendo caracterizado por apresentar esporangióforo simples ou de ramificação variada, com esporângio em sua parte terminal podendo acompanhar uma vesícula na base. Os esporângios são globosos com um único esporangiosporo ou múltiplos. Representantes deste gênero são frequentemente isolados do solo (NGUYEN et al., 2019).

No Brasil, alguns estudos têm sido realizados a fim de se conhecer a diversidade de



Mucoromycota isolados a partir de amostras do solo da Reserva Ecológica de Dois Irmãos. Como Mortierellales era acomodada em Mucoromycotina (HIBBETT et al., 2007), tais estudos consideram táxons de Mortierella.

Fungos da ordem Mucorales e Mortierellales têm sido explorados quanto à produção de compostos aplicados biotecnologicamente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). *Mucor circinelloides* Tieghem e *Mucor hiemalis* Wehmer são apresentadas como produtoras de biossurfactantes, substâncias de grande aplicação comercial (MARQUES et al., 2019; FERREIRA et al., 2020). Enquanto *Lichtheimia hyalospora* (Saito) Kerst. Hoffman, Walther & K. Voigt e *Mucor subtilissimus* Oudemans têm sido promissoras na produção de quitosana, polímeros aplicados em diversas áreas (SOUZA et al., 2020). *Mortierella alliacea* Linnemann é mencionada como produtora de glucosidase, importante enzima que degrada polissacarídeos (TANAKA et al., 2002). Outras espécies têm sido exploradas também na produção de antimicrobianos, lipídios, enzimas e na fermentação de alimentos (BENTO et al., 2009; HUANG et al., 2016; SATARI; KARIMI, 2017).

Entre as enzimas produzidas por fungos tem-se as amilases, lipases, proteases, dentre outras. As amilases são enzimas especializadas em quebrar amido formando dextrina e glicose (GUPTA et al., 2003). Lipases são enzimas que atuam na hidrólise de triacilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol (GUERRAND, 2017). Já as proteases, também denominadas enzimas proteolíticas, degradam proteínas quebrando ligações peptídicas (SOUZA et al., 2015). Tais enzimas apresentam grande aplicação biotecnológica na produção de medicamentos, papel, bebidas, alimentos, ração animal, produtos químicos, biodiesel e detergentes. Adicionalmente, possuem aplicação na indústria têxtil e no tratamento de efluentes (SINGH et al., 2016).

Estudos têm apresentado os fungos de Mucoromycota e Mortierellomycota como promissores para produção das citadas enzimas. Assim, o consecutivo estudo realizando a triagem de microrganismos para produção de enzimas é fundamental para o delineamento de isolados fúngicos com maior potencial biotecnológico (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar fungos de Mucoromycota e Mortierellomycota do solo em áreas da região Norte do Piauí, bem como realizar a caracterização enzimática quanto à produção de amilases, lipases e proteases.

## 2. METODOLOGIA

Amostras de solo foram coletadas durante o período de Outubro de 2012 a Maio de 2013 em área de Mangue, no Município de Luiz Correia, PI (2°53'45.32"S 41°40.20' 71"O),

na Embrapa Meio Norte/UEP de Parnaíba (3°04'49" S 41°46'50" O) e em áreas do Distrito Irrigado Tabuleiros Litorâneos do Piauí - DITALPI (3°01'49.91"S 41°46'17.09"O) (Figura 1). As coletas foram efetuadas com o auxílio de espátula/colher previamente esterilizada em álcool (70° GL) e as amostras acondicionadas em sacos plásticos para transporte.

Em laboratório, 0.1g de solo foi depositada em placas de Petri esterilizadas e sobre a mesma foi vertido o meio de cultivo Ágar Martin pré-aquecido, segundo método adotado por Warcup (1950). As placas foram armazenadas sob luminosidade e temperatura (28±2°C) ambientes. Após 48 horas de armazenamento, o desenvolvimento das culturas fúngicas foram acompanhados e, quando desenvolvidas, transferidas para o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) segundo metodologia empregada por Lacaz et al. (2002).

A identificação dos isolados foi realizada em culturas com cinco dias de desenvolvimento em Ágar Batata Dextrose sob luminosidade e temperatura (28±2°C) ambientes. Características macromorfológicas, como cor, textura das colônias e tamanho foram analisadas. Na análise micromorfológica, como forma, coloração e tamanho dos esporangióforos, esporângios e esporangiosporos foram observados com auxílio de um microscópio de luz. Para melhor visualização das microestruturas usou-se azul de lactofenol. Após o levantamento das características, estas foram comparadas com as da literatura especializada, como: Hesseltine e Ellis (1964), Trufem e Viriato (1985), Schipper (1978, 1984), Schipper e Stalpers (1983, 1984), Zheng e Chen (2001) e Alves et al. (2002a), dentre outras.

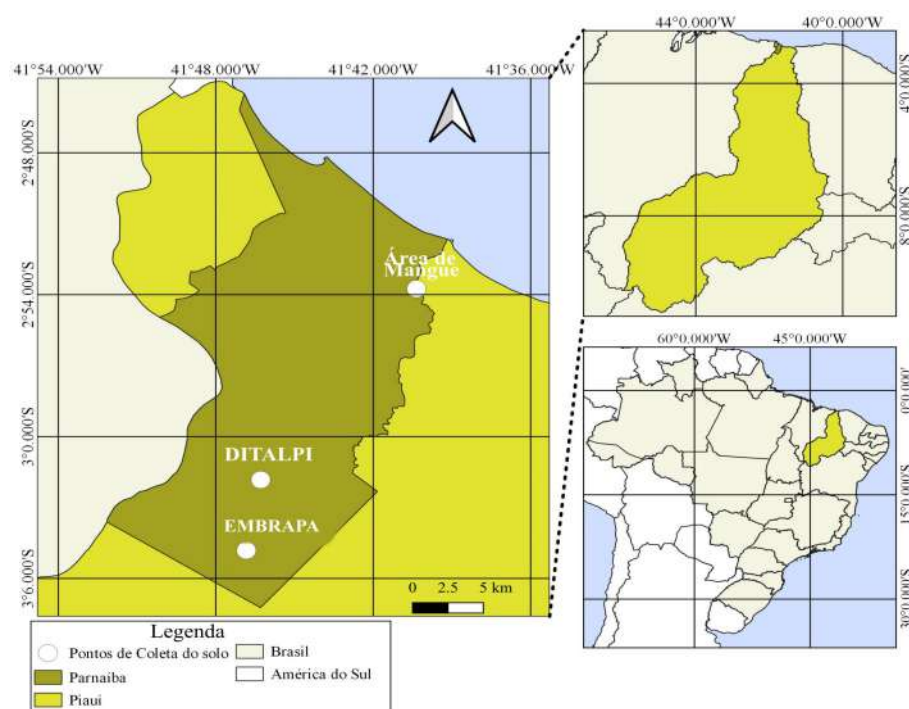


Figura 1. Locais de coleta das amostras de solo.

A caracterização enzimática foi realizada de forma qualitativa, que consiste da observação de halos enzimáticos formados ao redor das colônias em meio de cultivo sólido específico.

Amostras fúngicas foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose para obtenção de cultura monospórica. O micélio esporulado desta cultura foi lavado com água destilada esterilizada e a suspensão de esporos depositada em tubo de ensaio. A contagem dos esporos foi realizada com o auxílio da câmara de Newbauer sob microscópio óptico e a suspensão de  $10^6$  esporos/mL obtida.

Os meios de cultivo sólido específico para detecção de amilases, lipases e proteases foram 0,2% de amido solúvel (Merck), Tween 80 e 0,4% de gelatina-leite, respectivamente, de acordo com Hanking e Anagnostakis (1975). No meio de cultivo em placas de Petri medindo 12 cm em diâmetro, foi realizado uma perfuração central de cinco milímetros, onde foram depositados 50  $\mu$ L da suspensão  $10^7$  esporos/mL. As amostras foram incubadas sob luminosidade e temperatura ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ) ambientes. Todas as análises foram carreadas em triplicata. Após 96 horas de incubação, a presença de halos ao redor das colônias foi observado e, quando presentes, mensurados com auxílio de uma régua milimetrada. Para revelação do halo de degradação por amilases, foi vertido uma solução de lugol a 5% (m/v) sobre a cultura. Os halos formados por lipases e proteases foram visualizados sem o uso de solução.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

A partir das amostras de solo coletadas, foram identificados sete táxons de Mucoromyceta. Destes, cinco pertencentes a ordem Mucorales, Mucoromycota, como segue: *Lichtheimia ramosa* (Zopf) Vuill. (Embrapa Meio Norte); *Cunninghamella echinulata* (Thaxter) Thaxter, *Rhizopus arrhizus* A. Fisch, *Mucor plumbeus* Bonord e *Syncephalastrum racemosum* Cohn (Tabuleiros Litorâneos) e dois táxons, da ordem Mortierellales, Mortierellomycota, identificados ao nível de gênero, denominados de *Mortierella* sp. 1 e *Mortierella* sp. 2 (Mangue).

*Cunninghamella echinulata* foi previamente isolada do solo por Schoenlein-Crusius et al. (1996) assim como no presente estudo. Schoenlein-Crusius e Milanez (1997) isolaram sete espécies de Mucorales do solo da Mata atlântica da reserva biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André. Entre as espécies isoladas pelos citados autores, somente *Syncephalastrum racemosum* foi ocorrente no presente trabalho. Schoenlein-Crusius et al. (2006) também isolaram, a partir de amostras do solo de Cubatão - São Paulo, um único táxon em colaboração a este estudo, a espécie *C. echinulata*. Cavalcanti et al. (2006), ao

estudarem fungos filamentosos do solo da região Xingó, isolaram apenas *Lichtheimia ramosa* em comum aos fungos identificados neste estudo.

*Syncephalastrum racemosum* foi isolado do solo de mineração de cobre por Santiago e Souza-Motta (2006), adicionalmente, por Oliveira et al. (2013), em estudos sobre a diversidade de fungos filamentosos no solo do Parque Nacional do Vale do Catimbau, Pernambuco. *Rhizopus arrhizus* tem sido isolado de solo contaminado com metais tóxicos no estado de São Paulo (SOUZA; SCHOENLEIN-CRUSIUS; OLIVEIRA, 2008).

No estudo dos Mucorales no solo do semiárido de Pernambuco desenvolvido por Santiago, Santos e Maia (2013), 19 táxons foram catalogados entre os quais, em concordância com o presente trabalho, esteve presente *Cunninghamella echinulata*, *Rhizopus arrizus* e *Syncephalastrum racemosum*. Lima, Santiago e Souza-Motta (2015) mencionaram *C. echinulata*, *L. ramosa*, *R. arrhizus* e *S. racemosum* isolados de solo do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, corroborando com a ocorrência destas espécies neste trabalho. As espécies *Rhizopus arrhizus* e *Syncephalastrum racemosum* têm sido apresentadas como ocorrentes no solo de Mata Atlântica (LIMA et al., 2018). Enquanto *Mucor plumbeus* não tem sido reportado nos trabalhos apresentados, no entanto, esta espécie tem sido catalogada para os estados de Pernambuco, Minas Gerais e São Paulo, isolados do solo de domínio fitogeográfico, Mata Atlântica (SANTIAGO, 2015).

Corroborando com o isolamento de *Mortierella* neste estudo, espécies deste gênero foram isoladas do solo no estado de Pernambuco por Upadhyay (1965) e Upadhyay (1970). Adicionalmente, Schoenlein-Crusius et al. (1996) isolaram *Mortierella* sp. de solo no estado de São Paulo.

Dentre os isolados, cinco ao nível específico foram submetidos à caracterização enzimática quanto à detecção da produção de amilases, lipases e proteases. Todos os isolados testados apresentaram halo de degradação por amilases, sendo que os halos formados por *Rhizopus arrhizus* e *Lichtheimia ramosa* foram os de maior diâmetro medindo 7.0 e 6.4 cm, respectivamente. Os mesmos fungos apresentaram os maiores halos de degradação por lipases, com diâmetros de 8.0 e 7.3 cm, respectivamente. Quanto à detecção da produção de proteases, *R. arrhizus* também apresentou maior halo, medindo 8.0 cm em diâmetro, seguido de *Cunninghamella echinulata* e *Mucor plumbeus* que demonstraram halos de 4.5 cm (Tabela 1).

O isolado de *Rhizopus arrhizus* usado nesta caracterização enzimática apresentou maior potencial para produção das enzimas testadas. Tal isolado diferencia-se daquele usado por Thompson e Eribo (1984), que apresentou halo por lipases medindo 1.0 – 2.5 mm e não apresentou formação de halo por amilases e proteases. Todos os isolados de Mucorales

testaram positivo na detecção enzimática deste estudo, apresentando halos enzimáticos maiores que os isolados de Mucorales testados por Thompson e Eribo (1984).

Tabela 1 - Caracterização enzimática do halo em centímetro (cm) de Mucoromycota isolado de solo de áreas do Piauí.

TÁXON	ATIVIDADE ENZIMÁTICA		
	AMILASES	LIPASES	PROTEASES
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt.	5.1	6.5	4.5
<i>Rhizopus arrhizus</i> A. Fisch	7.0	8.0	8.0
<i>Lichtheimia ramosa</i> (Zopf) Vuill.	6.4	7.3	0.0
<i>Mucor plumbeus</i> Bonord	5.0	0.0	4.5
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn	3.6	5.8	3.0

Fonte: Os autores.

Detecção enzimática da produção de amilases, lipases e proteases por Mucorales do gênero *Mucor* foi observada por Alves et al. (2002b), corroborando com a produção de amilases e proteases pelo representante do gênero neste estudo, *Mucor plumbeus*. Gopinath, Anbu e Hilda (2005) também realizaram a triagem para detecção de amilases e lipases por *C. echinulata* e *S. racemosum* que em contraste aos testes desenvolvidos neste trabalho não produziram amilases em meio de cultivo sólido e somente *S. racemosum* demonstrou halo lipolítico. Ainda contribuindo com o presente estudo, Santiago e Souza-Motta (2006) mencionam a produção de amilases por *S. racemosum*, isolados do solo.

Mukunda, Onkarappa e Prashith (2012) trabalharam com isolamento e triagem de fungos isolados do solo analisando qualitativamente a produção de amilases, lipases e proteases por *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. O isolado de *Rhizopus* sp. apresentou produção das três enzimas citadas, assim como ocorreu com *R. arrhizus* neste estudo. Halo lipolítico e proteolítico não foram formados por *Mucor* sp., corroborando, quanto à lipases, com o resultado obtido por *M. plumbeus*. Saleem e Ebrahim (2014) realizaram a detecção da produção de amilases por fungos filamentosos isolados de vegetais e analisaram, em comum com o presente trabalho, a formação de halo amilolítico por *C. echinulata* e *S. racemosum*, as quais apresentaram halos de 2.6 e 2.5 mm em diâmetro, respectivamente. Sendo menores que os halos obtidos nesse estudo aqui apresentados.

#### 4. CONCLUSÃO

Sete táxons de Mucoromyceta têm sido reportados como ocorrentes no solo do estado do Piauí contribuindo para o conhecimento da diversidade de fungos. Cinco destes fungos têm sido apresentados como produtores de amilases, lipases ou proteases, assim apontando-

os como promissores para sucessivos estudos quantitativos de produção enzimática.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALVES, M.H.; TRUFEM, S.F.B. MILANEZ, A.I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, [São Paulo], v. 25, p.147–160, 2002a.
- ALVES, M. H.; TAKAKI, G. M. C.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 33, p. 325-330, 2002b.
- BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; STAMFORD, T. C. M.; SOUZA, E. L. Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP 064 as alternative natural compound to inhibit listeria monocytogenes. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 40, p. 583-589, 2009.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, [São Paulo], v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.
- FERREIRA, I. N. S.; RODRÍGUEZ, D. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; ANDRADE, R. F. S. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, [Valparaiso], v. 47, p. 51-58, 2020.
- GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, [Tokyo], v. 46, p. 119-126, 2005.
- GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 3-7, 2017.
- GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUCHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, [Londres], v.38, n.11, p. 1599-1616, 2003.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, [Lancaster], v. 67, p. 597-607, 1975.
- HELSELTINE, C.W; ELLIS.J.J. The genus Absidia: Gongronella and cylindrical-spored

species of *Absidia*. **Mycologia**, [Lancaster], v. 56, n. 1, p. 568-601, 1964.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H. T.; LUTZONI, F.; MATHENY, B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERSI, J. A.; VILGALYS, R.; AIM, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUSI, P. W.; DAI, Y.; GAMSI, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KOLJALGZ, U.; KURTZMAN, P.; LARSSON, K.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLE, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGER, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHUßLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, [Cambridge], v. 3, p. 509-547, 2007.

HOFFMANN, K.; PAWLOWSKA, J.; WALTHER, G.; WRZOSEK, M.; HOOG, G.S.; BENNY, G.L.; KIRK, P. M.; VOIGT, K. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia**, [Leiden], v. 30, p. 57-76, 2013.

HUANG, G.; ZHOU, H.; TANG, Z.; LIU, H.; CAO, Y.; QÍAO, D.; CAO, Y. Novel Fungal Lipids for the Production of Biodiesel Resources by *Mucor fragilis* AFT7-4. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [Hoboken], v. 35, n. 6, p. 1-9, 2016.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**. Wallingford: CABI, 2008.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.M.; HEIS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, D. X.; CORDEIRO, T. R. L.; SOUZA, C. A. F.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SOUZA-MOTTA, C. M. Diversity of basal fungal order Mucorales (Mucoromycota) in a remaining area of the Brazilian Atlantic Rainforest. **Nova Hedwigia**, [Weinheim], v. 107, n. 3-4, p. 459-471, 2018.

LIMA, D. X.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SOUZA-MOTTA, C. M. Diversity of Mucorales in natural and degraded semi-arid soil. **Brazilian Journal of Botany**, [São Paulo], v. [39], n. [4], p. 1127-1133, 2015.

MARQUES, N. S. A. A.; SILVA, T. A. L. S.; ANDRADE, R. F. S.; JÚNIOR, J. F. B.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C. Lipopeptide biosurfactant produced by *Mucor circinelloides* UCP/WFCC 0001 applied in the removal of crude oil and engine oil from soil. **Acta Scientiarum**, [Marangá], v. 41, p. 1-9, 2019.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MUKUNDA, S.; ONKARAPPA, R; PRASHITH, K . T. R. Isolation and Screening of Industrially Important Fungi from the Soils of Western Ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. **Science Technology and Arts Research Journal**, [Nekemte], v. 1, n. 4, p. 27-32, 2012.

NGUYEN, T. T. T.; PARK, S. W.; PANGGING, M.; LEE, H. B. Molecular and morphological confirmation of three undescribed species of *Mortierella* from Korea. **Mycobiology**, [Coreia], v. 47, n. 1, 2019.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, [Londres], v. 95, p. 49-54, 2013.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, [Taibah], v. 8, p. 90-97, 2014.

SANTIAGO, A. L. C. M. A. **Mucorales**. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: [http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=1&familia=null&ordem=null&genero=Rhizopus&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODO&origem=TODO&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODO&mostrarAte=SUBESP\\_VAR&opcoesBusca=TODO\\_OS\\_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica](http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=1&familia=null&ordem=null&genero=Rhizopus&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODO&origem=TODO&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODO&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODO_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica) Acesso em: 03 ago. 2020.

SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SANTOS, P. J. P.; MAIA, L. C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 44, n. 1, p. 299-305, 2013.

SANTIAGO, A.L.C.M.A.; SOUZA-MOTTA, C.M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botânica Brasileira**, [São Paulo], v. 20, p.641-647, 2006.

SATARI, B.; KARIMI, K. Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [Berlin], v. 15, p. 1-21, 2017.

SCHIPPER, M. A. A.; STALPERS, J.A. A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rhizopus microsporus*-group. **Studies in Mycology**, [Baarn], v. 25, p. 20-34, 1984.



- SCHIPPER, M.A., STALPERS, J.A. Spore ornamentation and species concept in *Syncephalastrum*. **Persoonia**, [Leiden], v. 12, p. 81–85, 1983.
- SCHIPPER, M.A.A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Studies in Mycology**, [Baarn], v. 17, p. 1–9, 1978.
- SCHIPPER, M.A.A. A revision of the genus *Rhizopus* I. The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in Mycology**, [Baarn], v. 25, p. 1–34, 1984.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Mucorales (Zygomycotina) da Mata Atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. **Acta Botânica Brasílica**, [São Paulo], v. 11, n. 1. p. 95-101. 1997.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I.; TRUFEM, S. F. B.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; GRANDI, R. A. P.; SANTOS, M. L.; GIUSTRA, K. C. Microscopic fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 37, p. 267-275, 2006.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; TRUFEM, S. F. B.; MALATINSKY, S. M. M.; NINOMIYA, A.; ANTUNES, M. F. R. Mucorales (Zygomycotina) from soil affected by excremento of birds in the “Parque Estadual das Fontes do Impiranga”, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 19, n. 1, 1996.
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTA, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech**, [Berlin], v. 6, n. 174, p. 1-15, 2016.
- SOUZA, A. F.; GALINDO, H. M.; LIMA, M. A. B.; RIBEAUX, D. R.; RODRÍGUEZ, D. M.; ANDRADE, R. F. S.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biotechnological Strategies for Chitosan Production by Mucoralean Strains and Dimorphism Using Renewable Substrates. **International Journal of Molecular Sciences**, [Basel], v. 21, p. 2-15, 2020.
- SOUZA, J. I.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; OLIVEIRA, L. H. S. Selected species of Mucorales from soil contaminated with toxic metals in São Paulo State, Brazil. **Mycotaxon**, [Ithaca], v. 106, p. 273-288, 2008.
- SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C., FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X.F., JUNIOR, A. P., MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.
- TANAKA, Y.; AKI, T.; HIDAKA, Y.; FURUYA, Y.; KAWAMOTO, S.; SHIGETA, S.; ONO, K.; SUZUKI, O. Purification and Characterization of a Novel Fungal  $\alpha$ -Glucosidase from *Mortierella alliacea* with High Starch-hydrolytic Activity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [Tokyo], v. 66, n. 11, p. 2415-2423, 2002.

THOMPSON, D. P.; ERIBO, B. E. Extracellular enzyme production by *Rhizopus* and *Mucor* species on solid media. **Canadian Journal of Microbiology**, [Ottawa], v. 30, p. 126-128, 1984.

TRUFEM, S.F.B.; VIRIATO, A. Mucorales do Estado de São Paulo. 6. Mucoraceae coprófilas. **Rickia**, [São Paulo], v. 12, p. 113–123, 1985.

UPADHWAY, H.P. Soil fungi from North-east and North-Brazil – VIII. **Persoonia**, [Leiden], v. 6, p. 111-117, 1970.





UPADHWAY, H.P. Soil fungi from North-East Brazil. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, [Haia], v. 30, n. 2, p. 276-286, 1965.

WARCUP, J.H. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. **Nature**, [Reino Unido], v. 166, n. 4211, p. 117-118. 1950.





WIJAYAWARDENE, N. N.; HYDE, K. D.; AL-ANI, L. K. T.; TEDERSOO, L.; HAELEWATERS, D.; RAJESHKUMAR, K. C.; ZHAO, R. L.; APTROOT, A.; LEONTYEV, D. V.; SAXENA, R. K.; TOKAREV, Y. S.; DAI, D. Q.; LETCHER, P. M.; STEPHENSON, S. L.; ERTZ, D.; LUMBSCH, H.T.; KUKWA, M.; ISSI, I.V.; MADRID, H.; PHILLIPS, A. J. L.; SELBMANN, L.; PFLIEGLER, W. P.; HORVÁTH, E.; BENSCH, K.; KIRK, P. M.; KOLAŘÍKOVÁ, K.; RAJA, H. A.; RADEK, R.; PAPP, V.; DIMA, V.; MA, J.; MALOSSO, E.; TAKAMATSU, S.; RAMBOLD, G.; GANNIBAL, P. B.; TRIEBEL, D.; GAUTAM, A. K.; AVASTHI, S.; SUETRONG, S.; TIMDAL, E.; FRYAR, S.C.; DELGADO, G.; RÉBLOVÁ, M.; DOILOM, M.; DOLATABADI, S.; PAWŁOWSKA, J. Z.; HUMBER, R. A.; KODSUEB, R.; SÁNCHEZ-CASTRO, I.; GOTO, B. T.; SILVA, D. K. A.; SOUZA, F. A.; OEHL, F.; SILVA G. A.; SILVA, I. R.; BŁASZKOWSKI, J.; JOBIM, K.; MAIA, L. C.; BARBOSA, F. R.; FIUZA, P. O.; DIVAKAR, P. K.; SHENOY, B. D.; CASTAÑEDA-RUIZ, R. F.; SOMRITHIPOL, S.; LATEEF, A. A.; KARUNARATHNA, S. C.; TIBPROMMA, S.; MORTIMER, P. E.; WANASINGHE, D. N.; PHOOKAMSAK, R.; XU, J.; WANG, Y.; TIAN, F.; ALVARADO, P.; LI, D. W.; KUŠAN, I.; MATOČEC, N.; MEŠIĆ, A.; TKALČEC, Z.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; PAPIZADEH, M.; HEREDIA, G.; WARTCHOW, F.; BAKHSHI, M. B.; OEHM, E.; YOUSSEF, N.; HUSTAD, V. P.; LAWREY, J. D.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; FIRMINO, A. L.; TIAN, Q.; HOUBRAKEN, J.; HONGSANAN, S.; TANAKA, K.; DISSANAYAKE, A. J.; MONTEIRO, J. S.; GROSSART, H. P.; SUIJA, A.; WEERAKOON, G.; ETAYO, J.; TSURYKAU, A.; VÁZQUEZ, V.; MUNGAI, P.; DAMM, U.; LI, Q.R.; ZHANG, H.; BOONMEE, S.; LU, Y. Z.; BECERRA, A. G.; KENDRICK, B.; BREARLEY, F. Q.; MOTIEJŪNAITĖ, J.; SHARMA, B.; KHARE, R.; GAIKWAD, S.; WIJESUNDARA, D. S. A.; TANG, L. Z.; HE, M. Q.; FLAKUS, A.; RODRIGUEZ-FLAKUS, P.; ZHURBENKO, M. P.; MCKENZIE, E. H. C.; STADLER, M.; BHAT, D. J.; LIU, J. K.; RAZA, M.; JEEWON, R.; NASSONOVA, E. S.; PRIETO, M.; JAYALAL, R. G. U.; ERDOĞDU, M.; YURKOV, A.; SCHNITTLER, M.; SHCHEPIN, O. N.; NOVOZHILOV, Y. K.; SILVA-FILHO, A. G. S.; GENTEKAKI, E.; LIU, P.; CAVENDER, J. C.; KANG, Y.; MOHAMMAD, S.; ZHANG, L. F.; XU, R. F.; LI, Y. M.; DAYARATHNE, M. C.; EKANAYAKA, A. H.; WEN, T. C.; DENG, C. Y.;

PEREIRA, O. L.; NAVATHE, S.; HAWKSWORTH, D. L.; FAN, X. L.; DISSANAYAKE, L. S.; KUHNERT, E.; GROSSART, H. P.; THINES, M. Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, [Chiang Rai], v. 11, n. 1, p. 1060-1456, 2020.

ZHENG, Y.Y., CHEN, G.Q. A monograph of *Cunninghamella*. **Mycotaxon**, [Ithaca], v. 80, p. 1–75, 2001.

 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
 [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)  
 @atenaeditora  
 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](http://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

# Fungos do ar e solo: do isolamento à detecção enzimática

 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
 [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)  
 @atenaeditora  
 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](http://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

# Fungos do ar e solo: do isolamento à detecção enzimática