

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
JARDIM DE FUNGOS DA FORMIGA *Atta robusta* BORGMEIER
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

PATRÍCIA LIMA ALVES
Bacharel em Biologia

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2016

PATRÍCIA LIMA ALVES

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
JARDIM DE FUNGOS DA FORMIGA *Atta robusta* BORGMEIER
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, como parte das
exigências do Curso de Graduação de
Bacharelado em Biologia, para obtenção
do título de Bacharel em Biologia.

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2016

PATRÍCIA LIMA ALVES

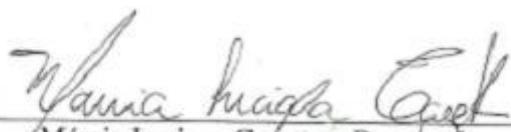
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE JARDIM DE FUNGOS DA FORMIGA *Atta robusta* BORGMEIER (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte das exigências do Curso de Graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Aprovado: 08, Julho de 2016


Norma Suely Evangelista Barreto
Doutorado
UFRB


Liliâne Andrade Sande da Silva
Mestrado
UFRB


Márcia Luciana Cazetta – Doutorado
Orientador
UFRB

*Dedico este trabalho aos meus pais
Amilton e Irandi, aos meus irmãos Thiago e
Rafael, pelo amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, pela força, pelo sustento, por estar presente em cada segundo da minha vida, sem Ele nada seria possível.

A minha orientadora, Prof^a Márcia Luciana Cazetta, pelos três anos de orientação com muita paciência, incentivo e ajuda, disponibilizando seus conhecimentos.

Aos colegas de laboratório: Juli, Camila, Liliane, Thiara, Carine, Tiago Freitas e Tiago Felipe, por tornar cada dia de trabalho mais prazeroso e animado.

Aos meus colegas de curso, em especial Malu, Rosi e Paulinho, pelo companheirismo e por compartilhar os momentos de alegrias e os difíceis também.

As técnicas, em especial Lene e Carol, pela disponibilidade e auxílio.

Aos meus pais pelo amor, cuidado, atenção, incentivo, sempre presentes em todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos Thiago e Rafael, pelo cuidado, amizade, companheirismo e pela força.

Ao meu namorado Victor, pela paciência e amor.

Aos mestres do Curso de Bacharelado em Biologia, pelo aprendizado.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Estrutura química dos corantes tipo Azo: Alaranjado G, Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5.....6
- Figura 2.** Estrutura química do corante Remazol Brilhante Azul.....7
- Figura 3.** Jardim de fungo em ninho de formiga.....8

Capítulo 1

- Figura 1.** Produção de enzimas pelos isolados do Jardim de fungos da formiga *Atta robusta*.....22
- Figura 2.** Crescimento de isolados no meio com inulina (esquerda), comparando com o controle positivo (direita).....25
- Figura 3.** Formação de halo azul indicando produção de composto amilóide nos isolados dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*.....26

Capítulo 2

- Figura 1.** Estrutura química dos corantes tipo Azo: Alaranjado G, Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5.....36
- Figura 2.** Estrutura química do corante Remazol Brilhante Azul.....37
- Figura 3.** Taxa de descoloração (%) nos quatro tipos de corante, pela *Hyphopichia heimii* isolada de jardins de fungo da formiga *Atta robusta*.....40
- Figura 4.** Coloração dos corantes Preto Reativo 5, Remazol Brilhante Azul, Alaranjado G e Remazol Brilhante Violeta antes do processo de descoloração (acima) e depois do processo (abaixo), pela *Hyphopichia heimii* isolada de jardins de fungo da formiga *Atta robusta*.....41
- Figura 5.** Crescimento celular (D.O) por hora nos quatro tipos de corantes, pela *Hyphopichia heimii* isolada de jardins de fungo da formiga *Atta robusta*.....42
- Figura 6.** Valor do pH por hora dos quatro tipos de corante, pela *Hyphopichia heimii* isolada de jardins de fungo da formiga *Atta robusta*.....43

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Escala de produção de enzimas.....	20
Tabela 2. Medidas dos halos de hidrólise para produção de celulase, por leveduras isoladas de jardins de fungos da formiga <i>Atta robusta</i>	23
Tabela 3. Medida dos halos de hidrólise para enzima amilase, por leveduras isoladas de jardins de fungos da formiga <i>Atta robusta</i>	24
Tabela 4. Osmotolerância, crescimento com etanol e produção da enzima inulinase por isolados dos jardins de fungos da formiga <i>Atta robusta</i>	28

Capítulo 2

Tabela 1. Taxa de germinação (%) do corante Remazol Brilhante Violeta.....	44
Tabela 2. Taxa de germinação do corante Preto Reativo 5.....	45
Tabela 3. Comprimento médio da radícula utilizando corante Remazol Brilhante Violeta....	46
Tabela 4. Comprimento médio da radícula utilizando corante Preto Reativo 5.....	46

RESUMO

LIMA ALVES, PATRÍCIA, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Julho de 2016. Potencial biotecnológico de leveduras isoladas de jardim de fungos da formiga *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). Orientador: Márcia Luciana Cazetta.

Enzimas de origem microbiana são importantes catalisadores, que apresentam grande potencial industrial e biotecnológico. A produção de enzimas, especialmente amilases, proteases e celulases é crescente, pois estas são usadas como ferramentas biotecnológicas nos mais variados setores industriais. Algumas espécies de leveduras também possuem capacidade de sobreviver em condições com variadas concentrações de compostos como sal, pH e temperatura, o que favorece sua aplicação em diversos setores industriais como descoloração de corantes têxteis e produção de biocombustíveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de produção de enzimas de interesse industrial, bem como de descoloração das leveduras isoladas dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*. Esta espécie de formiga cortadeira é endêmica das regiões de restinga localizadas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, as quais estão sofrendo forte ação antropogênica e tendo seu habitat seriamente ameaçado. No capítulo 1, foi estudada a produção de enzimas por 78 leveduras que cresceram em meios com 1% da fonte de carbono e proteína. Após o crescimento foi adicionado solução corante para visualizar formação de halos de hidrólise: lugol para amilase e Vermelho Congo para celulase; para a protease foi observado halo transparente ao redor da colônia. Para inulinase foi analisado o crescimento em inulina e comparado com os controles positivos e negativos. Também foram realizados testes de tolerância osmofílica em meios contendo 50% de glicose e meio com 10% de NaCl, além de testes para assimilação de etanol, produção de compostos amiloides e de termotolerância em temperaturas de 35, 37, 40, 42 e 45°C. Como resultado, 32% produziram enzima amilase, 5% produziram a enzima protease, 39% produziram a enzima celulase, 58% dos isolados mostram-se capazes de produzir a enzima inulinase. Para os testes de tolerância osmofílica, o crescimento foi considerado moderado, para assimilação de etanol os isolados mostraram-se aptos para o crescimento; apenas 9 isolados foram produtores extracelular de compostos amiloides e 4 isolados apresentaram crescimento na temperatura de 35 °C. No capítulo 2, foram realizados testes de descoloração utilizando os corantes Alaranjado G, Remazol Brilhante Azul, Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5. Para testar a toxicidade dos metabólitos produzidos após a descoloração foram realizados testes de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e calculadas as taxas de germinação (TG%) e de inibição do crescimento radicular (TICR). A *H. heimii* apresentou boa descoloração nas primeiras 24 horas, tanto para os corantes Remazol Brilhante Violeta quanto para Preto Reativo 5, atingindo 94,5% e 97,3% de taxa de descoloração, respectivamente, e para os corantes Alaranjado G e Remazol Brilhante Azul, as taxas de descoloração foram baixas atingindo, no máximo, 25,8% e 42,1%, respectivamente. De acordo com os resultados das TG e TICR dos testes de fitotoxicidade, os sobrenadantes de ambos os corantes Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5, de um modo geral, apresentaram-se menos tóxicos do que o corante original. Os isolados do jardim de fungos da formiga *Atta robusta* apresentaram bom potencial para produção de enzimas e utilização em processos de descoloração.

Palavras-chave: Fungos, enzimas, biorremediação.

ABSTRACT

LIMA ALVES, PATRÍCIA, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, July de 2016. Biotechnological potential of yeasts isolated from fungus garden of the ant *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). Advisor: Márcia Luciana Cazetta.

Enzymes microbial are important catalysts, which have large industrial and biotechnological potential. The production of enzymes, especially amylases, proteases and cellulases is increasing, as these are used as biotechnological tools in various industrial sectors. Some species of yeast also have ability to survive in conditions with varying concentrations of compounds such as salt, pH and temperature, which favors their application in many industrial sectors as bleaching textile dyes and biofuels. The objective of this work was to study the production capacity of enzymes of industrial interest, as well as discoloration of yeasts isolated from fungus gardens robust *Atta* ant. This kind of cutting ant is endemic of restinga areas in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, which are suffering strong anthropogenic action and having their seriously threatened habitat. In Chapter 1, the enzyme production by 78 yeast grown in media with 1% carbon source and protein was studied. After the growth was added dye to visualize the formation of halos of hydrolysis: lugol for amylase and cellulase for congo red; for the protease was observed transparent halo around the colony. For inulinase was analyzed growth in inulin and compared with the positive and negative controls. Also osmophilic tolerance tests were performed in media containing 50% glucose and medium with 10% NaCl, and tests for assimilation ethanol production amyloid compounds and thermotolerance at temperatures of 35, 37, 40, 42 and 45°C. As a result, 32% produced amylase, 5% produced the enzyme protease, cellulase produced 39% enzyme, 58% of the isolates are shown capable of producing the enzyme inulinase. For the osmophilic tolerance testing, it was considered moderate growth for the ethanol uptake isolates were able to grow only 9 isolates are extracellular amyloid producing compounds and 4 isolates grew in the 35 ° C temperature. In chapter 2, was performed destaining, industrial dyes tests, dye Orange G were used, Remazol Brilliant Blue, Remazol Brilliant Violet and Black Reactive 5 and realized phytotoxicity tests using lettuce seeds (*Lactuca sativa*) and calculating germination rate (GR %) and inhibition of root growth rate (IRGR). The *H. heimii* showed good decolorization within 24 hours for both dyes Remazol Brilliant Violet and for Reactive Black 5, reaching 94.5% and 97.3% discoloration rate, respectively, and for the dye Orange G, Remazol Brilliant Blue, discoloration rates were low, reaching a maximum of 25.8% and 42.1%, respectively. According to the results of TG and TIGR of the phytotoxicity test, supernatants from both Remazol Brilliant Violet dyes and Reactive Black 5, in general, presented less toxic those original dyes. Isolated from ant fungus garden *Atta robusta* showed good potential for enzyme production and use in bleaching processes.

Key-words: Fungi, enzymes, biorremediation.

ÍNDICE

Introdução Geral	1
Revisão Bibliográfica	3
Referências	9
Capítulo 1	
Avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas de jardim de fungos da formiga <i>Atta robusta</i> Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae)	14
Resumo	15
Abstract	16
Introdução	17
Objetivo	18
Material e Métodos	18
Resultados e Discussão	21
Conclusão	29
Referências	30
Capítulo 2	
Descoloração de corantes industriais por levedura isolada de jardins de fungos da formiga <i>Atta robusta</i> Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae).....	32
Resumo	33
Abstract	33
Introdução	34
Material e Métodos	38
Resultados e Discussão	39
Conclusão	47
Referências	47
Conclusão geral	53

INTRODUÇÃO GERAL

Leveduras são importantes fontes de compostos de interesse biotecnológico como pigmentos, biocombustíveis, enzimas, entre outros, produzidos por meio de processos fermentativos (MALAJOVICH, 2012).

Dentre os compostos de maior interesse estão às enzimas, que são proteínas que realizam atividades catalíticas essenciais para os sistemas vivos e que mantêm sua função mesmo quando removidos das células (LEHNINGER, 2006).

As enzimas apresentam características que as tornam altamente desejáveis como catalisadores do ponto de vista industrial (ORLANDELLI et al., 2012). São importantes para a biotecnologia industrial e no uso direto de bioprocessos, visto que sua produção e utilização causam redução no custo final e produção de compostos indesejáveis (MENDES et al., 2011).

A produção de enzimas, como: amilase, protease, celulase e inulinase, é crescente, pois estas são usadas como ferramentas biotecnológicas nas indústrias, em setores alimentícios, farmacêuticos, na síntese orgânica, entre outras aplicações (GOMES et al., 2007).

Algumas espécies de leveduras, assim como outros microrganismos, apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes, desfavoráveis como pH ácido, temperaturas elevadas, alta concentração de sal e açúcar, que outras formas de vida não conseguiriam se adaptar (SANTOS; LAMOSAS; COSTA, 2001).

As que possuem capacidade osmo- e termotolerantes são ideais para aplicação em processos de biorremediação, no qual são utilizados microrganismos para diminuir a quantidade de poluentes presentes no ambiente (YAKUBU, 2007). Nas indústrias têxteis, ocorre com frequência a liberação de corantes no meio ambiente, acarretando a poluição do ambiente, especialmente mananciais de água doce. Com o uso da biorremediação, corantes poluentes podem ser removidos recuperando o local total ou parcialmente (CAMARGO et al., 2007).

As leveduras apresentam um arsenal metabólico que possibilita sua colonização nos mais variados ambientes. Assim, é descrito o isolamento de leveduras de interesse biotecnológicos a partir de plantas, solo, água doce e salgada, bem como de insetos, como formigas. Estes últimos são bons vetores de dispersão das leveduras pelo ambiente. Vários trabalhos da literatura descrevem o isolamento de leveduras de ninhos

de formigas, uma vez que elas estabeleceram uma relação simbiótica com os microrganismos.

A formiga *Atta robusta* é uma espécie de formiga cortadeira, caracterizada por realizar interações simbióticas com microrganismos que são abrigados em seus ninhos. Elas são encontradas no Brasil na região de restinga dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (TEIXEIRA; SHOEREDER; MAYÉR-NUNES, 2003; TEIXEIRA; SHOEREDER; LOUZADA e 2004).

Os microrganismos isolados do jardim de fungos da *Atta robusta* nunca foram estudados. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial biotecnológico das leveduras isoladas desse ambiente.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Leveduras são fungos unicelulares, apresentam parede celular com predominância de carboidratos e sua reprodução ocorre principalmente por brotamento onde, a partir de uma célula mãe, diminutas protuberâncias, denominadas brotos, são produzidas (RAVEN; EVERT; EICHLORN, 2007).

Existem cerca de 80 gêneros com 600 espécies de leveduras identificadas (RAVEN; EVERT; EICHLORN, 2007). Embora classicamente estudadas como um grupo único, as leveduras são divididas entre dois filos: Ascomycota e Basidiomycota, sendo estes unificados pela predominante fase de crescimento unicelular (FELL et al., 2000; ALMEIDA, 2005). São classificados dessa forma pela diferença em suas estruturas reprodutivas, sendo por meio de ascos para Ascomycota e basídios para os Basidiomycota.

Os filos podem se diferenciar macroscopicamente, com base na pigmentação da colônia. Um grupo inclui espécies com colônias de cor de rosa, salmão ou avermelhadas e, com a exceção de alguns poucos casos, a grande maioria pertence ao filo Basidiomycota. O outro grupo inclui espécies que formam colônias brancas ou de cor creme, e seus membros são classificados tanto no filo Ascomycota como Basidiomycota (SAMPAIO et al., 2001).

As leveduras estão extensamente distribuídas na natureza, estando presente em diferentes ambientes, seja terrestre, aquático ou aéreo (TORTORA; FUNKE, CASE, 2005). Dependendo do tipo de substrato onde ocorre o seu crescimento, diferentes espécies ou grupos de leveduras possuem habitats especializados, que podem ser influenciados, por exemplo, pela concentração de nutrientes disponíveis (MORAIS; ROSA, 2000).

Devido à sua vasta diversidade, estes microrganismos são importantes fontes de compostos de interesse biotecnológico como pigmentos, biocombustíveis, enzimas, entre outros, produzidos por meio de processos fermentativos (MALAJOVICH, 2012).

Dentre os compostos de maior interesse estão às enzimas, que são proteínas que realizam atividades catalíticas essenciais para os sistemas vivos e que mantêm sua função mesmo quando removidos das células (LEHNINGER, 2006). São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação,

o que às tornam altamente desejáveis como catalisadores industriais (ORLANDELLI et al., 2012).

Enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalizam: hidrolases, oxirredutases, transferases, liases, ligases, isomerases (MALAJOVICH, 2012). O comportamento catalítico das enzimas as torna importantes para a biotecnologia industrial e no uso direto em bioprocessos, visto que sua produção e utilização causam redução no custo global. Além disso, devido à sua elevada especificidade, as enzimas reduzem a formação de compostos indesejáveis no final do processo, permitem a obtenção de produtos biodegradáveis, diminuindo a quantidade de resíduos e, conseqüentemente, problemas ambientais e tecnológicos (MENDES et al., 2011).

A produção de enzimas, especialmente amilases, proteases, celulasas e inulinase, é crescente, pois estas são usadas como ferramentas biotecnológicas nos mais variados setores industriais como na produção de xaropes e compostos aromatizantes, como aditivos de detergentes e sabões, na produção de fármacos, papel e celulose, na síntese orgânica, entre outras aplicações (GOMES et al., 2007).

A enzima inulinase é potencialmente útil na produção de frutose através da hidrólise de inulina, gerando xaropes com alto teor de frutose. A utilização da inulinase é muito vantajosa, pois obtém-se produtos com até 95% de frutose (MAZUTTI et al., 2006). Nos últimos anos, os microrganismos tem sido uma alternativa viável para produção dessa enzima, já que os vegetais, usados anteriormente como fonte dessa enzima, não oferecem quantidades suficientes para a exploração industrial (PESSONI et al., 2004). A *Kluyveromyces marxianus* é um exemplo de levedura muito utilizada na produção da enzima inulinase (FONSECA et al., 2008).

Produzida por plantas, animais e microrganismos, a amilase é uma enzima de grande importância industrial, se expandindo bastante nas áreas farmacêutica, médica e clínica, porém, pela eficiência e rapidez na produção por microrganismo, as indústrias preferem utilizar amilases microbianas (OLIVEIRA et al., 2007).

Apresentando capacidade lítica, a enzima protease é muito requerida pelas indústrias por ser uma forma barata, de fácil utilização e obtidos por microrganismos distribuídos na natureza (FLEURI; SATO, 2005). Porém, alguns microrganismos capazes de produzir esta enzima podem ser patogênicos, à medida que proteases degradam parede celular e pode causar antracnose em uma plantação de frutas tropicais, por exemplo (LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003).

A enzima celulase é capaz de hidrolisar celulose a glicose, sendo que a grande maioria de microrganismos que produzem essa enzima estão nos solos ou em raízes e resíduos de vegetais (RUEGGER;TAUK-TORNISIELO, 2004). A utilização desses microrganismos é crescente, pois são utilizados para degradação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de biocombustíveis, como o etanol celulósico (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011; SALES et al., 2010), além da utilização em indústrias têxtil, de alimento, bebidas, vinhos, de papel e celulose (UENOJO; PASTORE, 2007).

As leveduras, assim como outros microrganismos, apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes com quantidades fora do padrão, em fatores como pH, temperatura, concentração de sal e açúcar, que outras formas de vida não conseguiriam se adaptar (SANTOS; LAMOSA; COSTA, 2001).

A adaptação a termofilia é um fator de grande interesse para biotecnologia à medida que, leveduras que conseguem se proliferar em elevadas temperaturas, são importantes para utilização em bioprocessos (GOMES et al., 2007). Uma forma de utilizar leveduras osmo e termotolerantes é em processos de biorremediação, no qual são utilizados microrganismos para diminuir a quantidade de poluentes presentes no ambiente (YAKUBU, 2007). Esse processo ocorre com mais frequência em refinarias de petróleo, indústrias têxteis, de celulose, farmacêuticas, dentre outras, sendo os microrganismos nativos ou introduzidos ao ambiente (PEREIRA;FREITAS, 2012).

As indústrias têxteis utilizam muita água em seus processos, e com frequência liberam no ambiente resíduos sem o cuidado necessário, contendo corantes. Acarretando a poluição da área, impedindo a penetração dos raios solares, em efluentes, por exemplo, e diminuindo a taxa fotossintética dos vegetais aquáticos. Além de causar danos ao ser humano quando relacionado a cadeia alimentar, por se tratar de substâncias cancerígenas e altamente mutagênicas (SOUZA; ROSADO, 2009; PETERNEL; KOPRIVANAC, KUŠIĆ, 2006).

A maioria das indústrias utiliza corantes do tipo químico azo (CATANHO; MALPASS; MOTHEO, 2006). Estes são do grupo dos reativos, que apresentam alta solubilidade em água e estabelece uma forte ligação covalente entre o corante e a fibra, através de grupos amino, melhorando a fixação da cor ao tecido (GUARATINI; ZANONI, 2000). Os corantes Alaranjado G, Remazol Brilhante Violeta e o Preto Reativo 5, são exemplos de corantes do tipo azo (DE SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2005) (Figura 1).

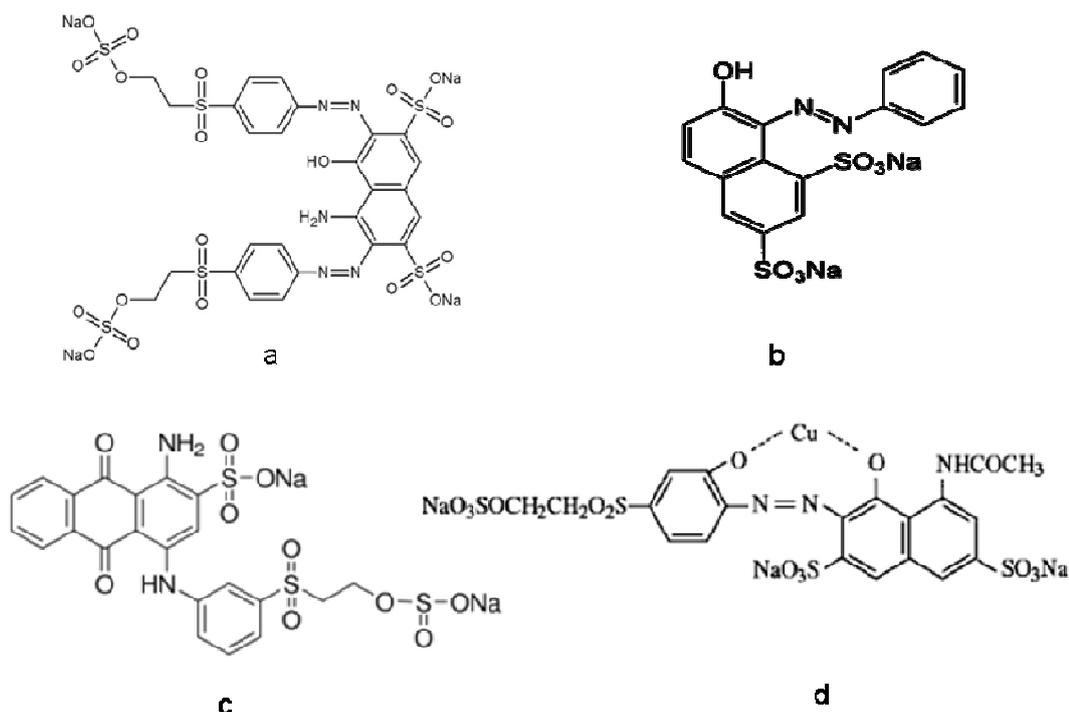


Figura 1. Estrutura química dos corantes: a) Preto Reativo 5; b) Alaranjado G; c) Remazol Brillhante Azul e d) Remazol Brillhante Violeta 5. Fontes: <http://www.sigmaaldrich.com>, ALEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004 e PINTO, 2010.

O Remazol Brillhante Azul R (RBBR) é um corante do tipo químico antraquinona, contendo em sua estrutura anéis aromáticos, que os tornam resistentes a oxidação química, além de serem altamente estabilizados por ressonância (SILVA; MONTEIRO, 2000; GUARATINI; ZANONI, 2000) (Figura 1).

A remoção desses corantes utilizados nas indústrias têxtil pode ocorrer de forma física, química ou biológica. Uma forma adequada e de baixo custo é utilizando microrganismos que sejam capazes de degradar esses compostos tóxicos, recuperando o local total ou parcialmente (CAMARGO et al., 2007).

A Formiga *Atta robusta*

Formigas cortadeiras realizam interações simbióticas com micro-organismos que são abrigados em seus ninhos. Elas transportam vegetais para o seu formigueiro e fungos simbiontes, por exemplo, utilizam o substrato vegetal para o seu crescimento, sendo utilizado posteriormente como alimento (BORBA et al., 2006). Nesses ninhos são encontradas câmaras subterrâneas, os jardins de fungos, que funcionam como um sistema, produzindo nutrientes de rápida e fácil assimilação pelas formigas (PINTO-TOMÁS et al., 2009) (Figura 2).



Figura 2. Jardim de fungo em ninho de formiga (Fonte: <http://formigasbrasil.blogspot.com.br>).

Atta robusta Borgmeier é uma espécie de formiga cortadeira endêmica, encontrada nas regiões de restinga, dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Embora, ainda existam ambiguidades em dados da literatura com relação a sua distribuição e escassez nos estudos entomológicos nesses ambientes, devido a barreiras físicas, elementos históricos e ecológicos, essa espécie é impossibilitada de se dispersar para outras regiões (TEIXEIRA; SHOEREDER; MAYÉR-NUNES, 2003; TEIXEIRA; SHOEREDER; LOUZADA e 2004).

A existência de uma diversidade de organismos nos ninhos de formigas, ocorre pela relação simbiótica existente entre eles, para tanto é frequente estudos relacionados com isolamento de microrganismo nesses locais.

Leveduras já foram isoladas de ninhos de diferentes espécies de formigas cortadeiras, como da *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2009), também das *Atta laevigata* e *Atta capiguara*, além de terem encontrado fungos em regiões do corpo desse inseto (PAGNOCCA et al., 2008). Pereira e Ueno (2008) também mostraram a capacidade de formigas manter associação com bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos em parte de seu corpo, mesmo em ambientes longe de seus ninhos, como em hospitais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.; ASSALIN, A. R.; ROSA, M. A., Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.. 27, n. 5, 818-824, 2004
- ALMEIDA, J. M. G. C. F de. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 53, p. 295–303, 2005.
- BORDA, R. DA S., et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, v.36, n.3, mai-jun, 2006.
- CAMARGO, A .T.; MONTANHEIRO, A. L.; GUNHA, M. L.; ARNDT, K.M., Biorremediação de compostos coloridos por microrganismos isolados de efluente de indústria de estampagem de tecidos, em Rio Claro, São Paulo, **SEB – Sociedade de Ecologia do Brasil**, 2007.
- CATANHO, M.;MALPASS, G. R. P. M.; MOTHEO, A. de J., Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis, **Química Nova**, v. 29, n. 5, 983-989, 2006.
- DE SOUZA, C. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P., Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 28, n. 2, 226-228, 2005.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H., Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, 871-879, 2005.
- FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, 1351–1371, 2000.
- FONSECA, G. G., et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n.3,339-54, 2008.
- GOMES, E., GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI M. V. B., Corantes têxteis, **Química Nova**, 2000.
- LEHNINGER, A.L., 1917-1986. **LEHNIGER Princípios de Bioquímica**. 4. Ed. São Paulo: SARVIER, 2006. p. 191-193.
- LIMA FILHO, R. M. L.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M., Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita, **Fitopatologia Brasileira**. v.28, n.6, nov - dez 2003.

MALAJOVICH, M.A., **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. Di. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, Issue 1, p. 56-59, 1 June 2006,

MENDES, A. A., et al., Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

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

OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S., CHAGAS-JÚNIOR, A. F., Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, 61-66, jan.-mar. 2007.

ORLANDELLI, R.C., et al., Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações, **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

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

PEREIRA, A. R., FREITAS, D. A. F., Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados, **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.6, n. 6, p. 975 – 1006, 2012.

PEREIRA, R. dos S.; UENO, M., Formigas como veiculadoras de microrganismos em ambiente hospitalar, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.41, n.5, 492-495, set-out, 2008.

PESSONI, R. A. B.; OLMEDO, P. M. O.; CLEMENTE FILHA, A. C.; Rita C. L. FIGUEIREDO-RIBEIRO, Produção de concentrados de frutose por inulinasas de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.3, 373-377, jul.-set. 2004.

PETERNEL, I.; KOPRIVANAC, N.; KUŠIĆ, H. UV-based processes for reactive azo dye mineralization. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 525-532, 2006

PINTO, T. F. **Absorção de corantes têxtil (Remazol Brilhante 5R Violeta) por serragem de madeira modificada com anidrido succínico**, Tese de Mestrado (Química), Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2010.

PINTO-TOMÁS, A.A. et. al., Symbiotic nitrogen fixation in the fungus-garden of leaf-cutter ants. **Science**, v. 326, November, 20, p.1120-1123, 2009.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHLORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 7^oed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, p. 830, 2007.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI JÚNIOR, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, out. 2009.

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

RODRIGUÉZ, J. P. G., **Identificação dos compostos produzidos na degradação do corante Remazol Brillhante Blue R (RBBR) pela ação do fungo do ambiente marinho *Tinctoporellus sp.***, Tese de mestrado (Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

RUEGGER, M. J.S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M., Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil, **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.

SALES, M. R., et al., Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1290-1296, nov. 2010.

SAMPAIO, J. P., GADANHO, M., SANTOS, S., DUARTE, F. L., PAIS, C., FONSECA, Á., FELL, J. W.. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporeidium*: *Rhodosporeidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 687-697, 2001.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M. Extremófilos: Micro-organismos à prova de Agressões Ambientais Extremas. **Biocombustíveis Microbianos: Boletim de Biotecnologia**. n. 2, 2001.

SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R., Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 24:669-674, 2000.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R., Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis, **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009.

TEIXEIRA, M.C., SHOEREDER, J.H., MAYÉR-NUNES, A.J., Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**. v. 32, n. 4:719-721, 2003.

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

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

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

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil, **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, Dec. 2007.

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE JARDIM DE FUNGOS DA FORMIGA *Atta robusta* BORGMEIER (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO Enzimas de origem microbiana são importantes catalisadores, que apresentam grande potencial industrial e biotecnológico. A produção de enzimas microbianas é crescente, pois estas são usadas como ferramentas biotecnológicas nos mais variados setores industriais como na produção de xaropes e compostos aromatizantes, aditivos de detergentes e sabões, produção de fármacos, papel e celulose, entre outras. O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de produção das enzimas, amilase, protease, celulase e inulinase pelas leveduras isoladas dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*, que é uma formiga cortadeira endêmica, cujo habitat são as regiões de restinga localizadas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. As leveduras cresceram em meio específico para cada enzima contendo 1% da fonte de carbono como amido, caseína, celulose e inulina. Após o crescimento foi adicionado solução corante para visualizar formação de halos de hidrólise, quando necessário. Para inulinase foi analisado o crescimento em inulina e comparou-se com os controles positivos e negativos. Também foram feitos testes de tolerância osmofílica em meios contendo 50% de glicose e meio com 10% de NaCl e 5% de glicose, além de testes para assimilação de etanol e produção de compostos amiloides. Como resultado, dentre os 78 isolados, 32% produziram enzima amilase, 5% produziram a enzima protease, 39% produziram a enzima celulase, 58% dos isolados mostram-se capazes de produzir a enzima inulinase. Para os testes de tolerância osmofílica, o crescimento foi considerado moderado e para assimilação de etanol 85% dos isolados apresentaram crescimento. Apenas 9 isolados são produtores extracelular de compostos amiloides.

Palavras chave: Leveduras, enzimas, *Atta robusta*.

ABSTRACT Enzymes microbial are important catalysts, which have large industrial and biotechnological potential. The production of microbial enzymes is increasing, as these are used as biotechnological tools in various industrial sectors such as the production of syrups and flavoring compounds such as detergents and soaps additives in pharmaceutical production, paper and cellulose, and others. The aim of this study was to evaluate the ability of production of enzymes, amylase, protease, cellulase and inulinase by yeasts isolated from the gardens of fungi *Atta robusta* ant, which is an endemic cutting ant, whose habitat is the sandbank regions in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo. Yeasts grown in specific means for each 1% of carbon as starch, casein, carboxymethylcellulose and inulin. After the growth was added dye to visualize the formation of halos of hydrolysis, when necessary. For inulinase was analyzed growth in inulin and compared with the positive and negative controls. They were also made osmophilic tolerance tests in media containing 50% glucose and medium with 10% NaCl plus 5% glucose, and tests for assimilation and ethanol and production amyloid compounds. As a result, among the 78 isolates, 32% produced amylase, 5% produced the enzyme protease, 39% produced cellulase and 58% of the isolates are shown capable of producing enzyme inulinase. For the osmophilic tolerance testing, it was considered moderate growth and 85% of isolated were able to uptake ethanol uptake as substrate. Amyloid compounds was produced by 9 isolates.

Key-words: Yeasts, enzymes, *Atta robusta*.

INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos unicelulares, apresentam parede celular com predominância de carboidratos. Devido à sua vasta diversidade, estes micro-organismos são importantes fontes de compostos de interesse biotecnológico como pigmentos, biocombustíveis, enzimas, entre outros, produzidos por meio de processos fermentativos (MALAJOVICH, 2012).

Dentre os compostos de maior interesse estão às enzimas, que são proteínas que realizam atividades catalíticas essenciais para os sistemas vivos e que mantêm sua função mesmo quando removidos das células (LEHNINGER, 2006). São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que as torna altamente desejáveis como catalisadores industriais (ORLANDELLI et al., 2012).

Este comportamento das enzimas as torna importantes para a biotecnologia industrial e no uso direto em bioprocessos, visto que sua produção e utilização causam redução no custo global. Além disso, devido à sua elevada especificidade, as enzimas reduzem a formação de compostos indesejáveis no final do processo, permitem a obtenção de produtos biodegradáveis, diminuindo a quantidade de resíduos e, conseqüentemente, problemas ambientais e tecnológicos (MENDES et al., 2011).

A produção de enzimas, especialmente amilases, proteases e celulasas, é crescente, pois estas são usadas como ferramentas biotecnológicas nos mais variados setores industriais como na produção de xaropes e compostos aromatizantes, como aditivos de detergentes e sabões, na produção de fármacos, papel e celulose, na síntese orgânica, entre outras aplicações (GOMES et al., 2007).

A Formiga *Atta robusta*

Formigas cortadeiras realizam interações simbióticas com micro-organismos que são abrigados em seus ninhos. Elas transportam vegetais para o seu formigueiro e fungos simbiotes, por exemplo, utilizam o substrato vegetal para o seu crescimento, sendo utilizado posteriormente como alimento (BORBA et al., 2006). Nesses ninhos são encontradas câmaras subterrâneas, os jardins de fungos, que funcionam como um sistema, produzindo nutrientes de rápida e fácil assimilação pelas formigas (PINTO-

TOMÁS et al., 2009).

Atta robusta Borgmeier é uma espécie de formiga cortadeira endêmica, encontrada nas regiões de restinga, dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Embora, ainda existam ambiguidades em dados da literatura com relação a sua distribuição e escassez nos estudos entomológicos nesses ambientes, devido a barreiras físicas, elementos históricos e ecológicos, essa espécie é impossibilitada de se dispersar para outras regiões (TEIXEIRA; SHOEREDER; MAYÉR-NUNES, 2003; TEIXEIRA; SHOEREDER; LOUZADA e 2004).

Os microrganismos do jardim de fungos da espécie *Atta robusta* nunca foram estudados. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as enzimas produzidas pelas leveduras isoladas deste ambiente, especialmente amilase, protease, celulase e inulinase, além da capacidade de tolerância osmofílica e ao etanol.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliação do potencial enzimático de leveduras isoladas do jardim de fungos da formiga *Atta robusta*.

Objetivos específicos:

- Estudar o potencial enzimático de leveduras quanto à produção das enzimas amilase, protease, celulase e inulinase em meio sólido;
- Estudar o potencial osmotolerantes das leveduras;
- Estudar a capacidade de assimilação do etanol pelos isolados;
- Selecionar leveduras termotolerantes isoladas desse ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos

Foram utilizados 78 leveduras, isoladas dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*, na região de restinga do município de Aracruz, ES e fazem parte da coleção de leveduras do Laboratório de Bioquímica do Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada (NEMA/ CCAAB).

Estudo da produção de diferentes enzimas pelos isolados

Para a produção das enzimas celulase, amilase e protease as leveduras, foram plaqueadas com o auxílio da alça de inoculação em meio YP (extrato de levedura 1%, peptona 2% e ágar 1,5%) contendo 1% de carboximetilcelulose e amido como únicas fontes de carbono e leite em pó como fonte de proteína, respectivamente, em triplicata.

Atividade Amilolítica – A capacidade de degradar amido é usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Após 5 dias, a temperatura de 27 ± 2 °C de incubação, foi adicionada solução de lugol nas placas que, em alguns minutos, formou uma nítida zona de hidrólise ao redor da colônia de levedura considerada positiva para a produção de amilase, o restante do meio, onde não houve a degradação de amido, ficou corado de violeta.

Atividade Proteolítica – A capacidade de degradar a proteína do leite em pó (caseína) pelas leveduras é utilizada para se determinar a produção de enzimas proteolíticas. Após 5 dias de incubação, a temperatura de 27 ± 2 °C, as leveduras produtoras dessa enzima apresentaram em volta da colônia um halo transparente indicando a hidrólise das proteínas.

Atividade Celulolítica – Após 5 dias, a temperatura de 27 ± 2 °C de incubação, foram adicionados às placas aproximadamente 5 mL de solução corante vermelho congo a 1%. Após 15 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com solução salina a 0,85%. Esse procedimento permite a revelação, no meio de cultura, do halo de degradação do substrato proporcionado pela atividade da celulase.

Nas placas com formação de halo de hidrólise foi realizado medidas dos diâmetros dos halos e das colônias para cálculo do Índice Enzimático (IE), por meio da fórmula:

$$IE = X_{DH} / X_{DC}$$

Onde: IE=índice enzimático, X = Média Aritmética, DH = Diâmetro do Halo, DC =Diâmetro da colônia

O Índice Enzimático (IE) foi determinado pelo método utilizado por Cruz et al., (2011), o qual consiste em relacionar o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia. As leveduras com IE igual ou superior a 2,0 são classificadas com habilidade para produção das enzimas estudadas (STAMFORD et al., 1998).

Em seguida, foi utilizada a escala sugerida por Mautone (2008) e por Fuentesfria (2004) com modificações (Tabela 1), classificando – as segundo o IE.

Tabela1: Escala de produção de enzimas.

Enzimas	Produção		
	Fraca	Intermediária	Forte
	Diâmetro do halo (cm)		
Amilase	<1,5	1,5 a 3,0	>3,0
Protease	<0,5	0,5 a 0,9	>0,9
Celulase	<1,5	1,5 a 2,4	≥2,5

Atividade inulinolítica: Para analisar a capacidade dos isolados em assimilar inulina, após 5 dias, a temperatura de 27 ± 2 °C de incubação foi observado o crescimento da colônia, o qual foi comparado aos controles positivos (meio YNB com 0,5% glicose) e negativos (meio YNB sem fonte de carbono) e os resultados foram classificados como negativos (-), fraca atividade (+), atividade intermediária (++) e forte atividade (+++).

Osmotolerância: As leveduras foram plaqueadas em meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de 27 ± 2 °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas para 500µl de solução salina a 0,85% e posteriormente inoculadas em meio contendo:

- Para teste de osmotolerância a NaCl: 0,67% de YNB, 10% de NaCl, 5% glicose e 2% de Agar.

- Para o teste de glicose a 50%: 0,67% de YNB, 50% de glicose e 2% de Agar.

Os meios foram autoclavados por 10 minutos a 121°C. As placas foram incubadas durante 5 dias a temperatura de 27 ± 2 °C. Após o período de incubação os resultados foram considerados como negativo (-), fraco (+), positivo (++) , quando comparados aos controles positivo (meio YNB com 0,5% glicose) e negativo (meio YNB sem fonte de carbono).

Assimilação de etanol

Para análise da assimilação de etanol as leveduras foram plaqueadas em meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de 27 ± 2 °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas para 500µl de solução salina a 0,85% e posteriormente transferidas para o meio contendo 0,67% de YNB, 2% de ágar e acrescentado aproximadamente 1,5ml de álcool etílico 95% como fonte de carbono, e

incubados durante 5 dias a temperatura de 27 ± 2 °C. Após incubação os resultados foram considerados como negativo (-), fraco (+), positivo (++) , quando comparados aos controles positivo (meio YNB com 0,5% glicose) e negativo (meio YNB sem fonte de carbono).

Produção extracelular de compostos amiloides

Para avaliar a capacidade de produzir compostos polissacarídeos amilóides pelos isolados, foi adicionada solução de iodo a uma placa de Petri contendo o crescimento leveduriforme após 21 dias em meio composto por glicose 0,5%, YNB 0,67% e ágar 2% (YARROW, 1998). O resultado positivo foi evidenciado pela formação de um halo azulado ao redor da colônia, devido à reação do composto amilóide com a solução de iodo.

Termotolerância: As leveduras foram plaqueadas em meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de 27 ± 2 °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas para 500µl de água destilada e posteriormente inoculadas em placas contendo meio YMA contendo 0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1% glicose, 1,5% agar e incubadas durante cinco dias a temperaturas de 35 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C e 45 °C. Após o período de incubação os resultados foram considerados como negativo (-), fraco (+), positivo (++) , quando comparados aos controles positivo (meio YMA com 1% glicose) e negativo (meio YMA sem fonte de carbono).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade enzimática

Para produção das enzimas amilase, protease e celulase observou-se a capacidade de formação do halo de hidrólise. Dentre os isolados, 32% produziram a enzima amilase, 5% produziram a enzima protease e 39% produziram a enzima celulase (Figura 1).

Muitos isolados apresentaram produção de celulase (39%), sendo cinco deles com produção caracterizada como intermediária (IE entre 1,5 e 2,4cm): D1, 41, 39, 98, 36. Embora os demais isolados tenham apresentado produção fraca, ou seja, com índice enzimático menor que 1,5cm (Tabela 2), estes resultados são bastante interessantes, pois a produção de celulase é atribuída, geralmente, a fungos filamentosos e bactérias. Provavelmente, o habitat de onde as leveduras foram isoladas tenha induzido à síntese de

celulases, uma vez que as formigas da tribo *Atta robusta*, classificadas como cortadeiras, levam muitas folhas para o ninho, havendo a necessidade de hidrolisar este material vegetal.

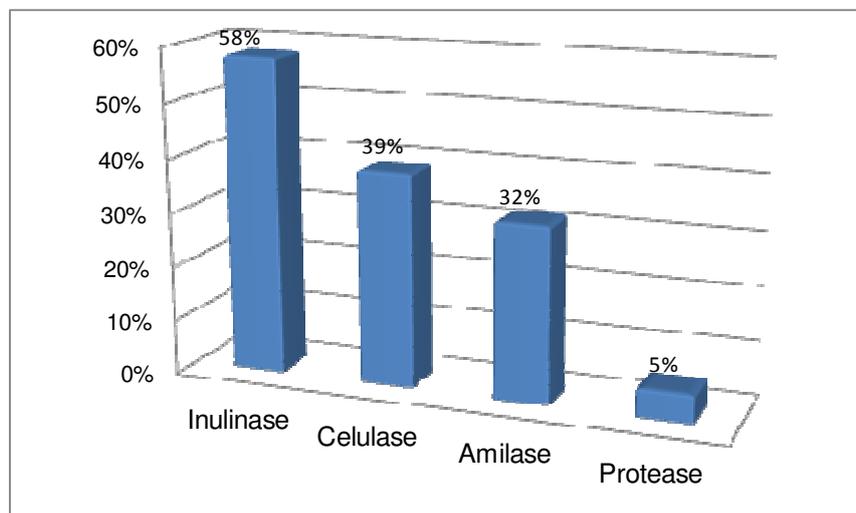


Figura 1. Produção de enzimas pelos isolados do Jardim de fungos da formiga *Atta robusta*.

A celulase apresenta função hidrolítica sobre materiais celulósicos e, por isso, possui importantes aplicações nas indústrias alimentícia e têxtil (CASTRO;PEREIRA JR., 2010; RUEGGER;TAUK-TORNISIELO, 2004), além de ser empregadas na produção de combustíveis como etanol. Na Tabela 2, estão listadas as leveduras e as medidas dos halos de hidrólise e seus respectivos IE.

A produção de amilase também foi bastante significativa, uma vez que 30 isolados (32%) apresentaram produção de halo na presença de amido como única fonte de carbono. A produção foi considerada de intermediária a fraca, uma vez que todos apresentaram IE de 1,5 cm para baixo (Tabela 3). Entretanto, estes resultados são preliminares, uma vez que o meio sólido pode dificultar a difusão das enzimas, fornecendo resultados subestimados. Soares et al. (2010), em seus estudos com identificação de amilase em fungos filamentosos, concluíram que, quando submetidos a baixas temperaturas e por mais tempo, o microrganismo é capaz de degradar mais o amido presente no meio e conseqüentemente ocorre uma maior formação do halo de hidrólise, o que pode ter ocorrido com este estudo, já que neste os isolados foram submetidos a 27 °C.

Tabela 2. Medidas dos halos de hidrólise para produção de celulase, por leveduras isoladas de jardins de fungos da formiga *Atta robusta*.

LEVEDURA	D (c) (cm)	D (h) (cm)	IE (X _{Dh} / X _{Dc})
D1	1,05	1,90	1,80
98	1,00	1,64	1,64
39	1,17	1,90	1,62
41	1,13	1,70	1,50
36	1,05	1,60	1,52
45	1,10	1,64	1,49
53	0,85	1,25	1,47
37	1,20	1,76	1,47
44	1,00	1,44	1,44
C2	0,80	1,15	1,44
64	0,95	1,35	1,42
E1	0,80	1,10	1,38
91	0,95	1,30	1,37
74	1,24	1,64	1,32
61	1,30	1,70	1,31
88	1,17	1,52	1,30
D4	0,90	1,15	1,28
58	1,10	1,40	1,27
63	1,10	1,37	1,25
94	1,10	1,30	1,20
97	1,20	1,37	1,14
D5	1,10	1,24	1,13
93	1,15	1,20	1,04
51	1,65	1,70	1,03
30	1,50	1,53	1,02

D(c): diâmetro da colônia; D(h): diâmetro do halo de hidrólise; X: média; IE: Índice enzimático.

Tabela 3. Medida dos halos de hidrólise para enzima amilase, por leveduras isoladas de jardins de fungos da formiga *Atta robusta*.

LEVEDURA	D (c) (cm)	D (h) (cm)	IE (X_{Dh}/X_{Dc})
36	0,60	1,15	1,92
30	1,00	1,35	1,35
74	1,20	1,57	1,31
C2	0,87	1,10	1,26
63	1,05	1,30	1,24
61	0,85	1,05	1,23
46	1,05	1,25	1,20
B9	0,97	1,14	1,17
B15	0,95	1,10	1,16
98	1,17	1,35	1,15
33	1,03	1,20	1,14
94	1,20	1,34	1,12
49	1,07	1,20	1,12
64	0,90	1,00	1,11
JFL11	1,50	1,65	1,10
38	1,27	1,40	1,10
51	1,73	1,90	1,10
41	1,15	1,25	1,09
D4	1,02	1,10	1,07
81	1,37	1,45	1,06
42	1,40	1,47	1,05
48	0,95	1,00	1,05
97	1,00	1,05	1,05
37	1,00	1,05	1,05
79	1,20	1,25	1,04
88	1,05	1,10	1,04
63	1,05	1,10	1,04
82	1,17	1,20	1,03
91	1,14	1,17	1,03

D(c): diâmetro da colônia; D(h): diâmetro do halo de hidrólise; X: média; IE: Índice enzimático.

Para produção de protease, apenas cinco isolados apresentaram formação do halo de hidrólise: JFL06, 43, D3, B2. Todos apresentaram forte produção da enzima, já que seus IE foram maiores que 0,9 cm.

Com relação à produção da enzima inulinase, 58% dos isolados mostram-se capazes de crescer no meio contendo inulina, indicando sua capacidade de produção desta enzima. Os isolados apresentaram bom potencial para produção de inulinase uma vez que foi bastante significativo o número de isolados que conseguiram crescer em meio contendo inulina como única fonte de carbono, (45 isolados), dos quais dois

apresentaram crescimento considerado forte: os isolados 63 e E1 (Tabela 4). A grande maioria apresentou crescimento intermediário e 33 não cresceram na presença deste substrato (Figura 2).

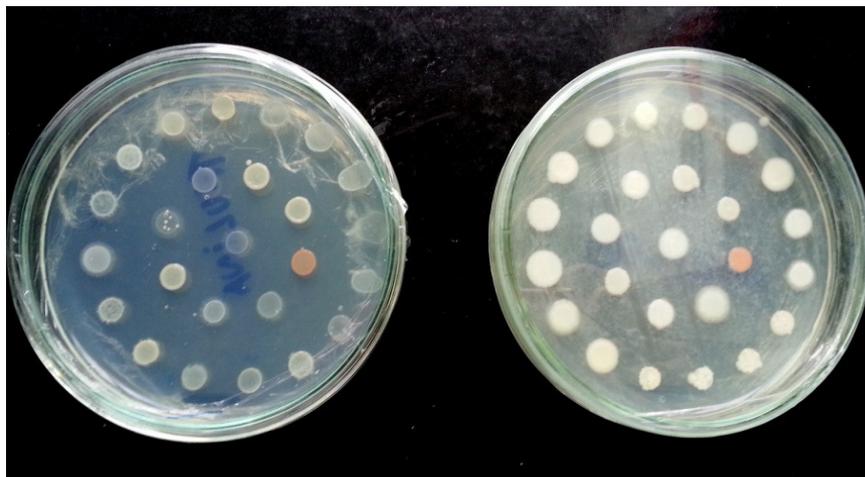


Figura 2. Crescimento de isolados no meio com inulina (esquerda), comparando com o controle positivo (direita).

Esses resultados são muito interessantes, pois a enzima inulinase tem uma grande aplicação industrial, desde a produção de xaropes com alto teor de frutose (VANDAME; DERIKE, 1983) até a produção de combustíveis utilizando inulina como substrato (CHI et al., 2011). Devido a isto, são descritas muitas pesquisas voltadas para isolamento de microrganismos com potencial para produção desta enzima, como a de Santiago;Souza-Motta (2006) que isolou mucorales de solos de mineração de cobre e todos os isolados foram positivos para crescimento em meio em inulina. Souza-Motta et al. (2003) estudando o potencial hidrolítico de fungos filamentosos isolados da rizosfera de girassol, encontraram 79 fungos capazes de hidrolisar inulina.

Osmotolerância

Por meio dos testes de osmotolerância observou-se que, em meios contendo altas concentrações de NaCl, 68% dos isolados apresentaram crescimento entre forte e moderado. No meio contendo concentração elevada de glicose (50%), 64,4% dos isolados tiveram crescimento moderado (Tabela 4).

O estudo da presença de leveduras osmotolerantes é útil para identificação dos isolados. Na indústria de alimentos, a presença de leveduras osmofílicas é indesejável, de um modo geral, pois estas estão relacionadas à deterioração e contaminação de alimentos açucarados. Rocha et al. (2004), observaram que leveduras osmofílicas dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichia* se multiplicavam mais rápido

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

Assimilação de etanol

Para a assimilação de etanol, 85% dos isolados apresentaram crescimento positivo, sendo que 10 isolados apresentaram crescimento forte (+++) na presença de etanol como única fonte de carbono (destaque em vermelho na Tabela 4). Esta característica é bastante interessante, pois a tolerância pode ser um indício de que estas leveduras também são capazes de produzir o etanol, sendo potenciais produtoras de biocombustíveis.

Produção extracelular de compostos amilóides

Nove isolados formaram halo azul que corresponde a produção de compostos amilóides: B15, 48,58, 61, JFL10, 36, 37, 39 e E1. A Figura 3, mostra a formação do halo azulado, pela produção de compostos amilóides.



Figura 3. Formação de halo azul indicando produção de composto amilóide nos isolados dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*.

Destaque deve ser dado a 16 isolados que apresentaram tanto capacidade de osmotolerância e assimilação do etanol, bem como produção da enzima inulinase (em negrito, na Tabela 4). Além disso, alguns deles também foram capazes de produzir outras enzimas, como amilase, protease ou celulase. Estas leveduras apresentam um potencial elevado, pois combinam várias características de interesse biotecnológico e industrial.

Testes de Termotolerância

Para o teste de termotolerância foram selecionadas as leveduras que obtiveram melhor crescimento nos testes de osmotolerância. Os 24 isolados selecionados (destacado em amarelo na Tabela 4) foram submetidos a cinco temperaturas diferentes, mas apenas a 35 °C ocorreu crescimento forte dos isolados JFL 11, 43, 89 e 42.

A temperatura influencia o desenvolvimento do microrganismo em diversos aspectos. Souza (2009) percebeu, em seu trabalho com produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, que em temperaturas elevadas e diminuindo a concentração de açúcar, obteve etanol com mais viabilidade. A atividade da enzima poligalacturonase secretada por *Bacillus* sp., aumentou quando submetido a altas temperaturas (CORDEIRO;MARTINS, 2009), já a levedura *Yarrowia lipolytica* YB-423, obteve maior desempenho quando armazenado a 25 °C (MACHADO;BURKERT, 2009).

Tabela 4. Osmotolerância, crescimento com etanol e produção da enzima inulinase por isolados dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*.

LEVEDURA	GLICOSE 50%	ETANOL	NaCl 10% e GLICOSE 5%	INULINASE
82	+	++	++	++
96	++	++	++	++
41	++	++	+++	++
88	+	++	++	++
63	+	++	++	++
74	++	+++	++	++
JFL11	++	+++	++	++
JFL10	++	+++	++	++
JFL9	+	+++	++	++
JFL6	+	+++	++	++
51	++	+++	++	++
94	++	++	++	++
B15	+	++	+	++
D5	++	++	++	++
B17	++	+++	++	++
89	++	+++	+	++
45	-	+++	++	++
36	-	++	-	++
B18	++	+++	-	++
D4	-	++	-	-
B2	+	++	+++	-
B3	++	++	-	-
B6	++	++	+++	-
B8	++	++	+++	-
B10	++	++	+++	-
B14	++	++	-	-
B16	-	++	+	-
B20	+	++	++	-
91	++	++	-	++

43	++	++	+++	-
42	++	++	++	-
39	-	++	-	++
34	++	++	++	-
33	+	++	-	-
48	+	++	-	++
95	++	++	++	-
75	+	++	-	-
47	++	++	++	-
53	+	++	++	-
76	+	++	++	-
81	+	++	++	-
90	+	++	++	-
JFL1	-	++	++	-
46	-	++	++	++
61	++	++	-	++
97	-	++	++	++
98	-	++	++	++
93	-	++	++	++
38	++	++	-	-
58	++	++	++	++
80	-	++	-	-
64	+	++	+	++
49	+	++	+	++
31	-	-	-	-
03	+	+	+	+++
B13	+	-	+	-
B1	-	-	-	-
E1	-	++	+	+++
44	-	++	+	+
C2	-	++	+	+
B5	-	++	++	+
68	+	-	+	-
50	-	-	-	-
B4	+	++	+++	-
70	-	-	-	-
96	+	++	+	+
82	+	++	+	+
62	+	++	+	+
30	-	-	-	-
37	-	++	-	++
32	-	-	-	-
07	++	-	++	++
79	-	-	-	++
67	-	+	-	-
B9	++	-	++	++
60	-	-	-	++

- não cresceu; + crescimento fraco; ++ crescimento intermediário; +++ crescimento forte.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pose-se concluir que as leveduras isoladas dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta*, apresentam potencial biotecnológico, pois todos os isolados apresentaram capacidade de produção de alguma das enzimas de interesse industrial estudadas.

Devido a esta rica população microbiana, os ninhos da formiga *Atta robusta* mostraram-se fonte de microrganismos de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

- BORDA, R. DA S., et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.725-730, mai-jun, 2006.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA, N Jr., Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.
- CHI, Z.M., ZHANG, T., CAO, T.S., LIU, X.Y., et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocess. **Bioresource Technology**. v. 102, p.4295-4303, 2011.
- CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, L. L., Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29,n.1, p.135-141, jan.-mar. 2009.
- CRUZ, T.M.L.; COUTO F.M.M.; FRANÇA, G.S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P. **Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro**. Disponível em < www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf> Acessado em 2014.
- FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. , Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 43-51, 2007.
- FUENTEFRIA, A.M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. 131p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- GOMES, E., et al., Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.
- LEHNINGER, A.L., 1917-1986. **LEHNIGER Princípios de Bioquímica**. 4. Ed. São Paulo: SARVIER, 2006. p. 191-193.
- MALAJOVICH, M.A., **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- MAUTONE, J.N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de Figueira do Parque de Itapuã, RD, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- MENDES, A. A., et al., Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- ORLANDELLI, R.C., et al., Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações, **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.
- PINTO-TOMÁS, A.A. et. al., Symbiotic nitrogen fixation in the fungus-garden of leaf-cutter ants. **Science**, v. 326, n. 20, p.1120-1123, Nov. 2009.

ROCHA, C. D.; SCHMIDT, H. J.; MONTEIRO, C.; ODEBRECHT, E., Deterioração de refrigerantes por leveduras, **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.5, n.2, p.95-100, Jul.-Dez./2004.

RUEGGER, M. J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M., Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil, **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. DE M. S.; BARONI, S., Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30,n.3, p.700-705, jul.-set. 2010.

SOUZA-MOTTA, C. M.; CALVACANTE, M. A. DE Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M.; NASCIMENTO, J. P.; LARANJEIRA, D., Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus L.*) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 273-280, 2003.

SOUZA, C.S., **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevados por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***, São Paulo, 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo.

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 Brasilica**, v.20, n.3, p.641-647, 2006.

STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de micro-organismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus L. Urban*) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 4, 1998.

TEIXEIRA, M.C., SHOEREDER, J.H., MAYÉR-NUNES, A.J., Geographic Distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.719-721, 2003.

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

VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G., Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 139-176, 1983.

YARROW, D. **Methods for the isolation and identification of yeasts**. In: The Yeasts, a taxonomic study. 4a. Ed. Amsterdam: Kurtzman e Fell. p. 77-100, 1998.

CAPITULO 2

DESCOLORAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS POR LEVEDURA ISOLADA DE JARDINS DE FUNGOS DA FORMIGA *Atta robusta* BORGMEIER (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

[Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Ambiência* (ISSN 2175 9405),
Guarapuava, Brasil, 2016]

Descoloração de corantes industriais pela levedura *Hyphopichia heimii* isolada de jardins de fungos da formiga *Atta robusta* Borgmeier (hymenoptera: formicidae)

Decolorization of industrial dyes by yeast *Hyphopichia heimii* isolated from ant fungi garden *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera:Formicidae)

Resumo

Formigas da espécie *Atta robusta* possuem jardins de fungos onde os nutrientes são de rápida e fácil assimilação, sendo descritas relações simbióticas com diversas espécies de fungos neste ambiente. Estes fungos têm sido estudados, não só para compreensão do seu papel nas populações desses insetos sociais, mas também para descobrir seu potencial biotecnológico na produção de substâncias de interesse industrial e ambiental. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de descoloração de corantes industriais usando a levedura *Hyphopichia heimii* isolada de jardins de fungos da formiga *Atta robusta*. Para isso foram utilizados quatro corantes: Remazol Brilhante Violeta, Remazol Brilhante Azul, Alaranjado G e Preto Reativo 5. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer, contendo Meio Normal de Descoloração (MND) líquido, durante 3 dias. Após os ensaios de descoloração, tanto o sobrenadante quanto os corantes foram diluídos a 6, 12, 25, 50 e 100% e utilizados para testes de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*), sendo analisadas a taxa de germinação (TG) e a taxa de inibição do crescimento radicular (TICR). A *H. heimii* apresentou boa descoloração nas primeiras 24 horas, que se mantiveram constantes até 72 horas, tanto para os corantes Remazol Brilhante Violeta quanto para Preto Reativo 5, atingindo 94,5% e 97,3% de taxa de descoloração, respectivamente. Os corantes Alaranjado G e Remazol Brilhante Azul foram pouco descoloridos, tendo como taxas máximas 25,8% e 42,1%, nesta ordem. Os testes de fitotoxicidade foram realizados com os corantes que obtiveram melhores descolorações (Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5) e, de acordo com os resultados das TG e TICR, os sobrenadantes de ambos os corantes apresentaram, de um modo geral, toxicidade menor do que seus respectivos controles até a diluição de 50%. Sem diluição, tanto sobrenadantes quanto os controles mostraram-se tóxicos, pois não houve germinação das sementes em nenhum dos testes. Isso sugere que ocorreu biodegradação parcial dos corantes cujos metabólitos, em altas concentrações, foram fitotóxicos.

Palavras chave: fungos; insetos sociais; biodegradação

Abstract

Ants from *Atta robusta* species have fungi gardens, where nutrients are quickly and easily assimilated, being described symbiotic relationships with several species of fungi in this environment. These fungi have been studied not only for understanding their role in the populations of these social insects but also to discover their biotechnological potential for substances production of industrial and environmental interest. The present study aimed to assess the biodegradability of industrial dyes using yeast isolated from ant fungi gardens *Atta robusta*, identified as *Hyphopichia heimii*. For this, four dyes have been used: Remazol Brilliant Violet, Remazol Brilliant Blue, Orange G and Reactive Black 5. Assays were performed Erlenmeyer flasks containing Discoloration

Normal Medium (DNM) liquid during 3 days. After the decolorization tests, both supernatant and dyes were diluted to 6, 12, 25, 50 and 100% and used for phytotoxicity tests using lettuce seeds (*Lactuca sativa*), and analyzed the germination rate (GR) and the root growth inhibition rate (RGIR). The *H. heimii* showed good decolorization within 24 hours, they remained constant up to 72 hours for both remazol brilliant violet dye and for reactive black 5, reaching 94.5% and 97.3% discoloration rate, respectively. The dyes Orange G and Remazol Brilliant Blue was slightly discolored, with the maximum rates 25.8% and 42.1% in that order. The phytotoxicity tests were carried out with dyes which performed better discolorations: Remazol Brilliant Violet and Black Reactive 5 and according to the results of TG and TIGR, supernatants from both dyes showed, in general, less toxic than their respective controls to 50% dilution. Undiluted, both supernatants as the controls were toxic because there was no germination in any of the tests. This suggests that there was partial biodegradation of dyes whose metabolites, in high concentrations, were phytotoxic.

Key words: fungi; social insect; biodecoloration

Introdução

Leveduras são fungos unicelulares, apresentam parede celular com predominância de carboidratos e sua reprodução ocorre principalmente por brotamento onde, a partir de uma célula mãe, diminutas protuberâncias, denominadas brotos, são produzidas (RAVEN; EVERT; EICHLORN, 2007).

Existem cerca de 80 gêneros com 600 espécies de leveduras identificadas (RAVEN; EVERT; EICHLORN, 2007). Embora classicamente estudadas como um grupo único, as leveduras são divididas entre dois filos: Ascomycota e Basidiomycota, sendo estes unificados pela predominante fase de crescimento unicelular (FELL et al., 2000; ALMEIDA, 2005). São classificados dessa forma pela diferença em suas estruturas reprodutivas, sendo por meio de ascos para Ascomycota e basídios para os Basidiomycota.

As leveduras estão extensamente distribuídas na natureza, estando presente em diferentes ambientes, seja terrestre, aquático ou aéreo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Dependendo do tipo de substrato onde ocorre o seu crescimento, diferentes espécies ou grupos de leveduras possuem habitats especializados, que podem ser influenciados, pela concentração de nutrientes disponíveis (MORAIS; ROSA, 2000).

Devido à sua vasta diversidade, estes microrganismos são importantes fontes de compostos de interesse biotecnológico como pigmentos, biocombustíveis, enzimas, entre outros, produzidos por meio de processos fermentativos (MALAJOVICH, 2012).

As leveduras, assim como outros microrganismos, apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes com quantidades fora do padrão, de fatores como pH, temperatura, concentração de sal e açúcar, que outras formas de vida não conseguiriam se adaptar (SANTOS, 2001).

A adaptação a termofilia é um fator de grande interesse para biotecnologia à medida que, leveduras que conseguem se proliferar em elevadas temperaturas são importantes para utilização em bioprocessos (GOMES et al., 2007). Uma forma de utilizar leveduras osmo e termotolerantes é em processos de biorremediação, no qual são utilizados microrganismos para diminuir a quantidade de poluentes presentes no ambiente (YAKUBU, 2007). Esse processo ocorre com mais frequência em refinarias de petróleo, indústrias têxteis, de celulose, farmacêuticas, dentre outras, sendo os microrganismos nativos ou introduzidos ao ambiente (PEREIRA;FREITAS, 2012).

As indústrias têxteis utilizam muita água em seus processos, e com frequência liberam no ambiente resíduos sem o cuidado necessário, contendo corantes. Acarretando a poluição da área, impedindo a penetração dos raios solares, em efluentes, por exemplo, e diminuindo a taxa fotossintética dos vegetais aquáticos. Além de causar danos ao ser humano quando relacionado a cadeia alimentar, por se tratar de substâncias cancerígenas e altamente mutagênicas (PETERNEL; KOPRIVANAC; KUŠIĆ, 2006; SOUZA; ROSADO, 2009).

A maioria das indústrias utiliza corantes do tipo azo (CATANHO; MALPASS; MOTHEO, 2006). Estes são do grupo dos reativos, que apresentam alta solubilidade em água e estabelece uma forte ligação covalente entre o corante e a fibra, através de grupos amino, melhorando a fixação da cor ao tecido (GUARATINI;ZANONI, 2000). Os corantes Alaranjado G, Remazol Brilhante Violeta e o Preto Reativo 5, são exemplos de corantes do tipo azo (DE SOUZA;PERALTA-ZAMORA, 2005) (Figura 1).

O Remazol Brilhante Azul R (RBBR) é um corante do tipo químico antraquinona, contendo em sua estrutura anéis aromáticos (Figura 1), que os tornam resistentes a oxidação química, além de serem altamente estabilizados por ressonância (SILVA; MONTEIRO, 2000; GUARATINI;ZANONI, 2000).

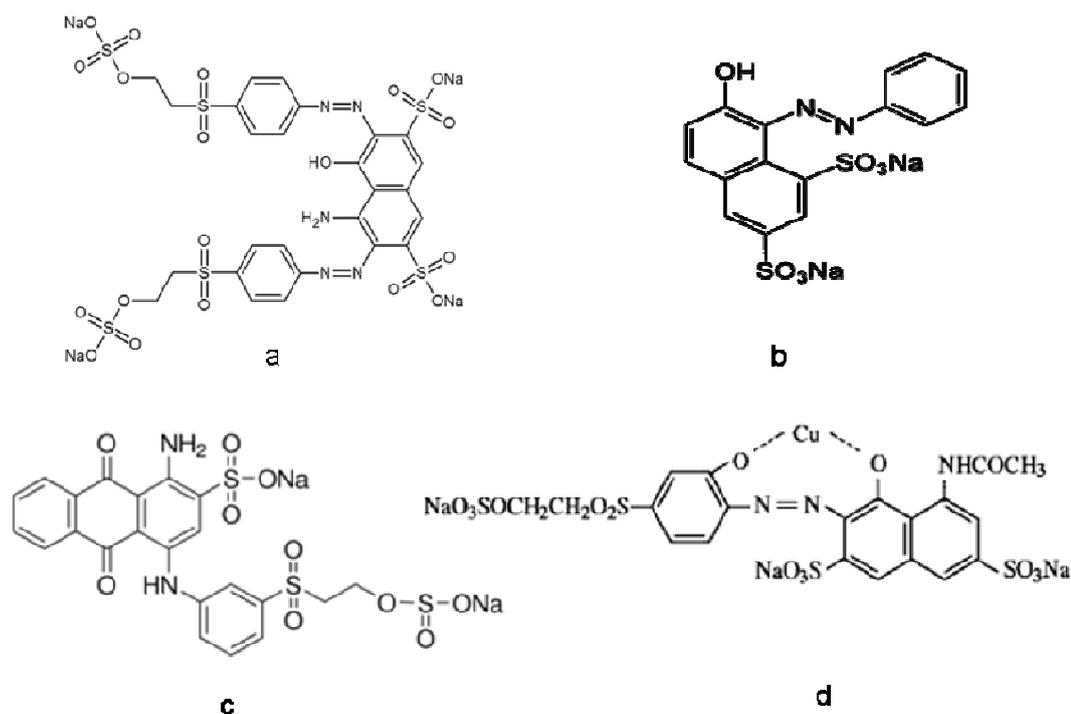


Figura 1. Estrutura química dos corantes: a) Preto Reativo 5; b) Alaranjado G; c) Remazol Brilhante Azul e d) Remazol Brilhante Violeta 5. Fontes: <http://www.sigmaaldrich.com>, ALEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004 e PINTO, 2010.

A remoção desses corantes utilizados nas indústrias têxtil pode ocorrer de forma física, química ou biológica. Uma forma adequada e de baixo custo é utilizando microrganismos que sejam capazes de degradar compostos tóxicos, recuperando o local total ou parcialmente (CAMARGO et al., 2007).

As leveduras apresentam um arsenal metabólico que possibilita sua colonização nos mais variados ambientes. Assim, é descrito o isolamento de leveduras de interesse biotecnológicos a partir de plantas, solo, água doce e salgada, bem como de insetos, como formigas. Como bons vetores de dispersão de leveduras pelos ambientes, as formigas cortadeiras realizam interações simbióticas com micro-organismos que são abrigados em seus ninhos. Elas transportam vegetais para o seu formigueiro e fungos simbiotes, utilizam o substrato vegetal para o seu crescimento, sendo utilizado posteriormente como alimento (BORBA et al., 2006). Nesses ninhos são encontradas câmaras subterrâneas, os jardins de fungos, que funcionam como um sistema, produzindo nutrientes de rápida e fácil assimilação pelas formigas (PINTO-TOMÁS et al., 2009).

Atta robusta Borgmeier é uma espécie de formiga cortadeira endêmica, encontrada nas regiões de restinga, dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Embora, ainda existam ambiguidades em dados da literatura com relação a sua distribuição e escassez nos estudos entomológicos nesses ambientes, devido a barreiras físicas, elementos históricos e ecológicos, essa espécie é impossibilitada de se dispersar para outras regiões (TEIXEIRA; SHOEREDER; MAYÉR-NUNES, 2003; TEIXEIRA; SHOEREDER; LOUZADA, 2004).

Os microrganismos do jardim de fungos da espécie *Atta robusta* nunca foram estudados. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de biodegradação de corantes têxtil por leveduras isoladas de jardins de fungos da formiga *Atta robusta*.

Material e Métodos

A levedura *Hyphopichia heimii* faz parte da coleção de leveduras do Laboratório de Bioquímica do Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada (NEMA/ CCAAB), e foi isolado de jardins de fungos da formiga *Atta robusta*, da região de restinga do município de Aracruz, ES.

O microrganismo cresceu em placas de petri contendo meio GYMP (extrato de malte 1%, extrato de levedura 0,5%, NaH₂PO₄ 0,2%, glicose 2%, ágar 2%), de 24-48 horas, a temperatura de 35 °C. Em seguida, para produção do inóculo, a levedura foi transferida para solução salina 0,85% até atingir a densidade óptica de 0,8 no comprimento de onda de 600 nm, que corresponde a 10⁸ células/ mL de acordo com a escala de McFarland.

Para teste de descoloração foram utilizados os corantes Alaranjado G, Remazol Brilhante Violeta, Remazol Brilhante Azul e Preto Reativo 5, a concentração de 50 ppm. Foi utilizado o Meio Mínimo de Descoloração (MND), contendo (g L⁻¹): extrato de levedura 2,5; KH₂PO₄ 5,0; MgSO₄.7H₂O 0,5 e CaCl₂ 0,13. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultivo MND com corante mantidos sob agitação de 150 rpm em câmara agitadora por 72 horas, a 35 °C. A cada 24 horas, triplicadas foram retiradas, centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos e, do sobrenadante, determinada porcentagem de descoloração por espectrofotometria, avaliando-se a diminuição da absorbância a partir do comprimento de onda fixado pela absorbância máxima de cada corante: Alaranjado G – 476nm, Remazol Brilhante Violeta – 558nm, Remazol Brilhante Azul – 595nm e Preto Reativo 5 – 595nm utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = (A - B)/A \times 100$$

Onde: (A) indica a absorbância do meio não inoculado e (B) indica a absorbância residual do meio.

Além disso, foram observadas as seguintes características: coloração do meio antes e após descoloração, pH e cor da biomassa. Como controle foi utilizado o meio de cultivo contendo somente o MND e solução do corante (RAMALHO et al., 2002; RAMALHO et al., 2004; MARTORELL et al., 2012).

Ensaio de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*)

Os bioensaios de fitotoxicidade foram realizados segundo Sobrero e Ronco (2004) utilizando sementes de alface com os corantes que obtiverem maior taxa de descoloração. Em placas de Petri foram colocados discos de papel para germinação (Whatman), posteriormente saturados com 2 mL do sobrenadante em diferentes concentrações (6, 12, 25, 50 e 100%) e 20 sementes de alface da espécie *L.sativa*. As placas foram lacradas com papel filme e colocadas em sacos plásticos para evitar a perda de umidade, incubadas durante 5 dias (120 horas), a uma temperatura de 22 ± 2 °C e colocadas em local escuro. Como controle positivo foi utilizada água destilada e como controle negativo os corantes nas mesmas concentrações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Terminado o período de exposição, quantificou-se o efeito na germinação e no crescimento médio da radícula e a porcentagem de inibição foi calculada, segundo Sobrero e Ronco (2004), pela equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{comprimento médio amostra} - \text{comprimento médio controle}}{\text{comprimento médio do controle}} \times 100$$

Resultados e Discussão

Teste de descoloração de diferentes corantes

Na Figura 2, observamos a porcentagem de descoloração dos corantes pela *Hyphopichia heimii*. Os corantes Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5 foram fortemente descoloridos nas primeiras 24 horas, atingindo 94,5% e 97,3% de taxa de descoloração, respectivamente, mantendo-se constante até as 72 horas. Por outro lado, o corante Alaranjado G foi pouco descolorido (25,8% em 24 horas) e diminuiu sua taxa de descoloração no decorrer do tempo chegando a 3,4% em 72 horas. O Remazol Brilhante Azul, que é do tipo antraquinona, também teve baixa taxa de descoloração, com um

máximo de 42,1% em 24 horas, mantendo-a quase constante, com uma queda sutil, até 72 horas.

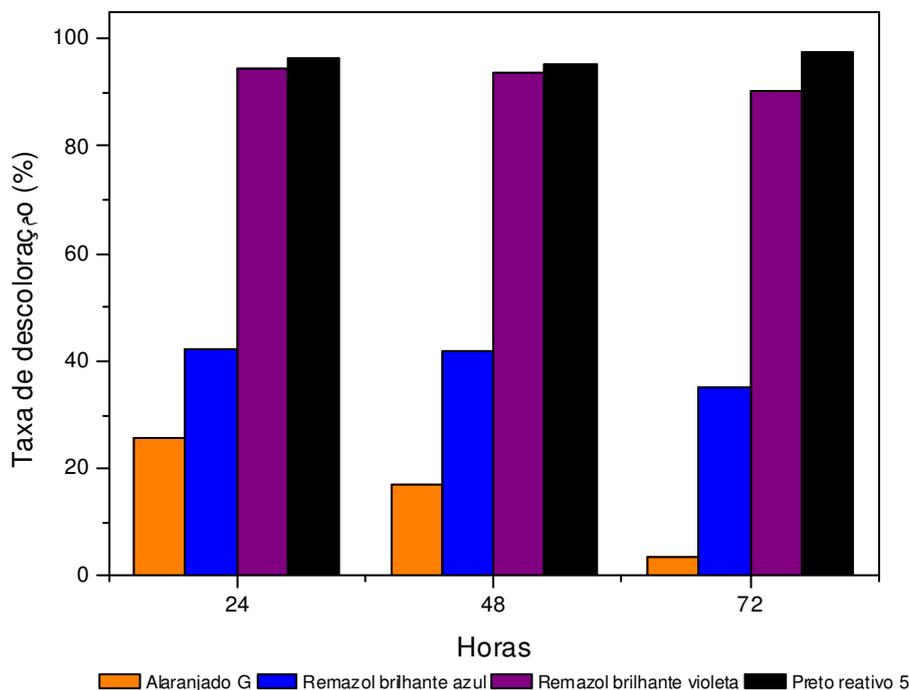


Figura 2. Taxa de descoloração (%) nos quatro tipos de corante pela *Hyphopichia heimii* após 72 horas de incubação a 150 rpm, 35 °C.

A queda da porcentagem de descoloração do corante Alaranjado G, mostra que ao ser degradado, libera compostos tóxicos, que inviabilizou a ação das enzimas envolvidas nesse processo.

Para o corante Remazol Brilhante Azul, a diminuição da descoloração pode ter ocorrido, por apresentar elevada toxicidade, principalmente pela formação de espécies reativas de oxigênio (OSMA; TOCA-HERRERA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2010).

Nos corantes que apresentaram descoloração, após o processo fermentativo o meio de cultura ficou incolor, diferente da condição inicial, e naqueles onde não ocorreu ação das enzimas da levedura, o meio de cultura permaneceu colorido (Figura 3).

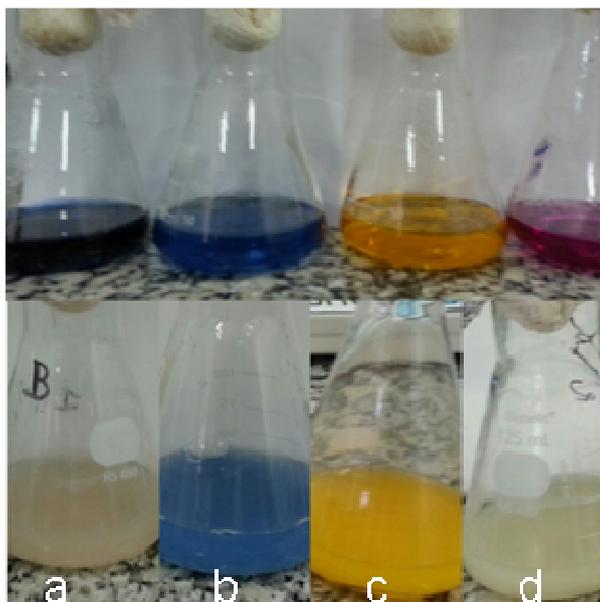


Figura 3. Coloração dos corantes antes do processo de descoloração (acima) e depois do processo (abaixo) por *Hyphopichia heimii* após 72 horas de incubação a 150 rpm e 35 °C. a) Preto Reativo 5; b) Remazol Brilhante Azul; c) Alaranjado G; d) Remazol Brilhante Violeta.

A coloração da biomassa permaneceu esbranquiçada para os corantes Alaranjado G, mesmo com baixa taxa de descoloração, bem como para o Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5. No corante Remazol Brilhante Azul a biomassa apresentou-se azulada, o que sugere que ocorreu o processo de adsorção do corante.

A adsorção ocorre quando o microrganismo retém um soluto e por consequência, a biomassa viva adquire a cor, quando relacionado com corantes (KAUSHIK;MALIK, 2009). Já para degradação, existem microrganismo que utilizam meios para decompor a molécula do corante, em azo-corantes ocorre hidrólise da ligação azo (-N=N-) com os compostos aromáticos o que leva ao desaparecimento da cor (SALGADO, 2009),. Segundo a literatura, as enzimas microbianas envolvidas com processo de degradação de corantes, pertencem ao complexo ligninolítico, como lignina peroxidase (Lip), manganês peroxidase (MnP), lacase e fenoloxidase (ROSOLEN et al., 2004; KAMIDA et al., 2005; CORDEIRO; MARTINS, 2009; RODRÍGUEZ, 2013).

A Figura 4 mostra o crescimento celular pela *H. heimii* nos quatro tipos de corante. Para os corantes Alaranjado G e Preto Reativo 5 o crescimento foi crescente até 72 horas. Para o Remazol Brilhante Azul o crescimento celular foi ascendente até 48 horas e, a partir de então, manteve-se praticamente constante até o final do processo. Por outro lado, no Remazol Brilhante Violeta ocorreu queda de crescimento após as 48 horas, atrelado a sua taxa de descoloração que também caiu no mesmo tempo. O

aumento do crescimento celular pode ter ocorrido pelo fato desses corantes, ao serem metabolizados, liberarem aminas que podem ser utilizadas como fonte de nitrogênio para o crescimento da levedura. Entretanto, no caso do Remazol Brilhante Azul, os metabólitos liberados podem ter apresentado efeito tóxico para o microrganismo, levando à queda do crescimento celular e da taxa de descoloração (GURATINI; ZANONI, 2000).

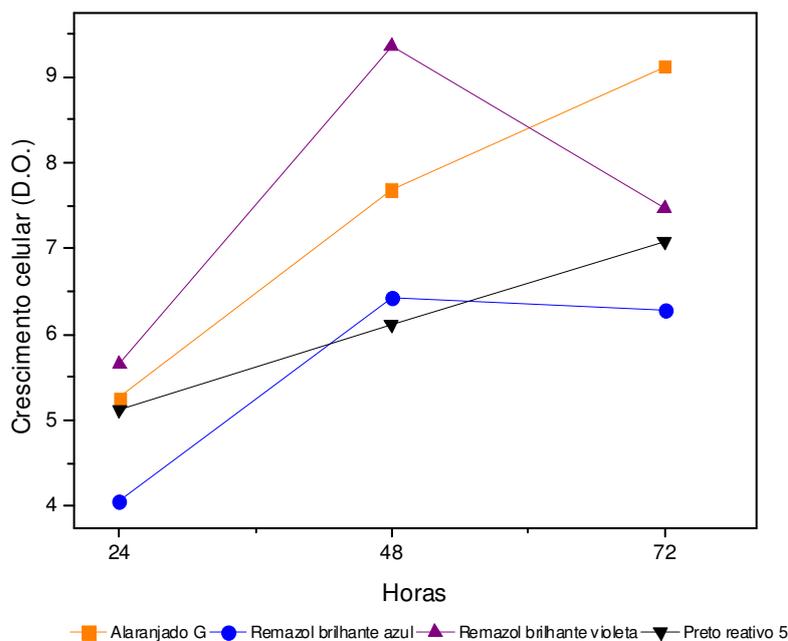


Figura 4. Crescimento celular (D.O) nos quatro tipos de corantes por *Hyphopichia heimii* após 72 horas de incubação, 150 rpm e 35 °C.

Os valores de pH aumentaram no decorrer de 72 horas, mas mantiveram-se ácidos durante o processo de degradação, tendo como maior valor o corante Alaranjado G com pH 5; porém, os outros mantiveram-se com valores entre 3,5 e 5,0 (Figura 5). O aumento do pH pode estar ligado a liberação de aminas, como subproduto da degradação do corante, que indica alcalinidade (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2007).

Assim, pode-se concluir que ocorre melhor descoloração em baixo pH. Outros trabalhos foram desenvolvidos nas mesmas condições, como de Rodrigues et al. (2011), utilizando o fungo *Aspergillus niger* para degradação de corantes em bateladas sequenciais, assim como Ramalho et al. (2004) utilizando fungo ascomiceto. Bheemaraddi et al. (2014), também encontrou melhor degradação do corante em pH ácido, usando a bactéria *Paracoccus* sp., e a porcentagem de degradação diminuiu com o aumento do pH.

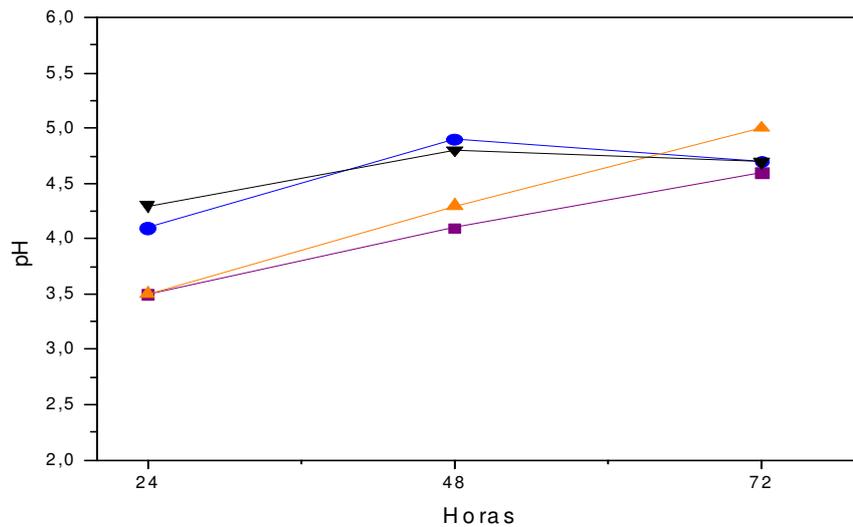


Figura 5. Valor do pH nos quatro tipos de corantes por *Hyphopichia heimi* após 72 horas de incubação, 150 rpm e 35 °C.

Fitotoxicidade

Os corantes que obtiveram maiores taxas de descoloração: Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5, foram submetidos ao teste de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, observou-se a taxa de germinação e o comprimento das radículas da semente. Na taxa de germinação, calculou-se a porcentagem de sementes que germinaram, comparando-se com o controle negativo (corante) sem estar inoculado, nas mesmas concentrações e com o controle positivo (água).

De um modo geral, à medida que aumentou a concentração do sobrenadante diminuiu a taxa de germinação para ambos os corantes. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na germinação das sementes quando foram testadas concentrações diferentes do sobrenadante proveniente da degradação do corante Remazol Brilhante Violeta e os resultados mostraram que apenas nas concentrações de 6% a toxicidade dos metabólitos presentes no sobrenadante foram baixas, pois apresentaram taxas de germinação próximas ou maiores do que no controle negativo, na mesma diluição. A partir de 12% os metabólitos apresentaram toxicidade crescente, até que nenhuma germinação foi observada na concentração de 100% em todos os tratamentos. A partir do teste de Scott-Knott, nota-se que houve diferença estatística à medida que aumentou a concentração do corante (letras minúsculas na horizontal na Tabela 1).

O tempo não apresentou efeito estatisticamente significativo em nenhuma das concentrações, pois o valor de p foi de 0,1484 ($p > 0,05$), ou seja, o aumento do tempo de fermentação não resultou em diminuição ou aumento da toxicidade (letras maiúsculas na vertical).

Tabela 1. Taxa de germinação (%) do corante Remazol brilhante Violeta.

Tempo de fermentação (horas)	Concentração				
	6%	12%	25%	50%	100%
24	55,0 aA	41,7 bA	23,3 cA	13,0 dA	0
48	60,0 aA	42,0 bA	33,3 cA	10,0 dA	0
72	40,0 aA	42,0 aA	33,3 aA	10,0 bA	0
*Corante	45,0 a	43,0a	38,0 a	32,0 b	0
**Água	55,0 a				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. *Corante: controle negativo; **Água: controle positivo.

Nos testes utilizando os metabólitos obtidos após descoloração do corante Preto Reativo 5 ocorreram taxas de germinação bem maiores que os controles (água e corante) nas mesmas concentrações (Tabela 2). Uma explicação possível é que os metabólitos forneceram nutrientes, como fontes de carbono e/ ou nitrogênio, que favoreceram a germinação. As taxas de germinação para esse corante foram sempre maiores que a dos controles chegando a 90%, o que é considerado excelente para este tipo de teste.

O aumento da concentração do sobrenadante levou à queda da taxa de germinação somente na concentração de 50%, que foram as mais baixas. Entretanto, o tempo apresentou influência estatisticamente significativa e positiva apenas nas concentrações de 25% e 50% ($p < 0,05$). Nestas concentrações, o aumento do tempo de fermentação levou a um aumento da taxa de germinação expressivamente maior em comparação com o tempo de 24 horas, especialmente na concentração de 50% após 72 horas. Nas demais concentrações, 6% e 12%, o tempo não influenciou na taxa de germinação (Tabela 2, letras maiúsculas na vertical).

Tabela 2. Taxa de germinação do corante Preto Reativo 5.

Tempo de fermentação (horas)	Concentração do sobrenadante				
	6%	12%	25%	50%	100%
24	90,0 a A	73,3 a A	38,3 c A	11,7 d A	0
48	83,3 a A	81,7 a A	76,7 a B	23,3 d B	0
72	76,7 a A	70,0 a A	75,0 a B	45,0 d C	0
*Corante	55,0 b	45,0 c	40,0 c	15,0 d	0
**Água	55,0 b				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Corante: controle negativo; **Água: controle positivo.

Para verificar a taxa de inibição (TI) do crescimento levou-se em consideração o alongamento da radícula, pois este é um dos indicadores representativos para determinar a capacidade de estabelecimento e desenvolvimento da planta (SOBRERO; RONCO, 2004). Esses ensaios devem ser realizados para garantir que o corante tratado seja menos tóxico que o não inoculado.

Neste trabalho, o resultado para o comprimento médio das radículas foi sempre superior ao do corante não tratado, mostrando que os produtos da descoloração são menos tóxicos, pois eles não inibiram o desenvolvimento da planta (Tabelas 3 e 4). O aumento da concentração do sobrenadante não influenciou no crescimento radicular, que foi, de modo geral, constante (letras minúsculas na horizontal), com exceção da concentração de 100% onde foi observada uma baixíssima, ou nenhuma, germinação das sementes.

Para ambos os corantes o tempo não apresentou efeito estatisticamente significativo em nenhuma das concentrações, ($p > 0,05$), sendo $p = 0,081$ para o Remazol Brilhante Violeta e $p = 0,6348$ para o Preto Reativo 5 (Tabelas 3 e 4), comprovando que maiores tempos de fermentação não diminuíram a taxa de toxicidade dos corantes.

Tabela 3. Comprimento médio da radícula utilizando corante Remazol Brilhante Violeta.

Horas	Concentração do sobrenadante				
	6%	12%	25%	50%	100%
24	2,0 aA	2,2 aA	2,2 aA	0,6 cA	0
48	1,8 bA	1,7 bA	2,3 aA	1,9 aA	0
72	2,6 aA	1,8 bA	1,9 bA	2,4 aA	0
*Corante	0,9 c	1,4 b	0,1 d	0,1 d	0
**Água	1,7 b				

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. *Corante: controle negativo; **Água: controle positivo.

Tabela 4. Comprimento médio da radícula utilizando corante Preto Reativo 5.

Horas	Concentração do sobrenadante				
	6%	12%	25%	50%	100%
24	2,4 aA	2,3 aA	1,7 bA	1,3 cA	0
48	2,3 aA	2,1 aA	2,1 aA	1,5 bA	0
72	2,1 aA	2,1 aA	2,0 aA	1,4 bA	0
*Corante	1,5 b	0,7 d	0,3 e	0,2 e	0
**Água	1,7 b				

Médias nas linhas seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal e maiúscula na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Corante: controle negativo; **Água: controle positivo.

Esses dois corantes são do tipo azo, após o processo de descoloração suas estruturas são clivadas e liberam sais, que possivelmente foram utilizados pelas sementes favorecendo o seu crescimento.

Trabalhos encontrados na literatura corroboram nossos resultados. Roselen, et al (2004) e Dellamatrice, (2005) observaram menor taxa de germinação que o controle, nas concentrações de 50% e 100%, quando utilizado *Pleutorus ostreatus* e *Pleurotus sajor caju*, em teste de toxicidade de efluentes têxtil com sementes de alface. Assim como Ribeiro (2013), usando fungo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* para tratamento de corantes têxteis e após descoloração o corante não apresentou toxicidade. Cordeiro

(2013) também observou diminuição a toxicidade de um efluente Kraft inoculando o fungo *Pleurotus florida*.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a *Hyphopichia heimii* apresentou boa capacidade de descoloração para os corantes Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5, além de apresentar toxicidade mais baixa do que os corantes não inoculados, o que torna esse microrganismo interessante para futuros estudos em biorremediação deste tipo de substância.

Referências

ALMEIDA, E.; ASSALIN, A. R.; ROSA, M. A., Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio, **Química Nova**, v. 27, n. 5, 818-824, 2004.

ALMEIDA, J. M. G. C. F de. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 53, p. 295–303, 2005.

BHEEMARADDI, M. C.; PATIL, S.; SHIVANNAVAR, C. T.; GADDAD, S. M., Isolation and Characterization of *Paracoccus* sp. GSM2 Capable of Degrading Textile Azo Dye Reactive Violet 5, **The Scientific World Journal**, Gulbarga, Karnataka, India, 2014.

BORDA, R. DA S., et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, v.36, n.3, mai-jun, 2006.

CAMARGO, A .T.; MONTANHEIRO, A. L.; GUNHA, M. L.; ARNDT, K.M., Biorremediação de compostos coloridos por microrganismos isolados de efluente de indústria de estampagem de tecidos, em Rio Claro, São Paulo, **SEB – Sociedade de Ecologia do Brasil**, 2007.

CATANHO, M.;MALPASS, G. R. P. M.; MOTHEO, A. de J., Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis, **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.983-989, 2006

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, L. L., Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.1, p.135-141, jan.-mar. 2009

CORDEIRO, C. C., **Estudo da biodegradação de efluente kraft por fungos ligninolíticos**. Trabalho de Conclusão de Curso (grau de Tecnólogo em processos ambientais). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DE SOUZA, C. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P., Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio, **Química Nova**, v. 28, n. 2, p.226-228, 2005.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodescoloração e toxicidade de corantes têxtil e efluentes da Estação de Tratamentos de Águas Residuárias de América, SP**. Tese de Doutorado (Ecologia de Agroecossistemas). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; LIMA, M. A. B.; ALBUQUERQUE, C. D.; VIEIRA, R. H. S. dos F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Degradação e citotoxicidade do azo corante têxtil alaranjado II por *Pseudomonas aeruginosa* ucp 992 sob condições aeróbicas. **Anais**. In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa - PB, 2007.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p.1351–1371, 2000.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI M. V. B., Corantes têxteis, **Química Nova**, v.2, n.1, p.71-78, 2000.

GOMES, E., et al., Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D., Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*, **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KAUSHIK, P., MALIK, A., Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential, **Environment International**, v. 35, p. 127-141, 2009.

MALAJOVICH, M.A., **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MARTORELL, M. M.; PAJOT, H. F.; DE FIGUEROA, L. I. C. Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 66, n. 1, p. 25-32, 2012.

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

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S., Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilized laccase, **Bioresourse Technology**, v. 101, p. 8509-8514, 2010.

PEREIRA, A. R., FREITAS, D. A. F., Uso de microrganismos para na biorremediação de ambientes impactados, **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.6, n. 6, p. 975 -1006, 2012.

PETERNEL, I.; KOPRIVANAC, N.; KUŠIĆ, H. UV-based processes for reactive azo dye mineralization. **Water Research**, v. 40, n. 3, p. 525-532, 2006.

PINTO-TOMÁS, A.A. et. al., Symbiotic nitrogen fixation in the fungus-garden of leaf-cutter ants. **Science**, v. 326, n.20, p.1120-1123, 2009.

PINTO, T. F., **Absorção de corantes têxtil (Remazol Brilhante 5R Violeta) por**

serragem de madeira modificada com anidrido succínico, Tese de Mestrado (Química), Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2010.

RAMALHO, P. A. et al. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 848-854, 2002.

RAMALHO, P. A. et al. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2279-2288, 2004.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHLORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7^oed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, 830 p.

RIBEIRO, A. P. A., **Efeito de fungos basidiomicetos na descoloração e fitotoxicidade de corante sintético e efluente têxtil**, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal Lavras, 2013.

ROCHA, C. D.; SCHMIDT, H. J.; MONTEIRO, C.; ODEBRECHT, E., Deterioração de refrigerantes por leveduras, **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 95-100, Jul.-Dez./2004.

RODRIGUES, K.; SILVA, K. M. L.; SILVA, G. M. M., LIMA, P. C. C.; WANDERLEY, C. R. P.; SILVA, G. M., Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. **Química Nova**, v. 34, n. 7, São Paulo, 2011.

RODRIGUÉZ, J. P. G., **Identificação dos compostos produzidos na degradação do corante Remazol Brilhante Blue R (RBBR) pela ação do fungo do ambiente marinho *Tinctoporellus sp.***, Tese de mestrado (Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

ROSOLEN, L. A.; MONTEIRO, R. T. R.; DELLAMATRICE, P. M.; KAMIDA, H. M., Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. **Química Têxtil**, São Paulo, setembro, 2004.

SALGADO, B. C. B., et al., Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H₂O₂), **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v.14 n.1, jan/mar 2009.

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 Brasilica**, v.20, n.3, p. 641-647, 2006.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M. Extremófilos: micro-organismos à prova de agressões ambientais extremas. Biotecnologia Microbiana: **Boletim de Biotecnologia**. n. 2, 2001.

SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R., Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.669-674, 2000.

SOBRERO, M. C. S.; RONCO, A., Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L., **G. Castillo** (ed.), Canadá. 202 pp, 2004.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R., Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis, **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009.

SOUZA, C.S., **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***, São Paulo, 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo.

TEIXEIRA, M.C., SHOEREDER, J.H., MAYÉR-NUNES, A.J., Geographic distribution of *Atta robusta* Borgmeier (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.719-721, 2003.

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

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

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. African **Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, Dec. 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, pose-se concluir que as leveduras isoladas dos jardins de fungos da formiga *Atta robusta* apresentam bom potencial biotecnológico, pois todos os isolados apresentaram capacidade de produção de alguma das enzimas de interesse industrial estudadas neste trabalho.

A levedura *Hyphopichia heinii* apresentou boa capacidade de descoloração dos corantes Remazol Brilhante Violeta e Preto Reativo 5, além de apresentar toxicidade mais baixa do que os corantes não inoculados, o que torna este microrganismo interessante para futuros estudos em biorremediação deste tipo de substância.

Devido a esta rica população microbiana, os ninhos da formiga *Atta robusta* mostraram-se uma boa fonte de microrganismos de interesse industrial.