



**VANESSA MARIA PEREIRA**

**DIVERSIDADE, RIQUEZA E COMPOSIÇÃO  
DOS GÊNEROS *Aspergillus* E *Penicillium* DE  
SOLOS DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**VANESSA MARIA PEREIRA**

**DIVERSIDADE, RIQUEZA E COMPOSIÇÃO DOS GÊNEROS  
*Aspergillus* E *Penicillium* DE SOLOS DO QUADRILÁTERO  
FERRÍFERO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

**LAVRAS – MG  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Vanessa Maria.

Diversidade, Riqueza e Composição dos Gêneros *Aspergillus* e  
*Penicillium* de Solos do Quadrilátero Ferrífero / Vanessa Maria  
Pereira. – Lavras : UFLA, 2016.

222 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Taxonomia polifásica. 2. Fungos filamentosos. 3.  
Micotoxinas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**VANESSA MARIA PEREIRA**

**DIVERSIDADE, RIQUEZA E COMPOSIÇÃO DOS GÊNEROS  
*Aspergillus* E *Penicillium* DE SOLOS DO QUADRILÁTERO  
FERRÍFERO  
DIVERSITY, RICHNESS AND COMPOSITION OF GENRES  
*Aspergillus* AND *Penicillium* IN SOIL OF IRON QUADRANGLE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de setembro de 2016  
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG  
Dra. Fabiana Reins Franca Passamani UFLA  
Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista UFLA  
Dr. Rodrigo Luz da Cunha EPAMIG

Orientador  
Prof. Dr. Luís Roberto Batista

**LAVRAS – MG  
2016**



## **DEDICO E AGRADEÇO**

Ao meu orientador Dr. Luís Roberto Batista por ter me aceito, proposto desafios e me dado liberdade de trabalhar do meu modo e tempo.

À minha querida e sempre orientadora Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza, que esteve muito presente nesse trabalho, que me deu ótimos conselhos e sempre abriu suas portas para mim quando mais precisei.

Aos meus amados pais e irmão que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até este momento de minha vida. Obrigado por acreditarem e investirem em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram esperança para seguir. Pai, sua presença constante e ajuda me mostraram que não estou sozinha nessa caminhada. Amo muito vocês!

Ao meu amor, obrigada pelo carinho, paciência e por me trazer paz na correria desses anos. Sem seu incentivo não estaria aqui, e por esse motivo, hoje estamos colhendo, juntos, os frutos do nosso empenho! Esta vitória, com toda certeza, também é sua!

Aos meus queridos amigos que torceram por mim e pacientemente esperaram por essa conquista, muito obrigada pelo apoio!

À Fabiana Passamani por me orientar em tudo! Obrigada pelos numerosos conselhos, pela ajuda no laboratório, por estar sempre disponível e receptiva, além da gentileza inestimável. Agradeço também ao professor Marcelo Passamani e ao Éder Carvalho pela grande colaboração, paciência ao me ensinar, entusiasmo e disponibilidade em me atender.

Agradeço imensamente a Luísa Freire e a Sirlei Souza por me deixarem entrar e suas vidas, pela amizade, pelos puxões de orelha, pelas risadas, pela parceria no laboratório, pelas fofocas, por me suportarem nos dias ruins, pelos almoços... muitas coisas boas e ruins que passamos juntas e espero passar por muitas outras com vocês! Amo muito!

A minha hoje e sempre amiga Gláucia Moreira muito obrigada por toda ajuda dentro e fora do laboratório, pela sinceridade, pelo companheirismo e por me incentivar e trazer alegria nas horas difíceis. Obrigada por ser a esquerda da minha direita!

À Nathasha Lira, da qual não sei o que é maior: o sorriso ou o coração, muito obrigada pela grande ajuda no laboratório, pelo riso frouxo, simpatia e amizade.

Às colegas de Netax, muito obrigada por compartilharmos esses anos juntas! Thaianá Sousa, obrigada pelas risadas e pela filosofia que vou levar para o resto da vida: “O que vale isso daqui 10 anos!”

Ao Jeferson Medeiros, Elaine Buarque, Wesley Oliveira, Michele Aragão, todos da iniciação que contribuíram de alguma forma para este trabalho e principalmente a Daniele Silva, muito obrigada pela grande ajuda!

Ao professor Eduardo Alves e as técnicas Aline e Eliza pela grande colaboração e bondade com que me ensinaram e ajudaram.

A Amanda Azarias, Paula Ribeiro e a Anita Texeira muito obrigada pela prontidão, disposição e interesse com que me atenderam. Além disso, obrigada por todo o trabalho realizado neste projeto.

À Dra. Fátima Maria de Souza Moreira pela receptividade, interesse, numerosos auxílios e ensinamentos.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras, aos Departamentos de Ciência dos Alimentos e Biologia, a EPAMIG e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para realização do meu doutorado.

Ao projeto: “Diversidade de plantas e de organismos do solo com potencial biotecnológico e indicadores de recuperação ambiental em Minas Gerais”, pelo apoio financeiro. À FAPEMIG, pela bolsa de Doutorado e pelos auxílios financeiros.

A todas as dificuldades, desafios e medos enfrentados, sem eles não teria a oportunidade de aprender, superar e crescer.

**OBRIGADA!**

*“É tudo novo no sentimento da gente,  
porém preserve do antigo  
o que lhe empurrou pra frente  
junte tudo que prestou  
misture com muito amor  
e faça um mundo diferente.*

*Preserve os beijos, os cheiros,  
os chamegos de amor,  
as gargalhadas mais altas,  
as piadas que contou,  
e se a tristeza apertar  
basta você se lembrar  
dos sorrisos que arrancou.*

*O meu ou o seu caminho  
não são muito diferentes,  
tem espinho, pedra, buraco  
pra mode atrasar a gente.  
não desanime por nada  
pois até uma topada  
empurra você pra frente!*

*Continue sendo forte  
tenha fé no Criador  
fé também em você mesmo  
não tenha medo da dor  
siga em frente a caminhada  
saiba que a cruz mais pesada  
o fí de Deus que carregou.”*

**Bráulio Bessa**

## RESUMO

O Brasil possui a maior diversidade global, entretanto tem testemunhado a percentuais elevados de devastação ambiental. A manutenção de espécies em laboratório, aliado a inovação, são a melhor alternativa para a manutenção dessa diversidade. O solo é considerado um mosaico de micro-habitats devido a sua heterogeneidade e complexidade e, dessa forma é um dos principais ecossistemas para o desenvolvimento de populações microbianas. Dessa microbiota, os fungos representam grande parte da biomassa, e são de grande importância. *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais importantes gêneros de fungos ligados as atividades humanas e o estudo exclusivo destes no solo é pouco comum. Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados do solo de cinco áreas no Quadrilátero Ferrífero, bem como avaliar seu potencial toxigênico e as correlações com os nutrientes do solo. Foram coletadas 20 amostras de solo, e para cada uma destas foram realizadas diluições seriadas nos meios DG18 e DRBC. As espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram identificadas através de características morfológicas. Foi realizada a caracterização dos isolados não identificados, utilizando fotografias das colônias e microscopia, assim como o estudo filogenético de alguns deles. A produção de ocratoxina A (OTA), citrinina e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foi avaliada por cromatografia de camada delgada. Foi verificada a diversidade, riqueza e composição das espécies e sua relação com os atributos do solo. Foram isolados 1984 espécimes pertencentes a 88 morfotipos distintos, sendo 50 destes não identificados. Um isolado de *A. ochraceoroseus* foi identificado e pode ser o único espécime encontrado fora da Costa do Marfim. A análise filogenética dos morfotipos não identificados foi inconclusiva, sendo necessários mais genes para confirmação das espécies. Todos isolados de *A. carbonarius* produziram OTA; nenhum isolado de *A. niger* e *A. niger* agregado produziram OTA; todos isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus* produziram as respectivas aflatoxinas. Todos isolados de *P. citrinum* produziram citrinina, assim como os morfotipos *Penicillium* sp. 04, 19 e 27. Foi visualizado a produção de várias substâncias luminescentes não identificadas dos morfotipos não identificados, o que pode auxiliar na identificação desses morfotipos e caracterizarem compostos de interesse industrial. As áreas foram heterogêneas em diversidade, riqueza e composição de espécies. Capim e Eucalipto foram mais representativas em riqueza e abundância de espécies. Alguns atributos do solo foram altamente associados à ocorrência e abundância das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* nos solos. As espécies avaliadas nesse trabalho, possivelmente são resistentes a Fe, Mn, Cu, Al e S e presumivelmente podem ser utilizadas na biorremediação de sítios contaminados.

Palavras chave: Taxonomia polifásica, fungos filamentosos e micotoxinas.



## ABSTRACT

Brazil has the largest global diversity index, however we have witnessed the high percentage of environmental devastation. Maintaining species in the laboratory, together with innovation, are the best alternative to maintain that diversity. The soil is considered to be a mosaic of micro-habitats, due to its heterogeneity and complexity, and thus is a major ecosystems for the development of microbial populations. This microflora, fungi represent a large part of the biomass, and are of great importance. *Aspergillus* and *Penicillium* are the most important genera of fungi related human activities and the exclusive study of these in the soil is unusual. This study evaluated the diversity of fungi *Aspergillus* and *Penicillium* isolated from soil of five distinct areas in the Iron Quadrangle, and evaluated its potential toxigenic and correlations with soil nutrients. Twenty soil samples were collected, and for each of these samples, serial dilutions were made in DG18 and DRBC means. The species of *Penicillium* and *Aspergillus* were identified by morphological characteristics. The characterization of the unidentified isolates was performed using microscopy and the colonies pictures, as well as phylogenetic study of some of them. The production ocrtoxina A (OTA), citrinin and aflatoxins B1, B2, G1 and G2 was assessed by Thin Layer Chromatography. Diversity, richness and composition of species, and their relationship with soil properties was verified. They were isolated in 1984 specimens belonging to 88 different morphotypes, 50 of these unidentified. An isolate of *A. ochraceoroseus* been identified and may be the only specimen found outside the Ivory Coast. Phylogenetic analysis of unidentified morphotypes was inconclusive, requiring more genes to confirm the species. All isolates of *A. carbonarius* produced OTA; any isolated from *A. niger* and *A. niger* aggregate OTA produced; all isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus* produced the respective aflatoxins. All *P. citrinum* produced citrinin, together with *Penicillium* sp. 04, 19 and 27. Luminescent several unidentified substances were produced by unidentified morphotypes, which can help identify these and can be compounds of industrial interest. The areas were heterogeneous in diversity, richness and species composition. Grass and Eucalyptus were more representative in richness and abundance of species. Some soil attributes were highly associated with the occurrence and abundance of species of *Aspergillus* and *Penicillium* in soils. The species evaluated in this work, are possibly resistant Fe, Mn, Cu, Al and S and can presumably be used in bioremediation of contaminated sites.

Key words: Polyphasic taxonomy, filamentous fungi and mycotoxins.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1	Número de espécies por filo, 10ª edição do “Dictionary of the fungi” .....	25
Figura 2	Micromorfologia de <i>Penicillium</i> .....	32
Figura 3	Micromorfologia de <i>Aspergillus</i> .....	34
Figura 4	Estrutura molecular da Ocratoxina A.....	38
Figura 5	Estruturas moleculares das Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1.....	39
Figura 6	Estrutura molecular da Citrinina.....	40

### CAPÍTULO 2

Figura 7	Áreas amostradas na Mina Córrego do Meio, Sabará, MG, Brasil.....	57
Figura 8	Precipitação (mm) e temperatura média compensada (° C) para Belo Horizonte no período de 2000 a 2013.....	57
Figura 9	Esquema de amostragem do solo.....	58
Figura 10	Pontos de coleta, CeBio - Mina do Córrego do Meio, Sabará, MG.....	59
Figura 11	Diluição Seriada em DRBC (esquerda) e DG18 (direita)	71
Figura 12	Macro e micromorfologia de <i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> var. <i>niger</i> , <i>A. niger</i> agregado, <i>A. aculeatus</i> , <i>A. carbonarius</i> e <i>A. sulphureus</i> .....	80
Figura 13	Macro e micromorfologia de <i>A. clavatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>A. candidus</i> e <i>A. ochraceoroseus</i>	81
Figura 14	Macro e micromorfologia de <i>P. citreonigrum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. decumbens</i> , <i>P. spinulosum</i> , <i>P. sclerotiorum</i> e <i>P. multicolor</i> .....	87
Figura 15	Macro e micromorfologia de <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. solitum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. raistrickii</i> e <i>P. fellutanum</i> .....	88
Figura 16	Macro e micromorfologia de <i>P. janthinellum</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. simplicissimum</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. paxillie</i> e <i>P. waksmanii</i> .....	89
Figura 17	Macro e micromorfologia de <i>P. citrinum</i> , <i>P. cosmopolitanum</i> , <i>P. miczynskii</i> , <i>P. janczewskii</i> , <i>T. funiculosus</i> e <i>T. variabilis</i> .....	90
Figura 18	Macro e micromorfologia de <i>T. purpurogenus</i> e <i>T. minioluteus</i> .....	91
Figura 19	Caracterização do morfotipo <i>Aspergillus</i> sp. 01.....	101
Figura 20	Caracterização do morfotipo <i>Aspergillus</i> sp. 02.....	102
Figura 21	Caracterização do morfotipo <i>Aspergillus</i> sp. 03.....	103

Figura 22	Caracterização do morfotipo <i>Eupenicillium</i> sp. 01.....	104
Figura 23	Caracterização do morfotipo <i>Eupenicillium</i> sp. 02.....	105
Figura 24	Caracterização do morfotipo <i>Eupenicillium</i> sp. 03.....	106
Figura 25	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 01.....	107
Figura 26	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 02 .....	108
Figura 27	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 03 .....	109
Figura 28	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 04 .....	110
Figura 29	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 05 .....	111
Figura 30	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 06 .....	112
Figura 31	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 07 .....	113
Figura 32	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 08 .....	114
Figura 33	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 09 .....	115
Figura 34	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 10 .....	116
Figura 35	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 11 .....	117
Figura 36	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 12 .....	118
Figura 37	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 13 .....	119
Figura 38	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 14 .....	120
Figura 39	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 15 .....	121
Figura 40	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 16 .....	122
Figura 41	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 17 .....	123
Figura 42	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 18 .....	124
Figura 43	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 19 .....	125
Figura 44	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 20 .....	126
Figura 45	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 21 .....	127
Figura 46	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 22 .....	128
Figura 47	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 23 .....	129
Figura 48	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 24 .....	130
Figura 49	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 25 .....	131
Figura 50	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 26 .....	132
Figura 51	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 27 .....	133
Figura 52	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 29 .....	134
Figura 53	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 30 .....	135
Figura 54	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 31 .....	136
Figura 55	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 32 .....	137
Figura 56	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 33 .....	138
Figura 57	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 34 .....	139
Figura 58	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 35 .....	140
Figura 59	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 36 .....	141
Figura 60	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 37 .....	142
Figura 61	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 38 .....	143

Figura 62	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 39 .....	144
Figura 63	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 40 .....	145
Figura 64	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 41 .....	146
Figura 65	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 42 .....	147
Figura 66	Caracterização do morfotipo <i>Penicillium</i> sp. 43 .....	148
Figura 67	Caracterização do morfotipo <i>Talaromyces</i> sp. 01 .....	149
Figura 68	Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia utilizando duas espécies de cada seção de <i>Penicillium</i> (editada).....	156
Figura 69	Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia do gênero <i>Talaromyces</i> (editada).....	157
Figura 70	Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1,B2,G1 e G2	160
Figura 71	Produção de citrinina em placa de Coconut Agar.....	160
Figura 72	Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de citrinina, OTA e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	161
<b>CAPÍTULO 3</b>		
Figura 73	Áreas amostradas na Mina Córrego do Meio, Sabará, MG, Brasil.....	177
Figura 74	Precipitação (mm) e temperatura média compensada (°C) para Belo Horizonte no período de 2000 a 2013.....	177
Figura 75	Esquema de amostragem do solo.....	178
Figura 76	Pontos de coleta, CeBio - Mina do Córrego do Meio, Sabará, MG.....	179
Figura 77	Representação gráfica da curva de rarefação da riqueza observada de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> nas áreas: Capim (CA), Eucalipto (EU), Canga (CG), Cerrado (CE) e Mata (MT).....	184
Figura 78	Diagrama da comparação das 20 amostras em termos de composição de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> pela análise multivariada de ordenação (MDS).....	186
Figura 79	Comparação das 20 amostras em termos de abundância das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> pela análise multivariada de ordenação (MDS).....	189
Figura 80	Diagramas das PCAs correlacionando atributos do solo a abundância de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> para: (A) Mata, (B) Cerrado, (C) Canga, (D) Capim e (E) Eucalipto.....	198



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Publicações de estimativas de diversidade de fungos.....	26
----------	--	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 2	Abreviações, descrição das áreas avaliadas e identificação geográfica dos pontos de coleta na Mina Córrego do Meio.....	56
Tabela 3	Valores médios da estimativa da população de fungos nas áreas Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado e Mata.....	69
Tabela 4	Total de isolados encontrados para <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> em DRBC e DG18.....	71
Tabela 5	Porcentagem de isolados encontrados por seção do gênero <i>Penicillium</i> .....	76
Tabela 6	Principais características dos morfotipos não identificados	94
Tabela 7	Morfotipos analisados e sequências de referência correspondentes à região gênica RPB2 depositadas no GenBank.....	153
Tabela 8	Produção de ocratoxina A (OTA) e Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) por espécies potencialmente produtoras e morfotipos não identificados dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	159

### CAPÍTULO 3

Tabela 9	Abreviações, descrição das áreas avaliadas e identificação geográfica dos pontos de coleta na Mina Córrego do Meio.....	176
Tabela 10	Diversidade, Riqueza, número de espécies e total de espécimes isolados nas áreas Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado e Mata.....	182
Tabela 11	Composição das espécies mais frequentes nas diferentes áreas e amostras.....	185
Tabela 12	Valores da ANOSIM para composição de espécies nas áreas Capim, Eucalipto, Canga, Cerrado e Mata.....	187
Tabela 13	Valores da ANOSIM para abundância de espécies nas áreas Capim, Eucalipto, Canga, Cerrado e Mata.....	190
Tabela 14	Resultados da análise de espécies indicadoras (ISA) nas áreas Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado e Mata.....	191
Tabela 15	Variâncias dos Componentes Principais das áreas Mata, Cerrado, Canga, Capim e Eucalipto.....	193



## APÊNDICES

Apêndice A	Número de isolados de cada espécie obtidos em cada área Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado, Mata e o total de isolados de cada espécie em todas as áreas.....	210
Apêndice B	Dados analíticos dos componentes do solo das amostras de Mata, Cerrado, Canga, Eucalipto e Capim.....	216
Apêndice C	Teores médios químicos e físicos nas áreas Capim (CA); Canga (CG); Cerrado (CE); Eucalipto (EU) e Mata (MT).....	218
Apêndice D	Correlação dos Componentes Principais para as áreas Mata, Cerrado, Canga, Capim e Eucalipto.....	219
Apêndice E	Espécies avaliadas na Análise de Componente Principais.....	222



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	22
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Estimativas de biodiversidade de fungos.....	24
2.2 O solo como habitat para microrganismos.....	27
2.3 Os gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> .....	29
2.3.1 História do gênero <i>Penicillium</i> .....	30
2.3.2 Biologia de <i>Penicillium</i> .....	31
2.3.3 Morfologia de <i>Penicillium</i> .....	32
2.3.4 História do gênero <i>Aspergillus</i> .....	33
2.3.5 Biologia de <i>Aspergillus</i> .....	33
2.3.5 Morfologia de <i>Aspergillus</i> .....	34
2.4 Taxonomia de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	35
2.5 Micotoxinas de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	37
2.6 Centro de Biodiversidade da Vale no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	44
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	54
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1 Localização das áreas de coleta.....	56
2.2 Desenho amostral e coleta.....	58
2.3 Isolamento dos fungos.....	60
2.3.1 Contagem de UFCs e avaliação dos meios DG18 e DRBC.....	60
2.4 Purificação e identificação de fungos filamentosos.....	61
2.4.1 Identificação fenotípica das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> .....	61
2.4.2 Identificação fenotípica das espécies do gênero <i>Penicillium</i> .....	62
2.5 Caracterização dos morfotipos não identificados.....	62
2.6 Análises moleculares e filogenia.....	63
2.6.1 Extração de DNA.....	63
2.6.2 PCR, sequenciamento e análises filogenéticas.....	64
2.7 Detecção da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 pelo método de Plug Agar.....	65
2.7.1 Detecção da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina nos morfotipos não identificados.....	66
2.8 Detecção da produção de citrinina por <i>Penicillium citrinum</i> pelo método de Coconut Agar.....	66

2.9 Análises Estatísticas.....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1 Estimativa da população fúngica total das amostras e comparação dos meios DRBC e DG18 utilizados no isolamento.....	68
3.2 Espécies identificadas dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	72
3.2.1 Espécies identificadas de <i>Aspergillus</i> e principais marcadores morfológicos.....	76
3.2.2 Espécies identificadas de <i>Penicillium</i> e principais marcadores morfológicos.....	82
3.2.3 Morfotipos não identificados.....	91
3.3 Análises filogenéticas.....	150
3.4 Avaliação das espécies produtoras de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	158
3.5 Avaliação da produção de citrinina pelos métodos plug ágar e Coconut Agar.....	160
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	162
5 CONCLUSÃO.....	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	164
<b>CAPITULO 3.....</b>	<b>174</b>
1 INTRODUÇÃO.....	174
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	176
2.1 Localização das áreas de coleta.....	176
2.2 Desenho amostral e coleta.....	178
2.3 Análise dos dados.....	180
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	182
3.1 Diversidade, Riqueza e Composição.....	182
3.2 Abundância e análise de espécies indicadoras.....	188
3.3 Análise de Componentes Principais.....	193
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	162
5 CONCLUSÃO.....	204
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	206
APÊNDICE.....	210

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem o maior índice de diversidade biológica global, com aproximadamente 20% do total das espécies conhecidas da biosfera (OLIVEIRA et al., 2006; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010), e, possui dois biomas endêmicos: a Mata Atlântica e o Cerrado, três grandes ecossistemas marinhos e seis biomas terrestres, com uma média de 700 novas espécies de animais descobertas por ano (BRASIL, 2015; MITTERMEIER et al., 1992). Entretanto, apesar de toda essa megadiversidade, o país tem testemunhado a percentuais elevados de devastação ambiental como agricultura, mineração, urbanização e desmatamento que levaram o Cerrado e a Mata Atlântica serem considerados como hotspots para a conservação (LEWINSOHN e PRADO, 2002; MITTERMEIER et al., 1999; ZARI, 2014).

A idéia de conservação estática da biodiversidade, como por exemplo manter intacta uma determinada área ou a armazenagem de material biológico, vem desaparecendo nos últimos anos e sendo substituída pela idéia de uma conservação dinâmica, através da noção de recurso e inovação. Novos acordos governamentais estabelecem que os países devem conservar sua biodiversidade, desenvolver recursos para sustentabilidade e partilhar os benefícios resultante de seu uso.

O solo abriga uma considerável parte da diversidade de fungos do planeta, sendo considerado seu ambiente primário. Entretanto, ainda não há uma boa estimativa do número de espécies de fungos do solo. Estes, são importantes componentes da microbiota, constituindo a maior biomassa quando comparado a outros organismos, dependendo das condições nutricionais do ecossistema. Estão envolvidos em processos como agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, estabelecimento de relações simbióticas e controle de pragas e doenças.

O isolamento de *Aspergillus* e *Penicillium* do solo é comum, já que as condições são favoráveis para o seu crescimento, principalmente pela abundância de compostos orgânicos neste ecossistema. E devido a essa ampla ocorrência de ambos os gêneros no solo, o isolamento e identificação de suas espécies pode contribuir para um melhor entendimento da estrutura da comunidade do solo e da função dessas espécies nesse ecossistema.

A presença de metais pesados no solo pode alterar a composição microbiológica, levando a uma diminuição da biodiversidade, entretanto pode também acarretar na seleção de linhagens resistentes ao impacto proveniente da exploração de minérios, e estas podem apresentar potencial biotecnológico ainda inexplorado.

Sobre tudo, é instigante avaliar a biodiversidade de ambientes de pós-mineração, visto que este ambiente foi completamente alterado e apresenta características diferentes de solos de cultivo, de florestas ou urbano. Além disso, a presença de grande quantidade de minério faz com que possivelmente a microbiota do solo seja específica e adaptada. Nessa perspectiva, o estudo de *Aspergillus* e *Penicillium* dessas áreas é necessário e de grande importância científica, principalmente com o propósito de contribuir para o conhecimento da diversidade de fungos desses ambientes pouco estudados. Também contribuirá para a taxonomia microbiana em Minas Gerais, principalmente taxonomia de fungos, aumentando o conhecimento sobre a diversidade de *Aspergillus* e *Penicillium*.

Nesse contexto, os isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificados, classificados fenotipicamente e avaliados quanto a produção de micotoxinas. Além disso, também foram avaliadas a riqueza e a abundância das espécies obtidas e suas correlações com os constituintes dos diferentes solos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

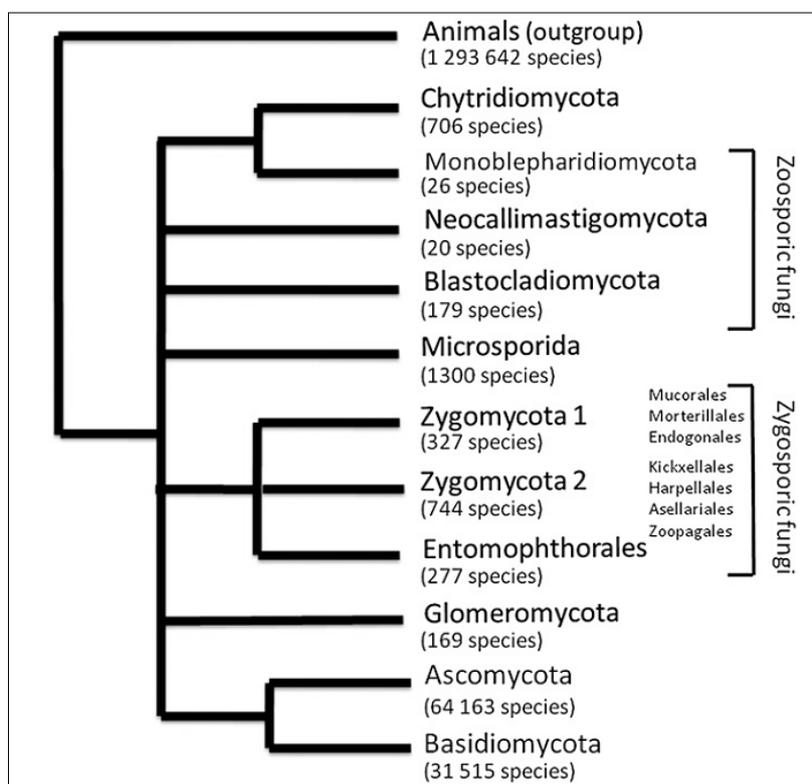
### **2.1 Estimativas de biodiversidade de fungos**

De forma simples, biodiversidade pode ser definida como a diversidade dos seres vivos e, há aproximadamente 20 anos, este termo e conceito têm adquirido um uso amplo, não só entre especialistas da área como também, líderes políticos e cidadãos informados em todo mundo. Este uso coincidiu com o aumento da preocupação ecológica e de extinção de espécies, iniciada nas últimas décadas do Século XX. Ou seja, perder sem ao menos ter a chance de conhecer (BRASIL, 2015).

Estimativas da biodiversidade de fungos são produzidas há muitos anos, a primeira mais descrita delas para espécies já identificadas, foi a edição inicial do “Dictionary of the fungi”, que apresentava 38.000 espécies. Hoje, na décima edição, o dicionário quase triplicou esse número, chegando a 99.000 espécies (KIRK et al., 2008). Desse número, os filos com mais representantes são, sem dúvida, Ascomycota e Basidiomycota (Figura 1).

Outra estimativa bastante discutida pelos micologistas é a chamada “estimativa G” proposta por Hawksworth em 1991, onde é apresentado um total de espécies fúngicas hipotéticas de 1,5 milhões. Esse número foi proposto com base em pesquisas anteriores e, na proporção de fungos por planta (6:1) encontrados nas ilhas britânicas. Entretanto, muitos autores, incluindo o próprio Hawksworth (HAWKSWORTH, 2012), consideram esta estimativa conservadora, por basear-se no local com menor diversidade de plantas vasculares do mundo comparados à América do Norte e Central e, além disso, não incluírem fungos encontrados associados a insetos e outros substratos (BLACKWELL, 2011; FRÖHLICH e HYDE, 1999; HAWKSWORTH, 2001; MUELLER e SCHMIT, 2007; SIMÔES et al., 2013).

**Figura 1** – Número de espécies por filo, 10ª edição do “Dictionary of the fungi”.



Fonte: Blackwell (2011).

A partir desse pressuposto, diversos autores publicaram estimativas para espécies fúngicas (Tabela 1). Entretanto, estudos recentes com a utilização de métodos moleculares em amostras ambientais de solo, revelaram alto índice de acumulação de novas espécies, e estes dados suportaram novas estimativas de 3,5 a 5,1 milhões de fungos (BLACKWELL, 2011; JUMPPONEN e JOHNSON, 2005; O'BRIEN et. al., 2005;).

Mesmo com as muitas tentativas de compilar as informações disponíveis sobre a diversidade de fungos, estes dados não podem ser usados para estimar com rigor a diversidade global de fungos (BLACKWELL, 2011). Pois, além da difícil estimativa, a taxonomia dos fungos evolui

continuamente com redefinições sucessivas da árvore da vida, isto é, constantes mudanças nos esquemas taxonômicos dos fungos, como por exemplo o novo conceito proposto de "um fungo um nome", para evitar nomes diferentes para os estados de fungos anamórficos e teleomórficos (SIMÕES et al., 2013).

A falta de informações básicas e mais precisas sobre a diversidade taxonômica de fungos tem implicações significativas em muitos aspectos, como por exemplo, na biologia evolutiva, hipóteses filogenéticas, relações coevolutivas e o papel que a biodiversidade desempenha no fornecimento de resiliência a perturbações. Dessa forma, ter uma estimativa estável e aceita de diversidade taxonômica de fungos é também necessário, para permitir que fungos sejam incluídos em propostas governamentais de conservação da biodiversidade e assuntos relacionados à preservação (MUELLER e SCHMIT, 2007).

**Tabela 1** – Publicações de estimativas de diversidade de fungos.

<b>Autor</b>	<b>Data</b>	<b>Estimativa de espécies (comentários)</b>
Hawksworth	1991	1,5 milhões
Hammond	1992	1 milhão
Smith and Waller	1992	1 milhão (somente em plantas tropicais)
Hywel-Jones	1993	1,5 milhões (fungos de insetos)
Rossmann	1994	1 milhão
Dreyfuss and Chapela	1994	1,3 milhões (somente endofíticos)
Hammond	1995	1,5 milhões
Shivas and Hyde	1997	0,27 milhões (somente patógenos de plantas)
Aptroot	1997	0,04-0,07 milhões (Ascomycetos)
Cannon	1997	9,9 milhões
Guzmán	1998	0,2 milhões (somente no México)
Fröhlich and Hyde	1999	1,5+ milhões (muito conservadora)
May	2000	0,5 milhões
Arnold et al.	2000	1,5+ milhões
Crous et al.	2006	0,17 milhões (somente na África do Sul)

Fonte: Mueller e Schmit (2007).

## 2.2 O solo como habitat para microrganismos

O solo é constituído por uma coleção de corpos naturais tridimensionais resultantes dos fatores de formação do solo, assim como matéria orgânica viva e morta (SANTOS et al., 2008).

O habitat do solo é definido como o conjunto de organismos vivos que habitam o solo, incluindo plantas, animais e microorganismos e seu ambiente abiótico. A natureza exata desse habitat é determinada por uma complexa interação de geologia, clima e vegetação, isto é, interação entre material mineral e orgânico com a temperatura, pluviosidade, altitude, latitude, exposição ao sol, ao vento, e muitos outros fatores. Isto faz do solo, um habitat extremamente peculiar com relação a outros habitats terrestres, em vista de sua natureza heterogênea, complexa e dinâmica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; PAUL, 2015). Tais características permitem que microrganismos com metabolismos díspares possam conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes com relações de dependência essenciais para sua sobrevivência, proporcionando, assim, condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Atualmente, sabe-se que o metabolismo e a sobrevivência dos microrganismos são fortemente influenciados pelo tipo de solo e diversos fatores ambientais. A estrutura das comunidades microbianas também está relacionada a fatores, tais como: tamanho de partículas, pH, capacidade de intercambio de íons, conteúdo de matéria orgânica, concentração de oxigênio e temperatura (GARBEVA et al., 2004). Em contraste com outros habitats, ambientes superficiais do solo podem sofrer alterações drásticas de suas características e, como consequência, a composição das comunidades microbianas do solo flutua bastante (DANIEL, 2006).

A maioria dos processos naturais têm o solo como o centro dinâmico, crítico e regulador e, este, não só abriga uma grande proporção da biodiversidade da Terra, mas também fornece substrato físico para a maioria

das atividades humanas. Embora, os solos já tenham sido amplamente estudados e classificados quanto às características físicas e químicas, o conhecimento de sua biodiversidade e função no ecossistema é muito mais complexo (COLEMAN et al., 2004). A exemplo disso, enquanto milhões de bactérias e fungos são frequentemente encontrados em solo fértil e de superfície, apenas cerca de 0,1% de taxa microbianos foram cultivados e seu papel entendido em solos mais profundos ou distantes da rizosfera (BARRIOS, 2007).

A microbiota do solo possui representantes de todos os grupos (bactérias, fungos, algas e vírus) que desempenham papel fundamental nos processos que afetam funções do ecossistema (AZEVEDO et al., 2010). Estima-se que microrganismos estão envolvidos em mais de 80% das reações que ocorrem no solo. Desses microrganismos, os fungos representam, na maioria dos habitats do solo, grande parte da biomassa microbiana, onde desempenham papel importante como decompositores de substratos complexos e participam do ciclo natural do carbono, nitrogênio e fósforo, representando até 90% da produtividade primária líquida desses elementos na maioria dos ecossistemas terrestres (BELL et al., 2009; JOERGENSEN e WICHERN, 2008; PAUL, 2015).

O sucesso na colonização e riqueza de fungos no solo está relacionado à sua habilidade saprofítica e competitiva, rápido crescimento micelial, produção de esporos, produção de enzimas, assim como, tolerância a agentes alopáticos, salinidade, metais pesados, fungicidas naturais e a temperatura (AZEVEDO et al., 2010).

Muitos fungos que habitam o solo são considerados sapróbios, ou seja, que decompõem a matéria orgânica e contribuem para a ciclagem dos nutrientes, outros formam micorrizas com diversas espécies de plantas (PFENNING e ABREU, 2006). Os gêneros de fungos filamentosos não formadores de micorrizas mais comumente encontrados no solo são representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007). Esses

microrganismos possuem a capacidade de secretar enzimas no meio ambiente e essas, auxiliam na degradação de produtos e compostos.

É amplamente encontrado na literatura que espécies do gênero *Aspergillus* são mais encontradas em solos tropicais, enquanto espécies de *Penicillium* são mais comumente encontradas em solos de regiões temperadas, também chamados solos boreais. Fungos pertencentes aos dois gêneros encontrados em solo são amplamente empregados em processos biotecnológicos, devido à produção de enzimas, antibióticos e outros compostos de proveito industrial (PAUL, 2015; SCHUSTER et al., 2002).

Recentemente, fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido amplamente estudados quanto sua capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis (CHANG e YANG, 2009; NARSIAN et al., 2010). Estes microrganismos fosfato solubilizadores podem transformar a forma insolúvel de fosfatos em forma solúvel por meio de quelação, reações de troca iônica e principalmente acidificação (WANG et al., 2007). Portanto, a presença desses microrganismos solubilizadores de fosfato no solo pode não só compensar o elevado custo de fabricação de fertilizantes fosfatados, como também reduzir a poluição causada pelos tradicionais métodos químicos de produção de fertilizantes fosfatados (KAPRI e TEWARI, 2010).

### **2.3 Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus***

Até 2011 os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* entre outros estavam compreendidos dentro da família Trichocomaceae. Contudo, com a mudança do novo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas esta família foi subdividida em: Aspergillaceae (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Hamigera*, *Leiothecium*, *Monascus*, *Penicilliopsis*, *Phialomyces*, *Sclerocleista*, *Warcupiella* e *Xeromyces*), Trichocomaceae (*Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Talaromyces*, *Thermomyces* e *Trichocoma*) e Thermoascaceae (*Byssochlamys/Paecilomyces* e *Thermoascus*)

(HOUBRAKEN e SAMSON, 2011; PETERSON, 2012; VISAGIE et al., 2014).

A família Aspergillaceae está compreendida na ordem Eurotiales, classe Eurotiomycetes e filo Ascomycota. Ambos, *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados os gêneros economicamente mais importantes desse filo, e são conhecidos por apresentarem impactos positivos e negativos sobre as atividades humanas. Algumas espécies pertencentes à família Aspergillaceae possuem propriedades fisiológicas bastante diversas como, por exemplo: crescem em baixa atividade de água, em baixas ou altas temperaturas, além de níveis de baixa acidez e oxigênio (HOUBRAKEN et al., 2014).

Devido à sua ampla distribuição geográfica *Aspergillus* e *Penicillium* são sempre encontrados em solos no mundo todo, onde são caracterizados como decompositores de matéria orgânica e bons produtores de enzimas. (COUTINHO et al., 2012).

### **2.3.1 História do gênero *Penicillium***

O nome *Penicillium* foi introduzido a primeira vez por Heinrich Friedrich Link em 1809, e é derivado de *Penicillus*, que significa "pequeno pincel". Diversos trabalhos surgiram no século 19 sobre o gênero, entretanto Dierckx (1901) foi o primeiro pesquisador a introduzir um sistema de classificação secundária, incluindo os subgêneros *Aspergilloides*, *Eupenicillium*, e *Biverticillium* (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011).

A monografia “The Penicillia” escrita por Thom (1930) foi uma das mais importantes contribuições para o conhecimento desse gênero. Nela, o autor classificou de forma ordenada (a partir de características da colônia e ramificações dos conidióforos), *Penicillium* em quatro subgêneros, 12 seções e 18 subseções (PITT, 1979). Outro trabalho fortemente reconhecido foi realizado por Pitt (1980), que introduziu novos nomes, designou neótipos de muitas espécies, separou *Eupenicillium* de *Penicillium* (seção) e subdividiu

antigos gêneros em séries, resultando em quatro subgêneros, 10 seções e 21 em séries (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011).

Vários autores iniciaram os estudos de filogenia do gênero *Penicillium* e os dados indicaram que os sistemas de classificação com base em morfologia da colônia e ramificação de conidióforos não é congruente com a filogenia, necessitando de uma junção de técnicas, a chamada taxonomia polifásica, para a classificação mais precisa deste gênero. Além disso, o pleomorfismo evidente nesse gênero fez com que os estados anamorfos e teleomorfos de algumas espécies fossem separados em espécies distintas. A partir de então diversas novas revisões foram propostas sobre este gênero e as mais recentes destas apresentam: a transferência de espécies do subgênero *Biverticillium* ao novo gênero *Talaromyces*, a inclusão de quatro espécies antes descritas no gênero *Aspergillus* e a exclusão de algumas espécies (SAMSON et al., 2011; VISAGIE et al., 2014).

### **2.3.2 Biologia de *Penicillium***

*Penicillium* ocorre de forma generalizada em ambientes terrestres e é encontrado inclusive em ambientes aquáticos. Este gênero compreende mais de 350 espécies descritas e muitas são habitantes comuns do solo, bem como produtos agrícolas, industrializados e alimentos em deterioração (FRISVAD e SAMSON, 2004; PITT e HOCKING, 2009; VISAGIE et al., 2014).

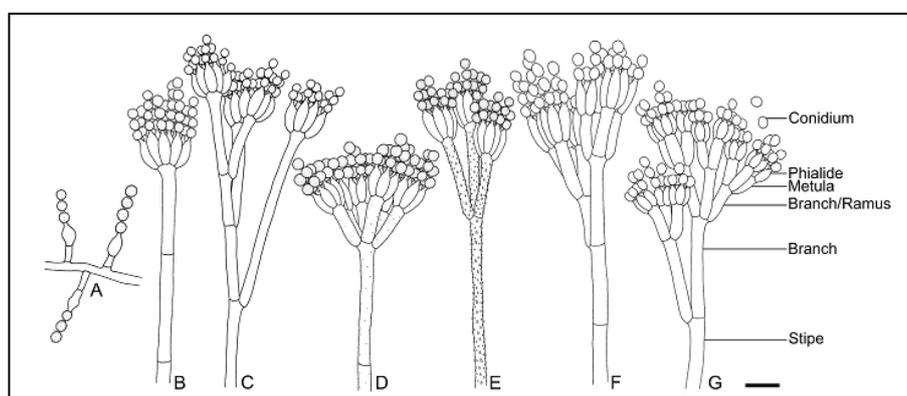
Desde a descoberta da penicilina espécies de *Penicillium* têm sido avaliadas, e com sucesso, quanto à produção de diversificados tipos de metabólitos secundários ativos, incluindo substâncias antibacterianas (PETIT et al., 2009), antifúngicas (NICOLETTI et al., 2007), imunossupressores, corantes (AKILANDESWARI e PRADEEP, 2016; CELESTINO et al., 2014) e também micotoxinas potentes (FRISVAD e SAMSON, 2004), e muitas dessas espécies, fonte de novos produtos inovadores e fármacos, foram isoladas de solo. Além disso, produzem diversas enzimas de interesse

industrial, e algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole e micoparasitismo (PALLU, 2010).

### 2.3.3 Morfologia de *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é caracterizado por produzir cadeias longas de conídios, a partir de verticilos das fiálides. As fiálides apresentam pescoço curto, paredes lisas e, por vezes, sua forma pode ser utilizada na identificação de espécies, podendo apresentar formato de garrafa, ampulhiforme (formato de ampulheta) e aciculado (formato de agulha). As fiálides podem originar-se diretamente de uma estipe (haste ereta de hifa), caracterizando *penicilli* monoverticilado; sobre métulas, caracterizando *penicilli* bivericilado; ou ainda sobre métulas, que por sua vez, originam-se de um ou mais ramos, caracterizando *penicilli* ter ou polivericilado (Figura 2) (PITT, 2000a).

**Figura 2** – Micromorfologia de *Penicillium*.



A: Conidióforos com fiálides solitárias; B: Monoverticilado; C: Divaricato; D e E: Bivericilado; F: Terverticilado; G: Polivericilado.

Fonte: Visagie et al., (2014).

### **2.3.4 História do gênero *Aspergillus***

*Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli e em seguida os autores Tom e Church em 1926, publicaram a primeira monografia sobre o gênero. O nome *Aspergillus* foi dado pela primeira vez devido à semelhança de sua estrutura assexual com um instrumento, *aspergillum* ou *asperge*, utilizado pela Igreja Católica para aspergir água benta (GIBBONS e ROKAS, 2013). Desde então, as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* ficaram cada vez mais conhecidas devido às suas características benéficas, e por vezes prejudiciais ao homem e, este gênero, passou a ser amplamente estudado (BENNETT, 2010; GEISER et al., 2007). A última revisão de *Aspergillus* realizada por Samson e colaboradores (2014), sugere que este gênero apresenta até o momento quatro subgêneros, dezenove seções e 339 espécies. Embora tenha sido bastante estudado, a sistemática desse gênero ainda apresenta constantes mudanças devido aos recentes estudos de filogenia molecular e quimiotaxonômicos (SAMSON e VARGA, 2009; SAMSON et al., 2014).

### **2.3.5 Biologia de *Aspergillus***

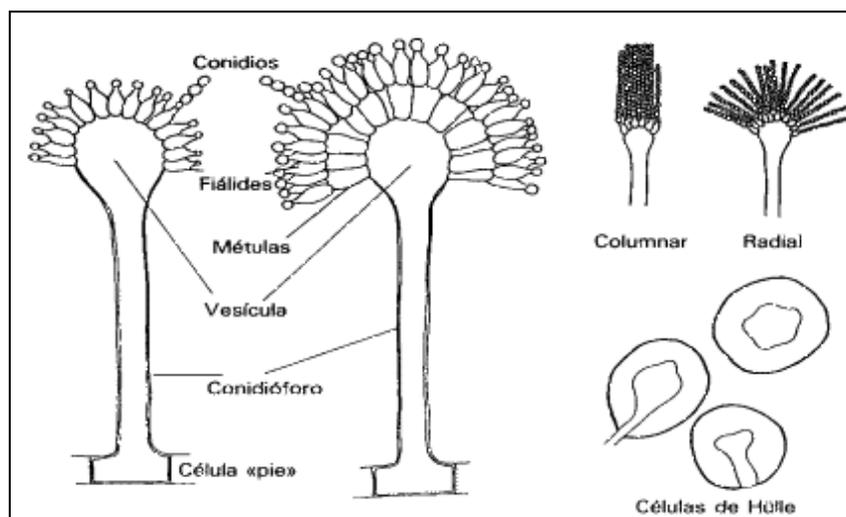
O gênero *Aspergillus* é bastante diverso, considerado cosmopolita e amplamente distribuído na natureza (KLICH, 2002b). As espécies desse gênero são costumeiramente reconhecidas por deteriorar alimentos (sapróbios), produzir micotoxinas e algumas são frequentemente descritas como patógenos humanos e animais. Além disso, muitas espécies são utilizadas na biotecnologia para a produção de uma variedade metabólitos, tais como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos, enzimas e como agentes em fermentações (SAMSON et al., 2014).

### 2.3.5 Morfologia de *Aspergillus*

A hifa ereta proveniente da célula pé é denominada conidióforo, o qual se dilata para dar origem a uma forma arredondada ou elíptica, dita vesícula. Na área fértil da vesícula são formadas células conidiogênicas, métulas e fiálides que produzem cadeias longas de esporos mitóticos, denominados conídios. Todo este aparato é denominado *aspergilli* (Figura 3), o qual pode ser bisseriado quando há métulas e fiálides, ou unisseriado quando apenas fiálides surgem da vesícula (BENNET, 2010).

Além do *aspergilli*, outras estruturas morfológicas podem auxiliar na identificação do gênero, são estas cleistotécios, escleródios e associadas a este, células de Hülle. O cleistotécio e o escleródio são estruturas capsulares, fechadas e esféricas que podem ser abundantes em colônias de algumas espécies de *Aspergillus*. O cleistotécio é característico do estágio sexual reprodutivo e contém ascósporos meióticos no interior do asco. A estrutura escleródio é composta por massas de micélio torneada e sua função está relacionada com a sobrevivência em condições adversas (BENNET, 2010).

**Figura 3** – Micromorfologia de *Aspergillus*.



Fonte: Control Calidad SEIMC.

## 2.4 Taxonomia de *Aspergillus* e *Penicillium*

O objetivo primário da taxonomia é proporcionar uma classificação que pode ser utilizada para diversos fins. É tradicionalmente dividida em três passos: classificação, isto é, o arranjo ordenado dos grupos; nomenclatura, isto é, dar nome aos grupos definidos na classificação e, identificação de organismos desconhecidos, isto é, o processo de determinar se um organismo pertence ou não aos grupos definidos na classificação (MOORE et al., 2010)

Identificação de espécies é uma meta importante na microbiologia taxonômica, e para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, ela é necessária devido às estreitas relações destes microorganismos com as atividades humanas. Informações sobre cada microrganismo como, por exemplo, descrição morfológica, fisiológica, propriedades bioquímicas, funções ecológicas e riscos ou benefícios sociais, são elementos chave neste processo (PETERSON, 2012; RODRIGUES et al., 2009).

As identificações, até o momento, principalmente de fungos filamentosos, não estão completamente consolidadas e frequentemente surgem revisões de esquemas taxonômicos. Estas alterações tornam a identificação ainda mais complicada para os pesquisadores não especializados, pois cada grupo taxonômico apresenta literatura, terminologia e características especializadas. Isso faz com que, muitas vezes, as identificações só possam ser realizadas por um grupo restrito de cientistas, “especialistas na arte” (SIMÕES et al., 2013).

Destarte, a taxonomia de fungos nos últimos anos tem reconhecido que a utilização de múltiplas técnicas em consórcio (morfológica, bioquímica e molecular) é a melhor forma de se chegar a um resultado mais preciso. Na realidade, isto significa que é recomendável combinar a análise tradicional fenotípica com abordagens fisiológicas modernas e biologia molecular, a chamada taxonomia polifásica, para a identificação correta de espécies (RODRIGUES et al., 2011).

A primeira metodologia utilizada neste processo é morfologia (macro e micro morfologia) seguida da bioquímica e da biologia molecular. Devido aos custos e tempo de resposta, a biologia molecular é normalmente usada como a última metodologia na abordagem polifásica (SANTOS et al., 2010).

O principal método para identificação e classificação de fungos filamentosos ainda permanece a morfologia porque, de maneira geral, fungos filamentosos têm traços morfológicos mais distintos do que, por exemplo, bactérias e leveduras unicelulares (SANTOS et al., 2010). A identificação de fungos filamentosos por morfologia é considerada difícil, demorada, e decisões sobre o que representa uma espécie tendem a ser um pouco subjetivas. Todavia, gêneros de fungos muito conhecidos, com características microscópicas bem definidas e diversos marcadores morfológicos como *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sua identificação sendo realizada com sucesso, há muitos anos, por muitos pesquisadores.

A identificação contínua de espécies de gêneros com grande relevância em área ambiental, tais como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, entre outros, tradicionalmente, tem-se baseado na caracterização morfológica. Características como formato de conídios, coloração e ornamentação são consideradas como caracteres morfológicos primários para diagnóstico e identificação de espécies de fungos filamentosos (SIMÕES et al., 2013). Para alguns gêneros e/ou espécies, a diferenciação pode ser conseguida por meio de crescimento em diferentes condições (PITT, 1988; RODRIGUES et al., 2009; SANTOS et al., 2010). Uma vez que a morfologia e a cor da colônia varia com o uso de meios de cultura diferenciados, isto é determinante para a identificação morfológica fúngica. Além disso, alguns fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* podem produzir pigmentos solúveis e exudatos diferentes, dependendo das condições de crescimento, tais compostos, por vezes, podem auxiliar na identificação das espécies fúngicas (KLICH, 2002b; SAMSON et al., 2007).

A incorporação de caracteres bioquímicos, como por exemplo, enzimas e metabólitos secundários tais como micotoxinas, na taxonomia fúngica vem contribuindo para resolver problemas existentes em alguns gêneros. Diferentes classes de enzimas têm sido hoje utilizadas como características bioquímicas importantes para a caracterização de fungos. Isso ocorre pois, os fungos de maneira geral, são capazes de produzir enzimas incomuns a partir de reações químicas difíceis. Estes podem converter desde madeira à tintas, e até querosene em substratos viáveis com auxílio de seu aparato enzimático. Estas enzimas são um dos traços utilizados para o perfil bioquímico fúngico (SIMÕES et al., 2013).

Outro importante biomarcador utilizado na identificação de fungos são as micotoxinas. Estas, são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, que têm efeitos adversos para a saúde em animais e seres humanos. A maioria das micotoxinas são produzidas por três gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. (ABRAMSON et al., 2009). Algumas micotoxinas produzidas por espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, por exemplo, estão sendo amplamente utilizadas na identificação das espécies, como as aflatoxinas (AFLS) B e G, ácido ciclopiazônico (CPA), ocratoxina A (OTA) entre outras (RODRIGUES et al., 2011; SAMSON et al., 2007; VARGA et al., 2007).

## **2.5 Micotoxinas de *Aspergillus* e *Penicillium***

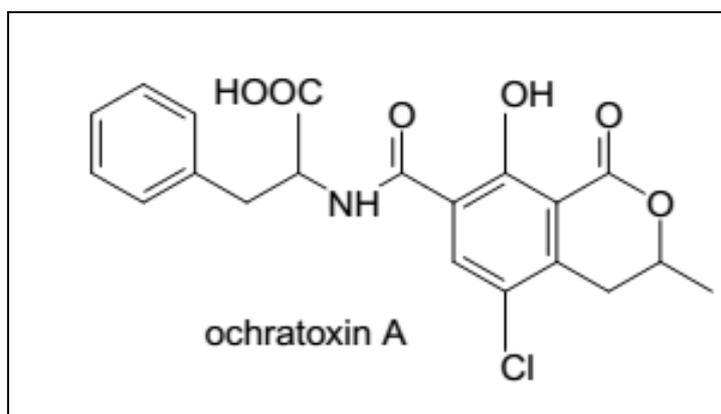
As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos sintetizados sob condições específicas por determinadas espécies de fungos filamentosos. Algumas destas toxinas permanecem restritas ao micélio fúngico, enquanto que a maior parte é secretada como extrólito (COPETTI et al., 2012).

Ocratoxina A (OTA) está entre as micotoxinas mais importantes e é produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Estes gêneros são capazes de crescer em climas bastante diversos e em várias espécies de plantas. Como conseqüente, a contaminação de culturas alimentares com

OTA pode ocorrer em todo o mundo. A ocratoxina A pode ser encontrada como contaminante natural em uma ampla gama de alimentos, tais como cereais, cerveja, vinho, cacau, café, uvas passas e especiarias, bem como em animais de corte e seus produtos (leite, carne, etc). Esta toxina tem mostrado efeito nefrotóxico, carcinogênico, imunotóxico, genotóxico e teratogênico a todas as espécies animais testadas (PFOHL-LESZKOWICZ e MANDERVILLE, 2007; VARGA e KOZAKIEWICZ, 2006).

A OTA é representada quimicamente por (7-(L-fenilalanil- $\beta$ -carbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-di-hidro-3R-metilisocumarina) (Figura 4). Apresenta propriedades fluorescentes (o que permite sua visualização em cromatovisor) e é altamente solúvel em solventes orgânicos polares (RINGOT e CHANGO, 2010).

**Figura 4** – Estrutura molecular da Ocratoxina A.



Fonte: Varga e Kozakiewicz (2006).

Os esporos fúngicos são geralmente inativados por vários processos químicos, físicos ou alterações ambientais a que são expostos, entretanto, as micotoxinas são compostos estáveis, não sendo completamente destruídas durante a maioria das operações de processamento de alimentos, o que pode levar à sua presença em produtos acabados (COPETTI et al., 2012).

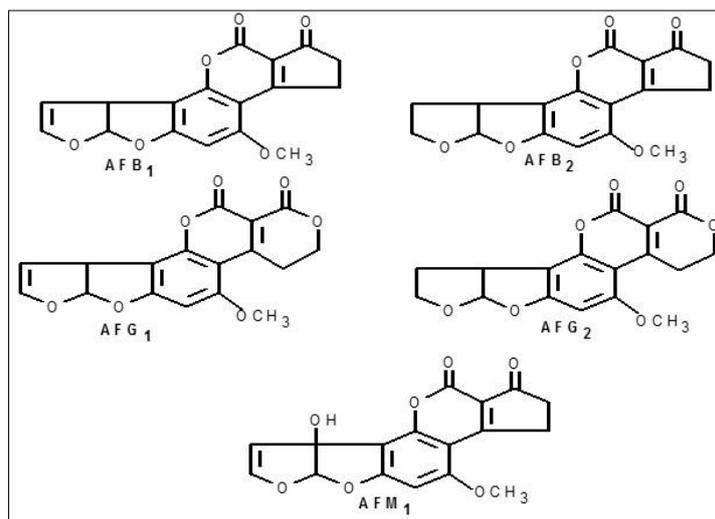
As aflatoxinas (Figura 5) são produzidas pelo gênero *Aspergillus*, mais comumente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, que são

ordinariamente difundidas na natureza. Estas micotoxinas são encontradas em diversos gêneros alimentícios, como milho, arroz, oleaginosas, frutas secas, amendoins, que foram indevidamente armazenados em condições insalubres (locais quentes e úmidos) (BENNETT e KLICH, 2003).

Há quatro aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2 que aparecem em azul e verde, respectivamente, sob luz UV. São conhecidas por serem cancerígenas para seres humanos e animais e, destas, a aflatoxina B1 é o agente hepatotóxico e hepatocarcinogênico mais potente. A Afl. B1 é teratogênica, carcinogênica, mutagênica, além de causar toxicidade aguda (HAMID et al., 2013).

Além dos danos a saúde, o impacto econômico da contaminação por aflatoxinas tornou-se uma preocupação mundial sobre o mercado agrícola, afetando cerca de 25% do abastecimento de alimentos do mundo, como estimado pela Food and Agriculture Organization (FAO). Bilhões de dólares são perdidos anualmente no mundo como resultado da presença das aflatoxinas (WOMACK et al., 2013).

**Figura 5** – Estruturas moleculares das Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1.



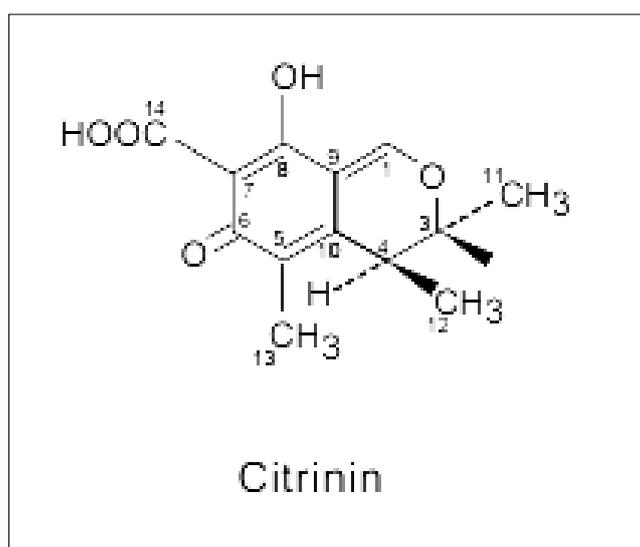
Fonte: Council for Agricultural Science and Technology (CAST).

A citrinina (Figura 6) foi isolada a primeira vez de *P. citrinum* em 1931. Esta, é um extrólito tóxico produzido por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Monascus* e *Penicillium*, principalmente este último (PITT e HOCKING, 2009).

Os fungos que produzem citrinina podem contaminar uma ampla gama de produtos alimentares, particularmente grãos armazenados, bem como frutas, ervas e especiarias (EFSA, 2012).

A citrinina possui atividade nefrotóxica, interrompendo as funções renais de todas as espécies animais testadas, além disso, também tem sido referida como sendo teratogênica, embriocida, fetotóxica e imunossupressora e em animais (XU et al., 2006).

**Figura 6** – Estrutura molecular da Citrinina.



Fonte: Council for Agricultural Science and Technology (CAST).

## **2.6 Centro de Biodiversidade da Vale no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais**

O Quadrilátero Ferrífero (QF) está localizado na porção centro-oeste do Estado de Minas Gerais. Abrange uma área de cerca de 7.000 km<sup>2</sup> e compreende cinco grandes conjuntos de unidades rochosas: Complexos metamórficos, Super-grupo Rio das Velhas, Super grupo Minas, Grupo Sabará e Grupo Itacolomi (DORR, 1969; RAMOS, 2016). Além disso, situa-se na zona limítrofe entre dois hotspots brasileiros: Mata Atlântica e o Cerrado.

Localiza-se adjacente ao limite austral da Cadeia do Espinhaço, e sua flora distribui-se em diversas formações vegetais, caracterizadas por um mosaico de influências biogeográficas. São encontradas na região do Quadrilátero Ferrífero formações florestais (Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila), savânicas (Cerrado sensu stricto, campos sujos e campos limpos) e rupestres (Campo Rupestre sobre Quartzito, Campo Rupestre sobre Canga e, mais raramente, Campos sobre Afloramento Granítico). A região conta com extrema diversidade florística, incluindo diversas espécies endêmicas, ameaçadas de extinção e de uso potencial como medicinais, ornamentais, alimentícias ou madeiras (ATAÍDE et al., 2011; VIANA, 2008).

A região do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais é reconhecida por sua vasta riqueza mineral, em função de importantes depósitos de ouro e reservas de ferro. Os solos presentes nesta região são muito diversificados quanto sua classificação, sendo predominante o latossolo vermelho com altos teores de ferro (AZEVEDO et al., 2012).

O Quadrilátero Ferrífero é considerado de “importância biológica extrema” para a conservação da biodiversidade no estado, em razão da grande diversidade geológica e sua riquíssima biodiversidade (AZEVEDO et al., 2012; COSTA, 1998). É considerada uma das regiões que apresentam maior diversidade florística da América do Sul com mais de 30% de

endemismo em sua flora (JACOBI e CARMO, 2008). Apesar disso, ainda é um ecossistema pouco estudado embora altamente ameaçado, principalmente por causa da intensa atividade mineradora associada a seus afloramentos de ferro (RAMOS, 2016).

A mina Córrego do meio é considerada a mais antiga na região do Quadrilátero Ferrífero. A mina de ferro sobre atual controle da Empresa Vale do Rio Doce S/A foi explorada durante 65 anos e desativada em 2005, estando em processo de recuperação ambiental desde então. Atualmente a mina abriga o Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero (CeBio) criado em 27 de junho de 2008 (AZEVEDO et al., 2012).

O CeBio apresenta grande representatividade de Campos Rupestres (Vegetação de Canga) e está inserido entre dois importantes hotspots brasileiros: a Mata Atlântica e o Cerrado. Estes são considerados regiões com maior biodiversidade do mundo, bem como áreas remanescentes do processo de mineração (Capim) e regiões reflorestadas com Eucalipto (RAMOS, 2016).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, D. et al. Production of patulin and citrinin by *Penicillium expansum* from British Columbia (Canada) apples. **Mycotoxin Res.**, v. 25, p. 85-88, 2009.
- ATAÍDE, E. S.; CASTRO, P. T. A.; FERNANDES, G. W. Florística e caracterização de uma área de Campo Ferruginoso no Complexo Minerário Alegria, Serra de Antônio Pereira, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. **Revista Árvore**, v.35, n.6, p.1265-1275, 2011.
- AZEVEDO, E.; FIGUEIRA, D.; CAEIRO, M.F.; BARATA, M. Biodiversity of filamentous fungi on soils and sands In: Rai,M.; Kövics, G. (Eds.). **Progress in Mycology**. New Pali, India: Scientific Publishers, 2010. p. 233-257.
- AZEVEDO, U.R. et al. Geoparque Quadrilátero Ferrífero (MG). **Geoparques do Brasil / Propostas**, v. 1, p. 183-220, 2012.
- BARRIOS, E. Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecological Economics**, v. 64, p. 269 -285, 2007.
- BELL, C.W. et al. Linking microbial community structure and function to seasonal differences in soil moisture and temperature in a Chihuahuan Desert Grassland. **Microbial Ecology**, v. 58, p.827-842, 2009.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 497-516, 2003.
- BENNETT, J. W. **An overview of the genus *Aspergillus***.2010. Disponível em: <<http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2015.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

CELESTINO, J. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Proc. Biochem.**, v. 49, p. 569-575, 2014.

CHANG, C.H.; YANG, S.S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1648-1658, 2009.

COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D.A.; HENDRIX, P.F. **Fundamentals of Soil Ecology**, 2. Ed. Elsevier Academic Press, Boston. 386p. 2004.

COSTA, C.M.R. **Biodiversidade em Minas Gerais: Um atlas para sua conservação**. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 237p.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames: Task Force Report, 2003. n. 139, 199 p.

COPETTI, M.V. et al. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 158-64, 2012.

COUTINHO, F.P.; FELIX, W.P.; YANO-MELO, A.M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85-89, 2012.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, v. 3, p. 470-478, 2006.

DORR, J. V. N. **Physiographic, stratigraphic and structural development of the Quadrilátero Ferrífero Minas Gerais, Brazil**. Washington: United States Government, 1969. 110 p.

EUROPE FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. **Eur. Food Saf. Auth. J.**, v. 10, p. 1-82, 2012.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. p. 535-556.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wiss Technology**, v. 13, p. 128-130, 1980.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174, 2004.

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

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

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Trans. Br. Mycol. Soc. British. Mycological Society**, v. 46, p. 235-244, 1963.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends Microbiol.**, v. 21, n. 1, p. 14-22, 2013.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Ver. 2.17c. **Palaeontologia Electrônica**, v. 4, n.1, p. 1-9, 2001.

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

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

HAWKSWORTH, D.L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, v. 21, p. 2425-2433, 2012.

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

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R.P.; SAMSON, R.A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 199-249, 2014.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Megadiversidade**, v. 4, p. 24-32, 2008.

JOERGENSEN, R.G.; WICHERN, F. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2977-2991, 2008.

JUMPPONEN, A.; JOHNSON, L.C. Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations: A case study from tallgrass prairie. **Mycologia**, v. 97, p. 1177-1194, 2005.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 787-795, 2010.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. Wallingford, UK:CABI, 2008. 784 p.

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

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002b. 116 p.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. 1. ed. São Paulo: Editora Contexto, 2002. 176 p.

LUDWIG, J.A.; REYNOLDS, J.F. **Statistical ecology: a primer of methods and computing**. New York: Wiley Press, 1988. 337 p.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. New Jersey: Princeton University Press, 1988. 179 p.

MICHELI, P. A. **Nova Plantarum Genera**. 1729.

MITTERMEIER, R.A.; AYRES, J.M.; FONSECA, G.A.B. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**, v. 14, p. 20-27, 1992.

MITTERMEIER, R.A. et al. **Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. 1. ed. Mexico City: CEMEX, 1999. 430 p.

MOORE, E.R.B. et al. Microbial systematics and taxonomy: Relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 430-438, 2010.

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

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

MULVANEY, M.J. et al. Carbon and nitrogen mineralization and persistence of organic residues under conservation and conventional tillage. **Agronomy Journal**, v. 102, n.5, p. 1425-1433, 2010.

NARSIAN, V.; SAMAHA, S.M.; PATEL, H.H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, p.57-62, 2010.

NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M. P.; MANZO, E.; CARELLA, A.; CIAVATTA, M. L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 295-301, 2007.

O'BRIEN, B.L. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5544-5550, 2005.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, p. 1-18, 2006.

PALLU, A.P.S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAUL, E.A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4th ed. Londres: Elsevier Academic Press, UK, 2015. 59 p.

PETERSON, S. W. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 339-344, 2012.

PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.

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

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 51, p. 61–99, 2007.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium***. London: Academic Press, 1979. 634 p.

PITT, J. I. **A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. Australia: Food Science Australia, 2000. 187 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Dordrecht Springer, 2009. 503 p.

RAMOS, T. C. D. A. **Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do Quadrilátero Ferrífero, MG**. 2016. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2016.

RINGOT, D.; CHANGO, A. **Mycotoxins in food, feed and bioweapons**. Noida, Índia: Verlag Berlin e Heidelberg: Springer, 2010. 406 p.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**. v. 111, p. 877-892, 2011.

RODRIGUES, P. et al. Polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi*

isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 187-193, 2009.

SAMSON, R.A. et al. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129-145, 2007.

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

SAMSON, R.A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 141-173, 2014.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v.70, p. 159-183, 2011.

SANTOS, M.L.M. et al. Solos e Ocupação das Terras na Amazônia Brasileira. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: Editora UFLA, p. 69-70, 2008.

SIMÕES, M.F.; PEREIRA, L.; SANTOS, C.; LIMA, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Eds.). **Management of Microbial Resources in the Environment**. Netherlands : Ed. Springer, 2013. 530 p.

TESFAMARIAM, I.G.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.G. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. **Oncology Letters**, v. 5, p. 1087-1092, 2013.

THOM, C.; CHURCH, M. **The Aspergilli**. Baltimore: Williams & Wilkins Comp., 1926. 272 p.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 75-88, 2007.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 72-81, 2006.

VIANA, P. L. A flora sobre os campos rupestres sobre canga no Quadrilátero Ferrífero. In: SIMPÓSIO AFLORAMENTOS FERRUGINOSOS NO QUADRILÁTERO FERRÍFERO, 1., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2008.1 CD-ROM.

VISAGIE, C.M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

XU, B.; JIA, X.; GU, L.; SUNG, C. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, v. 17, p. 271-285, 2006.

WANG, G. et al. Inoculation with phosphate-solubilizing fungi diversifies the bacterial community in rhizospheres of maize and soybean. **Pedosphere**, v. 17, p. 191-199, 2007.

WOMACK, E.D.; BROWNAB, A.A.E.; SPARKSA, D.L. A recent review of non-biological remediation of aflatoxin-contaminated crops. **J. Sci. Food Agric.**, v. 94, p. 1706-1714, 2014.

ZARI, M.P. Ecosystem Services Analysis in Response to Biodiversity Loss Caused by the Built Environment. **S.A.P.I.E.N.S.**, v. 7, P. 1-14, 2014.



## CAPÍTULO 2

### Identificação e Potencial Toxigênico de *Aspergillus* e *Penicillium* do Solo do Quadrilátero Ferrífero

#### 1 INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grande grupo de seres vivos que podem ser encontrados em quase todos os nichos ecológicos, sendo o solo o habitat mais rico nesses microorganismos. É inquestionável que os fungos são extremamente importantes na Terra como agentes de degradação. Eles são os principais microorganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, contribuindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes. Isto significa que o equilíbrio ambiental é altamente dependente da sua presença (TAUK, 1990).

Dentre os fungos mais comuns em solo estão *Aspergillus* e *Penicillium*, considerados os gêneros mais importantes de fungos filamentosos relacionados as atividades humanas. Estão presentes em diversos processos biotecnológicos, em transformações de alimentos, como agentes deteriorantes, solubilizadores de minerais, produtores de micotoxinas e como patógenos humanos.

Desde que o homem começou a conhecer melhor os seres vivos, sentiu a necessidade de os classificar, agrupar e organizar de maneira lógica e ordenada, de modo a facilitar o seu estudo e compreensão. Surgiu assim a taxonomia, hoje entendida como a ciência que inclui a classificação (ordenação), nomenclatura (designação ou nomeação) e a identificação (descrição e caracterização) dos seres vivos. Um organismo é formalmente conhecido pelos taxonomistas se for descrito de acordo com um conjunto de regras de nomenclatura (MACHADO, 2006).

A taxonomia de fungos evoluiu bastante nas últimas décadas, e a abordagem polifásica é hoje a mais adequada forma de identificação de

fungos filamentosos. A observação da morfologia das colônias, avaliação de compostos bioquímicos, auxiliadas por análises moleculares corroboram a identificação precisa de espécies. Na identificação morfológica, marcadores morfológicos são essenciais na diferenciação específica. Estes são características fenotípicas de fácil identificação visual, tais como forma, cor ou tamanho. Muitos marcadores morfológicos são importantes "descritores" de novas espécies.

Para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* características como: tamanho, forma e coloração da colônia; tamanho, forma e textura de conídios; tamanho e forma de vesículas; ramificação e, produção de pigmentos solúveis, exudatos e escleródios são importantes determinantes específicos e, algumas destas características, quando peculiares, podem ser identificadas como marcadores morfológicos da espécie.

Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem produzir ocratoxina A, citrinina ou aflatoxinas, que são extrólitos tóxicos com efeitos carcinogênicos, teratogênicos entre outros. Estes metabólitos secundários também podem ser empregados de forma positiva na identificação, como marcadores bioquímicos.

Dessa maneira, neste estudo foram identificadas as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* encontradas nos diferentes solos do Quadrilátero Ferrífero e averiguado seus potenciais toxigênicos. Além disso, as espécies não identificadas foram caracterizadas e avaliadas por técnicas bioquímicas e moleculares.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização das áreas de coleta

O estudo foi realizado em diferentes áreas da mina Córrego do Meio (19°51'41.23"S; 43°48'11.13"O), pertencentes à empresa Vale (Sabará – MG). A extração de minério ferro nessa mina foi totalmente desativada no ano de 2006. As cinco áreas avaliadas (Figura 7), descritas na Tabela 2, se localizam na unidade morfoestrutural do Quadrilátero Ferrífero e estão inseridas na sub-bacia hidrográfica do Rio das Velhas.

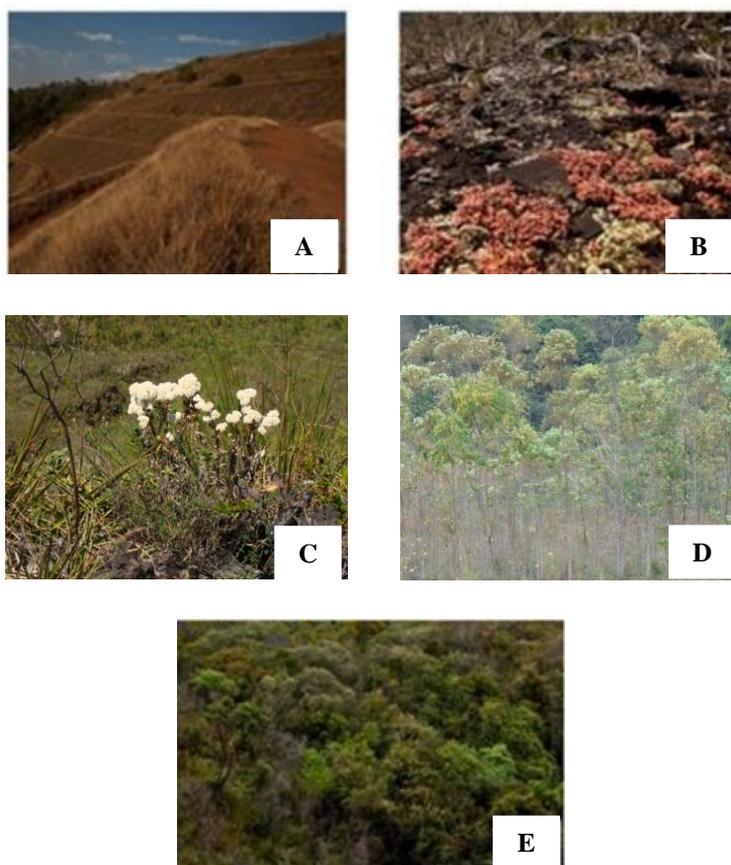
O clima predominante da região é tropical de altitude, Cwa de acordo com a classificação de Köppen, caracterizado por verões quentes e úmidos e invernos secos e frios. A precipitação média anual está em torno de 1700 mm, com pequeno período seco (Figura 8) e temperatura média em torno de 22°C.

**Tabela 2** – Abreviações, descrição das áreas avaliadas e identificação geográfica dos pontos de coleta na Mina Córrego do Meio.

Área	Descrição	Altitude (m)	Coordenadas
EU	Área de reflorestamento vegetada predominantemente com <i>Eucalyptus</i> spp.	926 a 971	0624909 7803671
CA	Área em processo de recuperação ambiental após mineração de ferro, revegetada com capim gordura ( <i>Melinis minutiflora</i> )	1041 a 1060	0625824 7803430
CE	Vegetação de cerrado preservada e com baixo grau de antropismo	992 a 1006	0625152 7803184
CG	Ambiente rupestre bastante preservado sobre afloramentos rochosos	1196 a 1201	0632410 7806420
MT	Vegetação secundária em diferentes estágios de regeneração natural, originalmente pertencente à Mata Atlântica	880 a 966	0625403 7803336

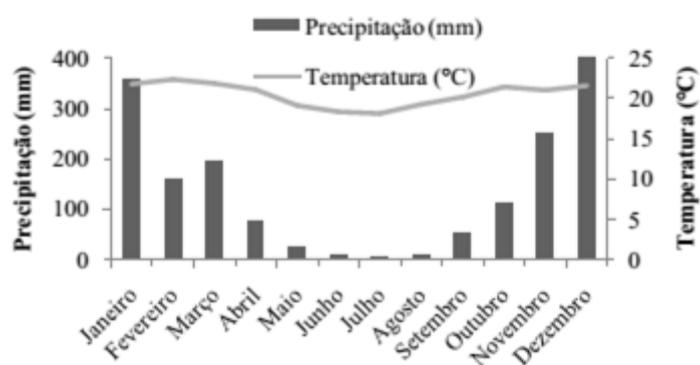
EU: Eucalipto; CA: Capim; CE: Cerrado; CG: Canga e MT: Mata.

**Figura 7** – Áreas amostradas na Mina Córrego do Meio, Sabará, MG, Brasil.



A: Capim; B: Canga; C: Cerrado, D: Eucalipto e E: Mata.  
Fonte: Teixeira, 2015 (modificado).

**Figura 8** – Precipitação (mm) e temperatura média compensada ( $^{\circ}$  C) para Belo Horizonte no período de 2000 a 2013.



Fonte: INMET, 2015.

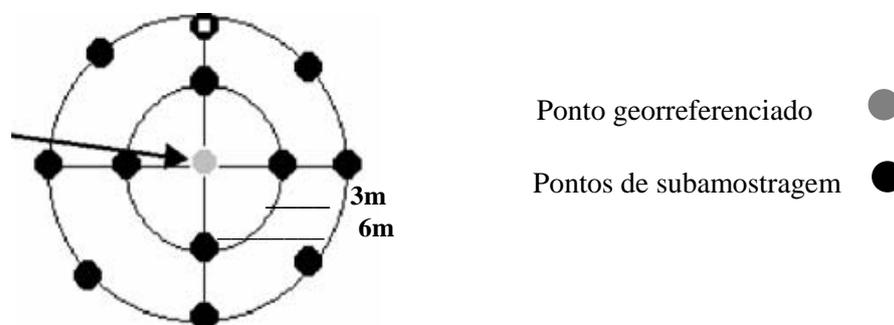
## 2.2 Desenho amostral e coleta

As amostras foram coletadas conforme Huising e colaboradores (2008), para amostragem de fungos do solo. A coleta foi realizada no período de 23 a 27 de setembro de 2013. Foram coletadas quatro amostras (repetições) por área de estudo, estas denominadas Eucalipto (EU), Capim (CA), Canga (CG), Cerrado (CE) e Mata (MT). Os locais de coleta foram georreferenciados (Tabela 2) e plotados no mapa (Figura 10).

Para cada amostra, 12 subamostras foram coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do ponto georreferenciado como observado na Figura 9. Cada subamostra foi extraída com o auxílio de um trado, na profundidade de 0 a 20 cm.

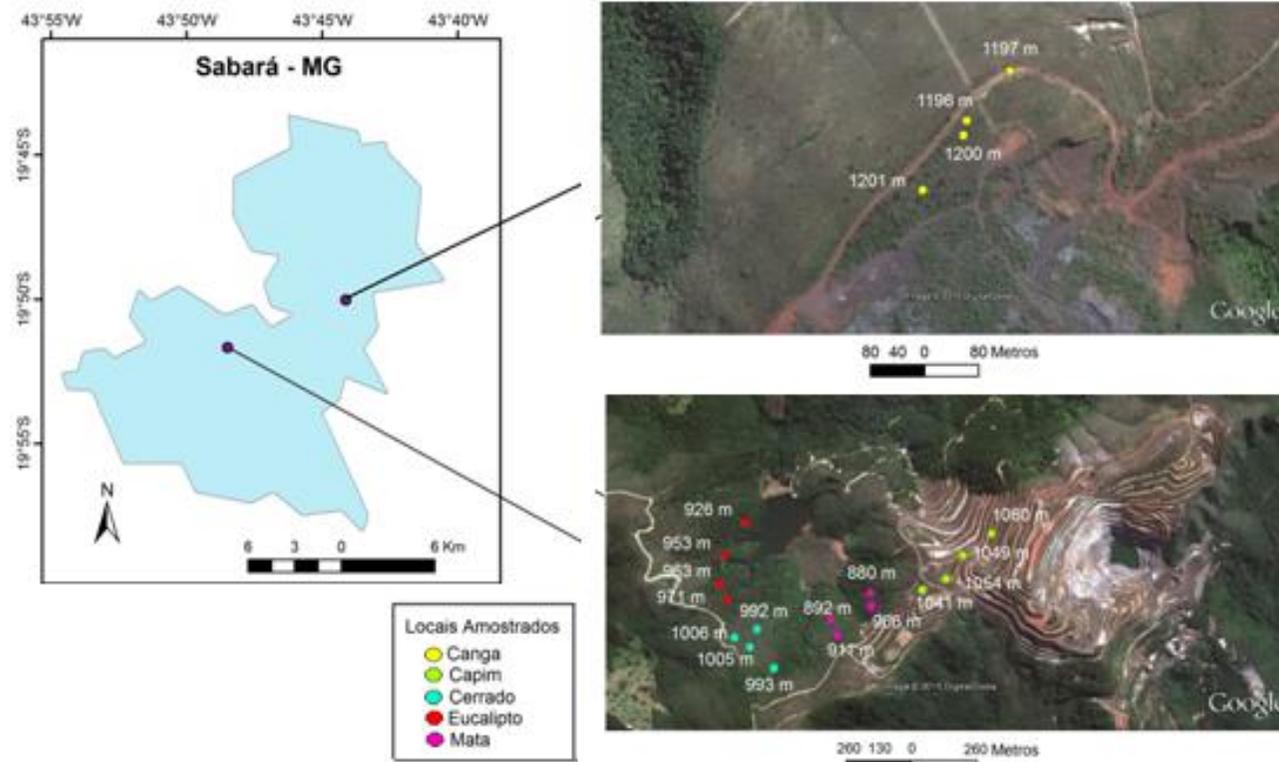
Foram retirados por amostra aproximadamente 500 g de solo, entretanto para o isolamento de fungos foi utilizado 30 g de solo coletado em cada amostra dessas regiões. As amostras compostas de solo foram homogeneizadas, armazenadas em sacos plásticos e colocadas em isopor para transporte até o Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde ficaram armazenadas em freezer - 20 °C até início do processamento. Parte de cada amostra foi enviada para os Laboratórios de Análises de Fertilidade do solo do DCS/UFLA para caracterizações química e física (Apêndice B).

**Figura 9** – Esquema de amostragem do solo



Dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do ponto georreferenciado.  
 Fonte: Huising et al., 2008.

**Figura 10** – Pontos de coleta, CeBio - Mina do Córrego do Meio, Sabará, MG.



Rosa: Mata, Azul: Cerrado, Verde: Capim, Vermelho: Eucalipto e Amarelo: Canga.  
 Fonte: Teixeira, 2015 (modificado).

### 2.3 Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos presentes nas amostras foi utilizada a técnica de diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) onde foi pesado 10,0 g do solo coletado, e a este foi adicionado em 90,0 mL de água peptonada (1,0 %) esterilizada. Cada amostra foi homogeneizada em shaker a 120 rpm, por período de 30 minutos.

Foi realizado um pré-teste com diversos meios para isolamento, sendo os meios DG18 e DRBC considerados os mais favoráveis à riqueza de espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.. Desta forma, estes meios foram selecionados para este estudo:

- **DG18:** 1,0 mL de Dicloran; 5,0 de Peptona Bacteriológica; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 220 g de Glicerol; 15,0 g de Ágar; 1 mg de cloranfenicol; 1000 mL de Água Destilada.
- **DRBC:** 10,0 g de Glicose; 5,0 de Peptona Bacteriológica; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 mL de solução 5% de Rosa de Bengala; 1,0 mL de Dicloran; 1000 mL de Água Destilada; 15,0 g de Ágar; 1 mg de cloranfenicol.

As placas foram incubadas a 25 °C, por um período de cinco dias.

#### 2.3.1 Contagem de UFCs e avaliação dos meios DG18 e DRBC

Após o estabelecimento das colônias, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) conforme Pitt e Hocking (1997), afim de estimar a poluição total de fungos/g de solo das amostras e áreas avaliadas. Também foi efetuada a contagem seletiva dos isolados pertencentes aos dois gêneros avaliados exclusivamente.

Os meios de cultura utilizados, DG18 e DRBC, foram comparados entre si quanto a efetividade no isolamento de *Aspergillus* e *Penicillium*.

## 2.4 Purificação e identificação de fungos filamentosos

As colônias com macromorfologia similar as de *Aspergillus* e *Penicillium* foram purificadas em meio de cultivo Extract Malt Agar (20,0 g de Extrato de Malte; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada), e posteriormente inoculadas em meios de cultivo e temperaturas padronizados de acordo com manuais de identificação: Klich (2002b), para o gênero *Aspergillus* e Pitt (2000), para o gênero *Penicillium*.

### 2.4.1 Identificação fenotípica das espécies do gênero *Aspergillus*

Isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram inoculados nos meio de cultivo: CYA, a 25 °C e 37 °C e MEA a 25 °C, com a seguinte formulação CYA (1,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10,0 mL de Concentrado de Czapek; 1 mL de Solução Metálica; 5,0 g de Extrato de Levedura; 15,0 g de Ágar; 30,0 g de Sacarose e 1000 mL Água Destilada), Extract Malt Glucose Agar (20,0 g de Extrato de Malte; 1,0 g de Peptona Bacteriológica; 20,0 g de Glicose; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada) e incubados por um período de sete dias.

Para a identificação morfológica das espécies de *Aspergillus* foram analisadas características macroscópicas, como cor da colônia, micélio, presença ou ausência de exsudato, cor do reverso, diâmetro da colônia, presença ou ausência de pigmentação solúvel e cleistotécio/escleródios. E além destas, características microscópicas a partir do meio de cultura CYA 25°C foram observadas como: comprimento e largura dos conidióforos, diâmetro da vesícula, diâmetro, forma e textura dos conídios, forma e cor do cleistotécio/escleródios. Os isolados de *Aspergillus* foram identificados conforme o manual de identificação dos mesmos, descrito por Klich (2002b), e artigos recentes de espécies novas.

#### **2.4.2 Identificação fenotípica das espécies do gênero *Penicillium***

Os isolados pertencentes ao gênero *Penicillium* foram inoculados em meios de cultivo padronizados conforme mencionado na literatura, CYA a 25 °C e 37 °C, MEA a 25 °C, CREA (3,0 g de Creatina; 30 g de Sacarose; 0,5 g de HCl; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>.7H; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada) e YES (20 g de Extrato de Levedura; 150 g de sacarose; 15,0 g de Ágar e 1000 mL de Água Destilada) a 25 °C. Após a inoculação, estes foram incubados em BOD por sete dias.

Para a caracterização microscópica foram confeccionadas lâminas a partir de colônias puras do meio de cultivo MEA, onde foi avaliada: ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura das métulas e fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídios. E para características macroscópicas avaliados: diâmetro da colônia, cor, micélio, presença ou ausência de exsudato, cor do reverso, presença ou ausência de pigmentação solúvel e cleistotécio/escleródios. As espécies de *Penicillium* foram identificadas com base na publicação de Pitt (2000), Pitt e Hocking (1997) e artigos recentes.

#### **2.5 Caracterização dos morfotipos não identificadas**

Os morfotipos não identificados foram caracterizados quanto ao seu crescimento em seis cultivos diferentes: CYA a 25, 30 e 37 °C; MEA a 25 °C; YES a 25 °C e CREA a 25 °C, e as características microscópicas também foram avaliadas segundo Houbraken e Samson (2011), modificado. Fotografias macro e microscópicas foram utilizadas para auxiliar na caracterização dos morfotipos.

## 2.6 Análises moleculares e filogenia

Dos morfotipos não identificados, 40 foram selecionados para a identificação molecular. As regiões ITS, e RPB2 do DNA foram utilizadas para essas análises e construção das árvores filogenéticas.

### 2.6.1 Extração de DNA

Após o crescimento das colônias em MA (Malte 2%) por cinco dias a 25 °C, estas foram raspadas da superfície das placas e colocadas em microtubos para a reativação das próximas fases.

A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (LESLIE; SUMMERELL, 2006), onde com o auxílio do nitrogênio líquido e 1 mg de polivinilpirrolidona (PVP) os micélios foram macerados e ressuspensos em 700 µL do tampão de extração CTAB 2% (Tris-HCl [pH 8,0] 100 mM; NaCl 500 mM; EDTA [pH 8,0] 50 mM; CTAB 2%; água ultrapura) acrescido de β-mercaptoetanol (10 µL/mL de tampão de extração).

O material foi agitado no vórtex e incubado, a 65 °C, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), vigorosamente agitado em vórtex e centrifugado, durante 5 minutos, a 12.000 rpm. Em seguida, 600 µL do sobrenadante foram resgatados em novo microtubo e foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após nova vigorosa agitação e centrifugação durante 5 minutos a 12.000 rpm, foram resgatados 400 µL da fase aquosa e adicionados 400 µL de isopropanol gelado e feita a agitação por inversão. O material foi incubado, durante 10 minutos, a aproximadamente 20 °C, centrifugado, durante 5 minutos, a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, sob agitação, por 5 minutos, a 10.000 rpm. Novamente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 100 µL de TE 1x (Tris-EDTA) + 5 µL de RNase A (0,5 mg/mL), que foi incubado em banho-

maria, a 37 °C, por 30 minutos. Seguindo à digestão com RNase A, foram adicionados 400 µL de isopropanol, deixando sob refrigeração, durante 10 minutos, para que houvesse a maior precipitação de DNA possível. Posteriormente, foi realizada a centrifugação, por 5 minutos, a 10.000 rpm. O isopropanol foi descartado e o pelet lavado e centrifugado, por 5 minutos, a 10.000 rpm, com 500 µL de etanol 70% gelado. Em seguida, o pelet foi seco para eliminar resíduos de etanol e ressuspendido em 50 µL de TE 1x.

O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium®) e seu peso molecular e concentração foram estimados por comparação com um marcador de 1 Kb ladder (Invitrogen).

### **2.6.2 PCR, sequenciamento e análises filogenéticas**

Para amplificação da região ITS foram utilizados os primers: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Para amplificação do gene RPB2 foram utilizados os primers 5F (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3') e 7CR (5'-CCATRGCTTGYTTRCCCAT-3').

A amplificação de ITS foi iniciada por um período de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, 60 s a 72 °C, uma extensão final por um período de 7 minutos a 72 °C, seguida por 10 °C. A amplificação de RPB2 foi iniciada por um período de 5 minutos a 94 °C seguido de 5 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C, 60 s a 72 °C, uma extensão final por um período de 7 minutos a 72 °C, seguida por 10 °C (VISAGIE et al., 2014).

Fragmentos dos genes foram sequenciados nas direções sentido e antissentido pela empresa MACROGEN, Coreia do Sul. Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento foram analisados visualmente, utilizando-se o programa SeqAssem® (HEPPERLE, 2004) e as sequências obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information, NCBI, por meio do programa BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequências de referência de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* correspondentes às regiões ITS e RBB2 foram relacionadas os morfotipos não identificados.

No programa MEGA® (TAMURA et al., 2011) foram feitos os alinhamentos múltiplos das sequências das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, bem como as análises filogenéticas, utilizando-se o método para inferência filogenética de máxima parcimônia (MP) para a construção das árvores.

### **2.7 Detecção da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 pelo método de Plug Agar**

Para teste do potencial micotoxigênico pelo método Plug Agar as espécies potencialmente toxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* foram inoculadas em meio CYA - Ágar Czapek: (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; Concentrado Czapek: 10,0 mL; Extrato de Levedura: 5,0 g, Agar: 15,0 g, Água Destilada: 1L; (Concentrado Czapek: NaNO<sub>3</sub>: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 5,0 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g, Água Destilada: 100mL)) por 7 dias a 25°C. Já as espécies potencialmente toxigênicas pertencentes à Seção *Circumdati* e *Flavi* foram inoculadas em meio YES - Ágar Extrato de Levedura Sacarose (Extrato de levedura: 20,0 g; Sacarose: 150 g; Agar: 20,0 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g; Água destilada: 1L), por 7 dias a 25°C conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Foram retirados plugs contendo o fungo e o meio de cultura dos centros das placas de Petri e estes foram aplicados sobre as placas de cromatografia de camada delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) juntamente com 10 µL das soluções padrão de Ocratoxina A e Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (SIGMA-ALDRICH). Como fase móvel foi utilizado TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% nas proporções 60:30:10.

Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão: roxo para OTA, azul para B1 e B2 e verde para G1 e G2.

### **2.7.1 Detecção da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina pelos morfotipos não identificados**

Os testes citados no item anterior foram realizados, de mesmo modo, nos morfotipos de *Aspergillus* não identificados para detecção da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Nos morfotipos não identificados de *Penicillium* foi realizado o teste de plug ágar para detecção da produção de citrinina e ocratoxina A. Os testes foram conduzidos de mesmo modo que para seção *Nigri* (para avaliação da OTA) e para seção *Flavi* (para detecção da citrinina), com a adição de 10  $\mu$ L do padrão de citrinina na placa de cromatografia de camada delgada.

Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção das micotoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER).

Os isolados considerados produtores apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão: roxo para OTA, azul para B1 e B2 e verde para G1 e G2 e verde brilhante para citrinina.

### **2.8 Detecção da produção de citrinina por *Penicillium citrinum* pelo método de Coconut Agar**

Os isolados previamente identificados como *Penicillium citrinum* foram inoculados em meio de cultura Coconut Cream Agar (400 mL de

Leite de Coco industrializado; 15,0 g de Ágar e 400 mL de Água Destilada) e acondicionados em BOD por 7 dias a 25 °C no escuro, conforme metodologia de Mohamed et al., 2013. Após este período, as placas de Petri foram observadas sob luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de citrinina apresentaram um halo verde-amarelado ao redor da colônia.

## **2.9 Análises Estatísticas**

Para avaliar se houve diferença entre os meios de cultura utilizados para o isolamento de *Aspergillus* e *Penicillium* (DG18 e DRBC) e para avaliar se houve diferença na estimativa da população total de cada área, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA), com um teste *a posteriori* de Tukey, considerando significância em 0,05.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estimativa da população fúngica total das amostras e comparação dos meios DRBC e DG18 utilizados no isolamento

Na avaliação da estimativa da população foram contabilizadas todas as colônias similares a fungos filamentosos nas placas. O valor encontrado nessa análise corresponde a média das três placas nos dois meios de cultura utilizados.

Segundo o Teste de Tukey aplicado, a área Canga foi a mais representativa em número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), e diferiu estatisticamente das demais áreas. As áreas Capim e Eucalipto foram consideradas semelhantes pelo teste de Tukey e apresentaram os segundos maiores valores de UFCs. Os menores valores de UFCs foram encontrados em Cerrado e Mata que também foram reputados como semelhantes pelo teste de Tukey (Tabela 3).

O maior valor de UFCs encontrado em Canga possivelmente é devido às características desse solo, uma vez que Canga apresenta um solo rico em matéria orgânica, além de possuir pH mais baixo (Apêndice B), oportunizando o estabelecimento de fungos em detrimento de bactérias e outros microrganismos, e deste modo, diminuindo a competição espacial e nutricional (TORTORA et. al., 2016). Ademais, o solo das amostras de Canga possui características peculiares como, por exemplo, a elevada concentração de ferro (Apêndice B) - indispensável em diversos processos biológicos - que pode ter corroborado com a alta estimativa encontrada.

Em contraposição, Mata que exibiu o menor valor de UFCs, apresentou em suas amostras os maiores valores de K (Apêndice B) - elemento facilmente lixiviável de material em decomposição (possivelmente por esta área apresentar grande quantidade de serrapilheira) (FRAGA e

PEREIRA, 2012), que pode ter influenciado negativamente o estabelecimento de algumas espécies de fungos.

Silva Filho e Vidor (2001), avaliando a atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio, observaram que em concentrações elevadas de K fungos de rápido desenvolvimento como *Aspergillus* tinham seu crescimento comprometido.

Outro possível determinante para o menor número de UFCs pode ser devido as características da Mata, dado que esta fitofisionomia dificulta a dispersão de esporos em certos pontos de seu interior devido a barreira física de troncos, galhos e folhas como mostrado na Figura 7, letra E.

Segundo a análise de variância, a comparação dos dois meios utilizados quanto ao número de unidades formadoras de colônia não foi significativa, ou seja, não teve diferença significativa entre DRBC e DG18 na contagem de UFCs em placa.

Monteiro e colaboradores (2016), trabalhando com isolamento de *Aspergillus* e *Penicillium* de solo do Cerrado de Minas Gerais auferiu valores de unidades formadoras de colônias bem inferiores (média total de  $5,0.10^3$ ) aos encontrados neste trabalho e, os valores de UFC também alteraram bastante de amostra para amostra.

**Tabela 3** – Valores médios da estimativa da população de fungos nas áreas Eucalipto, Capim, Ganga, Cerrado e Mata.

ÁREA	UFC/g de solo ( $\times 10^5$ )
CANGA	3,4 a
EUCALIPTO	1,3 b
CAPIM	1,1 b
CERRADO	0,6 c
MATA	0,5 c

As letras correspondem ao Teste de Tukey realizado.\*Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$ .

O resultado das análises de diversidade de fungos do solo depende do método utilizado (GAMS, 1992). O método de diluição em placa é o mais comumente empregado para estes estudos por apresentar bons resultados (Figura 11). Além disso, a escolha do meio de cultura é muito importante para priorizar o crescimento das espécies de interesse.

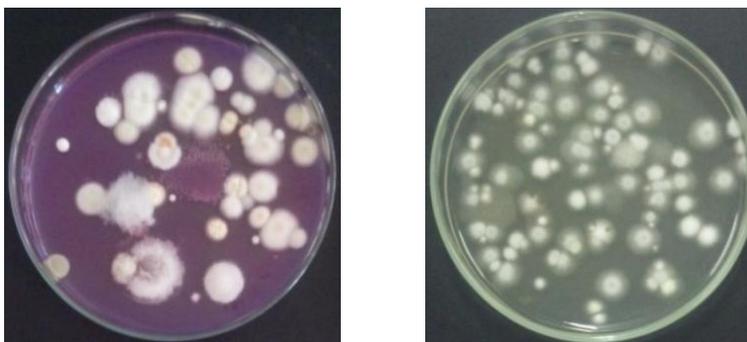
Neste contexto, na avaliação dos meios de cultura utilizados dentro de cada gênero (*Aspergillus* e *Penicillium*) em separado, foi evidente que o meio Dichloran Glycerol 18% (DG18) foi ideal para o isolamento de *Penicillium*, proporcionando o crescimento de aproximadamente 62% do total destes (Tabela 4). O gênero *Aspergillus* foi mais encontrado no meio Dichloran-Rose Bengal (DRBC) correspondendo a aproximadamente 69% de todos os isolados desse gênero (Tabela 4). Entretanto, segundo a análise de variância e o teste de Tukey aplicados (Tabela 4), houve diferença significativa na eficiência dos meios quanto ao gênero estudado, ou seja, devido aos altos números de morfotipos similares a *Penicillium* encontrados em ambos os meios, os dois meios foram considerados estatisticamente mais hábeis ao desenvolvimento de colônias de *Penicillium* a *Aspergillus*.

Markovina e colaboradores (2005) e Fraga e Pereira (2012), utilizando os meios DG18 e DRBC, isolaram fungos pertencentes à família Trichocomaceae em solo de uma reserva natural na Austrália e da Mata Atlântica brasileira respectivamente. Ambos, também encontraram um número expressivamente maior de morfotipos do gênero *Penicillium* nos meios, seguido pelo gênero *Aspergillus*. Haja vista o esforço amostral, estes e outros trabalhos da literatura apresentaram número de espécies inferior ao encontrado nesse trabalho, principalmente do gênero *Penicillium*.

O meio DG18 apresenta baixa atividade de água (0,95), o que auxilia o crescimento de fungos xerofílicos fastidiosos, como várias espécies de *Penicillium*. Meios com atividade de água alta (0,99) como o meio DRBC, caucionam espécies de rápido crescimento, como a maioria das espécies de *Aspergillus*. Este fato, pode explicar o maior número de morfotipos de *Aspergillus* nesse meio (HOCKING e PITT, 1980; SAMSON et al., 1996).

Douglas King e colaboradores (1979), ao descreverem o meio DRBC para isolamento de fungos em alimentos atentaram que, em concentrações elevadas (aproximadamente 5  $\mu\text{g}$ ), o antimicrobiano dicloran pode inibir completamente o crescimento de *A. niger*. A concentração de 2  $\mu\text{g}$  foi deste modo adotada por apresentar equilíbrio em inibir as espécies de crescimento rápido indesejadas como os gêneros *Rhizopus* e *Mucor* em detrimento das espécies de interesse como *Aspergillus*. À vista disso, o menor número de morfotipos de *Aspergillus* encontrados nos dois meios avaliados pode ser devido a presença deste antimicrobiano.

**Figura 11** – Diluição Seriada em DRBC (esquerda) e DG18 (direita).



**Tabela 4** – Total de isolados encontrados para *Penicillium* e *Aspergillus* em DRBC e DG18

GÊNEROS	DRBC *	DG18 *	TOTAL
<i>Penicillium</i>	685 a B	1141 a A	1826
<i>Aspergillus</i>	109 b A	49 b B	158
		<b>TOTAL =</b>	1984

\*Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$ . Comparação entre as colunas letras minúsculas (a, b); Comparação entre as linhas letras maiúsculas (A, B)

### 3.2 Espécies identificadas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Foram analisadas vinte amostras de solo divididas em cinco áreas (Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado e Mata), dessas, foram isolados 1984 fungos pertencentes aos gêneros avaliados.

Foram encontradas 88 espécies diferentes, sendo 15 pertencentes ao gênero *Aspergillus*, 68 ao gênero *Penicillium* (incluindo espécies sexuadas) e cinco a *Talaromyces*, mostrando a predominância do gênero *Penicillium* em solo. O número de isolados de cada espécie está representado no apêndice A.

O número de espécies e isolados de *Penicillium* foi definitivamente maior que os de *Aspergillus*, contudo, o mesmo não ocorreu em vários trabalhos encontrados na literatura que avaliaram fungos de solos cultivados.

Klich (2002a), compilou aproximadamente 250 trabalhos sobre identificação e biogeografia de *Aspergillus* de diferentes tipos de solo e, para a maioria das espécies, o solo cultivado apresentou maior abundância de isolados que solos sem ação antrópica. O gênero *Aspergillus* é amplamente conhecido por seu potencial enzimático, sendo considerado excelente decompositor de matéria orgânica, dessa forma, em solos ricos desse material - como solos cultivados, estes microrganismos possivelmente se sobressaem.

O gênero *Penicillium* é intensamente estudado quanto aos seus metabólitos secundários e produção de compostos de interesse econômico e, muitos destes são antimicrobianos ou alelopáticos (PETIT et al., 2009). Em solos com pouca ou nenhuma ação antrópica, como os avaliados neste trabalho, este gênero apresenta maior diversidade devido a estas características.

Oliveira e colaboradores (2013), avaliaram a diversidade de fungos do solo no semiárido pernambucano em dois períodos do ano (seco e chuvoso) e encontraram 85 espécies, sendo destas 28 de *Penicillium* (597 isolados) e 18 de *Aspergillus* (356 isolados). Souza (2010), trabalhando com solos da Mata Atlântica, obteve 29 espécies de *Penicillium* e seis de

*Aspergillus*. Puangsombat e colaboradores (2010), analisaram cinco tipos de solos da Tailândia e encontraram 9 espécies de *Aspergillus* e 27 de *Penicillium*. Além desses, diversos outros trabalhos no Brasil e no mundo têm o gênero *Penicillium* como dominante em solos com pouca ação antrópica, independente do clima regional.

Samson e colaboradores (2014) e Visagie e colaboradores (2014), listaram as espécies descritas corretamente de *Aspergillus* e *Penicillium* respectivamente, até o momento. Até a data das publicações, o gênero *Penicillium* apresentava 354 espécies e *Aspergillus* 339. Embora estes números sejam bastante semelhantes, a maior ocorrência de espécies de *Penicillium* no solo atesta que este gênero é realmente adaptado a este ecossistema e, inclusive, boa parte das espécies descritas até o presente foram isoladas do mesmo.

Os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Talaromyces* possuem 25, 19 e sete seções respectivamente (SAMSON et al.; 2014; VISAGE et al.; 2014; YILMAZ et al.; 2014). Destas, foram encontradas sete seções de *Aspergillus*, 11 de *Penicillium* e três de *Talaromyces*. Contudo, principalmente no gênero *Penicillium*, não foi possível a identificação de diversos morfotipos, sendo possível número maior de seções.

A seção *Nigri* foi a mais representativa em número de espécies e abundância no gênero *Aspergillus*. As espécies *A. aculeatus* (34,18%), *A. carbonarius* (5,06%), *A. foetidus* (1,89%), *A. niger* var. *niger* (28,48%) e *A. niger* Agregado (5,69%) pertencentes a esta seção, representam juntas 75,30% dos isolados de *Aspergillus* encontrados, sendo *A. aculeatus* e *A. niger* var. *niger* os mais numerosos (Apêndice A). *A. niger* var. *niger* é encontrado em grande número na maioria dos biomas terrestres, inclusive em latitudes superiores a 45°, já a espécie *A. aculeatus* é muito menos representativa nesses biomas (KLICK, 2002a). Entretanto, como exposto no apêndice B e C, foi encontrado número expressivo da espécie *A. aculeatus* nas áreas avaliadas.

A seção *Flavi*, com apenas duas espécies - *A. parasiticus* (15,20%) e *A. flavus* (3,16%), foi a segunda mais representativa com 18,36% dos isolados (Apêndice A). Segundo Klick (2002a), ambas as espécies *A. parasiticus* e *A. flavus* são encontradas entre as latitudes 0 e 45° do globo em diversos tipos de solos, contudo, ao contrário do observado neste estudo, *A. flavus* foi predominante em todos os locais avaliados.

Foi encontrado um isolado de cada das espécies *A. ochraceoroseus* (seção *Ochraceorosei*), *A. sulphureus* (seção *Circumdati*), *A. candidus* (seção *Candidi*) e *A. niveus* (seção *Terrei*) e dois isolados de *A. clavatus* (seção *Clavati*), representando juntos 3,80% dos isolados (Apêndice A).

O solo é ambiente primário para grande parte das espécies de *Aspergillus*, tendo em vista sua habilidade saprofítica. Assim o isolamento da maioria das seções encontradas neste trabalho é comum. Contudo, até o presente, todos os espécimes de *Aspergillus ochraceoroseus* identificados e preservados em coleções de cultura internacionais foram isolados de solo na Costa do Marfim (BARTOLI e MAGGI, 1978; CARY et al., 2012; FRISVAD et al., 2005; KLICH et al., 2000a). Deste modo, este é o primeiro relato desta espécie fora do país.

Por fim, três morfotipos não foram identificados (*Aspergillus* sp. 01, 02 e 03), e são 2,54% de todos os isolados encontrados para o gênero *Aspergillus* (Apêndice A).

As seções encontradas do gênero *Penicillium* foram listadas na Tabela 5. A seção *Lanata-Divaricata*, foi a mais numerosa destas com 30,48% das espécies identificadas. As espécies *P. janthinellum*, *P. oxalicum* e *P. simplicissimum* desta seção são amplamente distribuídas no mundo e encontradas em diversos tipos de solos em todos continentes (PITT, 2000a).

Com exceção da seção *Citrina*, a segunda mais representativa, as demais seções não apresentaram números de isolados superiores a 5% e a maioria das espécies foram encontradas em uma ou duas áreas avaliadas apenas (Apêndice A). No entanto, quase 50% dos espécimes isolados não foram identificados em espécie e foram separados em 43 morfotipos

distintos (Apêndice A). Estes podem representar espécies das seções encontradas, das outras 14 seções de *Penicillium* ou ainda pertencerem a novas seções a serem descritas.

As espécies de *Talaromyces* foram identificadas e relacionadas pois, até recentemente, este gênero era considerado fase sexuada de *Penicillium*. Além disso, todas espécies descritas no subgênero *Biverticillium* foram reescritas e renomeadas como *Talaromyces* (SAMSON et al., 2011; YILMAZ et al. 2014). Deste modo, as espécies *P. funiculosum*, *P. minioluteum*, *P. purpurogenum* e *P. variabile* são agora denominadas *T. funiculosus*, *T. minioluteus*, *T. purpurogenus* e *T. variabilis* respectivamente e estão incluídas nas seções *Talaromyces* (*T. funiculosus* e *T. purpurogenus*), *Trachyspermi* (*T. minioluteus*) e *Islandici* (*T. variabilis*). Um morfotipo caracterizado como *Talaromyces* não foi identificado (Apêndice A).

A diferenciação de espécies pela observação de seus caracteres morfológicos foi a primeira forma de classificação de organismos vivos e já extintos. Para fungos filamentosos, ainda hoje, esta técnica é muito utilizada e, de sobremaneira, corrobora outras técnicas moleculares e bioquímicas. Nesse contexto, imagens das formas microscópicas e das colônias em diferentes meios de cultura e temperaturas são de grande auxílio na taxonomia fúngica (WATANABE, 2010).

Durante a realização deste trabalho, foi observado que as espécies contidas nos grandes manuais de identificação, na generalidade foram isoladas de locais de clima temperado e que apresentam algumas características, principalmente a coloração, distintas das encontradas no Brasil e outros países de clima tropical. Dessa forma, nos itens a seguir foram relatados os principais determinantes específicos e marcadores morfológicos que auxiliaram na identificação dessas espécies, assim como fotografias das colônias e de microscopia.

A riqueza e composição das espécies nas áreas será apresentada e discutida adequadamente no capítulo 3.

**Tabela 5** – Porcentagem de isolados encontrados por seção do gênero *Penicillium*.

Seção	Espécies	%
<i>Aspergilloides</i>	<i>P. glabrum</i>	3,97
	<i>P. spinulosum</i>	
<i>Brevicompecta</i>	<i>P. brevicompactum</i>	0,56
<i>Canescentia</i>	<i>P. janczewskii</i>	2,40
<i>Citrina</i>	<i>P. citrinum</i>	9,45
	<i>P. cosmopolitanum</i>	
	<i>P. miczynskii</i>	
	<i>P. paxilli</i>	
<i>Charlesia</i>	<i>P. fellutanum</i>	0,17
	<i>P. multicolor</i>	
<i>Chrysogena</i>	<i>P. chrysogenum</i>	0,56
<i>Exilicaulis</i>	<i>P. citreonigrum</i>	1,51
	<i>P. corylophillum</i>	
	<i>P. decumbens</i>	
<i>Fasciculata</i>	<i>P. crustosum</i>	1,34
	<i>P. solitum</i>	
<i>Lanata-Divaricata</i>	<i>P. janthinellum</i>	30,48
	<i>P. oxalicum</i>	
	<i>P. simplicissimum</i>	
<i>Ramosa</i>	<i>P. raistrickii</i>	0,62
<i>Sclerotiora</i>	<i>P. sclerotiorum</i>	0,50
-	<i>Penicillium</i> sp.	48,44

### 3.2.1 Espécies identificadas de *Aspergillus* e principais marcadores morfológicos

O grupo de espécies da seção *Nigri* é considerado o mais importante dentro de *Aspergillus* por apresentarem deterioradores de alimentos, produtores de micotoxinas e, além disso, grandes produtores de diversas enzimas, ácidos orgânicos dentre outros compostos utilizados em processos industriais. (FERRACIN et al., 2009; VARGA et al., 2000). Contudo, essa seção também é conhecida pela difícil identificação e classificação

morfológica de algumas espécies (ABARCA et al, 2004; VARGA et al., 2011).

As espécies *A. niger sensu stricto*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, e *A. brasiliensis* são idênticas morfológicamente em placa e pertencem a um grupo complexo chamado *A. niger* Agregado (FERRACIN et al., 2009; LASRAM et al., 2012; PARENICOVA et al., 2001).

Tanto na análise das colônias quanto na microscopia, alguns marcadores morfológicos são imprescindíveis e determinantes na identificação das espécies, e estes foram as ferramentas utilizadas no presente trabalho para a identificação das mesmas, como nas Figuras 12 e 13.

Segundo o conceituado manual descrito por Klich (2002b), para identificação de espécies comuns de *Aspergillus*: *A. foetidus* apresenta conídios espinhosos quando ainda juntos as fiálides e conídios lisos quando maduros (Figura 12, A); isolados de *A. niger* var. *niger* possuem conídios globosos de 3,5 a 4,5 µm e estes podem ser finamente rugosos, rugosos ou espinhosos (Figura 12, B); já os isolados de *A. tubingensis* apresentam conídios similares aos de *A. niger*, entretanto podem ser lisos a finamente rugosos.

Dessa forma, os isolados encontrados que ficaram no intervalo igual dessas espécies, ou que de algum modo representaram dúvida da identificação, foram chamados de *A. niger* agregado (Figura 12, C).

Diversos trabalhos na literatura aduzem que a identificação de *A. tubingensis* só é possível através de análises moleculares (LASRAM et al.; PERRONE et al., 2006; SUSCA et al., 2007), entretanto espécies que apresentam conídios lisos podem ser identificadas por uma simples visualização microscópica, evitando dispêndio de tempo e reagentes.

Os isolados de *A. aculeatus* foram prontamente identificados microscopicamente por serem uniseriados e apresentarem vesículas extremamente grandes (60-100 µm), além disso, cresceram pouco e de forma peculiar a 37 °C (Figura 12, D). Os isolados de *A. carbonarius* também

cresceram pouco a 37 °C (10-30 mm) e apresentaram conídios muito grandes (7-10 µm) e rugosos (Figura 12, E), (KLICH, 2002b).

A espécie *A. sulphureus* apresentou os marcadores morfológicos: produção abundante de escleródios a 25 °C; em CYA 37 °C crescimento médio de 15-17 mm; conídios de coloração amarelo-enzofre, pequenos (2-2,5 µm), lisos e globosos (Figura 12, F).

Alguns isolados de *A. parasiticus* e *A. flavus* são muito similares macroscopicamente, com poucas diferenças microscópicas e, além disso, apresentam grande plasticidade fenotípica. Segundo o manual de Klich (2002b), os conídios de *A. flavus* são lisos a finamente rugosos (Figura 13, A), já os de *A. parasiticus* são extremamente rugosos (Figura 13, B). No entanto, os isolados encontrados de *A. parasiticus* no presente estudo, não apresentaram conídios muito rugosos, dificultando bastante a identificação morfológica. Nesse sentido, a avaliação da produção de aflatoxinas pode auxiliar na identificação dessas espécies, visto que mais de 70% dos isolados de *A. flavus* são produtores das aflatoxinas B1 e B2, e de *A. parasiticus* são produtores de B1, B2, G1 e G2, indubitavelmente reconhecidos em um teste de cromatografia de camada delgada devido as colorações distintas das micotoxinas B (azul) e G (verde) (KLICH, 2002b).

*A. clavatus* foi identificado por apresentar colônia verde escura, baixa e flocosa; vesícula claviforme (10-75 µm) com fiálides percorrendo toda a vesícula (unisseriado); conídios elipsoidais, lisos medindo de 3 a 6 µm (Figura 13, C).

Na identificação de *A. niveus* foi verificado o fraco crescimento nos meios analisados; coloração branca ou amarela claro; setores amarelos em CYA e MEA e vesículas piriformes (Figura 13, D).

*A. candidus* cresceu pouco em CYA e MEA a 25 °C (15-25 mm) e não cresceu a 37 °C; possui colônia baixa e granular no MEA; conídios brancos ou amarelo-pálidos, de forma globosa a ovóide e lisos (Figura 13, E). Alguns isolados de *A. candidus*, em placa, demonstraram características similares a *A. niveus* (KLICH, 2002b) entretanto, *A. candidus* apresenta

vesícula notoriamente maior (medindo 17-35  $\mu\text{m}$ ) que *A. niveus* (8-15  $\mu\text{m}$ ), auxiliando na identificação.

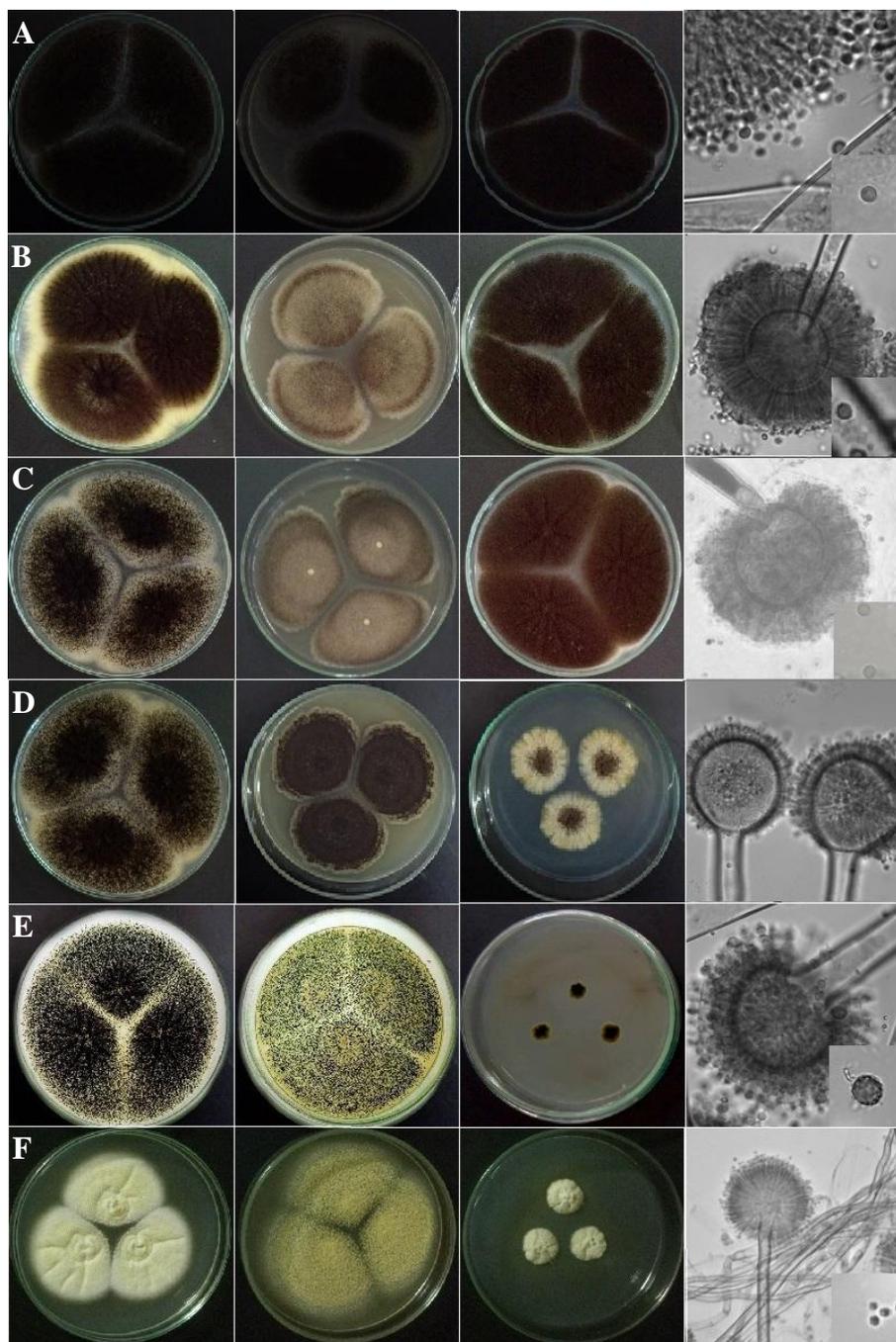
A identificação do isolado de *A. ochraceoroseus* foi realizada segundo Bartoli e Maggi (1978); Klich e colaboradores (2003), e pela chave proposta por Christensen (1982), para a seção *Circumdati*. Isto porque originalmente *A. ochraceoroseus* foi classificado como pertencente à seção *Circumdati*, devido as semelhanças morfológicas da espécie com outras desta seção. Entretanto estudos recentes da produção de extrólitos (aflatoxina e esterigmatocistina) e análises filogenéticas apontam que *A. ochraceoroseus* pertence a uma nova seção, chamada de *Ochraceorosei* (CARY et al., 2012; FRISVAD et al., 2005).

Na caracterização morfológica *A. ochraceoroseus* apresentou em MEA a 25 °C colônia radiada, de coloração amarela rosada e reverso rosado, medindo em média 60 mm de diâmetro; em CYA a 25 °C apresentou colônia amarelada, medindo 30 – 40 mm de diâmetro e não houve crescimento a 37 °C. Apresentou microscopicamente *aspergilli* bisseriado; conídios amarelodourados, globosos de aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e vesícula globosa medindo 20 - 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 13, F).

Estas características condizem com *A. ochraceoroseus*, entretanto são necessárias outras análises, como sequenciamento dos genes  $\beta$ -tubulina e calmodulina, para a confirmação da espécie.

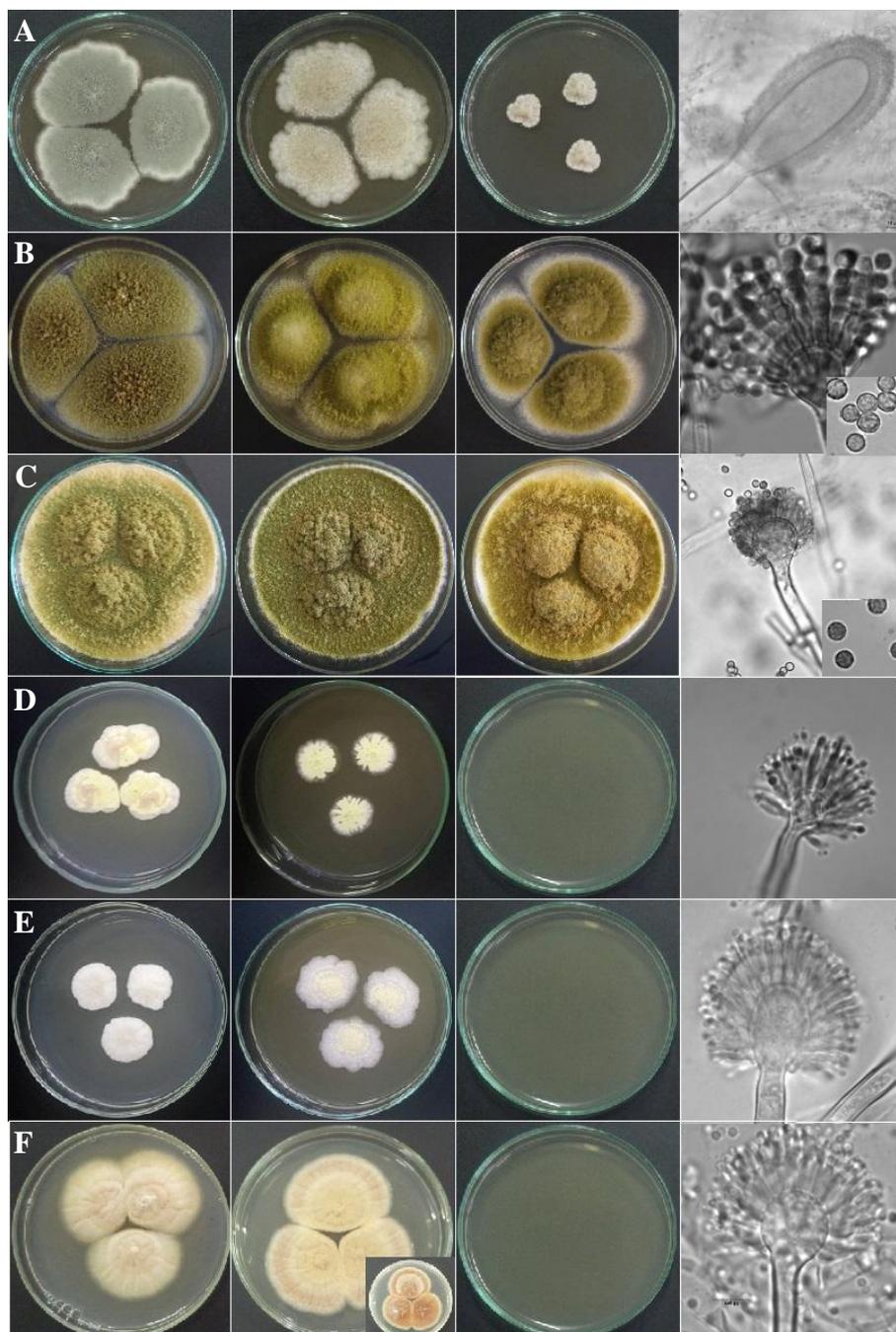
Os morfotipos *Aspergillus* sp. 01, 02 e 03 serão avaliados a diante no tópico de espécies não identificadas.

**Figura 12** – Macro e micromorfologia de *A. foetidus*, *A. niger* var. *niger*, *A. niger* agregado, *A. aculeatus*, *A. carbonarius* e *A. sulphureus*.



Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *A. foetidus*; B: *A. niger* var. *niger*; C: *A. niger* agregado; D: *A. aculeatus*; E: *A. carbonarius*; F: *A. sulphureus*.

**Figura 13** – Macro e micromorfologia de *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niveus*, *A. candidus* e *A. ochraceoroseus*.



Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *A. clavatus*; B: *A. flavus*; C: *A. parasiticus*; D: *A. niveus*; E: *A. candidus* e F: *A. ochraceoroseus*.

### 3.2.2 Espécies identificadas de *Penicillium* e principais marcadores morfológicos

A identificação de espécies de *Penicillium* é bastante laboriosa, visto que, diferente do gênero *Aspergillus*, grande parte das colorações são semelhantes e não separam as seções. Os caracteres mais variantes e considerados bons marcadores morfológicos desse gênero são o tamanho das colônias, crescimento a 37 °C e, assim como na maioria das espécies de fungos filamentosos, o formato, tamanho e textura dos conídios (HOUBRAKEN et al., 2011; SAMSON et al., 2010).

As espécies *P. citreonigrum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. multicolor*, *P. sclerotiorum* e *P. spinulosum* são predominantemente monoverticiladas. No entanto, seus caracteres microscópicos são conflitantes, por vezes não auxiliando na identificação. Já a maioria das características macroscópicas são facilmente distinguíveis e condiziam com as descritas por Pitt (2000) e literatura.

*P. citreonigrum* cresceu de 25 a 30 mm em CYA, verde acinzentado, com reverso amarelo brilhante e produção de pouco exudato amarelo claro; apresentou colônia no MEA semelhante ao CYA e não cresceu a 37 °C (Figura 14, A).

Os isolados de *P. glabrum* apresentaram: colônia em CYA de 40 a 50 mm, verde escura com micélio branco bastante desenvolvido e reverso de coloração palha; crescimento em MEA de 40 a 50 mm, colônia baixa, aveludada e similar a do CYA; não cresceu a 37 °C (Figura 14, B).

*P. decumbens* (Figura 14, C) apesar de possuir colônias semelhantes as de *P. glabrum*, estas foram menores (CYA de 20 a 30 mm e MEA de 25 a 40 mm) e *P. decumbens* cresceu a 37 °C.

*P. spinulosum* apresentou colônias verde muito escuras, baixas e de crescimento de 40 a 50 mm nos meios CYA e MEA a 25 °C e não cresceu a 37 °C (Figura 14, D).

As espécies *P. multicolor* e *P. sclerotiorum* são bastante similares entre si, e fazem parte do complexo *Penicillium sclerotiorum* muito discutido por diversos autores. *P. sclerotiorum* apresenta, segundo Pitt (2000), coloração verde acinzentada, crescimento de 20 a 40 mm e colônias radialmente sulcadas em CYA. Em MEA também apresenta crescimento de 20 a 40 mm e coloração verde acinzentada, no entanto, apresenta micélio laranja brilhante envolvendo os escleródios presentes (Figura 14, E). Segundo Rivera e Seifert (2011), *P. multicolor* apresenta crescimento inferior a *P. sclerotiorum* (de 13 a a 15 mm de diâmetro) e, além disso, possui todo o micélio de coloração laranja brilhante no MEA (Figura 14, F).

Contudo, dependendo da quantidade de escleródios presentes na colônia, a identificação destas espécies por caracteres morfológicos foi dificultosa e serão necessárias análises moleculares para confirmação destas espécies, visto que *P. multicolor* é filogeneticamente mais próximo de *P. fellutanum* que de *P. sclerotiorum* (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011). Além disso, o complexo *Penicillium sclerotiorum* apresenta 29 espécies bastante semelhantes que podem aduzir possíveis erros na identificação (RIVERA e SEIFERT, 2011).

As espécies *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum* e *P. solitum* são predominantemente terverticiladas, mas também podem apresentar alguns *penicilli* bi ou poliverticilados (PITT, 2000a).

*P. chrysogenum* apresentou em CYA colônia de 30 a 35 mm de diâmetro, verde acinzentada, baixa, com presença de exudato de coloração caramelo a marrom e reverso amarronzado; em MEA colônia de 20 a 25 mm de diâmetro, baixa, plana e verde escura com reverso palha; não cresceu a 37 °C. Microscopicamente: *penicilli* com um ou dois ramos e conídios elipsoidais, lisos, de 2,5 a 4 µm (Figura 15, A).

*P. crustosum* apresentou colônias similares no CYA e MEA a 25 °C medindo aproximadamente 40 mm de diâmetro, baixas, de coloração verde escura. Ao microscópio apresentou estipes rugosas com um ou dois ramos e conídios lisos, subglobosos de 3 a 4 µm (Figura 15, D). *P. crustosum*

apresenta como marcador morfológico elevada conidiogênese, espalhando esporos por toda a placa de Petri, quando esta é agitada manualmente (PITT, 2000a).

Os isolados de *P. solitum* apresentaram em CYA 25 °C colônias intensamente sulcadas, verde muito escuras medindo 22 a 28 mm. Em MEA colônias de 20 a 25 mm, baixas e planas (Figura 15, C). Os isolados de *P. brevicompactum* (Figura 15, B) possuem colônias análogas aos de *P. solitum*, contudo, *P. brevicompactum* apresenta colônias menores no MEA (12 a 20 mm); tipicamente produzem pigmentação solúvel amarronzada no CYA e *penicilli* mais arranjado e organizado. Já as placas de *P. solitum* possuem odor característico de maçã podre (PITT, 2000a).

As espécies biverticiladas foram predominantes neste estudo sendo estas: *P. fellutanum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. cosmopolitanum*, *P. janczewskii*, *P. janthinellum*, *P. miczynskii*, *P. oxalicum*, *P. paxilli*, *P. raistrickii*, *P. simplicissimum* e *P. waksmanii*.

As colônias de *P. raistrickii* em CYA cresceram de 35 a 45 mm de diâmetro, altas, acinzentadas e produziram escleródios. Em MEA cresceram entre 40 e 50 mm, altas, flocosas, cinza claro e produziram escleródios em abundância. Não cresceram a 37 °C. Microscopicamente: os escleródios mediam de 200 a 250 µm; estipes rugosas e conídios sub esferoidais, lisos, de 2 a 3 µm (Figura 15, E).

*P. fellutanum* em CYA cresceu 17 a 22 mm, radialmente sulcado, de coloração cinza pálido e verde escuro. Em MEA cresceu aproximadamente 16 mm, baixo e plano. Microscopicamente foi distinguível pois apresentou apenas duas métulas vesiculadas e conídios elipsoidais, finamente rugosos ou rugosos, medindo 2,5 a 3 µm (Figura 15, F).

As espécies *P. janthinellum*, *P. oxalicum* e *P. simplicissimum* são bastante similares em placa, e apresentaram elevado crescimento em CYA e MEA a 25 °C e também cresceram a 37 °C. Alguns de seus caracteres microscópicos foram diferenciados, possibilitando a identificação segundo Pitt (2000a).

*P. janthinellum* apresentou *penicilli* muito irregular com fiálides saindo diretamente da estipe (Figura 16, A); *P. oxalicum* apresentou estipe e conídios lisos (Figura 16, B), e *P. simplicissimum* tinha estipe e conídios rugosos (Figura 16, C).

*P. citrinum*, *P. waksmanii*, *P. paxilli* e *P. corylophilum* também possuem macromorfologias aproximadas, porém, *P. citrinum* é o único destes que cresceu a 37 °C. Além disso, apresentou alta produção de exudato e pigmentação solúvel verde ou amarelo citrino e crescimento em MEA bastante inferior ao CYA (Figura 17, A). As espécies *P. waksmanii*, *P. paxilli* e *P. corylophilum* foram diferenciadas microscopicamente pois, *P. waksmanii* apresentou métulas muito alargadas (Figura 16, F); *P. corylophilum* apresentou de duas a cinco métulas (Figura 16, D), enquanto *P. paxilli* mais de cinco métulas (Figura 16, E), como Pitt (2000a).

*P. cosmopolitanum* apresentou como características principais o crescimento radialmente sulcado com sulcos profundos em CYA 25 °C e coloração cinza pálido esverdeada; MEA com baixa conidiogênese, de coloração amarela e azul pálida. Apresentou conídios globosos (2,5 - 3 µm), rugosos, e alguns *penicilli* quarterverticilados (Figura 17, B) como visto em Houbraken e colaboradores (2011).

Os isolados de *P. janczewskii* cresceram de 25 a 30 mm de diâmetro em CYA e apresentaram coloração branca ou cinza pálido. No MEA colônias medindo 30 mm, de coloração verde acinzentada. Não cresceram a 37 °C. Apresentou conídios esféricos e espinhosos, medindo 2,5 a 5 µm (Figura 17, D).

A espécie *P. miczynskii* aparece de forma muito diferenciada em Pitt (2000) e Houbraken e colaboradores (2011). Dessa forma a identificação foi realizada seguindo o trabalho mais recente. *P. miczynskii* apresentou crescimento de 21 a 27 mm em CYA 25 °C e, 17 a 25 mm em MEA, sendo ambas as colônias muito similares: verde acinzentadas, enrugadas com reverso laranja amarronzado. Não cresceu a 37 °C. Apresentou *penicilli*

biverticilado muito simétrico e conídios subglobosos, lisos, de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 17, C).

O extinto subgênero *Biverticillium* era caracterizado pelo tamanho proporcionalmente igual das métulas e fiálides (PITT, 2000a), e as espécies *Talaromyces minioluteus*, *T. purpurogenus*, *T. funiculosos* e *T. variabilis* pertenciam a este grupo.

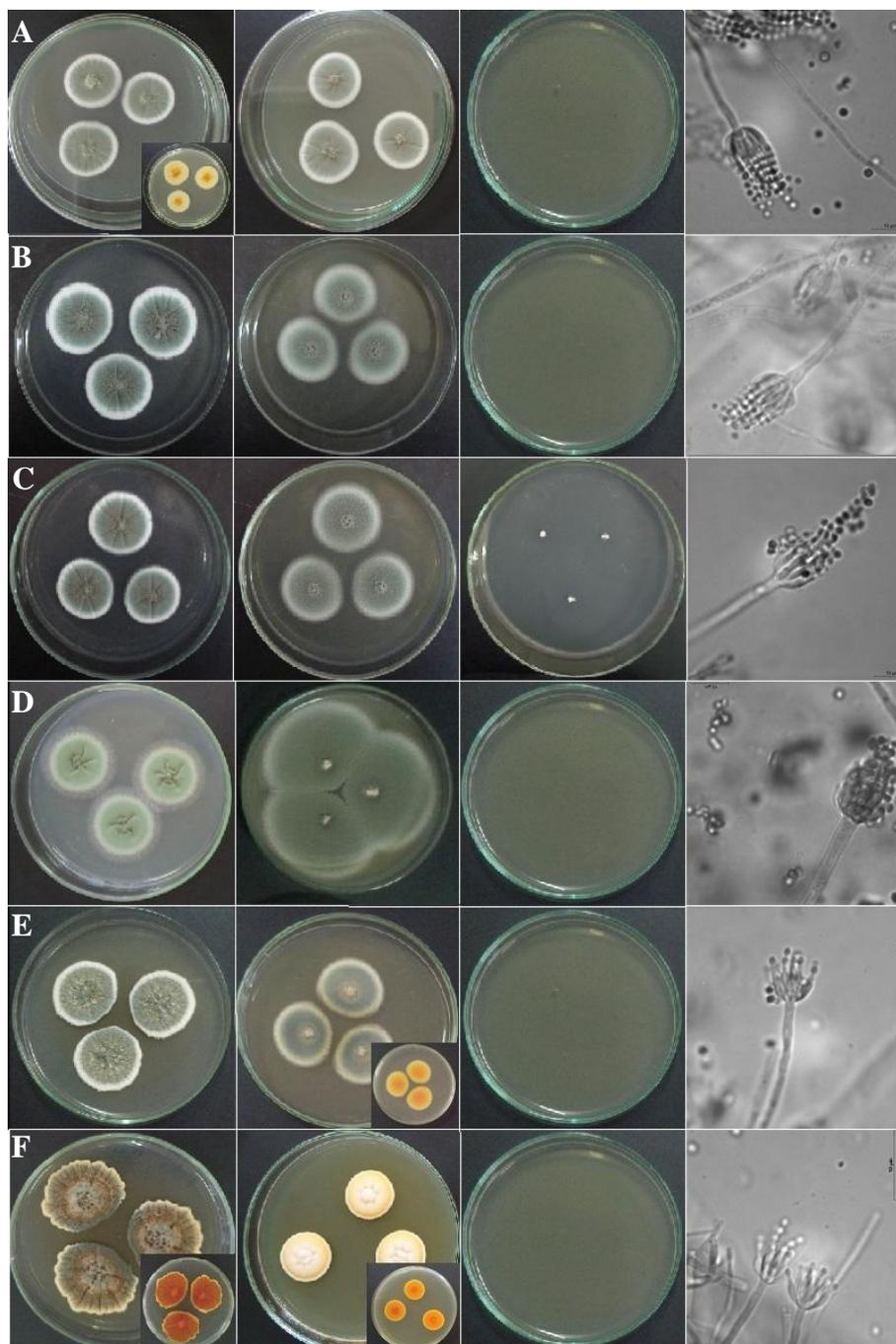
*T. variabilis* apresentou colônias similares em CYA e MEA a 25 °C: verde acinzentadas, baixas e planas, medindo de 15 a 22 mm. Apresentou como marcadores morfológicos fiálides aciculadas e conídios lisos, muito elipsoidais, medindo de 3 a 4  $\mu\text{m}$  (Figura 17, F).

*T. purpurogenus* foi caracterizado pelo fraco crescimento e produção de exudato e pigmentação solúvel vermelha em CYA 25 °C; colônia no MEA inconspícua e microcolônias em CYA 37 °C. *Penicilli* estreito e conídios elipsoidais, lisos, medindo 3 a 3,5  $\mu\text{m}$  (Figura 18, A).

*T. minioluteus* foi bastante desenvolvido em MEA e CYA a 25 °C e cresceu entre 15 e 20 mm em CYA 37 °C. Possui como caracteres relevantes o reverso avermelhado e conídios de elipsoidais a apiculados, lisos e medindo de 2,5 a 3,5  $\mu\text{m}$  (Figura 18, B).

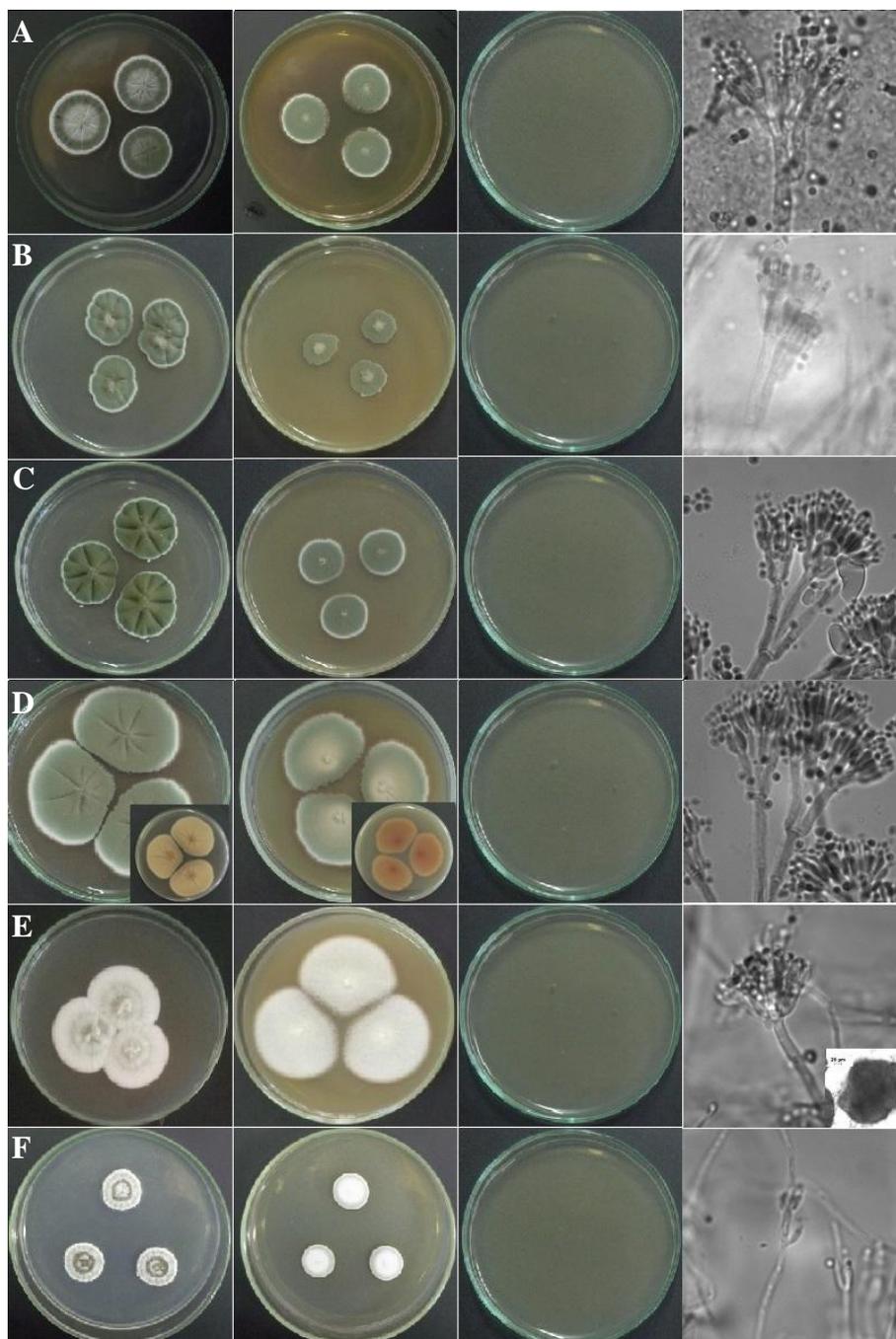
As colônias em MEA e CYA de *T. funiculosos* são muito conspícuas: micélio fortemente funiculoso; coloração verde e vermelho amarronzado; reverso vermelho pigmentado; de 25 a 40 mm de diâmetro. Não cresceram a 37 °C. Ao microscópio apresentou hifas aéreas provenientes dos funículos; *penicilli* em alguns casos muito irregulares e complexos e conídios lisos, elipsoidais, de 2 a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 17, E).

**Figura 14** – Macro e micromorfologia de *P. citreonigrum*, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *P. spinulosum*, *P. sclerotiorum* e *P. multicolor*.



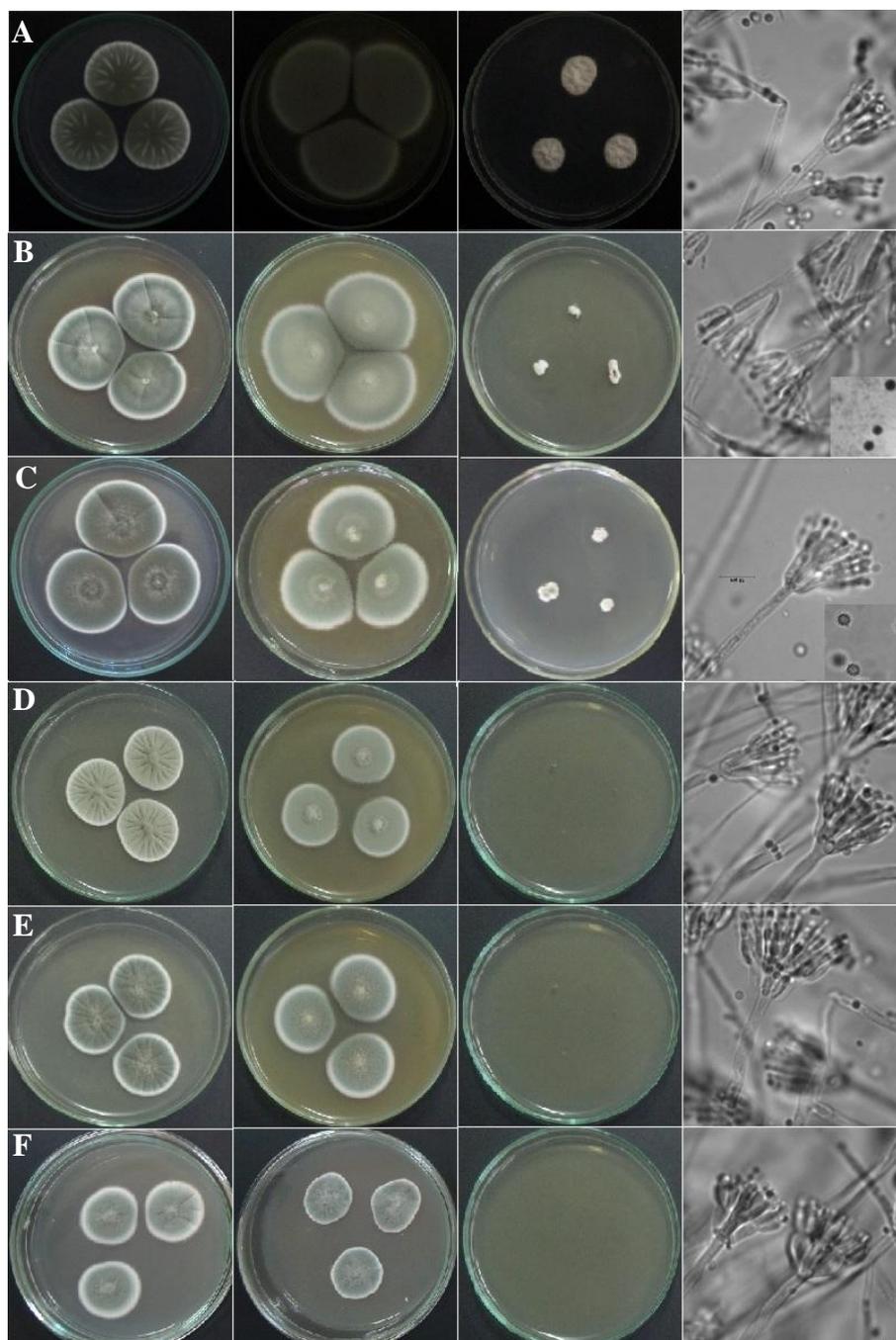
Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *P. citreonigrum*; B: *P. glabrum*; C: *P. decumbens*; D: *P. spinulosum*; E: *P. sclerotiorum* e F: *P. multicolor*.

**Figura 15** – Macro e micromorfologia de *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. solitum*, *P. crustosum*, *P. raistrickii* e *P. fellutanum*.



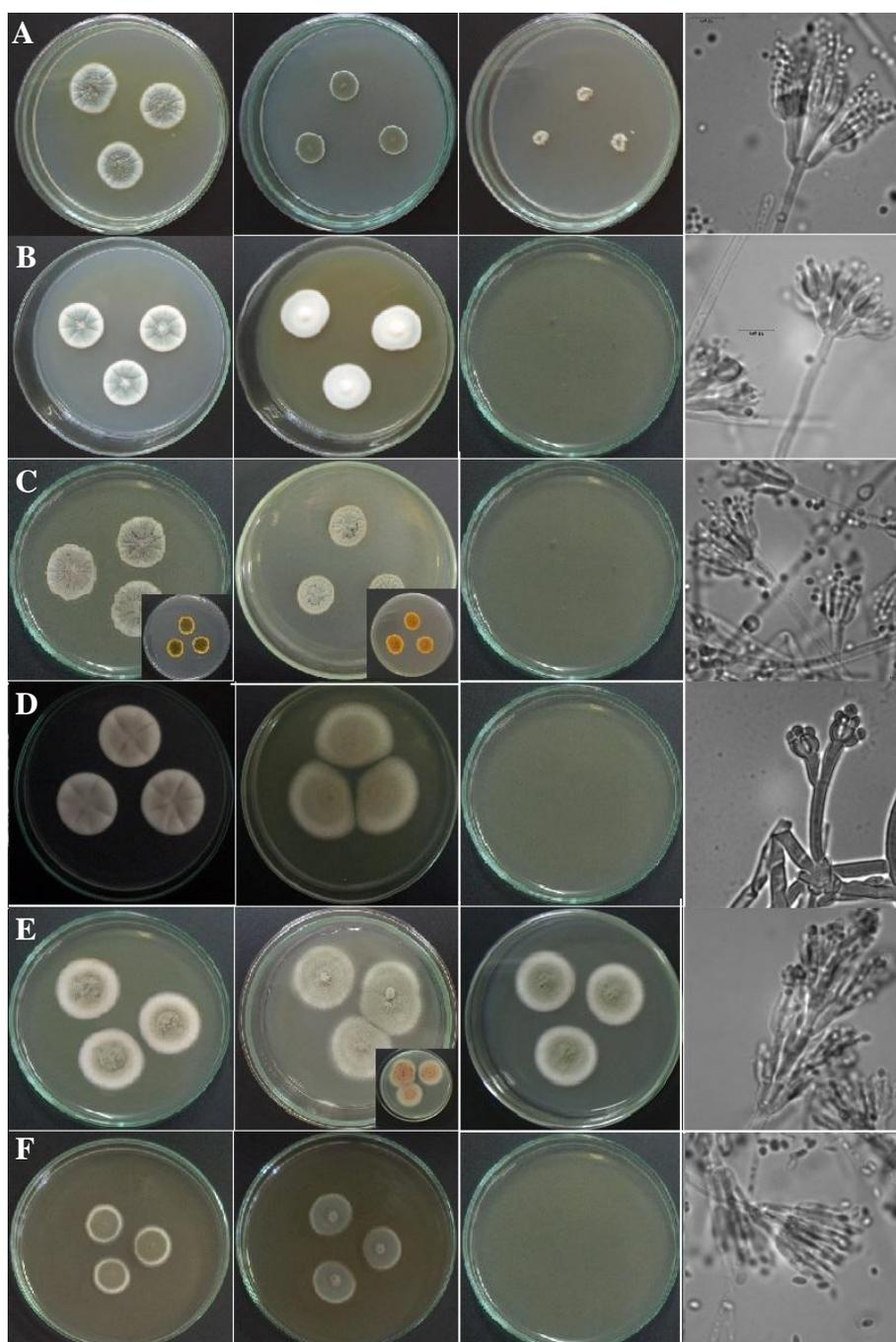
Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *P. chrysogenum*; B: *P. brevicompactum*; C: *P. solitum*; D: *P. crustosum*; E: *P. raistrickii* e F: *P. fellutanum*.

**Figura 16** – Macro e micromorfologia de *P. janthinellum*, *P. oxalicum*, *P. simplicissimum*, *P. corylophyllum*, *P. paxilli* e *P. waksmanii*.



Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *P. janthinellum*; B: *P. oxalicum*; C: *P. simplicissimum*; D: *P. corylophyllum*; E: *P. paxilli* e F: *P. waksmanii*.

**Figura 17** – Macro e micromorfologia de *P. citrinum*, *P. cosmopolitanum*, *P. miczynskii*, *P. janczewskii*, *T. funiculosus* e *T. variabilis*.



Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *P. citrinum*; B: *P. cosmopolitanum*; C: *P. miczynskii*; D: *P. janczewskii*; E: *T. funiculosus* e F: *T. variabilis*.

**Figura 18** – Macro e micromorfologia de *T. purpurogenus* e *T. minioluteus*.



Da esquerda para direita: CYA 25 °C; MEA 25 °C e CYA 37 °C. A: *T. purpurogenus* e B: *T. minioluteus*.

### 3.2.3 Morfotipos não identificados

Do total de morfotipos isolados, 50 não puderam ser identificados com base nos marcadores morfológicos, pois possuíam características muito distintas das encontradas nas chaves de identificação e artigos pesquisados.

Foram encontrados três morfotipos de *Aspergillus*, denominados *Aspergillus* sp. 01, 02 e 03; três de *Eupenicillium* denominados sp. 01, 02 e 03 e um de *Talaromyces*, o 01. Além desses, 43 morfotipos de *Penicillium* não foram identificados e foram chamados de sp. 01 a 43. O isolado *Penicillium* sp. 28, apesar de identificado e armazenado, não está mais viável e suas características não puderam ser descritas.

A caracterização e descrição desses morfotipos foi realizada utilizando a metodologia de Houbraken e Samson (2011) modificada, onde os caracteres mais relevantes foram dispostos na Tabela 6 a seguir, e podem ser visualizados nas Figuras 19 a 66.

A identificação destes morfotipos é de extrema importância para avaliar a riqueza e composição da comunidade de *Penicillium* e *Aspergillus* nas áreas estudadas.

Morfologia é a arquitetura física através da qual um organismo funciona e adapta-se ao meio ambiente. Mas esta pode variar ou ser induzida por estímulos específicos no ambiente em que o organismo se encontra. Como resultado, os espécimes caracterizados por um laboratório podem parecer diferentes quando cultivados em outro, por pequenas diferenças em nutrientes, temperatura ou umidade. Isso dificulta as comparações entre diferentes estudos (OKUDA, 1994; OKUDA et al., 2000).

Estes efeitos podem ser minimizados utilizando técnicas de trabalho estritamente padronizadas para a preparação dos meios de cultura, técnicas de inoculação e condições de incubação (VISAGIE et al., 2014). Estes parâmetros foram precisamente seguidos neste estudo no propósito de se obter material de qualidade para assistir como guia, futuras comparações e pesquisas.

Os meios utilizados na caracterização morfológica no presente estudo, são amplamente empregados na pesquisa de fungos filamentosos, principalmente para *Aspergillus* e *Penicillium*, promovem o crescimento de colônias morfológicamente distintas e, são fatores muito importantes na identificação.

Os meios CYA e MEA são considerados padrões no estudos de ambos os gêneros estudados (PITT, 2000a): MEA é rico em extrato de malte e glicose, nutrientes facilmente assimiláveis; as colônias crescidas neste meio são geralmente basais e por esse motivo, destas são preparadas as lâminas para a microscopia. CYA apresenta em sua composição solução de diversos metais e, neste meio são mais comuns as visualizações de pigmentos solúveis e exudatos coloridos.

O meio de cultura YES possui elevada concentração de sacarose e é recomendado para perfis de extrólitos, principalemnte micotoxinas. Em meio YES as colônias geralmente apresentam forte crescimento e são muito enrugadas. A visualização da produção de ácidos é possível em CREA, e muitas vezes é útil para distinguir entre espécies estritamente relacionadas (VISAGIE et al., 2014).

Outros fatores muito importantes na descrição de espécies de *Penicillium* incluem textura da colônia, grau de esporulação, coloração dos conídios, a abundância, textura e a coloração do micélio ao entorno da colônia, a presença e as cores dos pigmentos solúveis e exudatos, coloração do reverso da colônia e o grau de crescimento e produção de ácido. As características microscópicas importantes são a textura/ ornamentação da parede das estirpes e conídios, bem como dimensões, ornamentação e às vezes as cores de todos os elementos do conidióforo (VISAGIE et al., 2014).

As características mais marcantes observadas em grande parte dos morfotipos encontrados foram os reversos formentente pigmentados, a produção de pigmentação solúvel, a textura e coloração das colônias e os formatos e texturas do *penicilli*.

As fotografias são um excelente recurso para observação da coloração e profundidade das colônias, quando não há um parâmetro como por exemplo o “*Methuen Handbook of Color*”, guia padronizado para colorações em fungos. Além disso, nos últimos 20 anos a maioria da literatura de espécies novas traz fotografias das colônias nos meios padrões e de microscopia, que muito auxiliam na identificação das espécies.

**Tabela 6** – Principais características dos morfotipos não identificados.

Morfotipo	Diâmetro da Colônia		Máxima	Formato e textura dos conídios	Características Típicas
	CYAm	MEA mm	Temp. °C		
<i>Aspergillus</i> sp. 01 (Figura 19)	08 - 10	60 - 65	30	subglobosos; lisos	crescimento muito fraco em CYA; não cresceu a 37 °C; coloração laranja terrosa em MEA.
<i>Aspergillus</i> sp. 02 (Figura 20)	90	62 - 66	37	globosos; lisos a finamente rugosos	baixa conidiogênese esverdeada em todos os cultivos; <i>aspergilli</i> colunar.
<i>Aspergillus</i> sp. 03 (Figura 21)	10 - 17	13 - 17	30	globosos; lisos	fraco crescimento em todos os cultivos; colônias elevadas; vesículas de 14 a 30 µm.
<i>Eupenicillium</i> sp. 01 (Figura 22)	55 - 63	62 - 68	37	globosos; lisos	colônia arenosa em MEA; reverso marrom em CYA; estipe espinhosa.
<i>Eupenicillium</i> sp. 02 (Figura 23)	29 - 41	25 - 35	30	globosos a elipsoidais; lisos	colônias muito funiculosas em todos os cultivos; reverso alaranjado em CYA; estipe rugosa; métula alargada na extremidade.
<i>Eupenicillium</i> sp. 03 (Figura 24)	28 - 34	20 - 24	30	-	Colônias muito arenosas em todos os cultivos; presença de pigmentação solúvel e exudato em alguns isolados

(Continua)

<i>Penicillium</i> sp. 01 (Figura 25)	48 - 55	57 - 66	30	globosos a elipsoidais; lisos	reverso amarelo no centro em CYA; colônias aveludadas; métulas em ângulos abertos.
<i>Penicillium</i> sp. 02 (Figura 26)	27 - 34	43 - 50	37	subglobosos; espinhosos	colônias flocosas; colônias baixas com coremia em MEA; estipe e conídios espinhosos.
<i>Penicillium</i> sp. 03 (Figura 27)	72 - 76	26 - 31	30	subglobosos; lisos	colônias flocosas em todos os cultivos; estipes rugosas.
<i>Penicillium</i> sp. 04 (Figura 28)	28 - 31	16 - 22	25	subglobosos; lisos	colônia rosa claro com exudato vermelho em CYA; geralmente quatro métulas por <i>penicilli</i> .
<i>Penicillium</i> sp. 05 (Figura 29)	17 - 25	05 - 15	30	globosos; lisos	exudato incolor e viscoso em CYA 25 °C; pig. solúvel em MEA; fiálides aciculadas.
<i>Penicillium</i> sp. 06 (Figura 30)	38 - 45	36 - 45	37	globosos; lisos	colônias aveludadas; colônias enrugadas acima de 30 °C; predominantemente terverticilado.
<i>Penicillium</i> sp. 07 (Figura 31)	60	57 - 65	30	elipsoidais; lisos	colônias arenosas; CYA 25 °C palha; escleródios irregulares.
<i>Penicillium</i> sp. 08 (Figura 32)	45 - 55	45 - 55	30	subglobosos; lisos	Colônias aveludadas e elevadas; produção de ácido; duas métulas por <i>penicilli</i> .
<i>Penicillium</i> sp. 09	30 - 34	38 - 44	37	subglobosos a elipsoidais; lisos	exudato verde em CYA 25 °C; pig. solúvel amarronzada em CYA 37 °C; produção de

(Continua)

(Figura 33)					ácidos em CREA; reversos amarronzados.
<i>Penicillium</i> sp. 10 (Figura 34)	30 - 45	35 - 50	30	subglobosos a elipsoidais; lisos	exudato verde citrino em CYA 25 °C; reverso amarelo brilhante em CYA 25 °C.
<i>Penicillium</i> sp. 11 (Figura 35)	22 - 28	18 - 21	25	globosos; lisos	CYA 25 °C de coloração palha; fraca produção de ácidos; métulas alargadas.
<i>Penicillium</i> sp. 12 (Figura 36)	45 - 55	45 - 55	37	elipsoidais; lisos	colônias aveludadas esverdeadas; cresceu a 37 °C; monoverticilado não vesiculado.
<i>Penicillium</i> sp.13 (Figura 37)	30	36 - 43	37	elipsoidais; lisos	reversos amarelo avermelhados; <i>penicilli</i> muito organizado; fiálides aciculadas.
<i>Penicillium</i> sp. 14 (Figura 38)	40 - 50	40 - 50	30	subglobosos; lisos	colônias altas muito funiculosas; produção de ácidos; monoverticilado vesiculado.
<i>Penicillium</i> sp. 15 (Figura 39)	50 - 60	50 - 55	30	-	colônias elevadas muito funiculosas; alta produção de ácidos; escleródios grandes.
<i>Penicillium</i> sp. 16 (Figura 40)	20 - 28	17 - 23	30	subglobosos; lisos	pigmentação solúvel amarela em MEA; fraco crescimento a 30 °C; monoverticilado não vesiculado
<i>Penicillium</i> sp. 17 (Figura 41)	21 - 27	08 - 17	25	globosos; rugosos	colônias com centro branco em MEA; fialides saindo direto da estipe na maioria dos <i>penicilli</i> .

(Continua)

(Continua)

<i>Penicillium</i> sp. 18 (Figura 42)	26 - 31	24 - 28	30	globosos; lisos	reversos laranja brilhantes; MEA de coloração lilás alaranjando; monoverticilado vesiculado; pertence ao complexo <i>P. sclerotiorum</i>
<i>Penicillium</i> sp. 19 (Figura 43)	28 - 36	20 - 30	30	globosos; lisos	exudato verde citrino em CYA 25 °C; reverso amarelo brilhante em CYA 25 °C; alta produção de ácidos e reverso negro em YES.
<i>Penicillium</i> sp. 20 (Figura 44)	35 - 40	62	25	elipsoidais; lisos	colônias arenosas; em CYA amarelas e em MEA vermelhas; pig. solúvel amarela em CYA; fiálides aciculadas; métulas justapostas.
<i>Penicillium</i> sp. 21 (Figura 45)	20 - 25	20 - 26	37	elipsoidais; lisos	colônias brancas, elevadas e funiculosas em todos os cultivos; estipe rugosa.
<i>Penicillium</i> sp. 22 (Figura 46)	28	23 - 26	30	elipsoidais; lisos	reverso em CYA 25 e 30 °C verde escuro, em MEA e YES laranja; micélios conspícuos.
<i>Penicillium</i> sp. 23 (Figura 47)	26	26 - 28	30	globosos; lisos	colônias elevadas e funiculosas em todos os cultivos; monoverticilado com vesícula grande.
<i>Penicillium</i> sp. 24 (Figura 48)	50 - 55	68 - 73	37	globosos; lisos	reversos amarelos delimitados; micélios bege escuro em CYA e MEA.

(Continua)

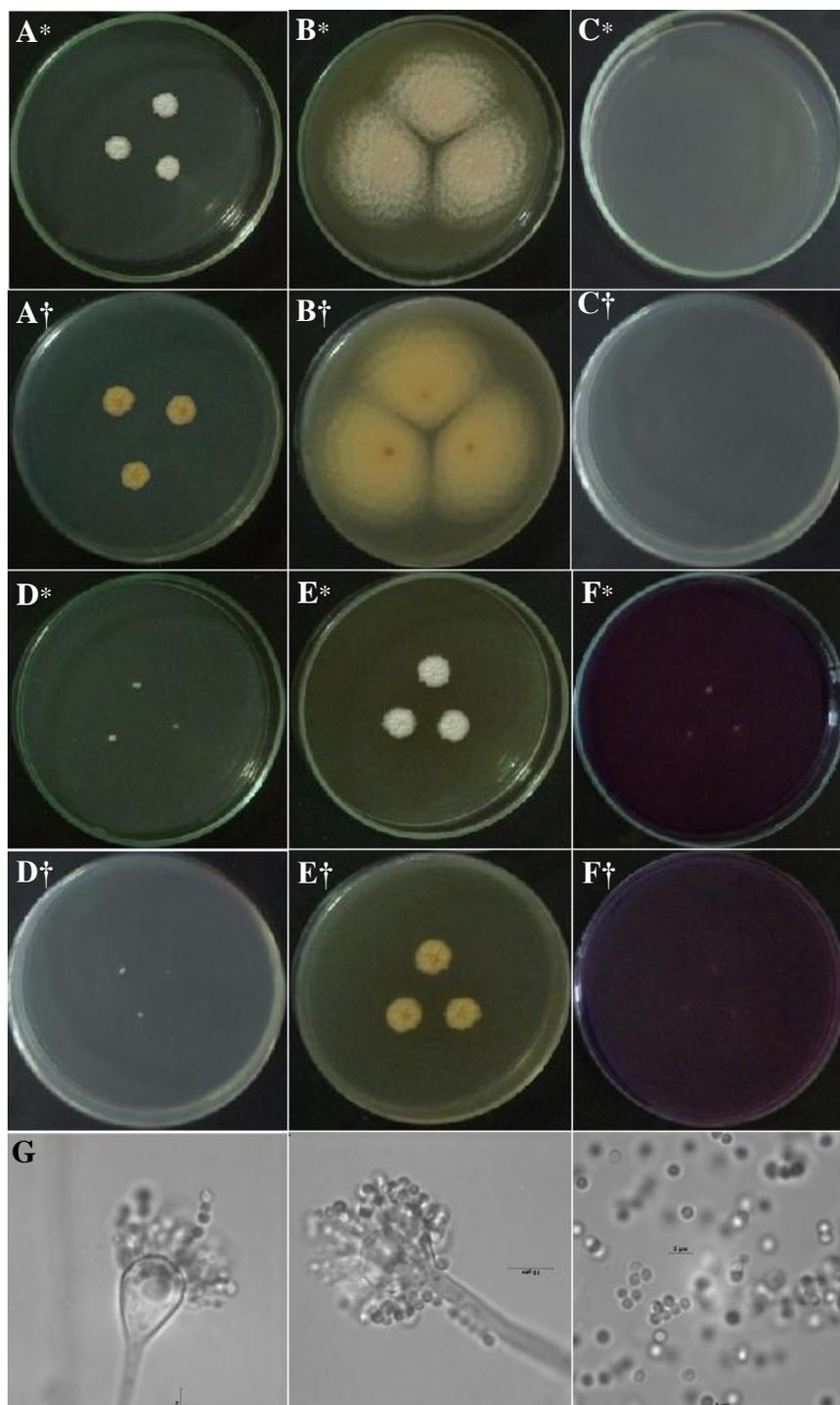
<i>Penicillium</i> sp. 25 (Figura 49)	28 - 31	45 - 48	30	subglobosos a elipsoidais; lisos	reversos amarronzados; alta produção de ácidos; duas métulas por <i>penicilli</i> .
<i>Penicillium</i> sp. 26 (Figura 50)	28 - 34	30 - 33	25	globosos; lisos	reverso verde escuro em CYA e marrom escuro em YES; colônias aveludadas.
<i>Penicillium</i> sp. 27 (Figura 51)	52 - 57	62	25	elipsoidais; lisos	colônias cinzas esverdiadas e arenosas em CYA e MEA; fraca produção de ácidos.
<i>Penicillium</i> sp. 29 (Figura 52)	35 - 45	35	25	elipsoidais; lisos	pigmentação solúvel amarela em CYA e vermelha em MEA; reverso vermelho em MEA e YES e amarelo brilhante em CYA.
<i>Penicillium</i> sp. 30 (Figura 53)	40 - 42	45 - 50	30	globosos; lisos	colônias muito funiculosas; reversos em CYA e YES amarelos; vesículas grandes.
<i>Penicillium</i> sp. 31 (Figura 54)	30 - 33	30 - 36	25	subglobosos; lisos	reversos verde escuros amarronzados; colônias aveludadas; de aspecto emborrachado.
<i>Penicillium</i> sp. 32 (Figura 55)	30 - 40	25 - 40	30	elipsoidais; lisos	exudato verde citrino em CYA 25 °C; reverso amarelo brilhante em CYA 25 °C.
<i>Penicillium</i> sp. 33 (Figura 56)	45	45	25	elipsoidais; lisos	CYA de coloração creme; colonias arenosas; métulas justapostas.

(Continua)

<i>Penicillium</i> sp. 34 (Figura 57)	08 - 12	10 - 15	30	subglobosos; lisos	fraco crescimento em todos os cultivos; pig. solúvel em CYA 25 °C; mono e biverticilado.
<i>Penicillium</i> sp. 35 (Figura 58)	65	60	30	elipsoidais a apiculados; lisos	colônias aveludadas; CYA de coloração palha; fraco crescimento a 30 °C; vesiculado.
<i>Penicillium</i> sp. 36 (Figura 59)	28 - 33	20 - 26	25	elipsoidais; lisos	colônias de bordas irregulares; CYA de coloração creme e pig. solúvel avermelhada.
<i>Penicillium</i> sp. 37 (Figura 59)	30 - 35	35 - 43	25	globosos; lisos	colônias flocosas; pig. solúvel e reverso verde brilhante em MEA.
<i>Penicillium</i> sp. 38 (Figura 60)	30 - 40	25 - 40	30	elipsoidais; lisos	exudato verde citrino em CYA 25 °C; reverso amarelo em CYA 25 °C; forte crescimento a 30 °C; predominantemente terverticilado.
<i>Penicillium</i> sp. 39 (Figura 61)	20	23 - 27	25	elipsoidais; lisos	colônias flocosas; forte pig. solúvel amarela em CYA e vermelha em MEA.
<i>Penicillium</i> sp. 40 (Figura 62)	25 - 30	15 - 18	25	globosos; rugosos	colônias brancas e enrugadas em CYA; terverticilado com ramos longos.
<i>Penicillium</i> sp. 41 (Figura 63)	26 - 32	19 - 24	25	globosos a apiculados, lisos	reversos amarelos amarronzados; estipes desenvolvidas.

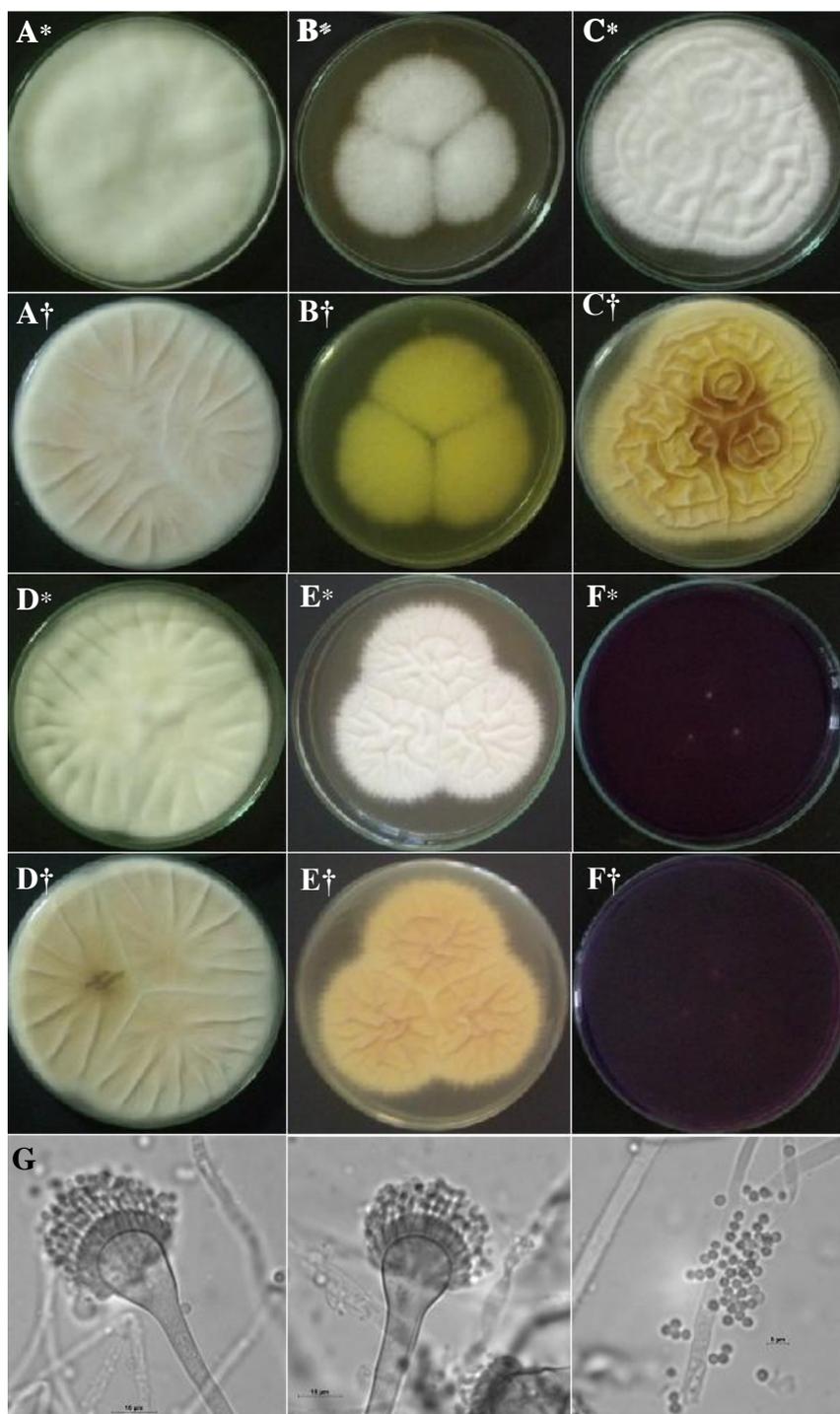
(Conclusão)					
<i>Penicillium</i> sp. 42 (Figura 64)	90	90	30	elipsoidais; lisos	colônias baixas; CYA 25 °C de coloração creme rosada; monoverticilado pouco vesiculado.
<i>Penicillium</i> sp. 43 (Figura 65)	45 - 53	40	37	subglobosos a elipsoidais; lisos	colônias aveludadas; CYA e YES de coloração branca; terverticilado com estipe rugosa.
<i>Talaromyces</i> sp. 01 (Figura 66)	47 - 51	56 - 65	37	-	colônias arenosas de coloração amarela clara; presença de exutato amarelo em CYA; lâmina repleta de cleistotécios grandes não maduros.

**Figura 19** – Caracterização do morfotipo *Aspergillus* sp. 01.



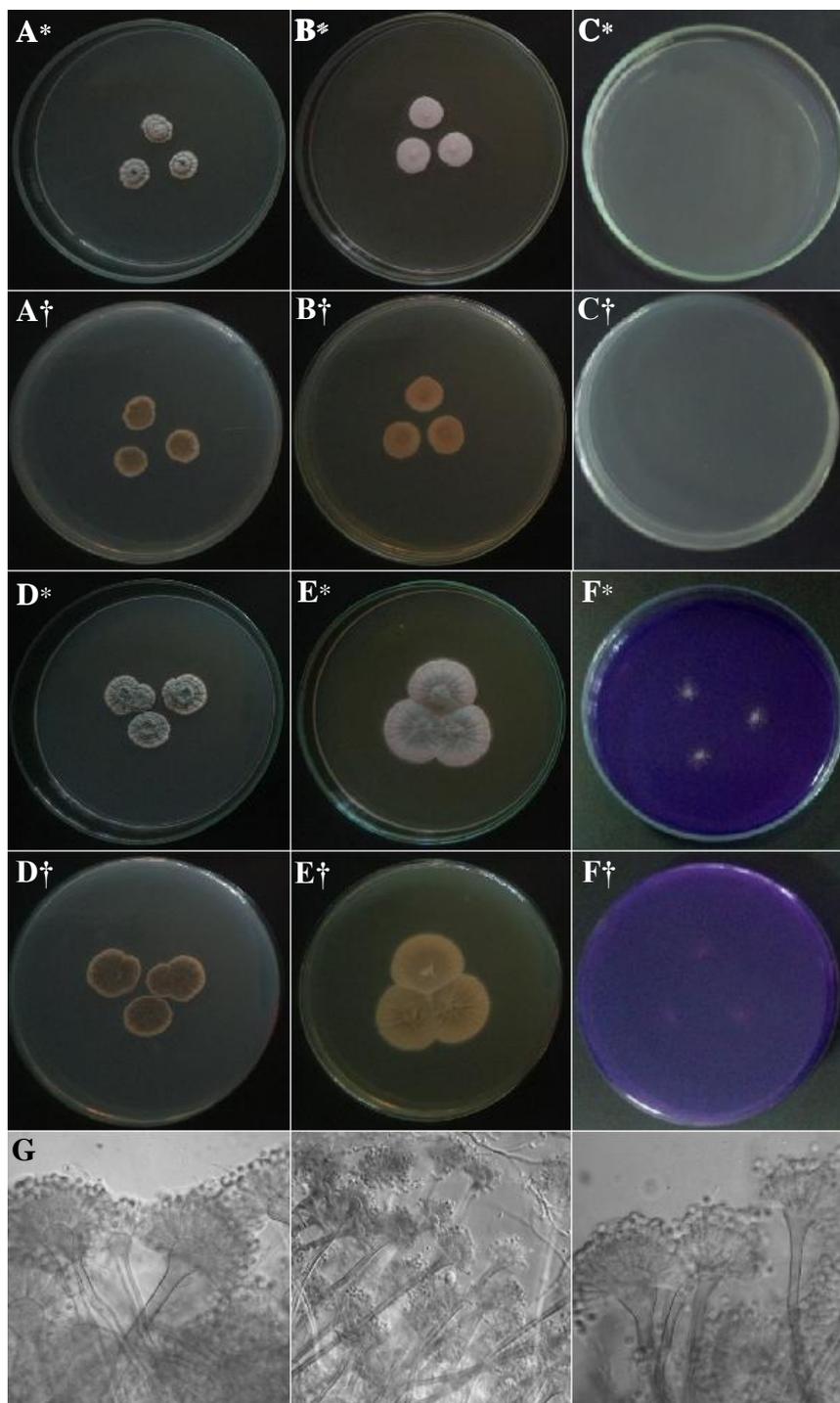
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 20** – Caracterização do morfotipo *Aspergillus* sp. 02.



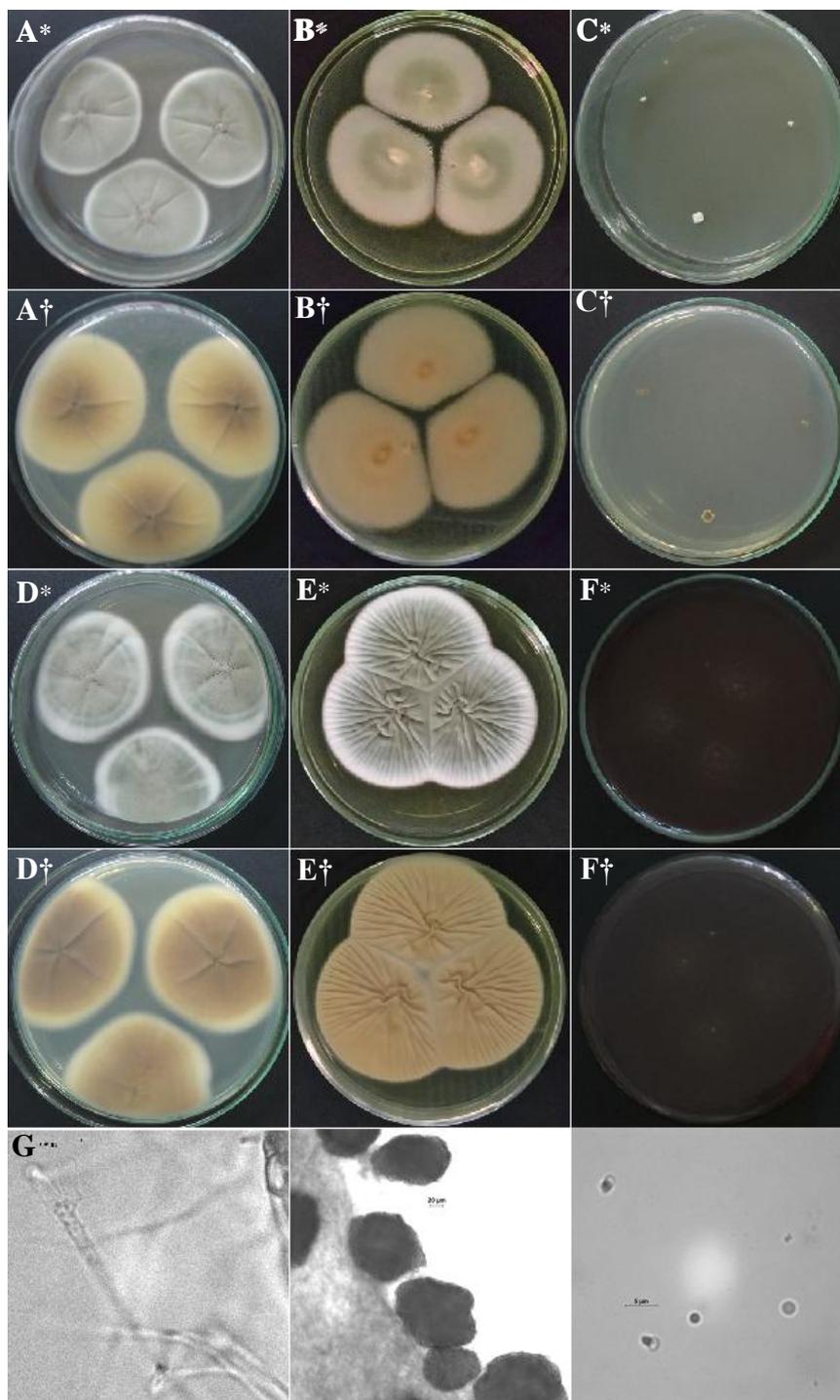
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 21** – Caracterização do morfotipo *Aspergillus* sp. 03.



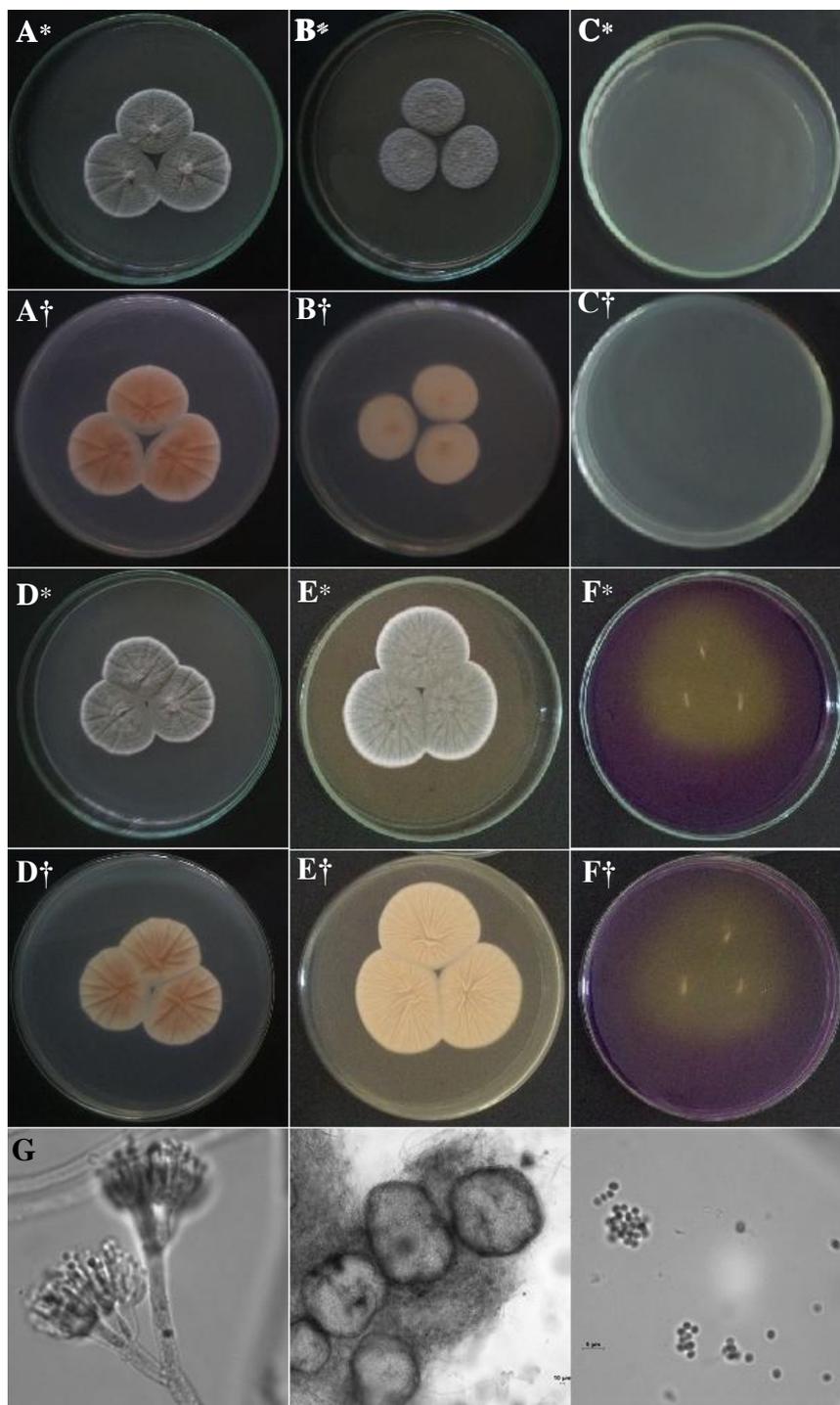
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 22** – Caracterização do morfotipo *Eupenicillium* sp. 01.



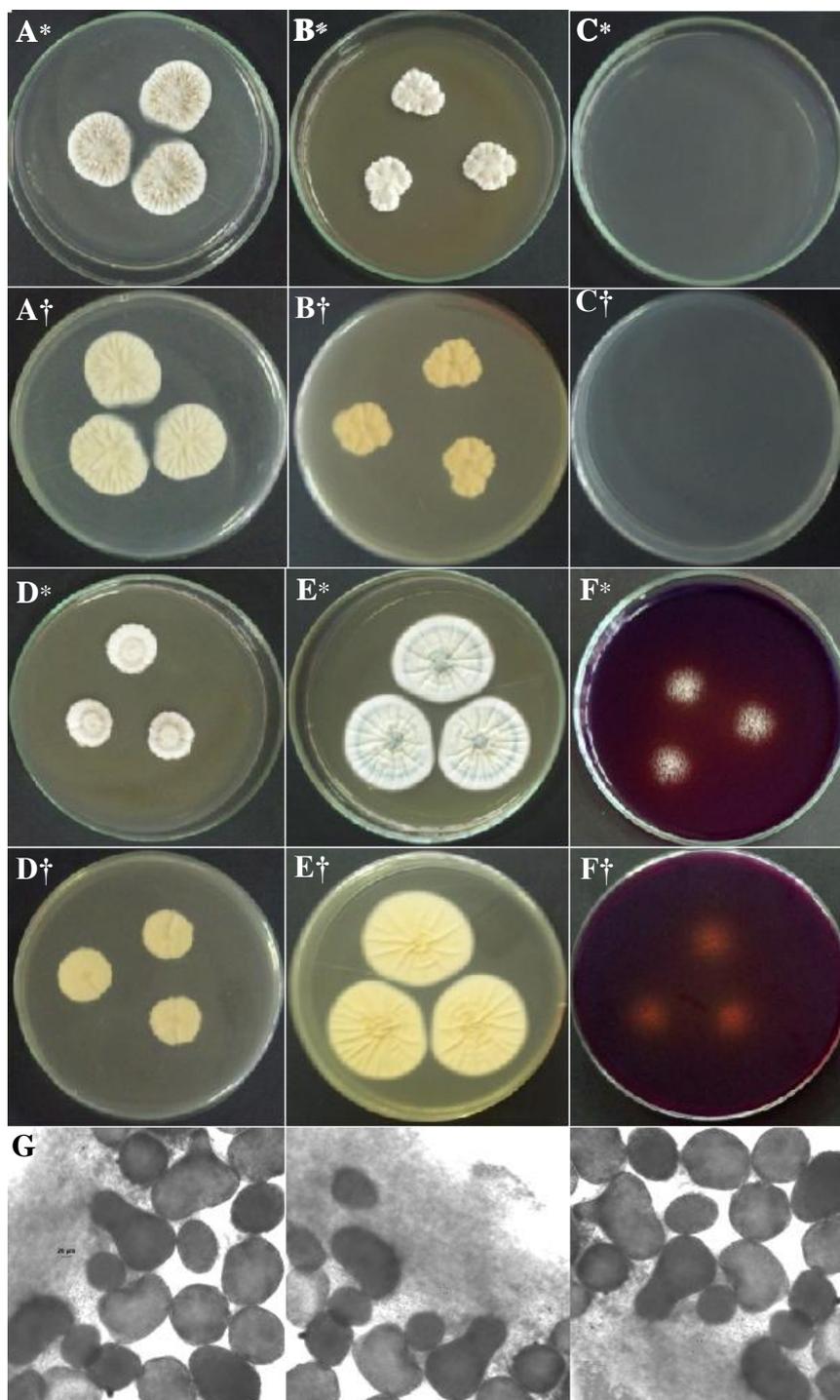
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 23** – Caracterização do morfotipo *Eupenicillium* sp. 02.



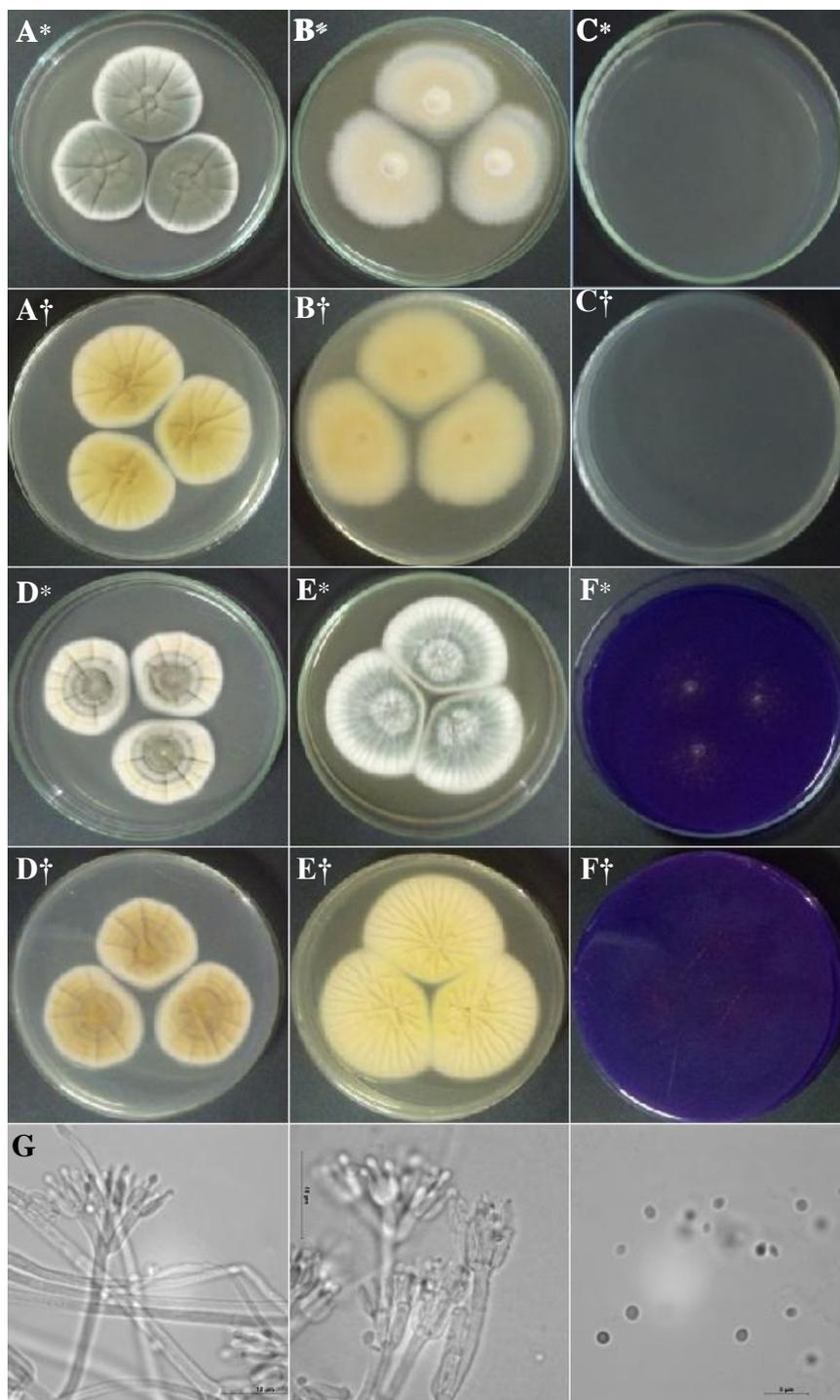
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 24** – Caracterização do morfotipo *Eupenicillium* sp. 03.



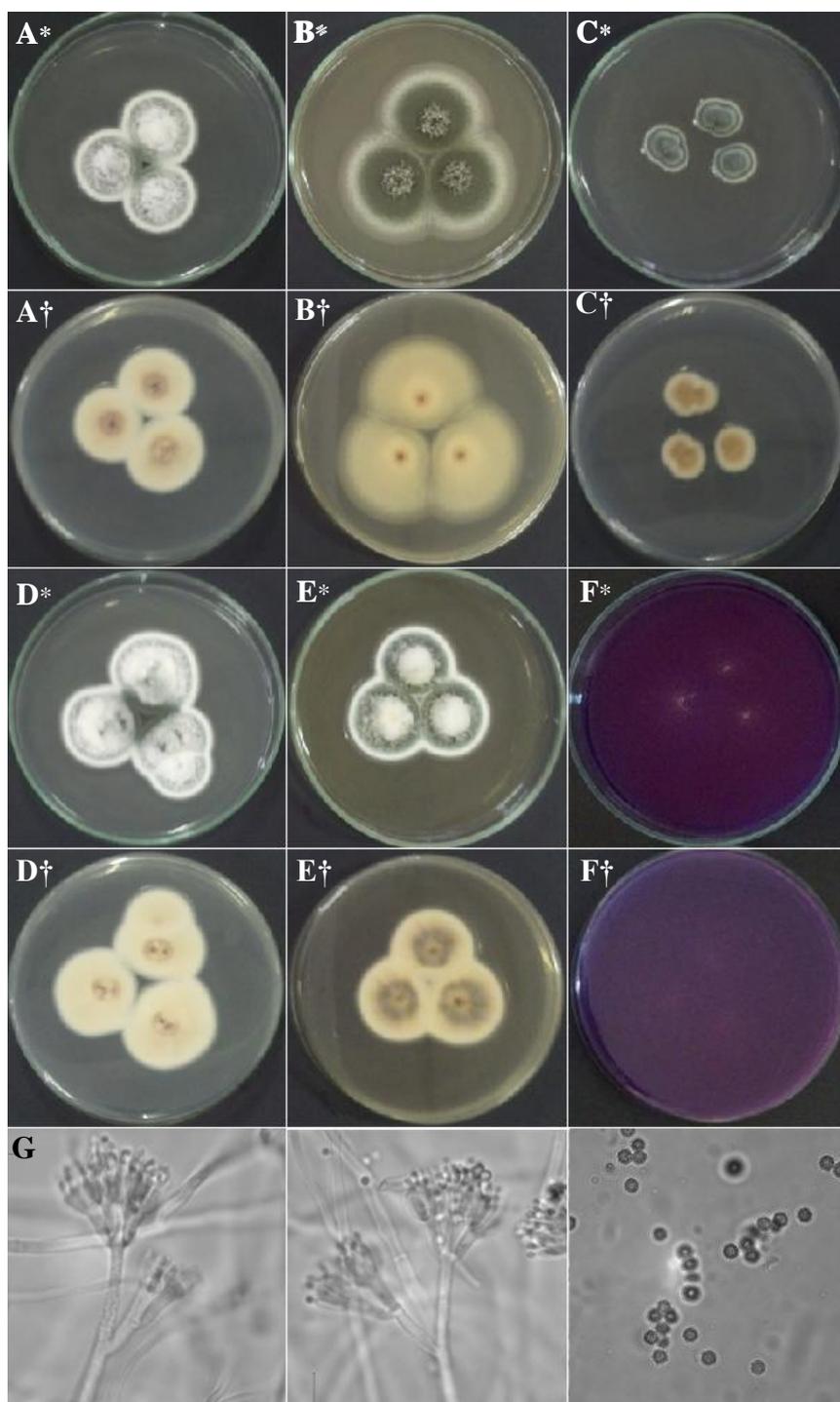
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 25** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 01.



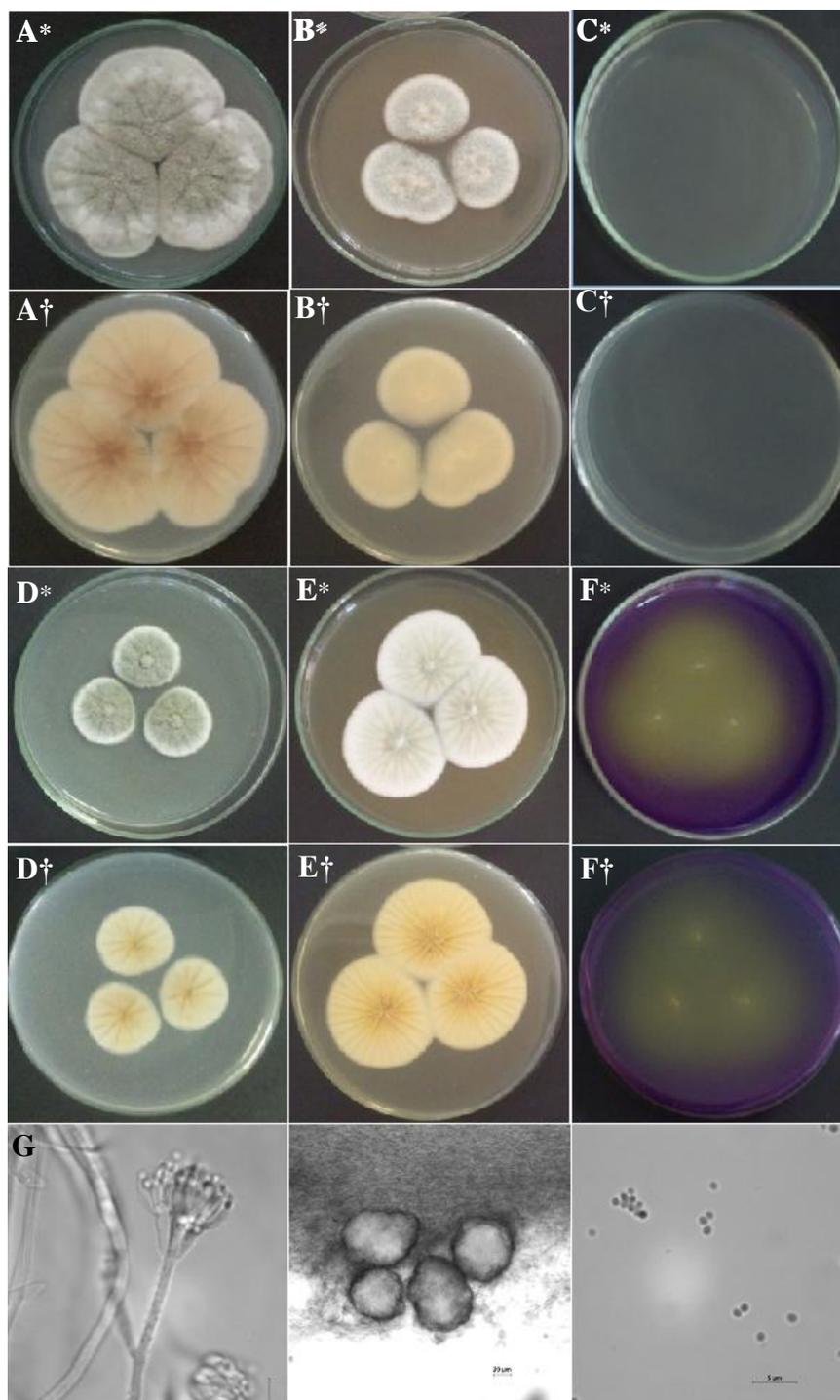
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 26** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 02.



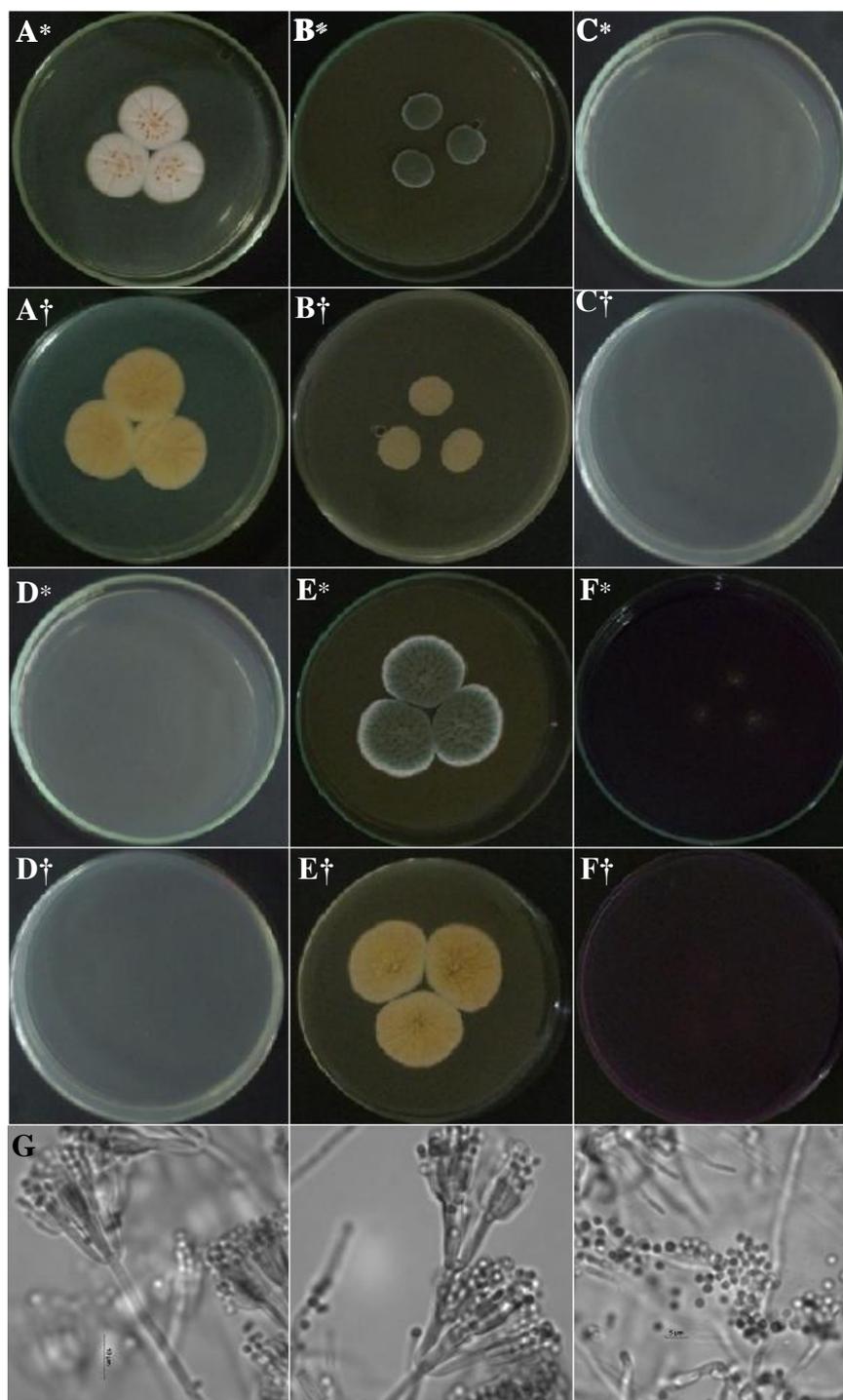
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 27** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 03.



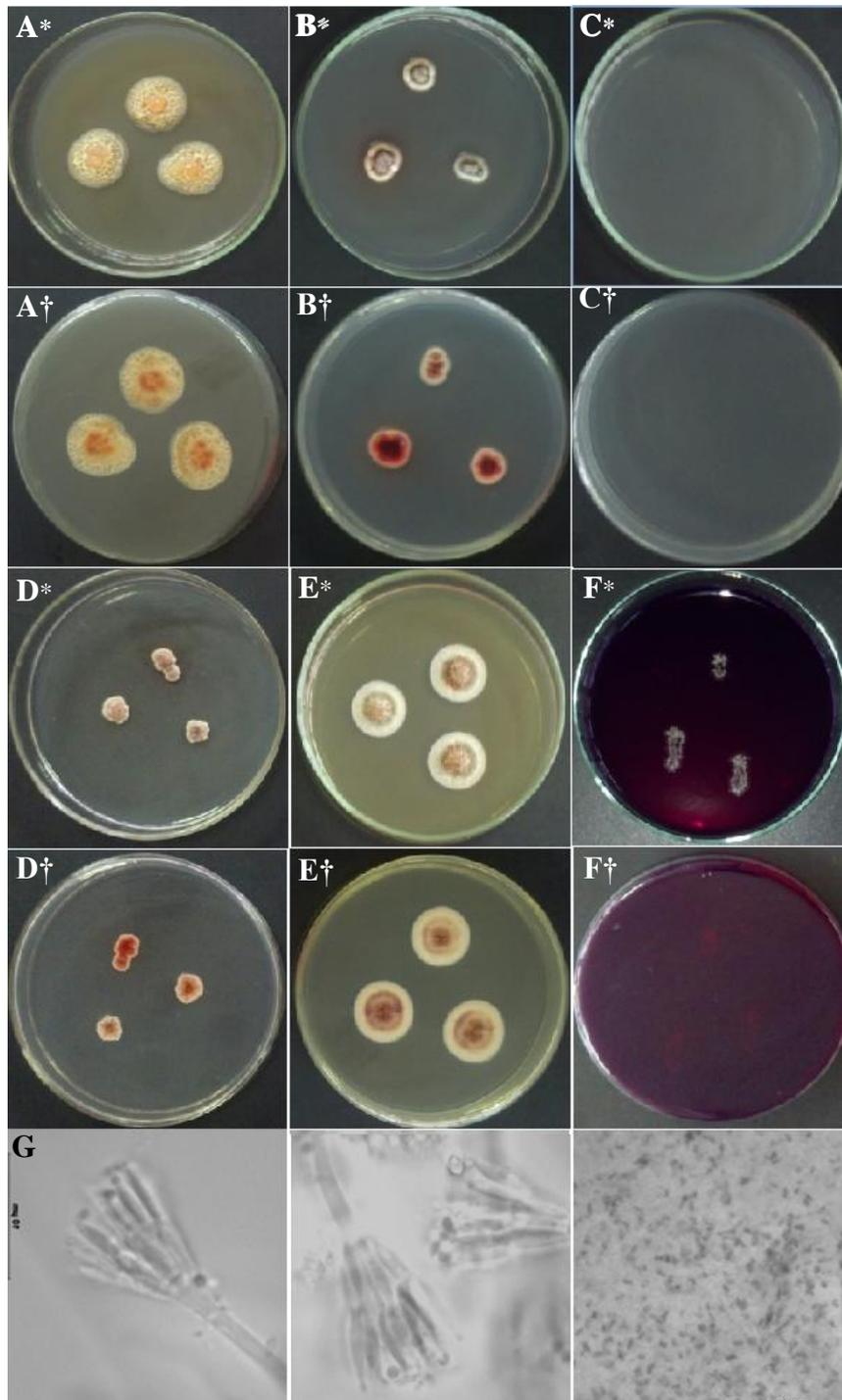
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 28** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 04.



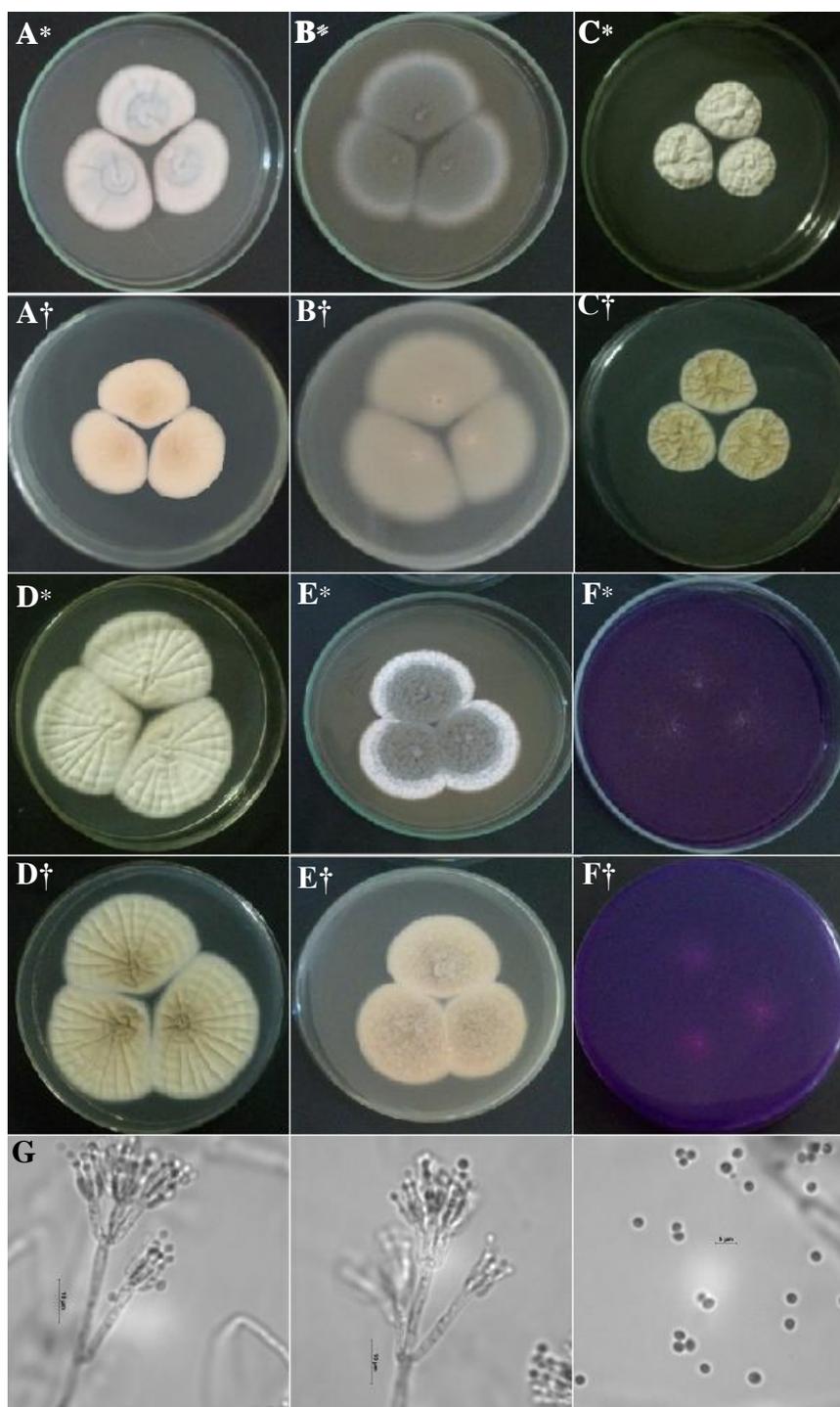
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 29** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 05.



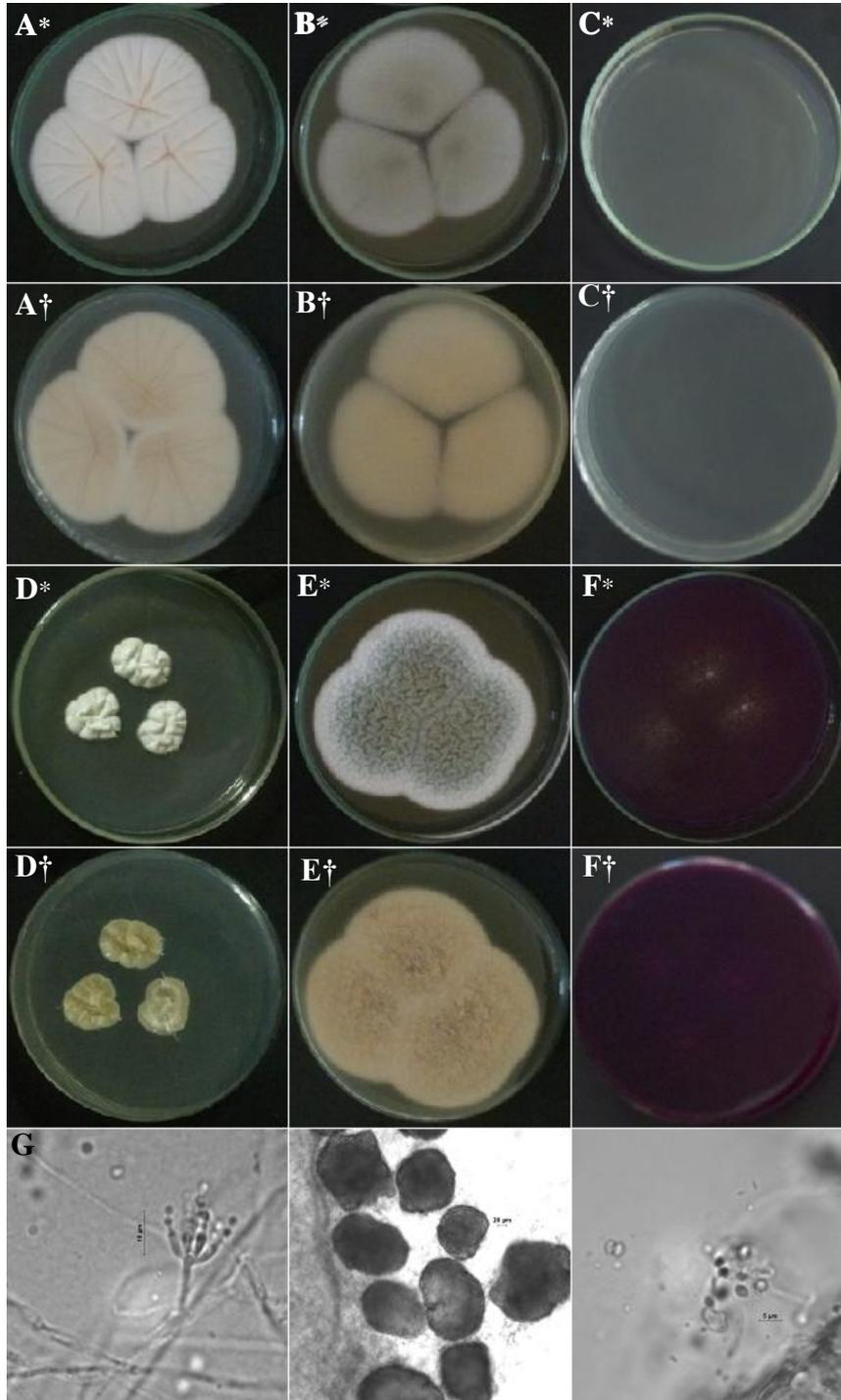
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 30** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 06.



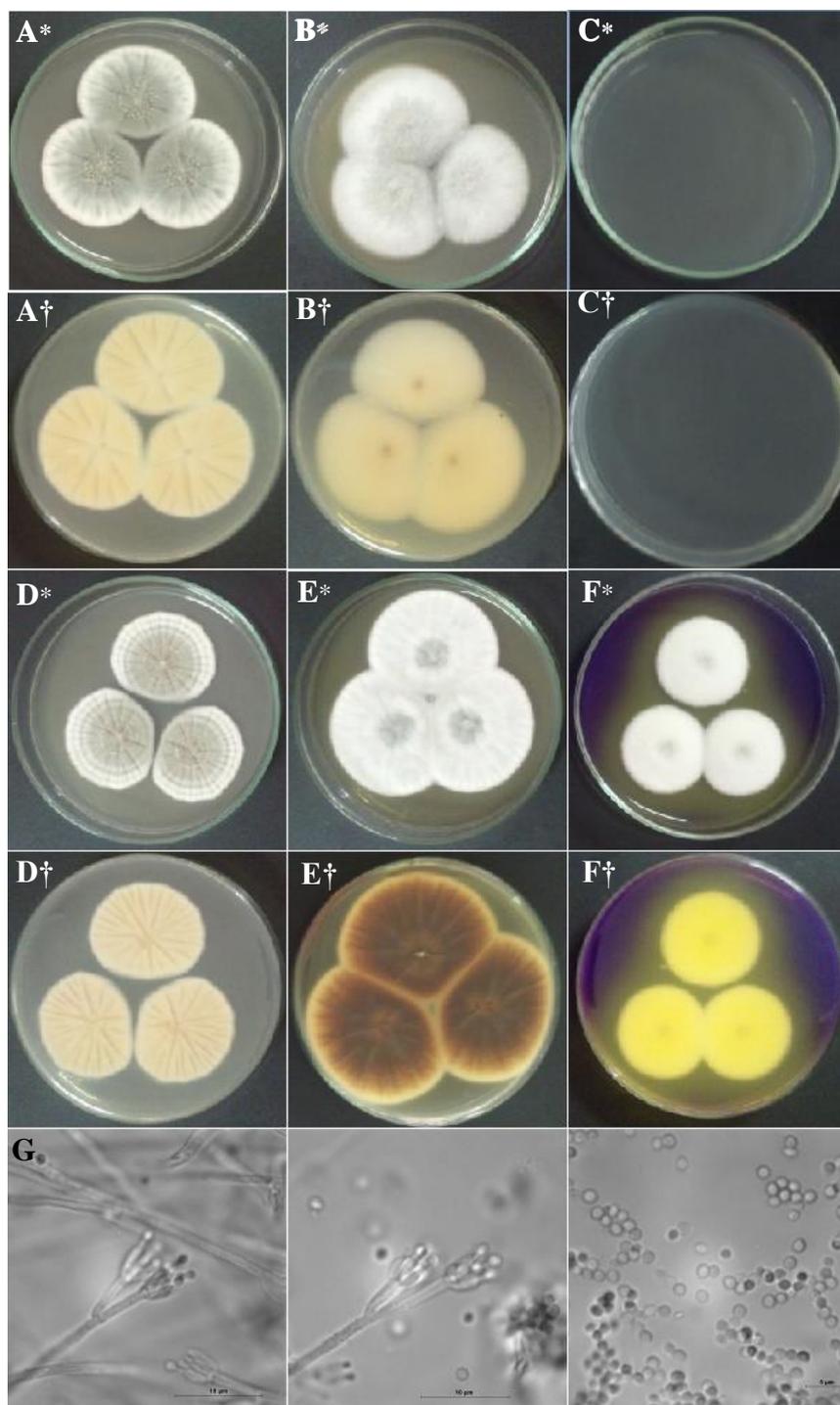
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 31** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 07.



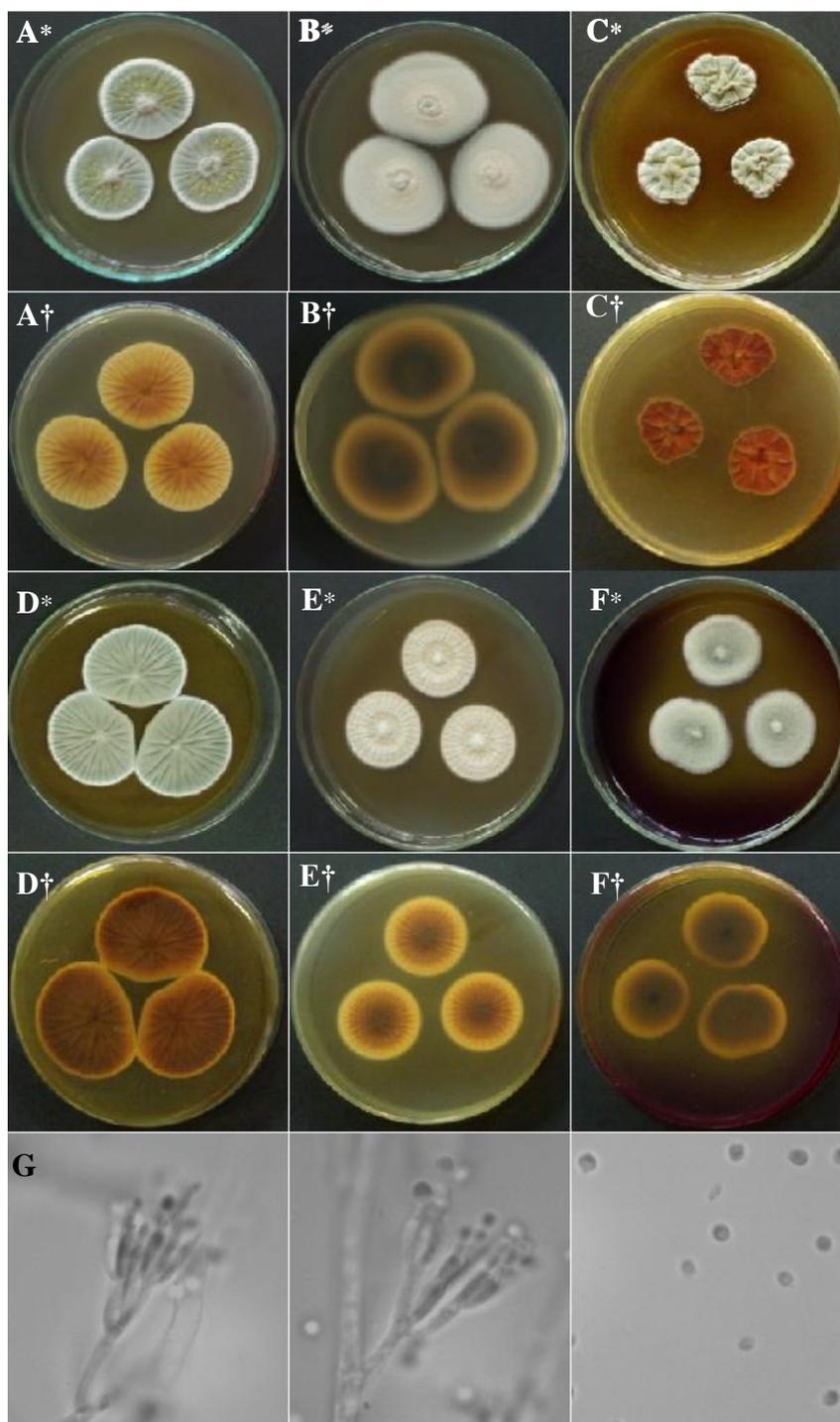
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 32** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 08.



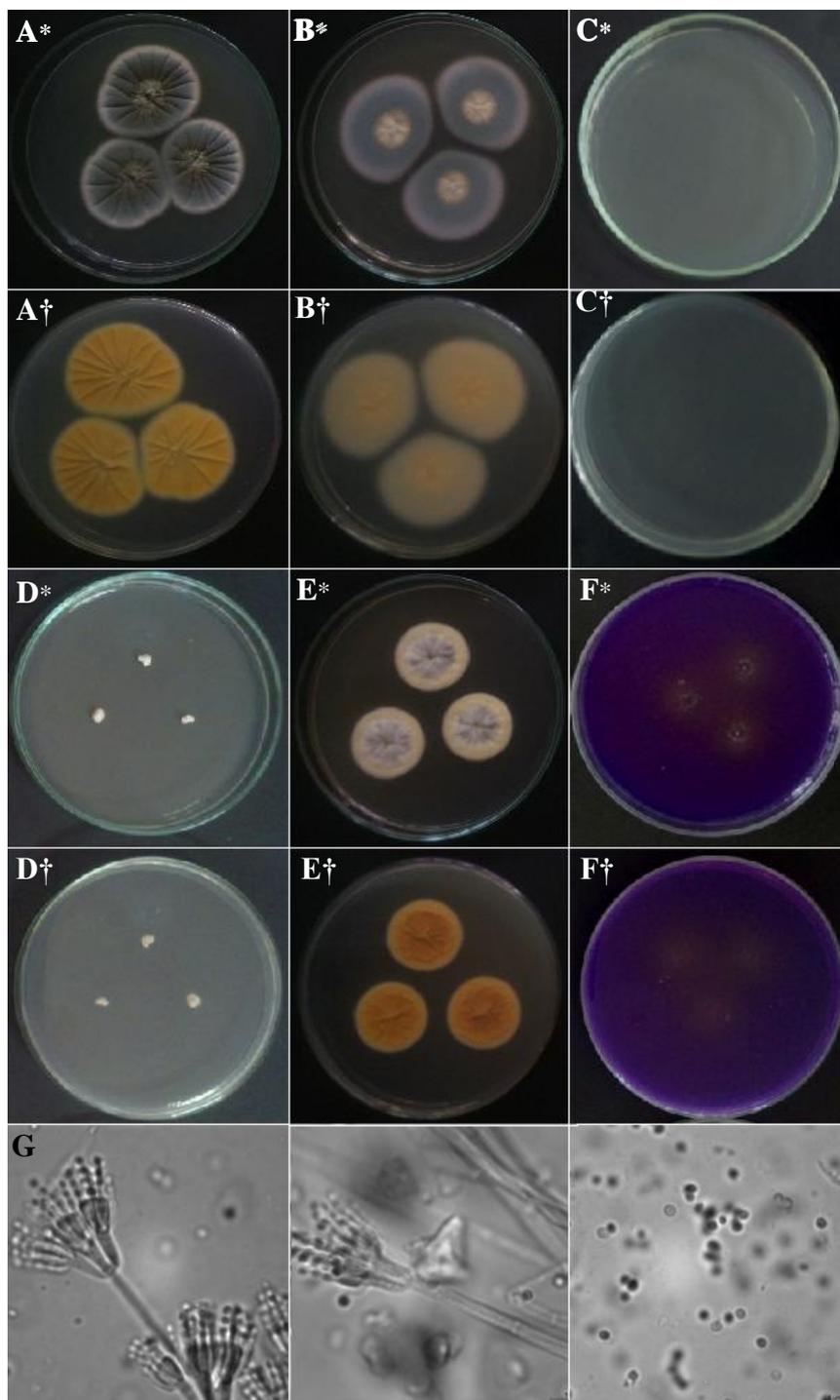
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 33** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 09.



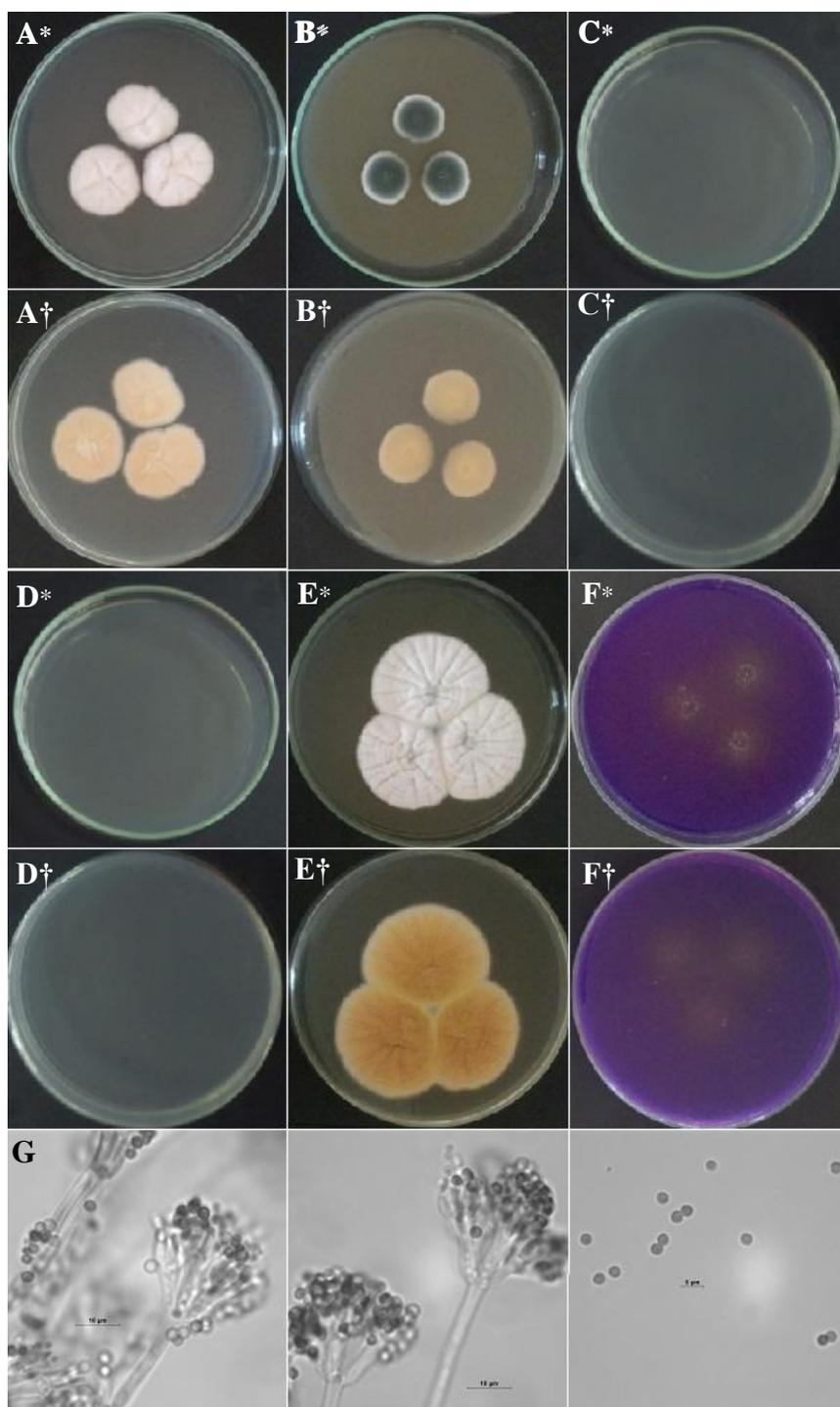
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 34** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 10.



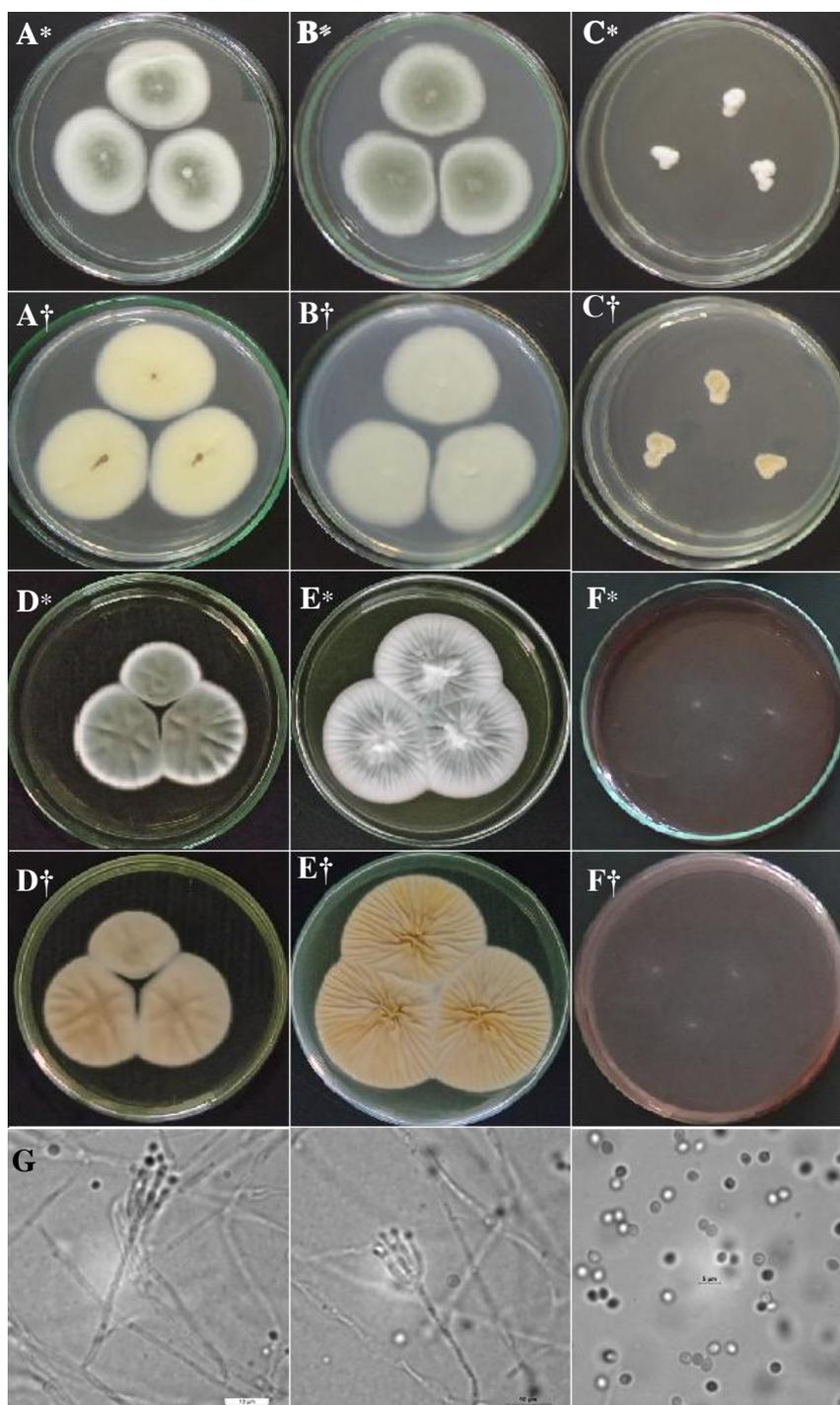
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 35** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 11.



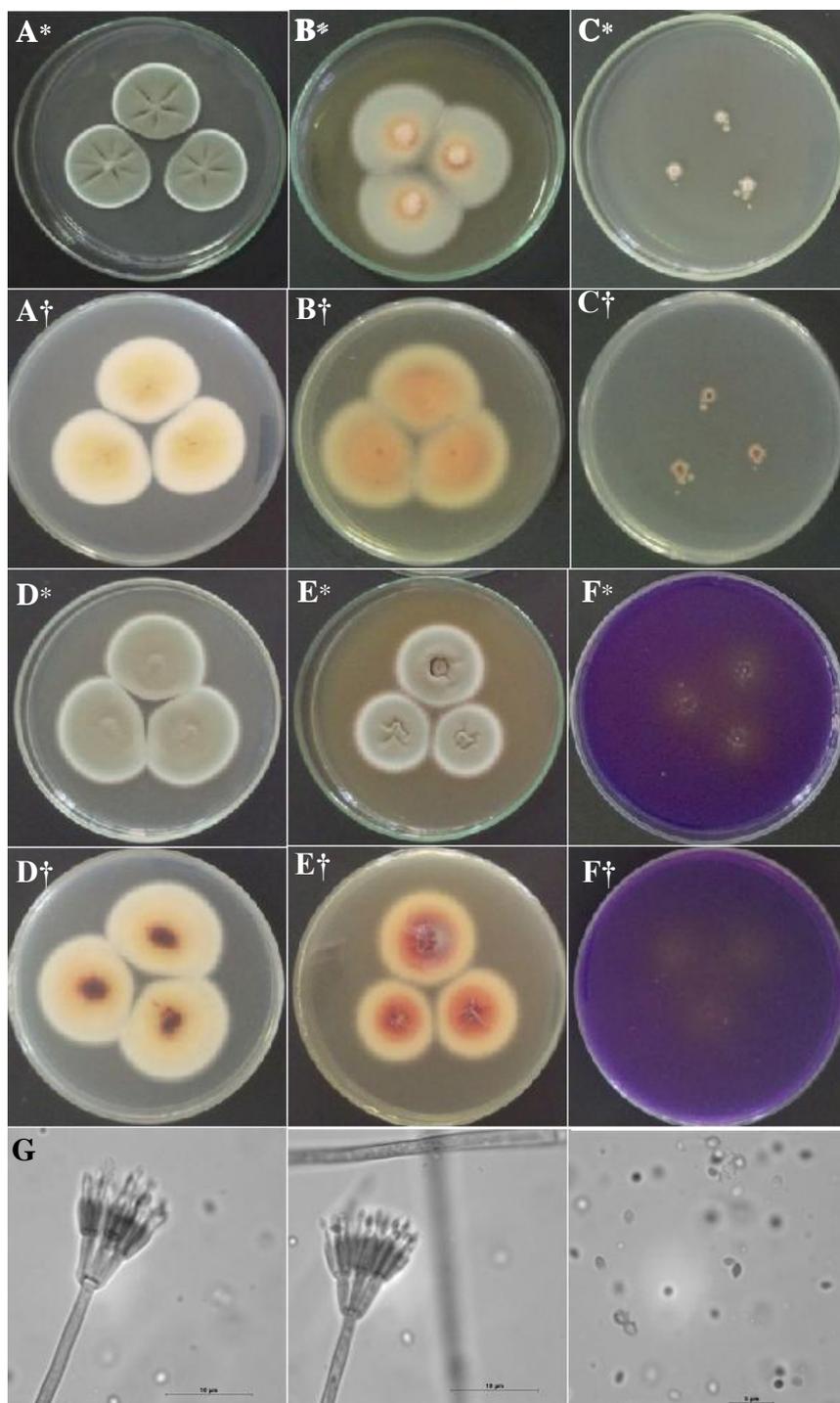
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 36** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 12.



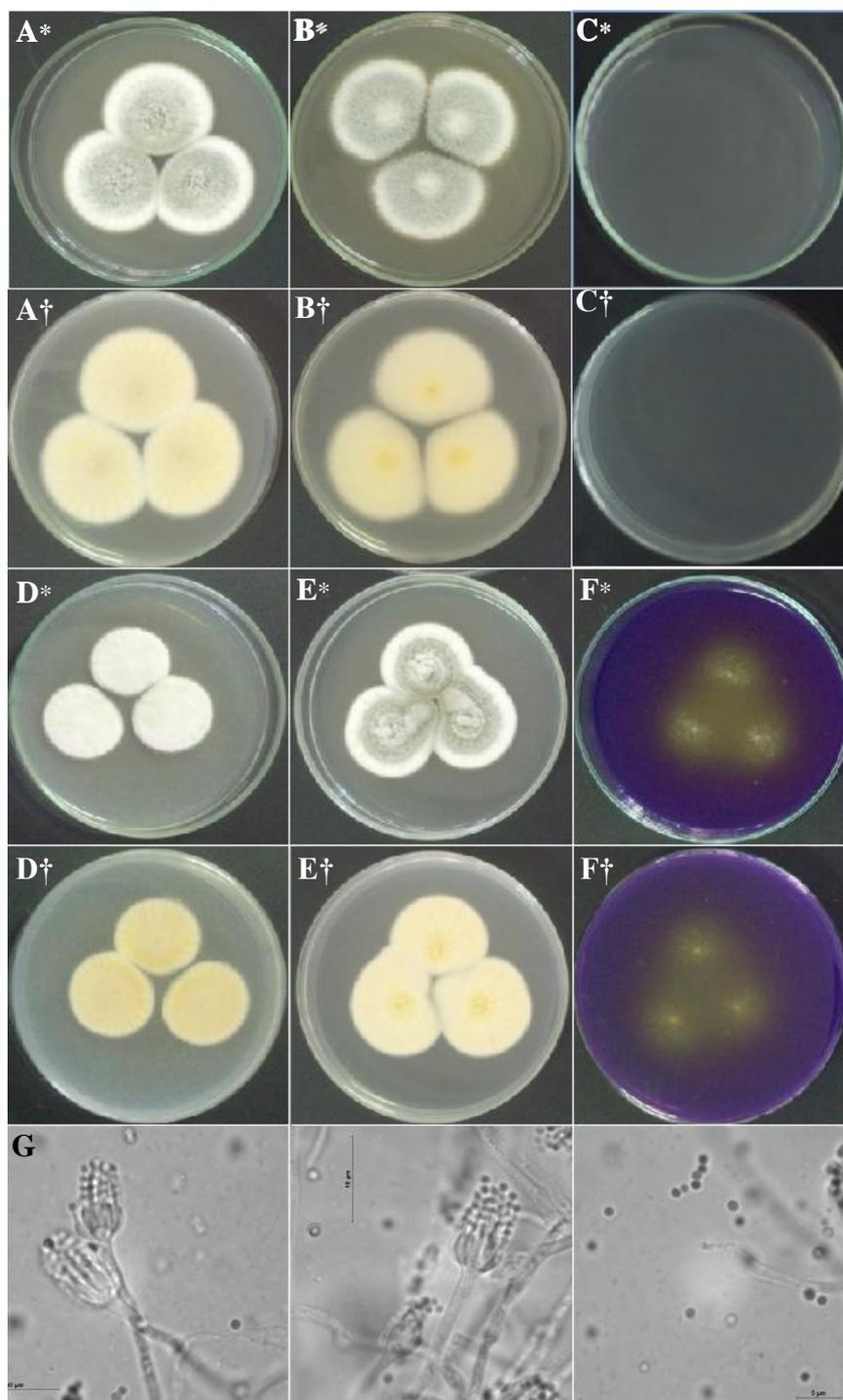
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 37** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 13.



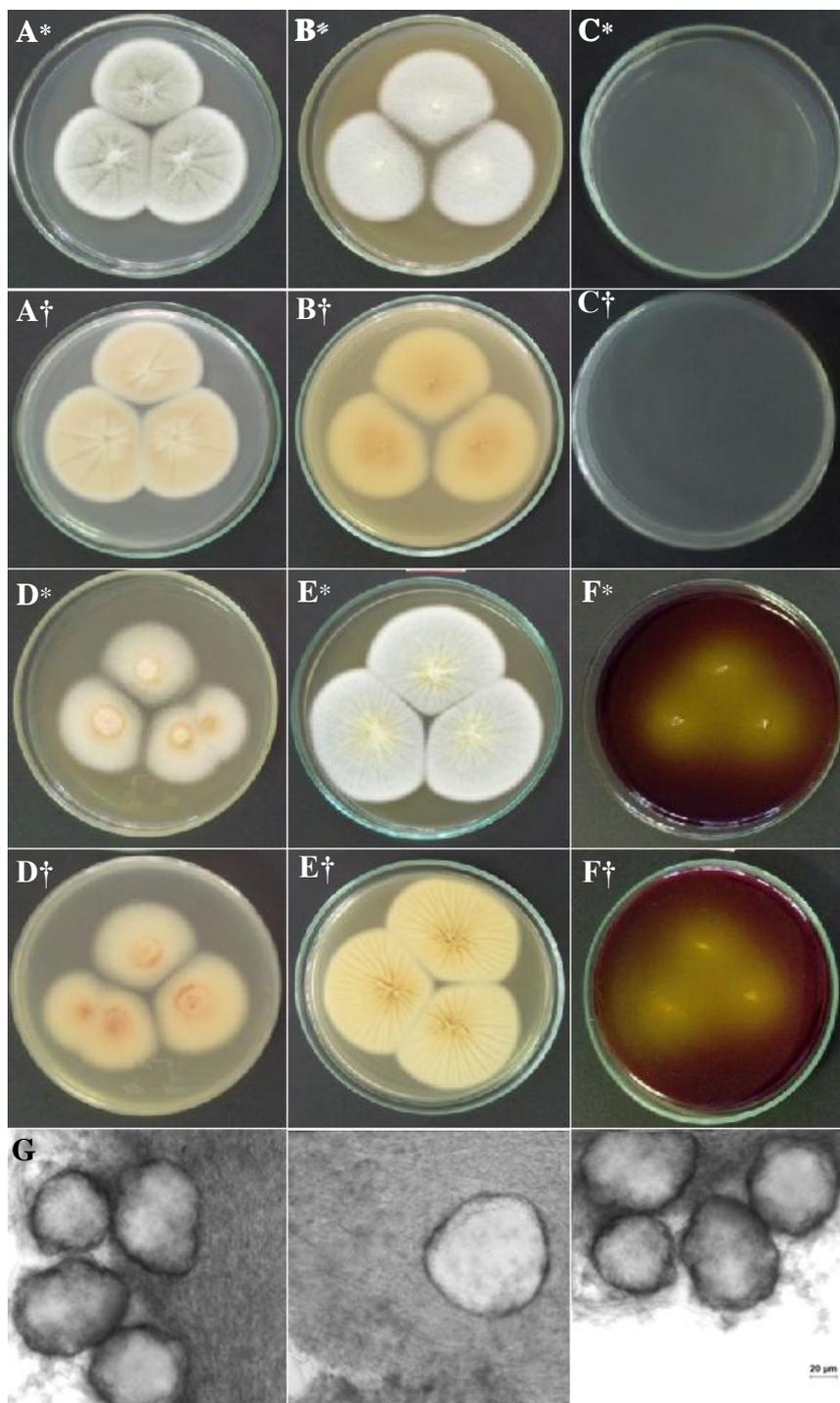
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 38** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 14.



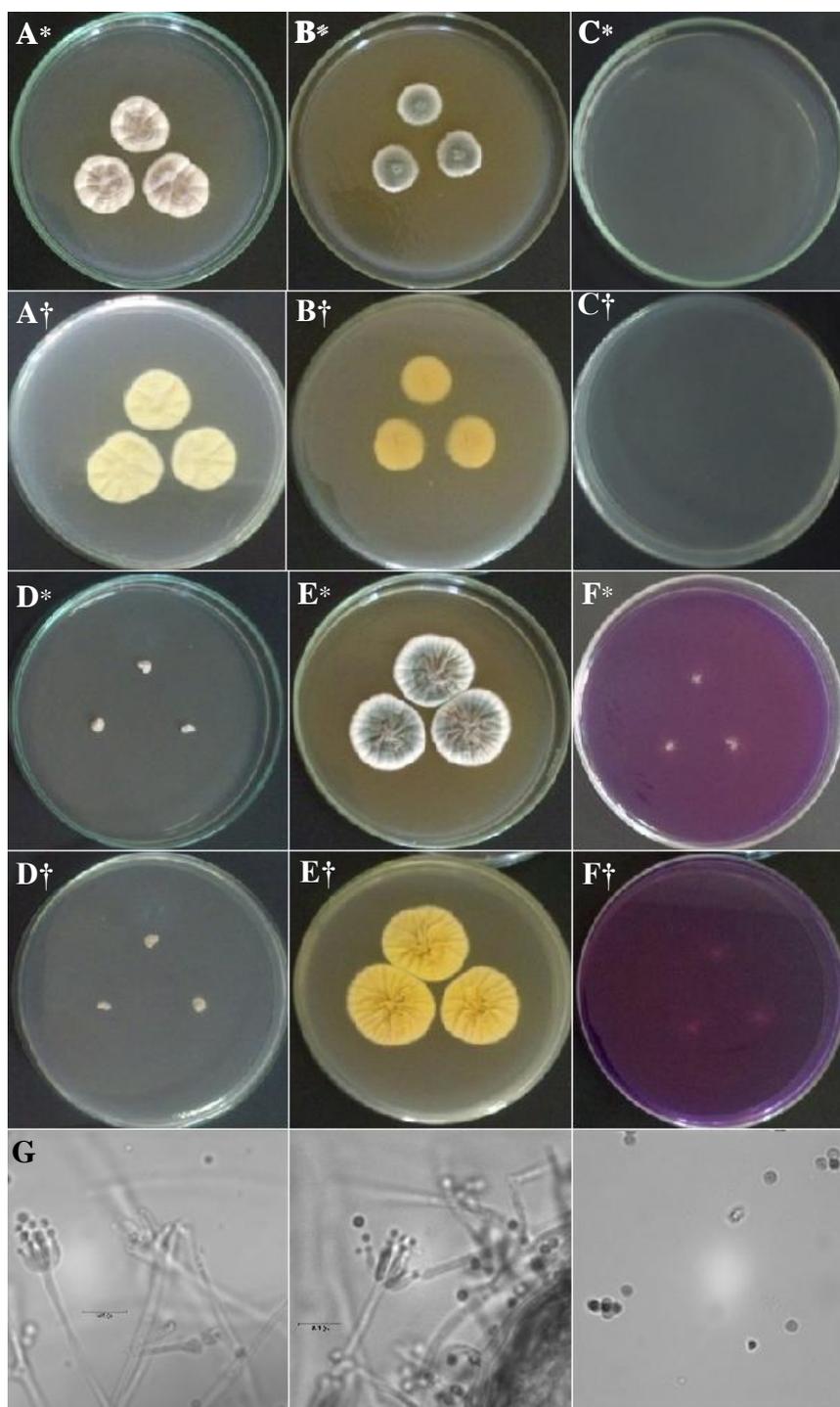
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 39** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 15.



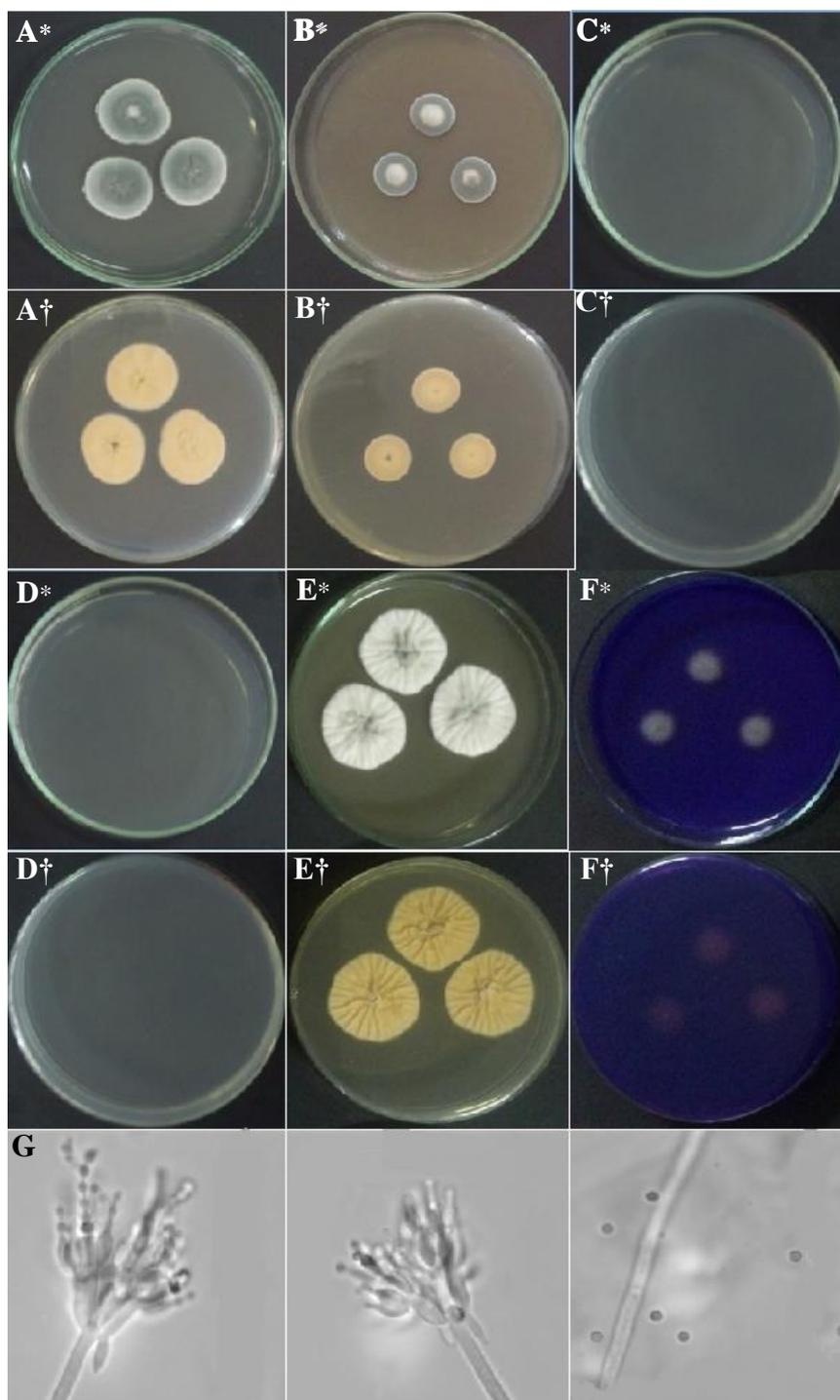
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 40** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 16.



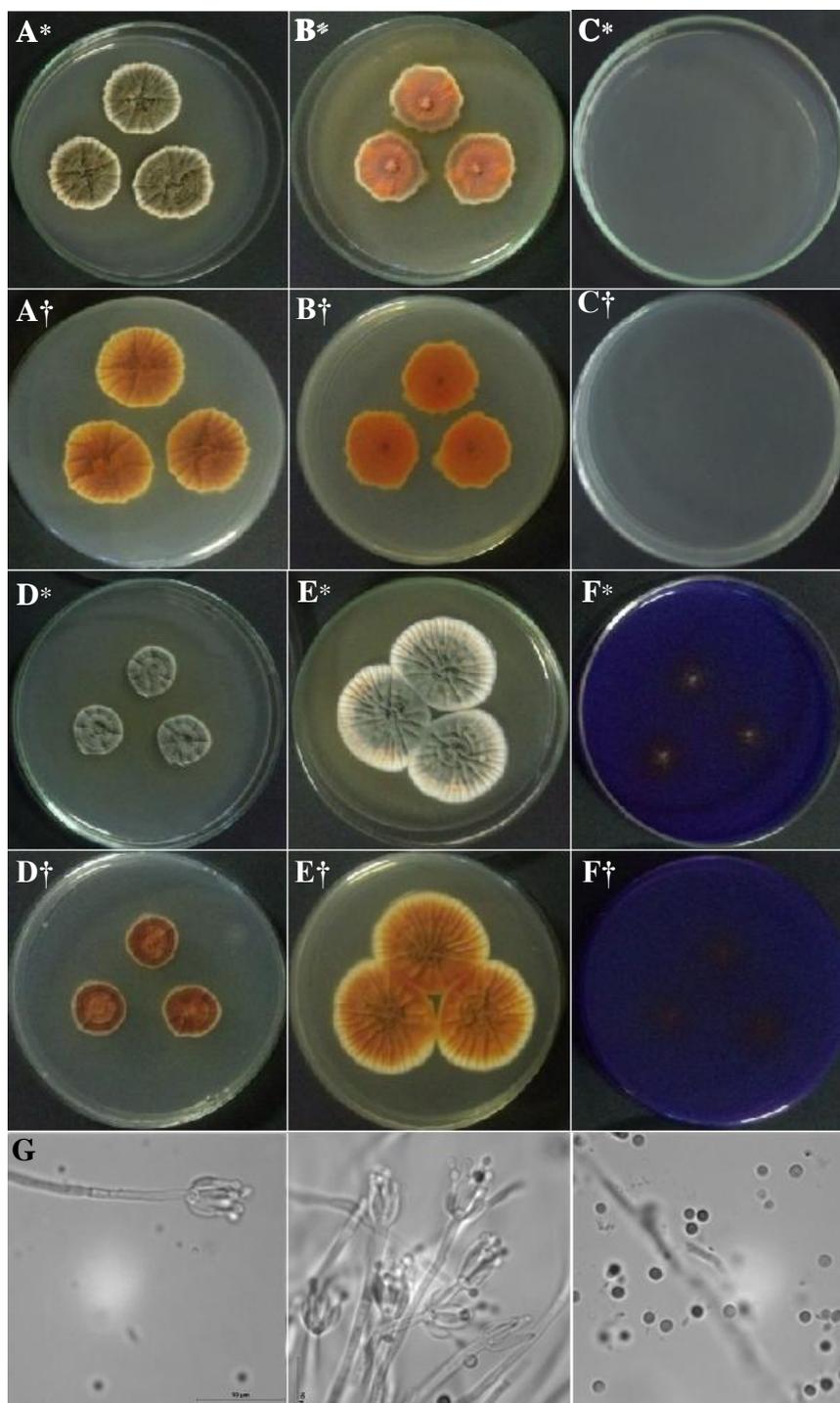
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 41** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 17.



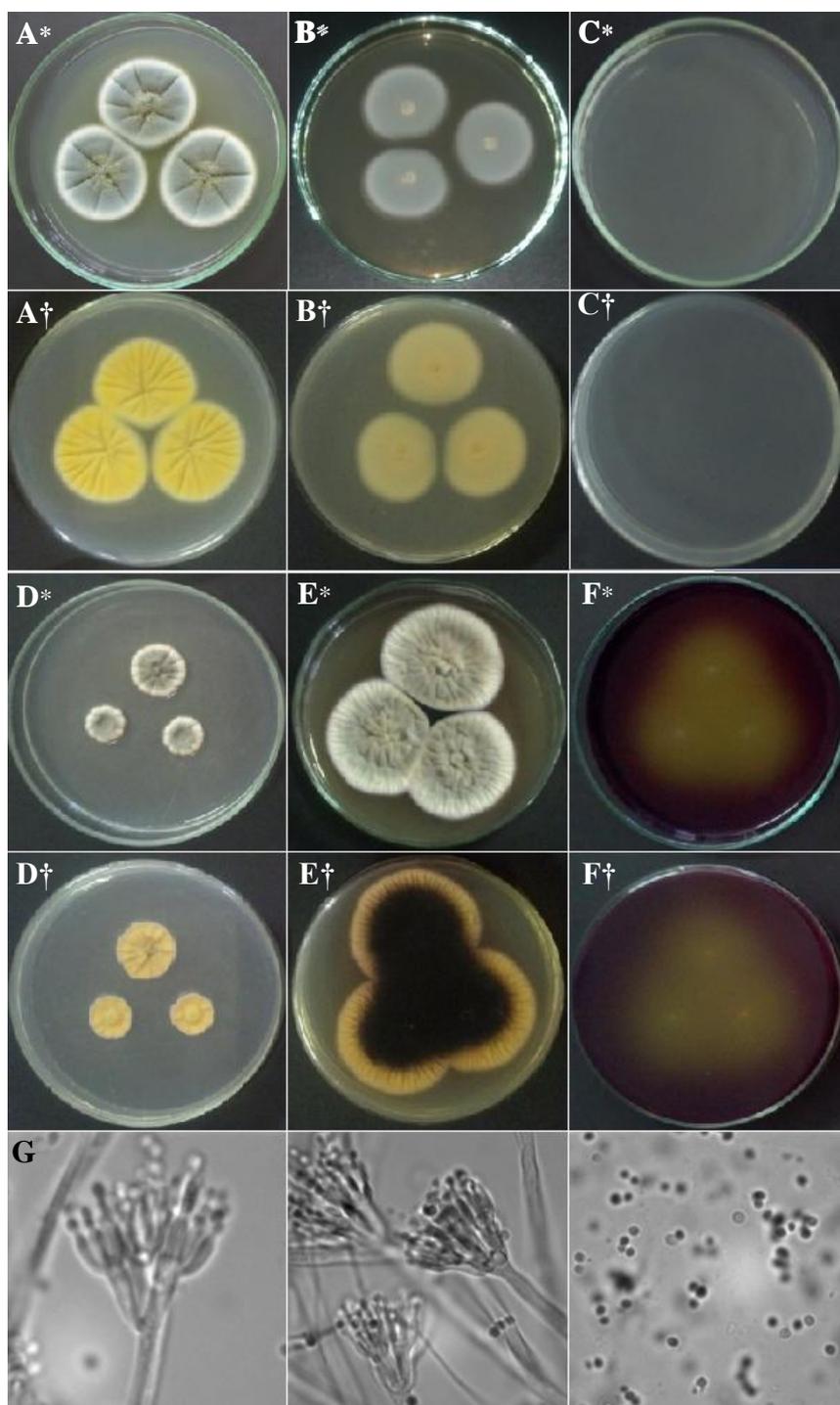
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 42** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 18.



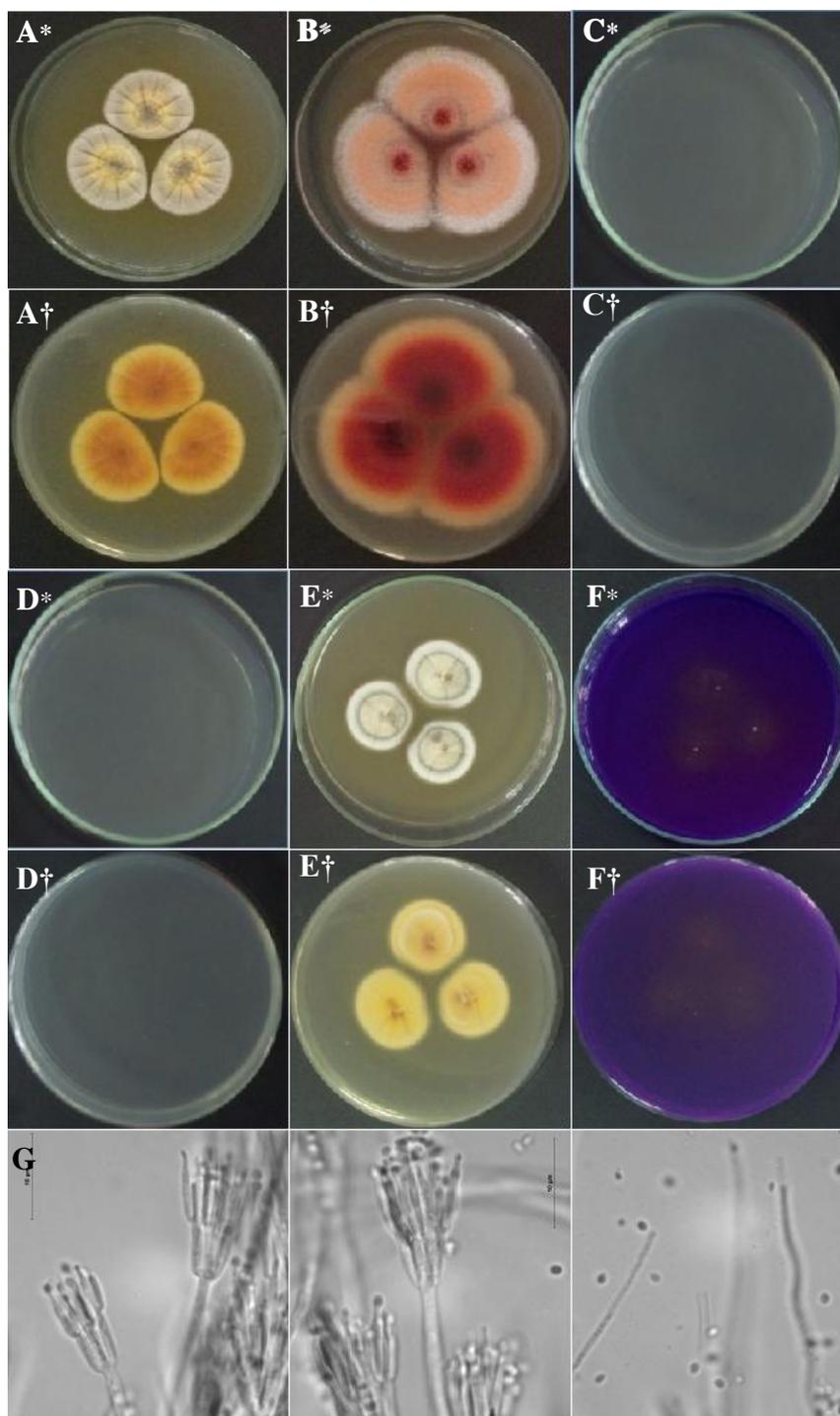
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 43** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 19.



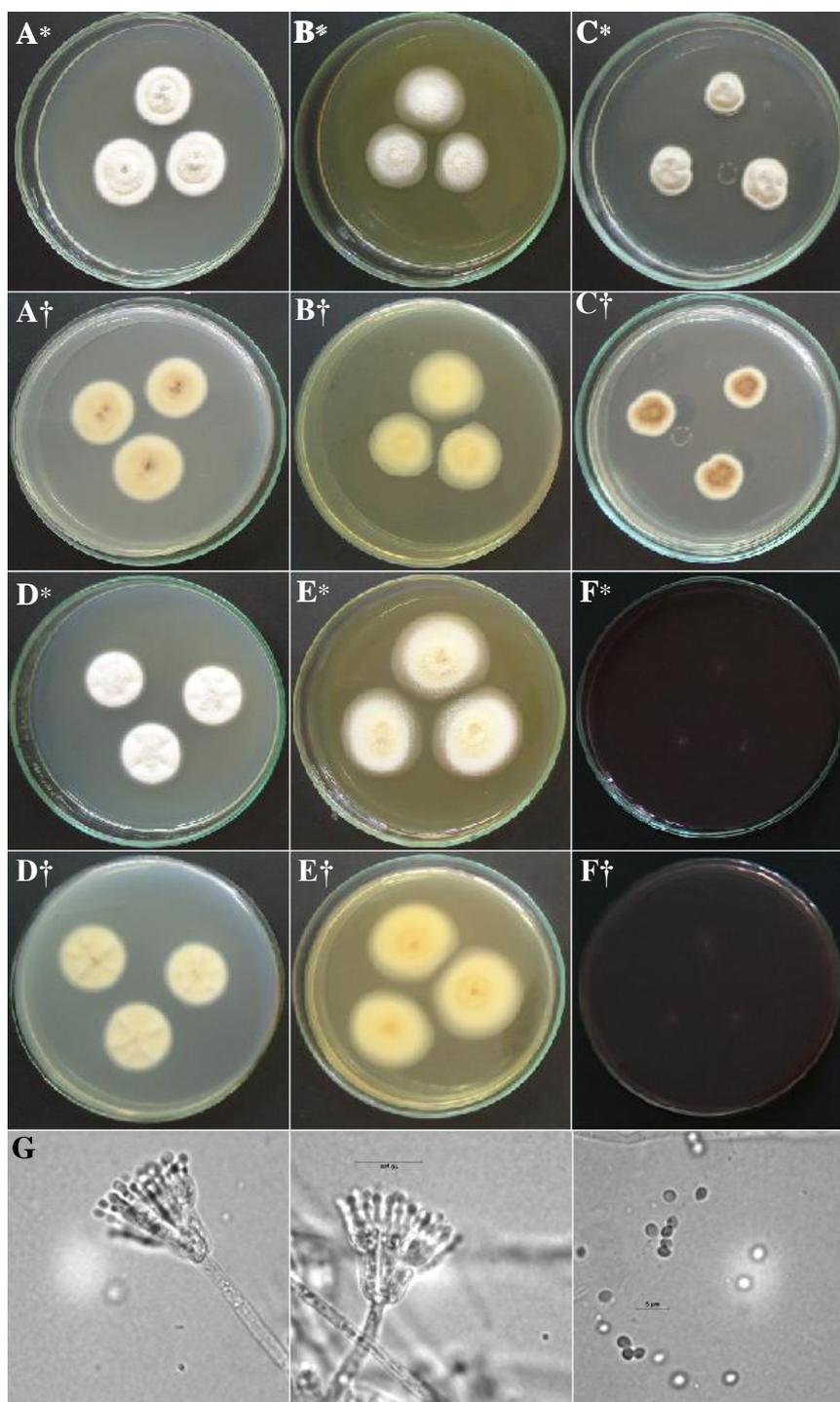
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 44** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 20.



A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 45** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 21.



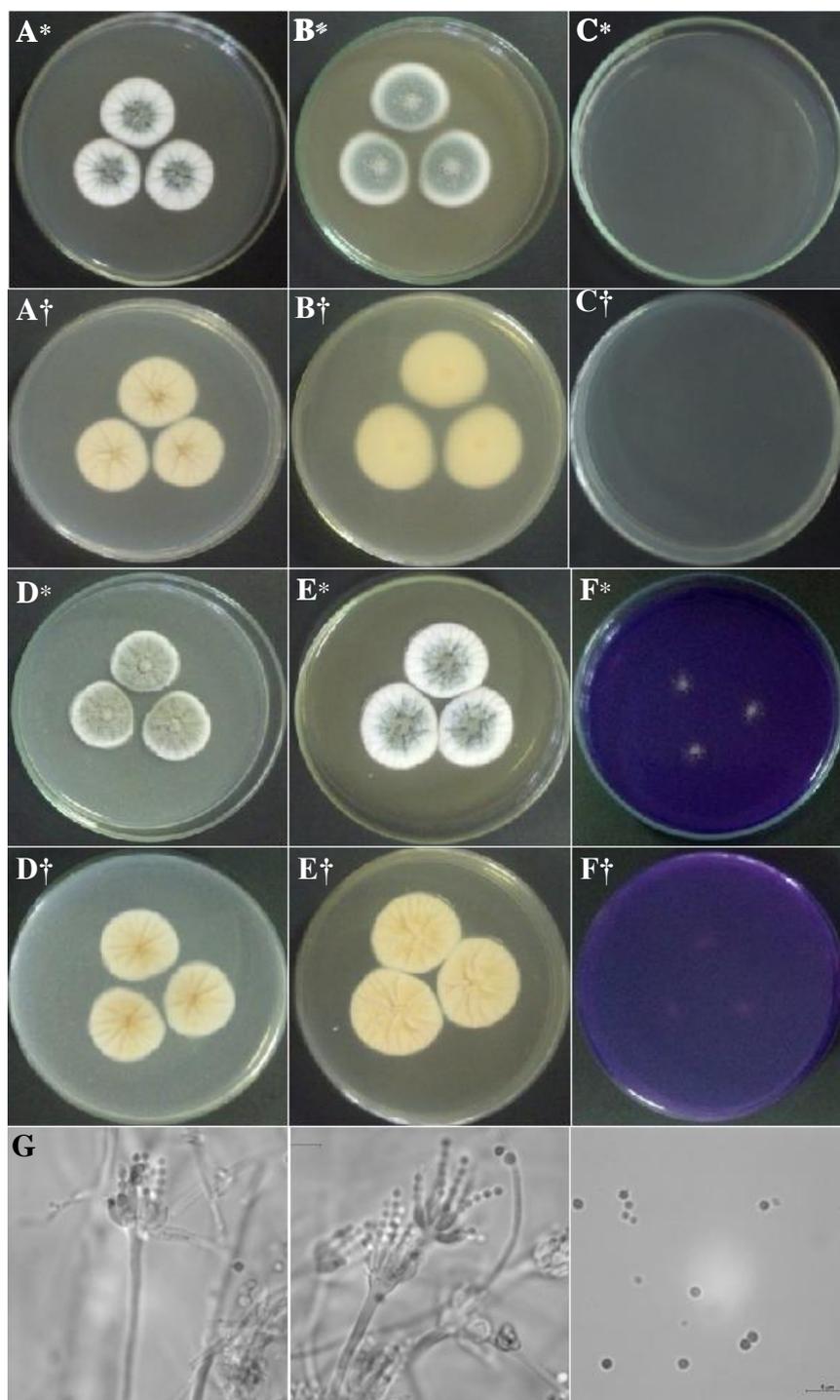
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 46** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 22.



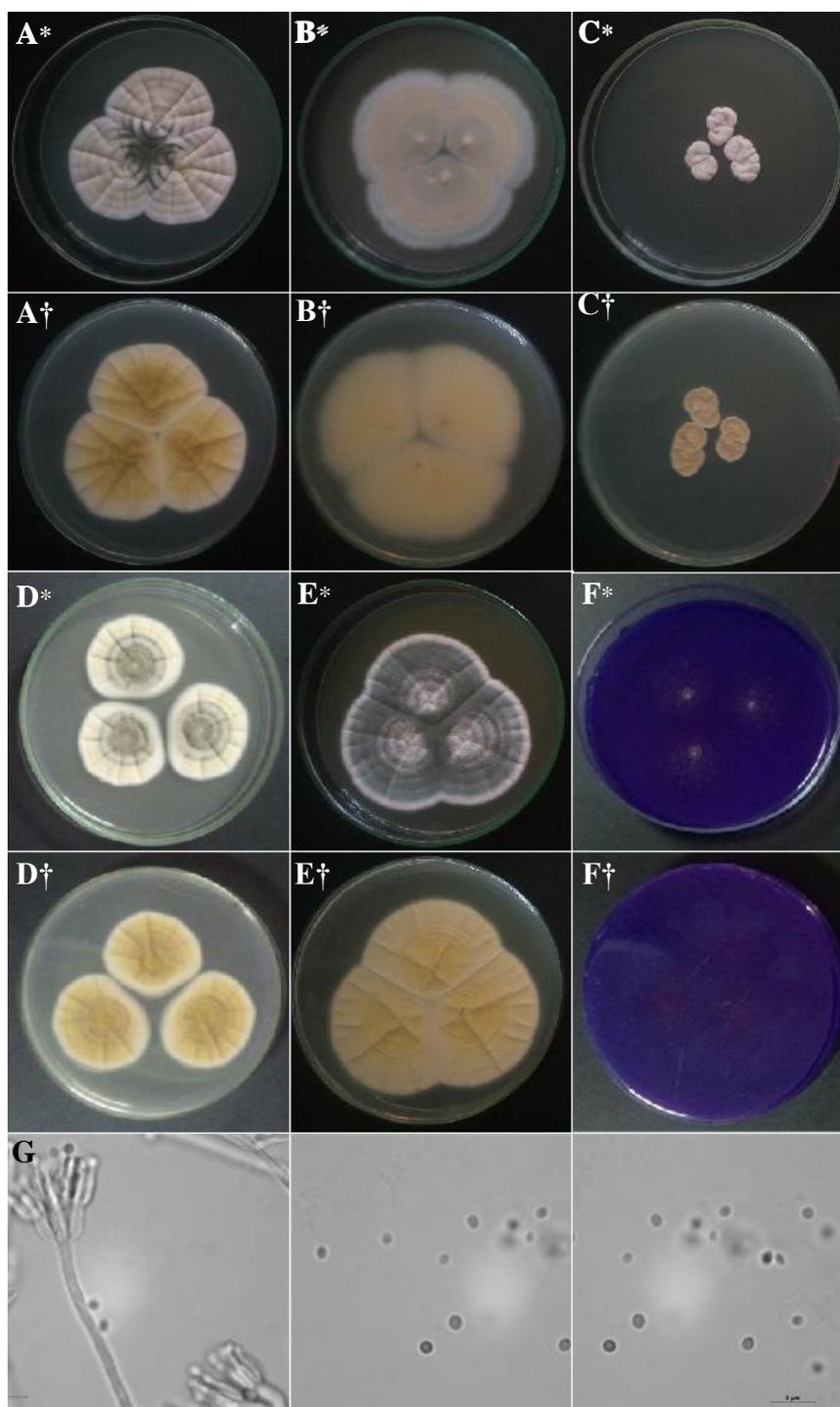
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 47** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 23.



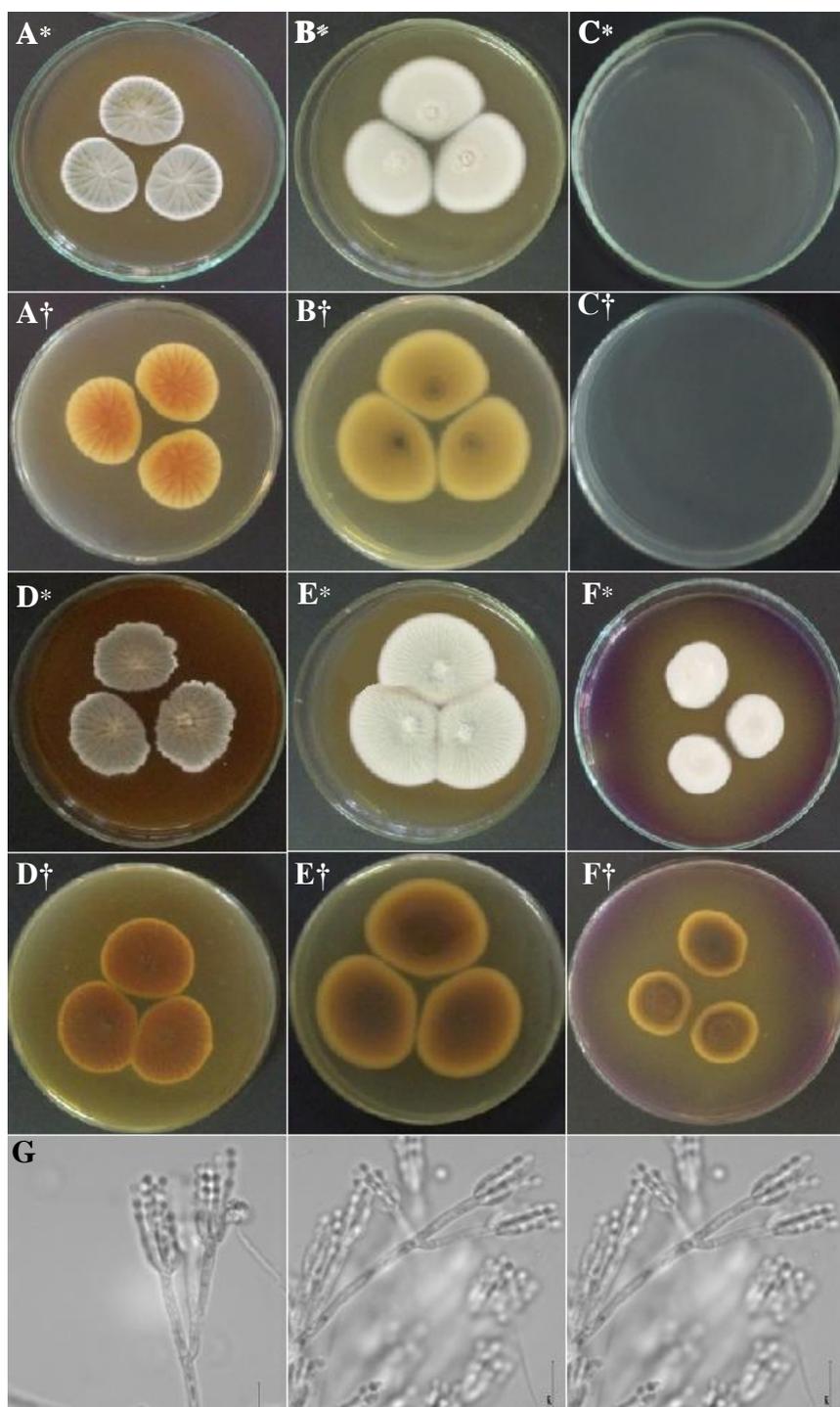
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 48** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 24.



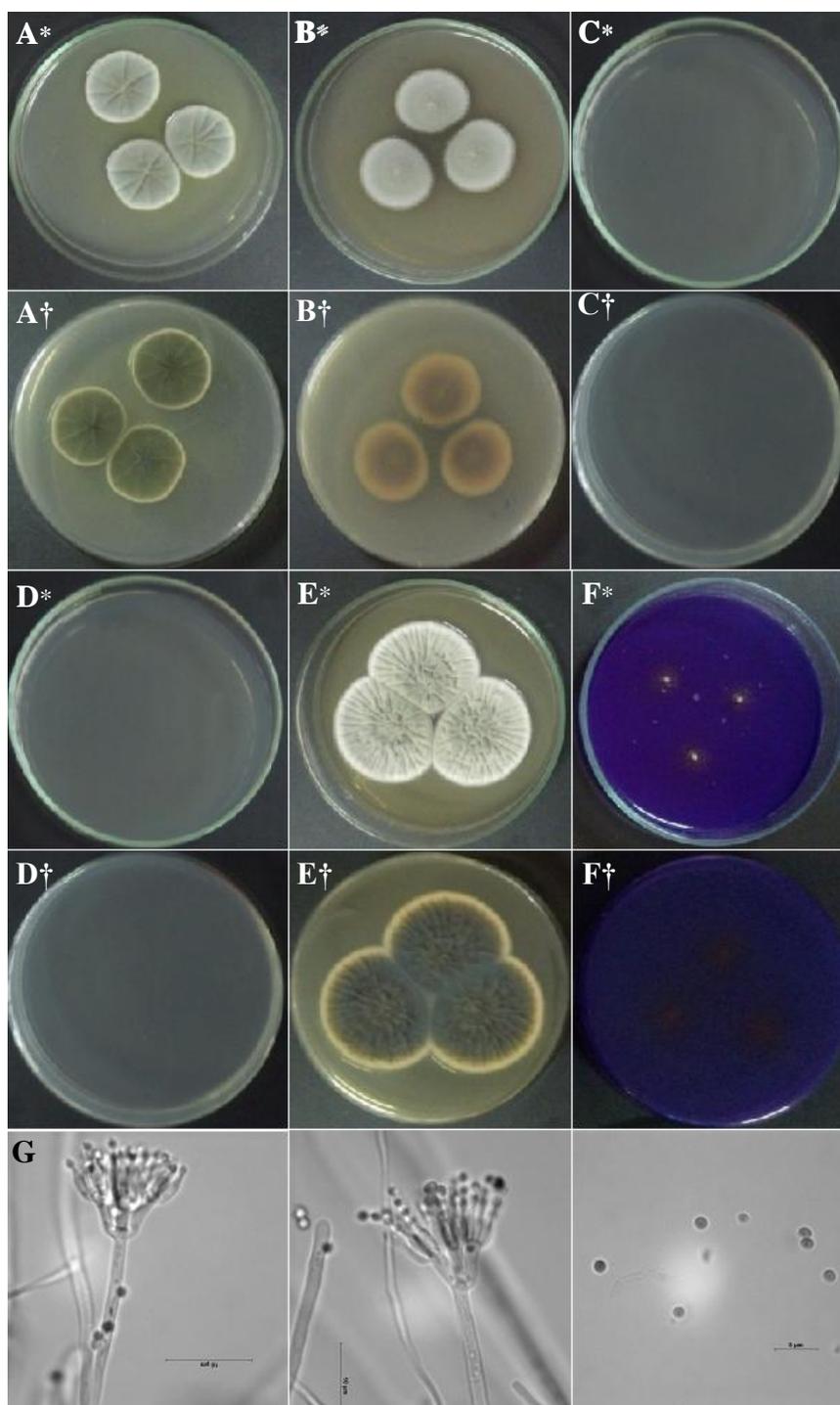
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 49** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 25.



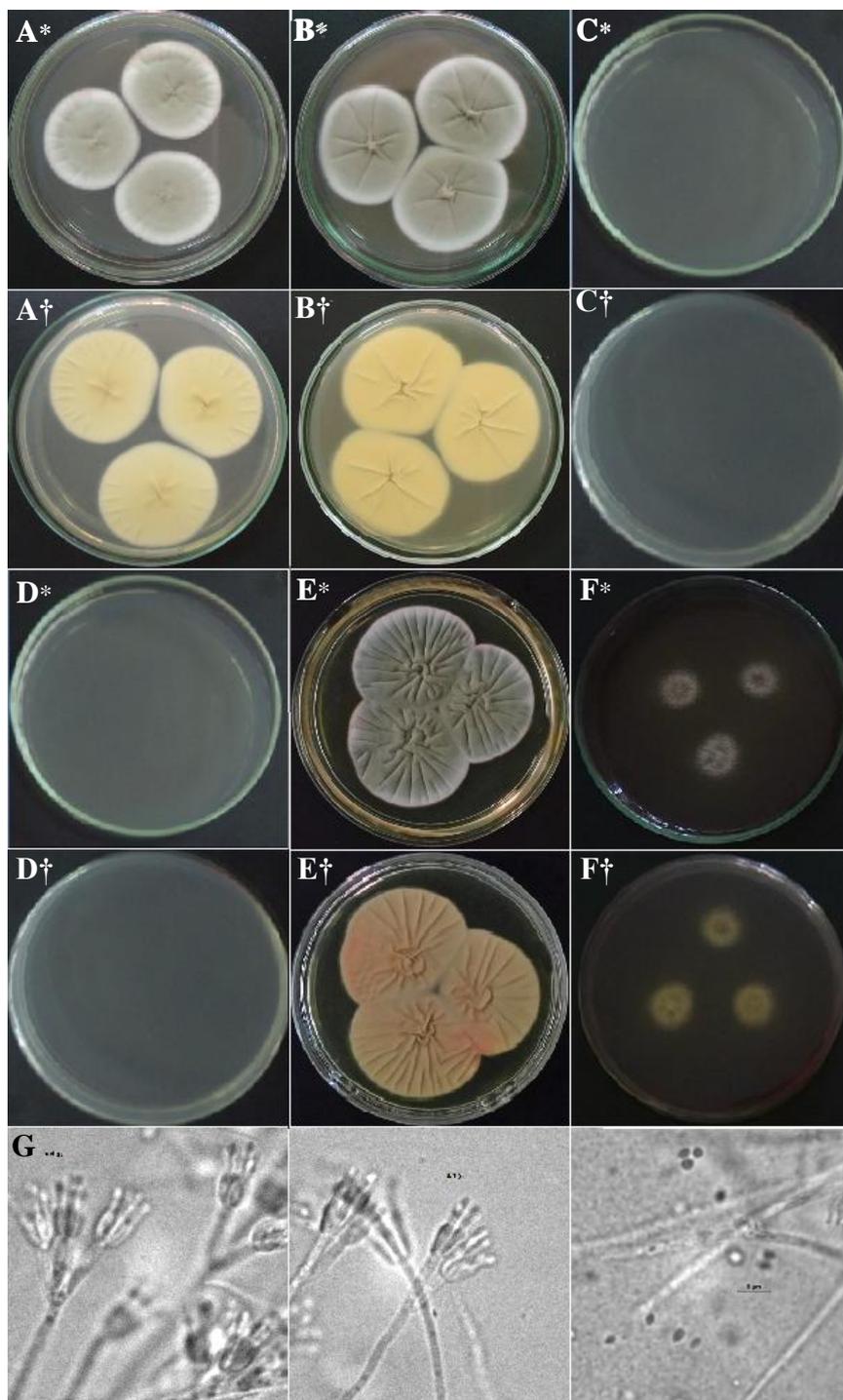
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 50** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 26.



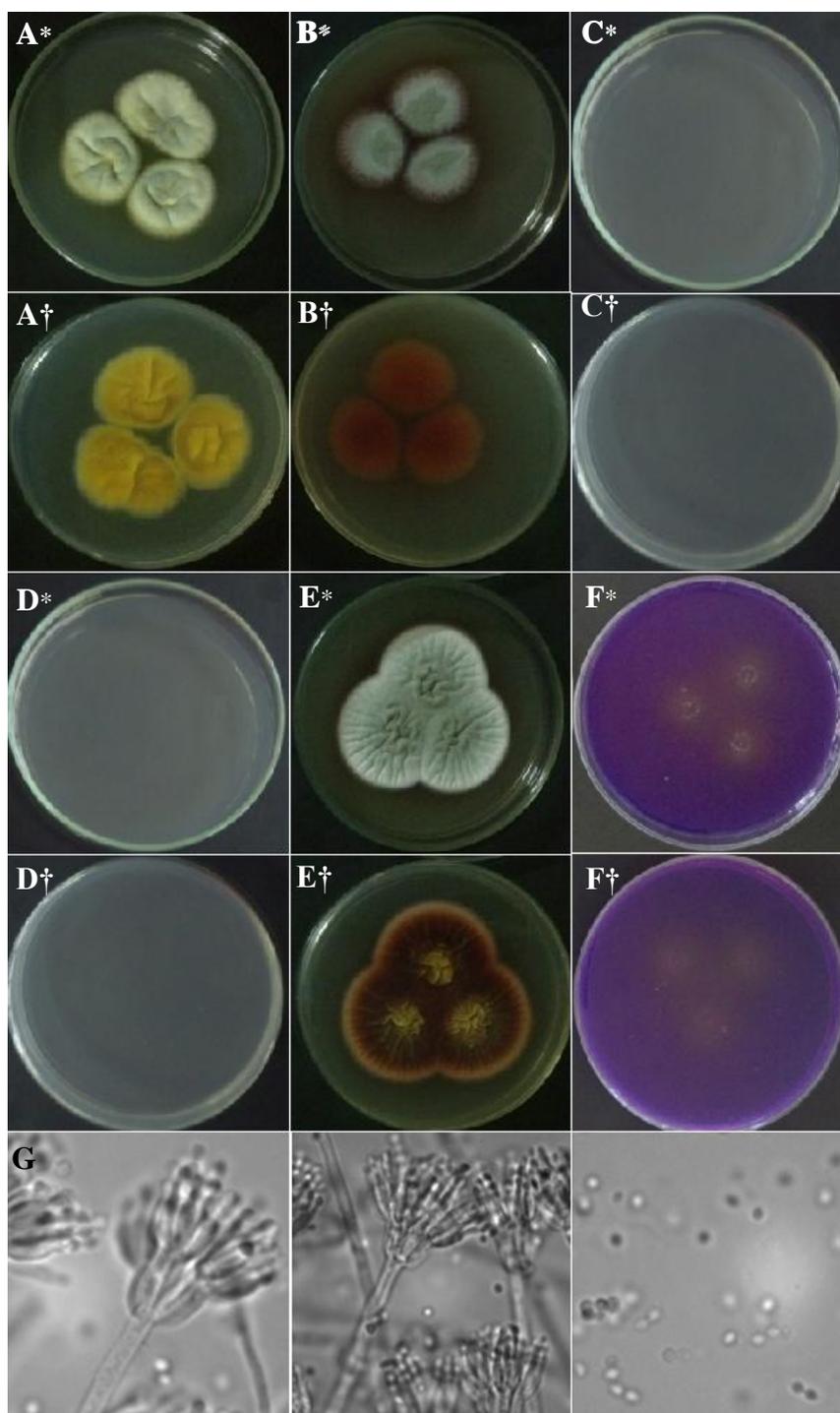
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 51** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 27.



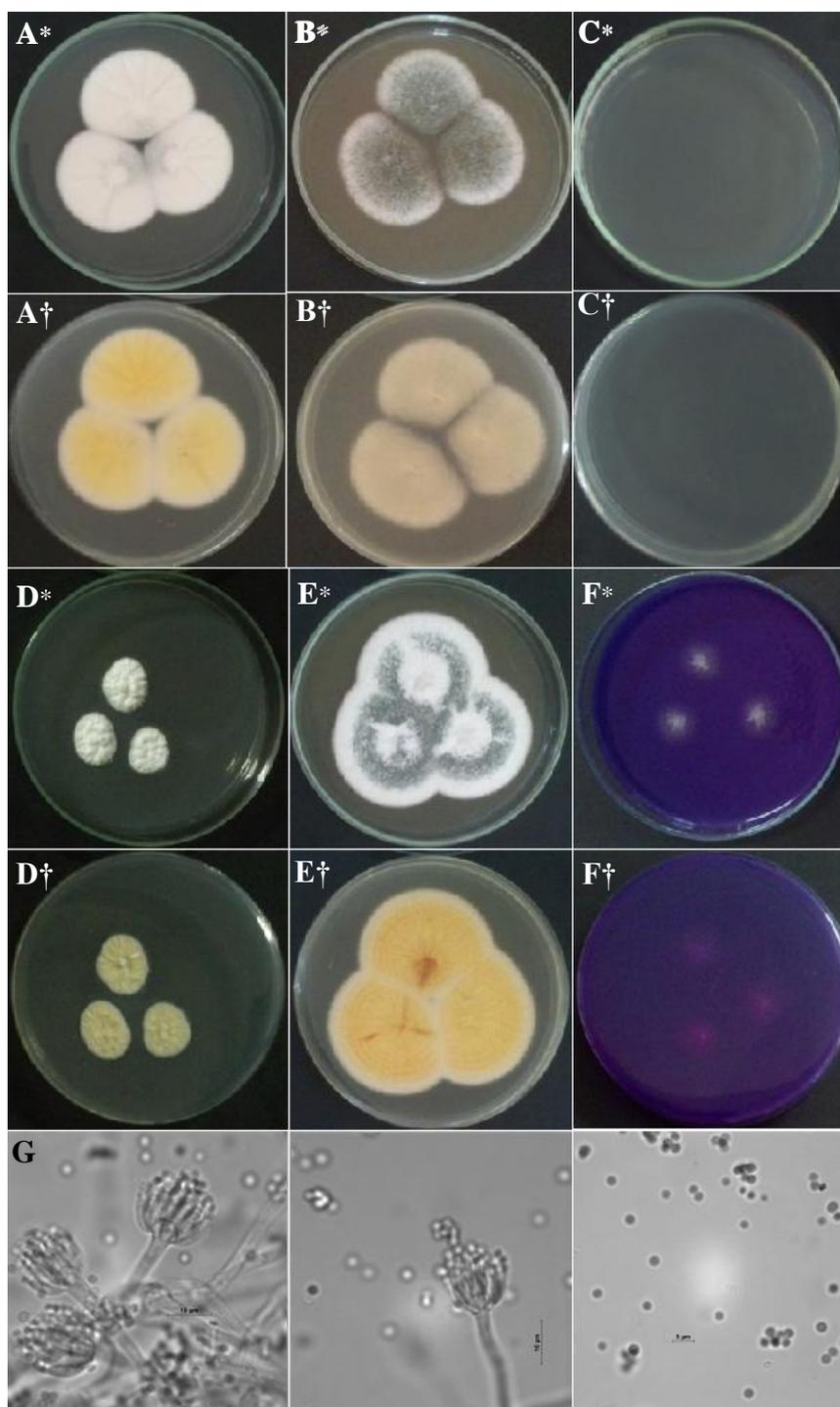
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 52** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 29.



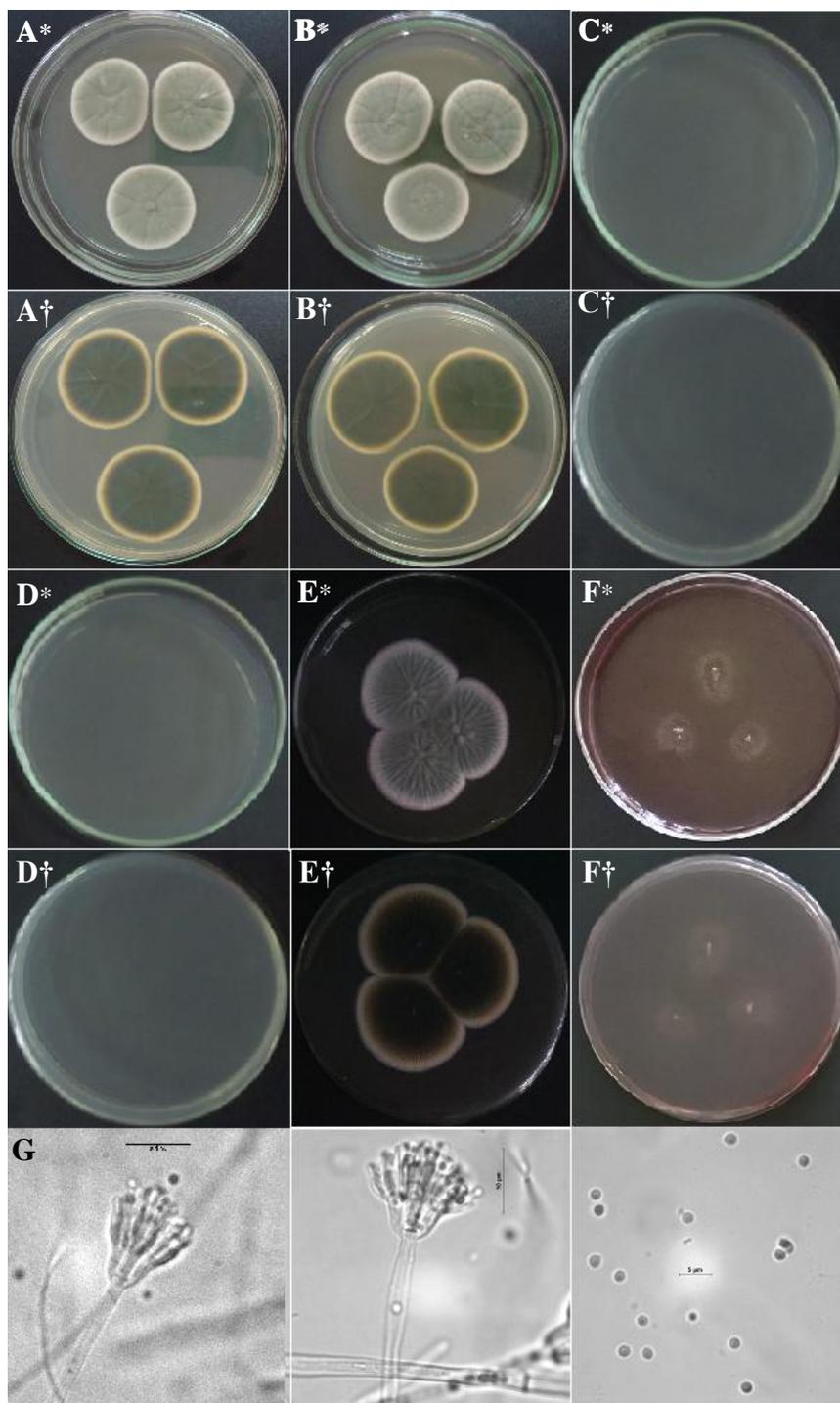
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 53** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 30.



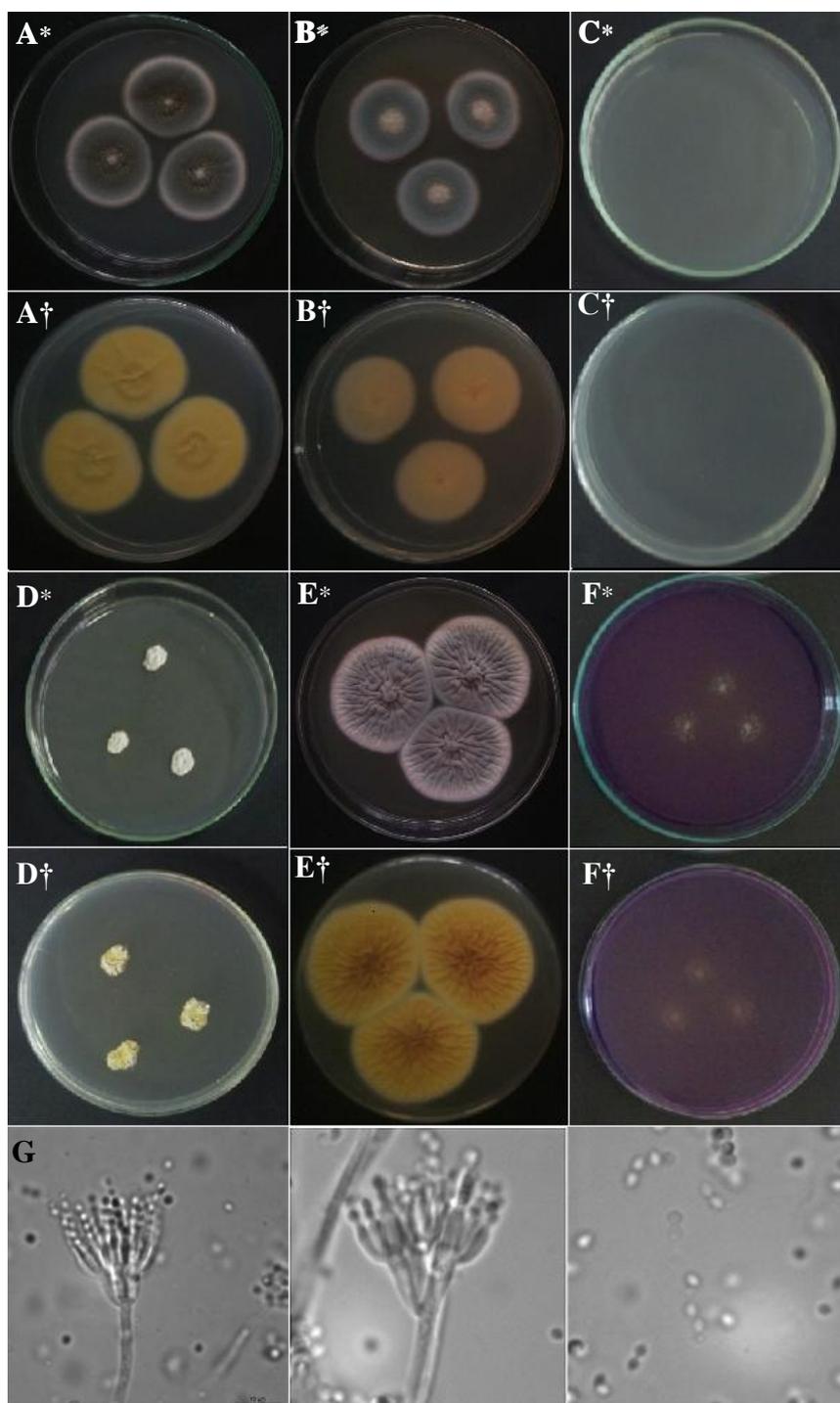
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 54** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 31.



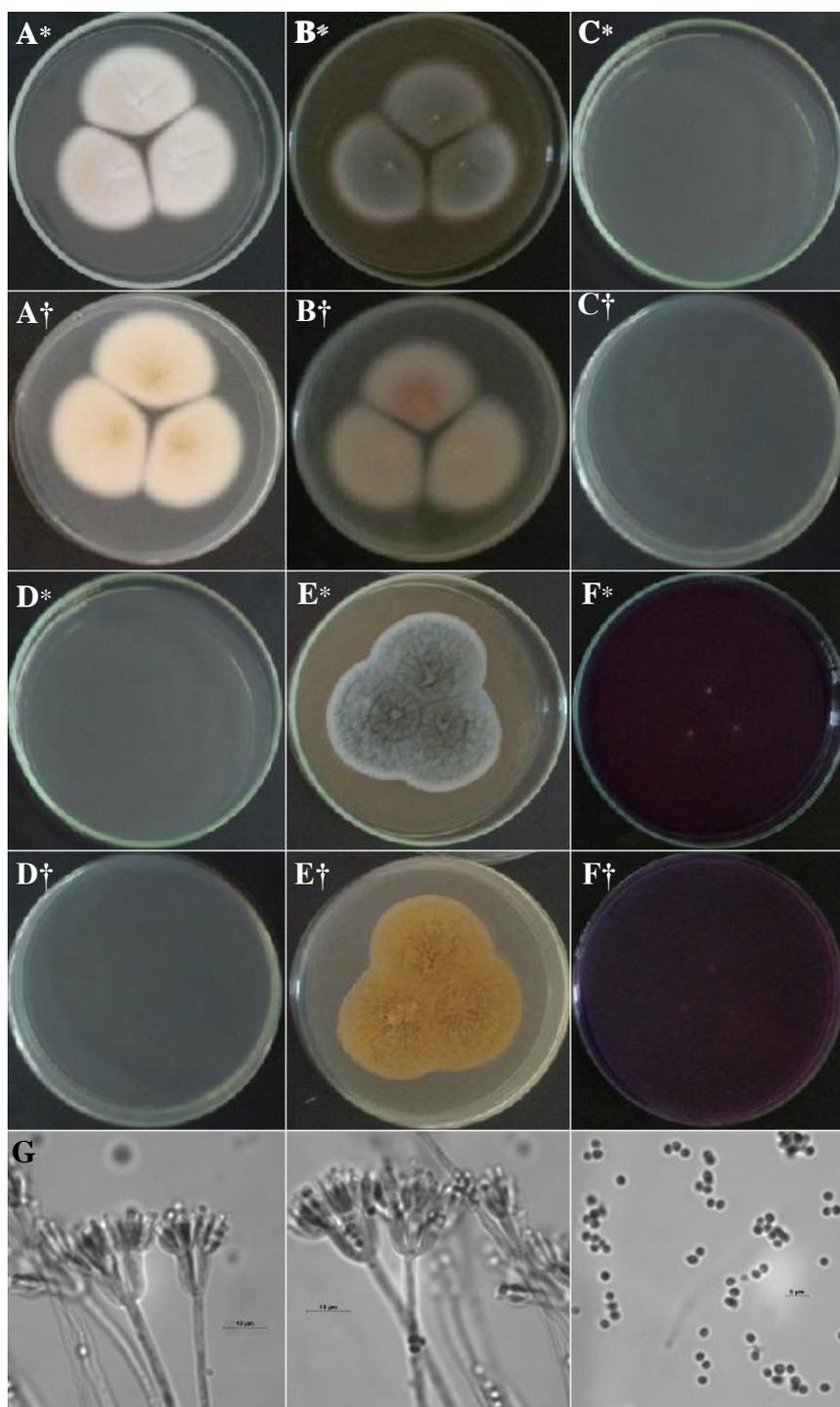
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 55** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 32.



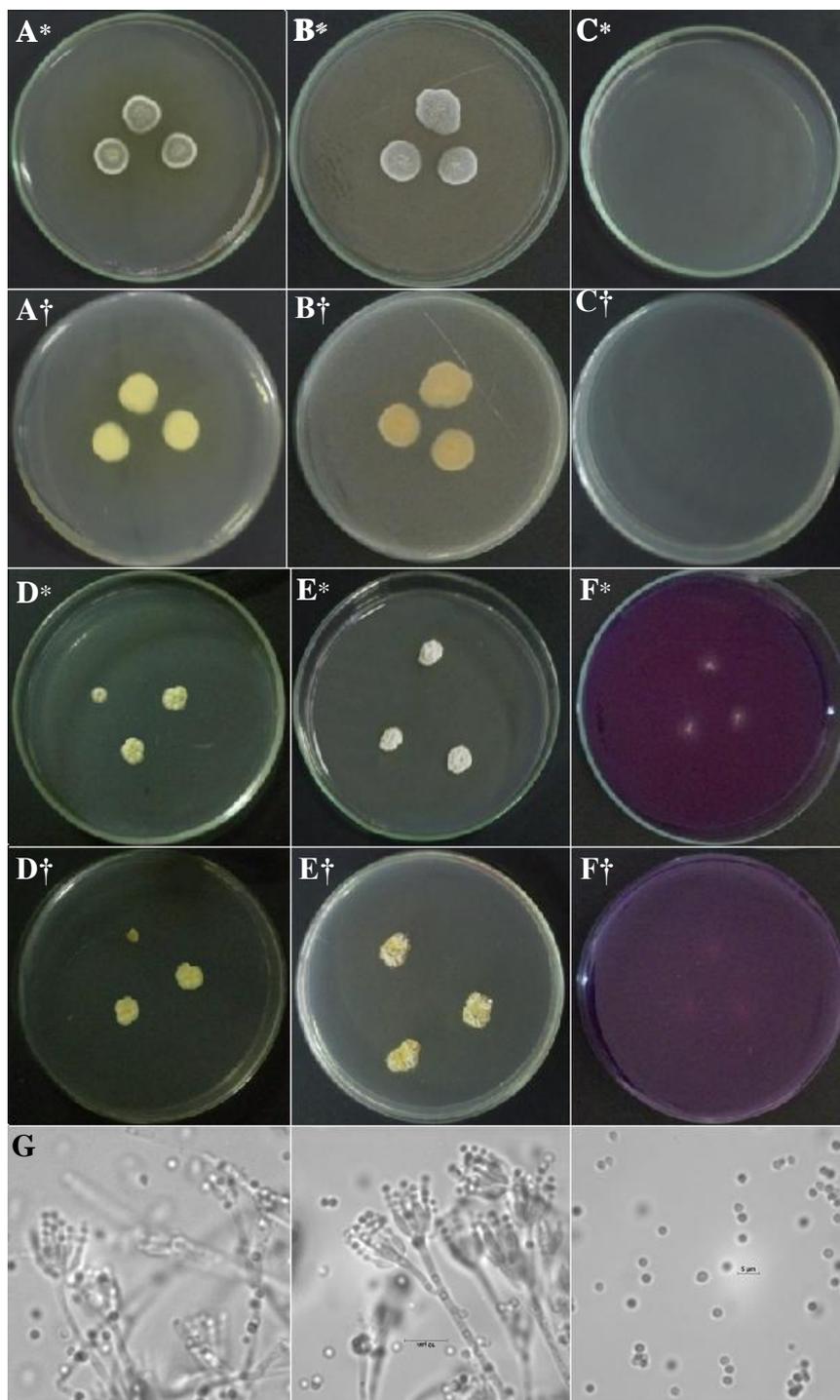
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 56** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 33.



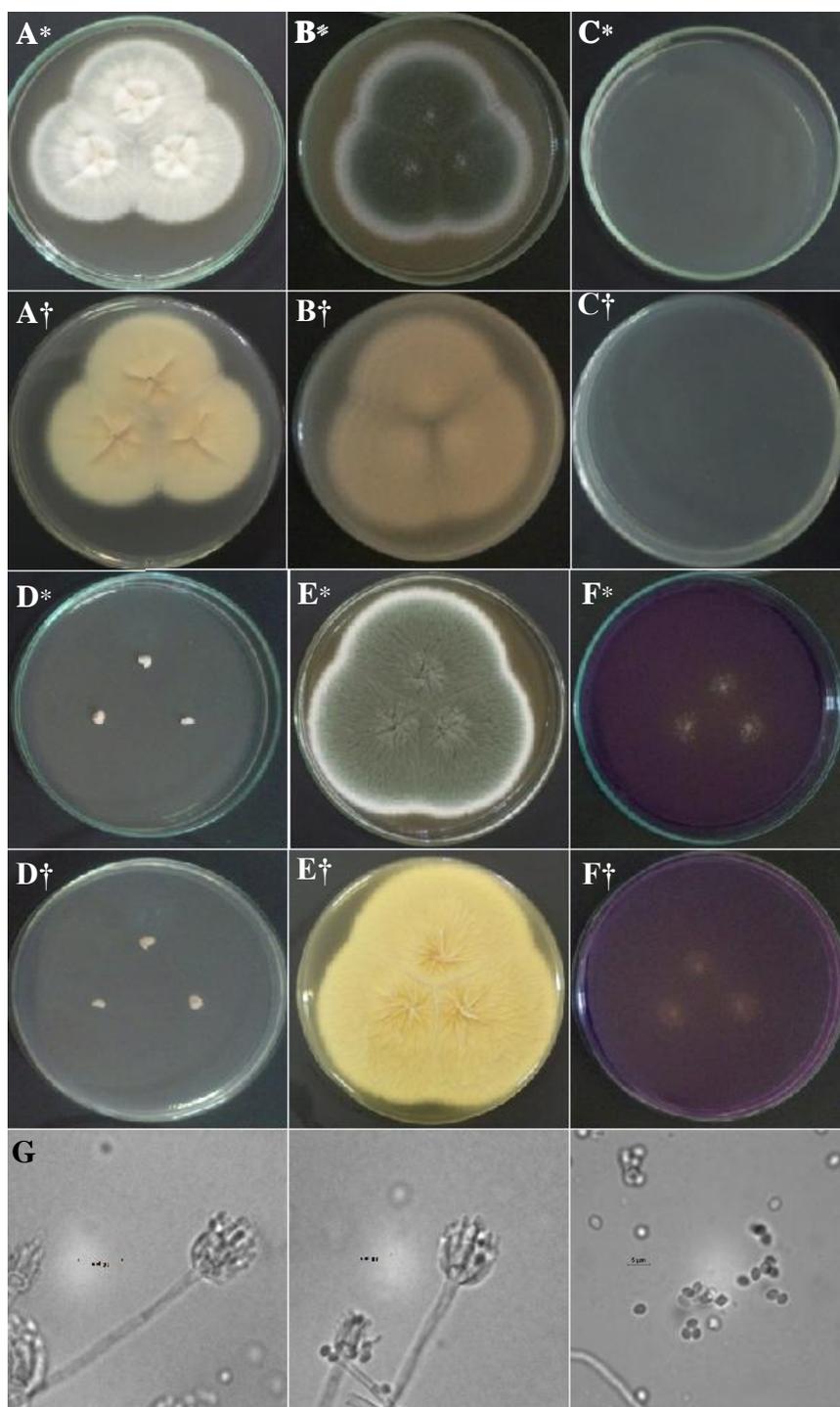
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 57** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 34.



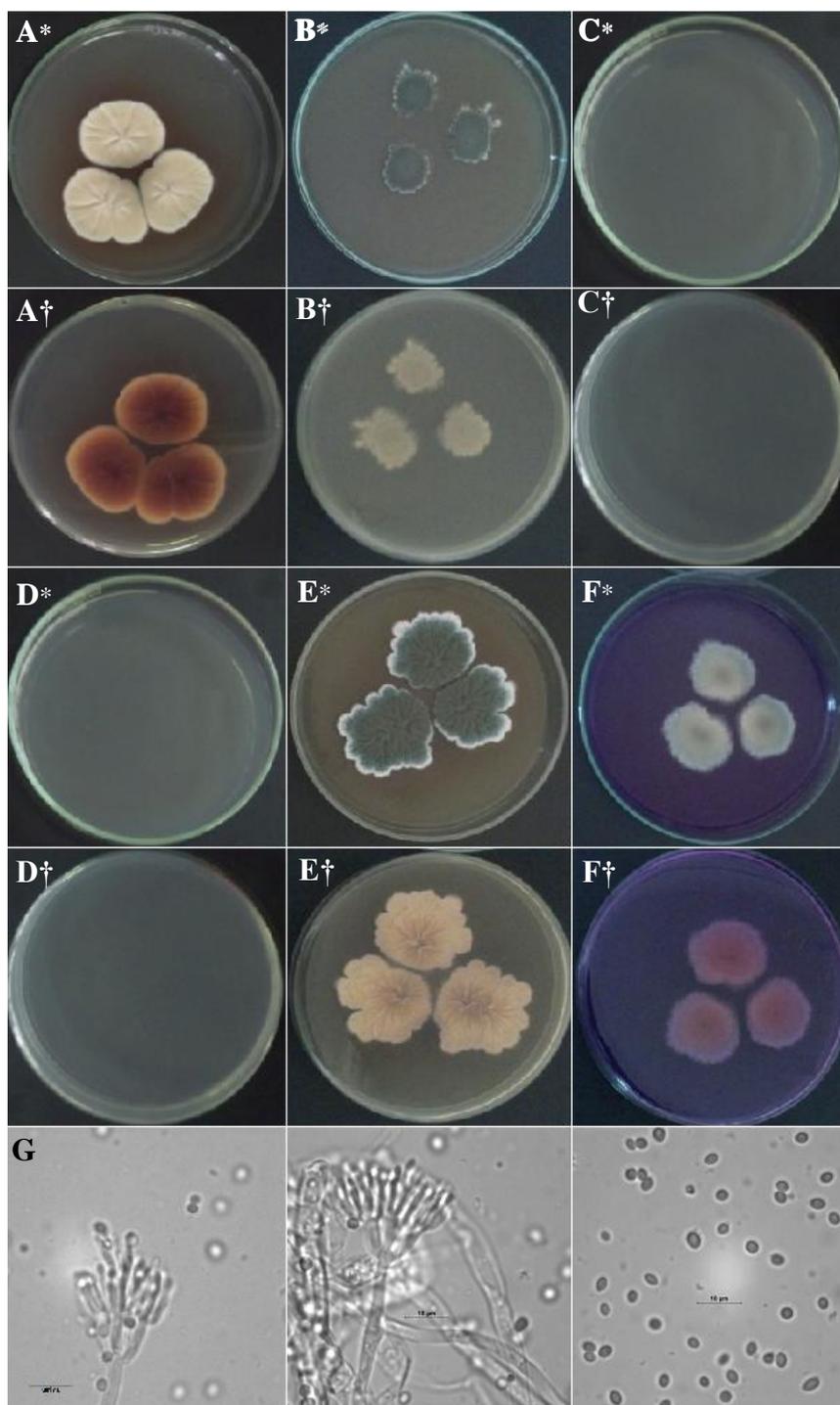
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 58** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 35.



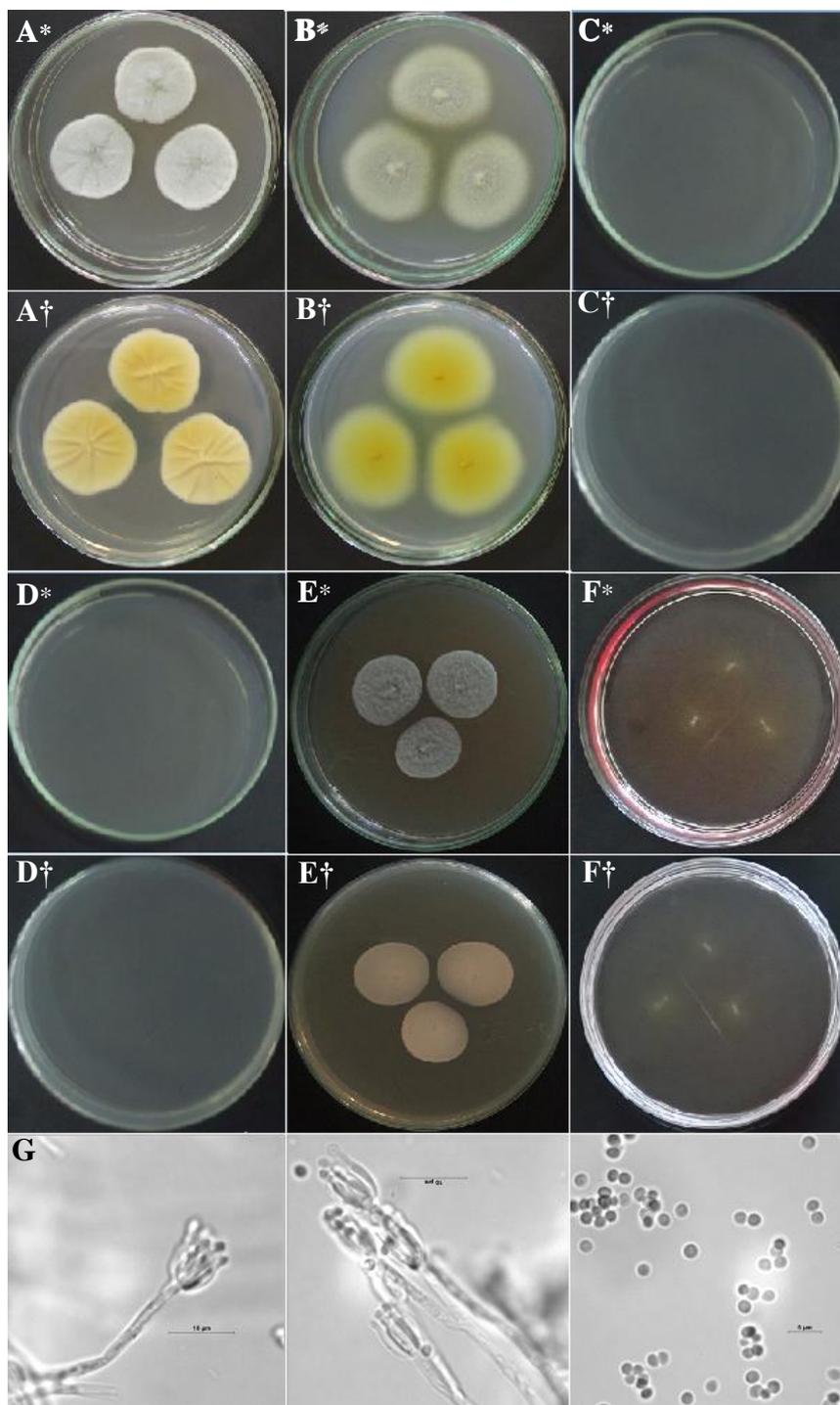
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 59** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 36.



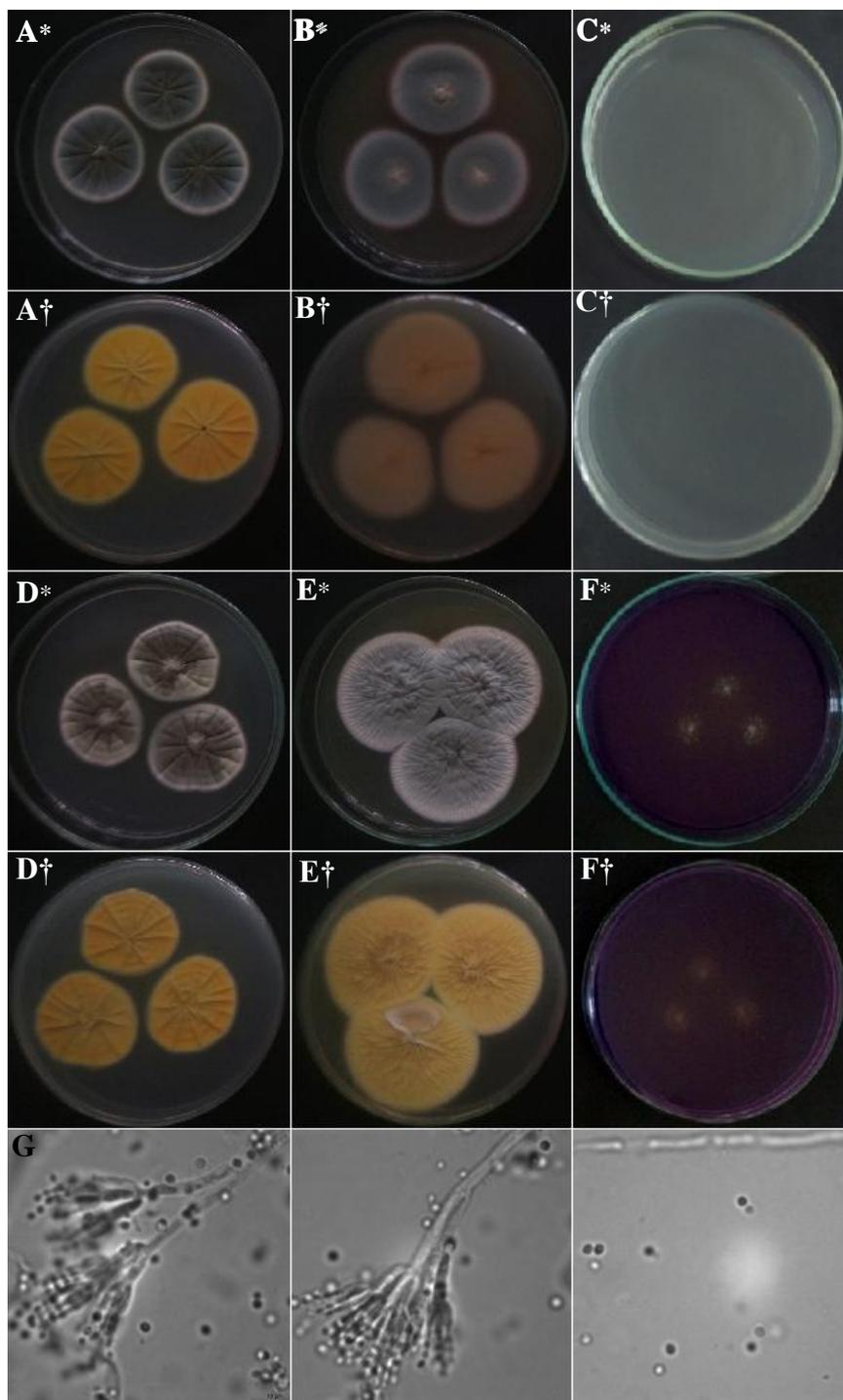
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 60** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 37.



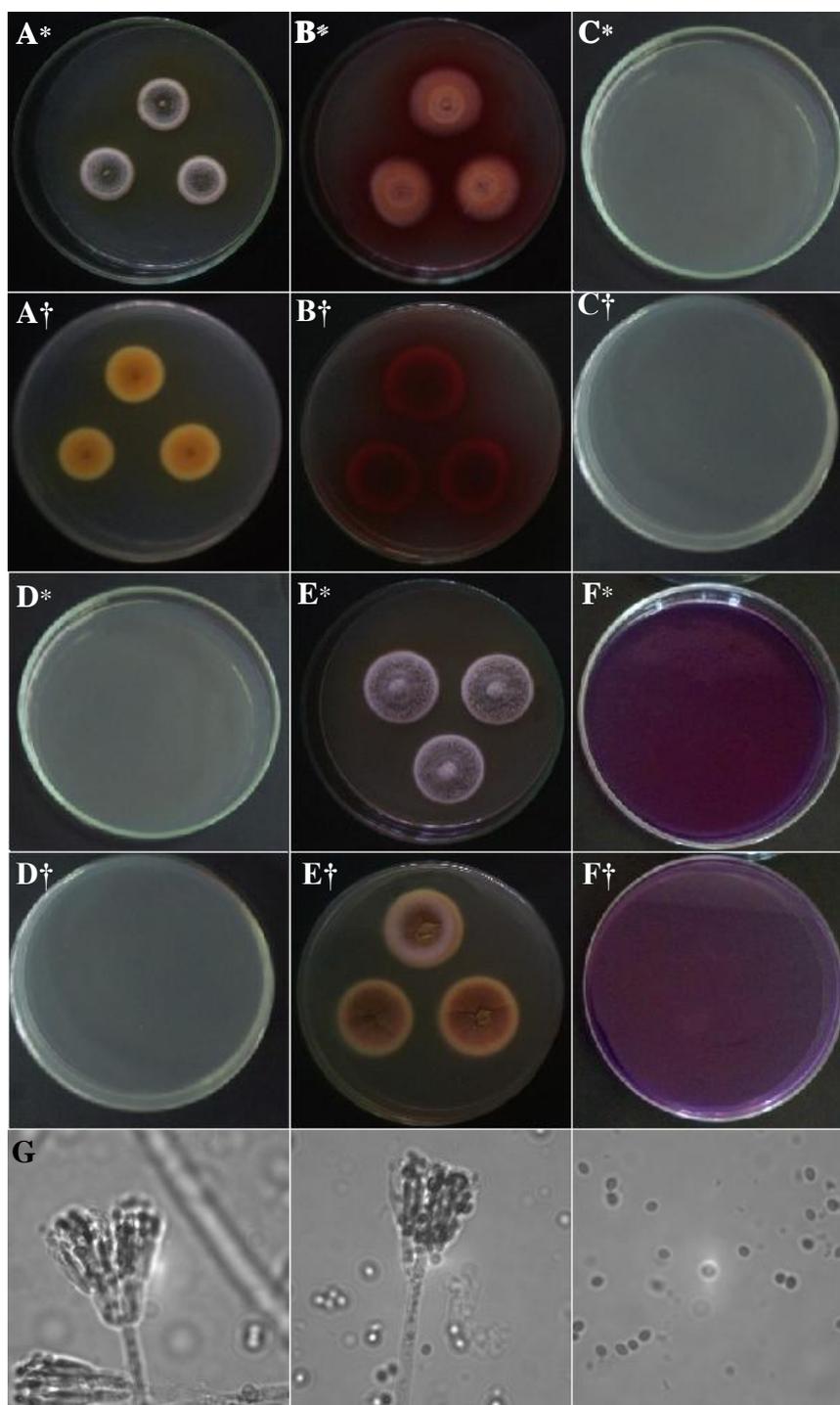
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 61** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 38.



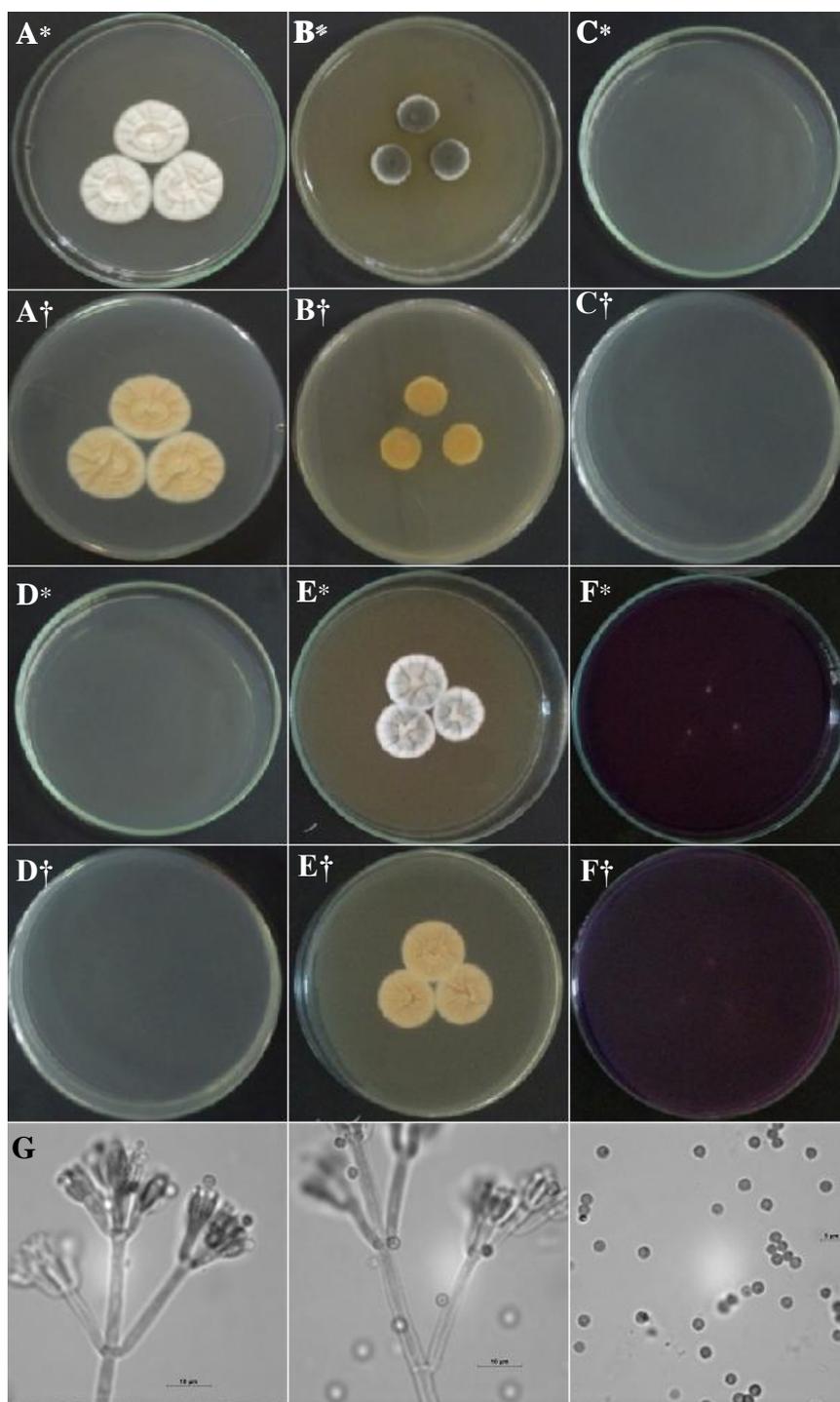
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 62** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 39.



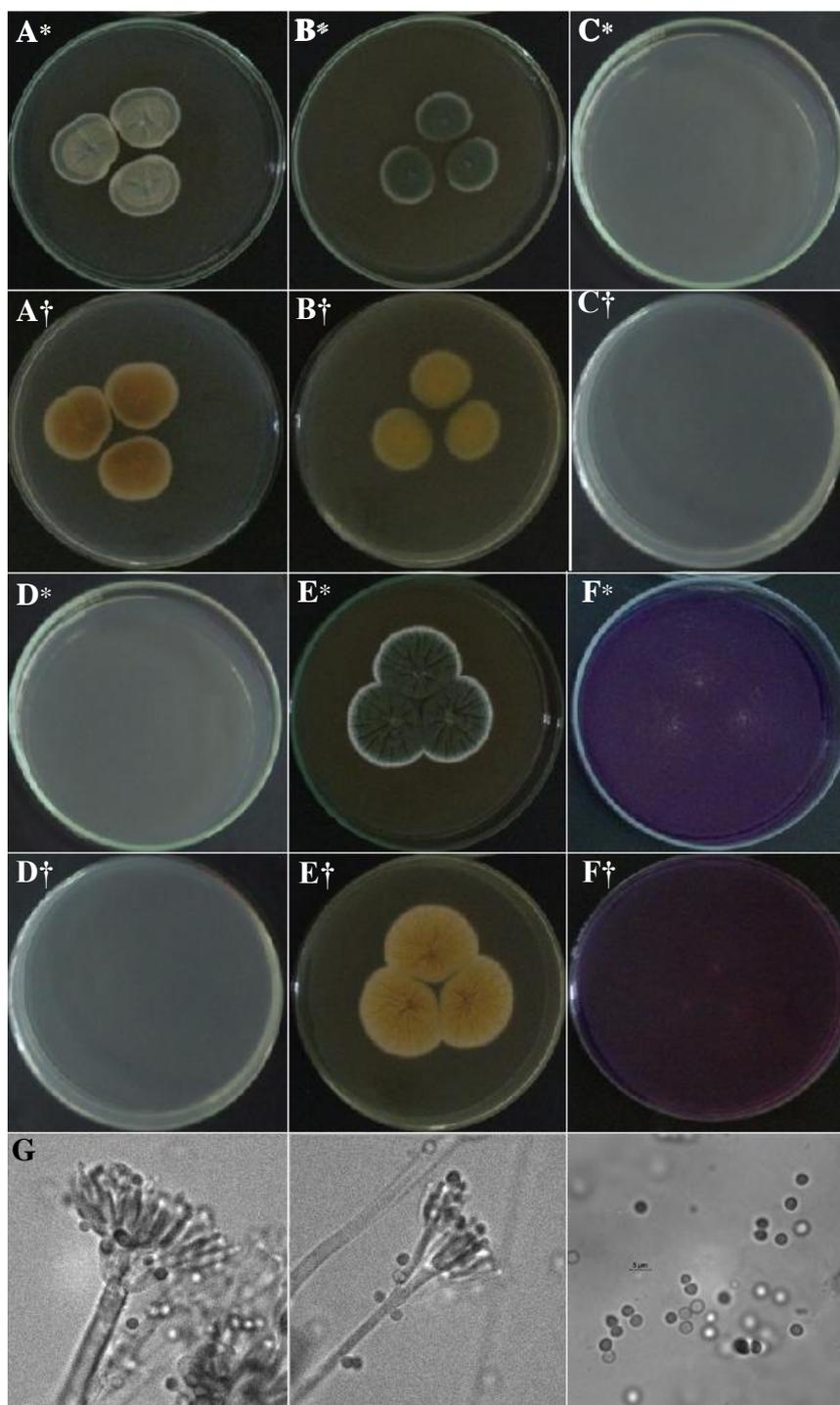
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 63** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 40.



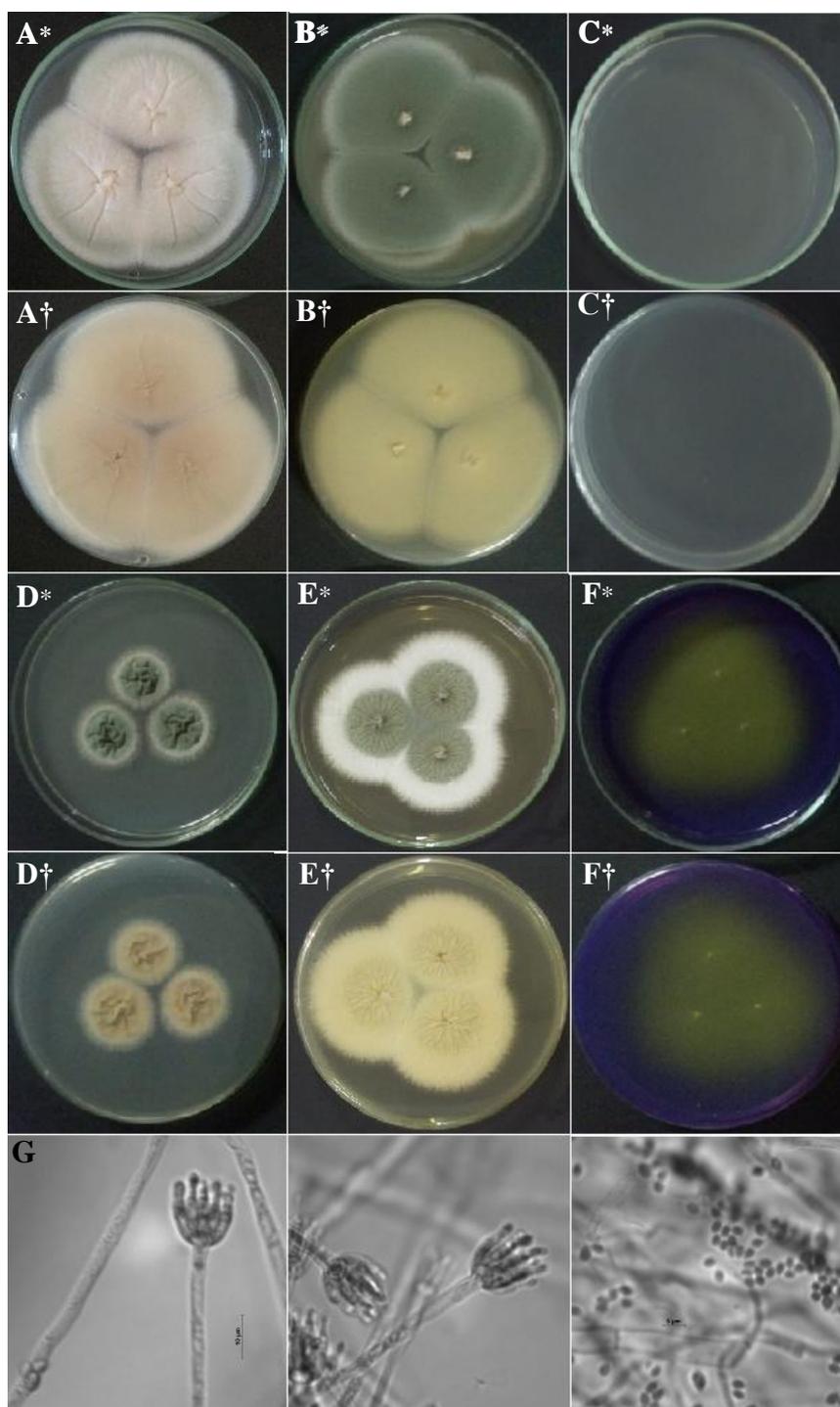
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 64** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 41.



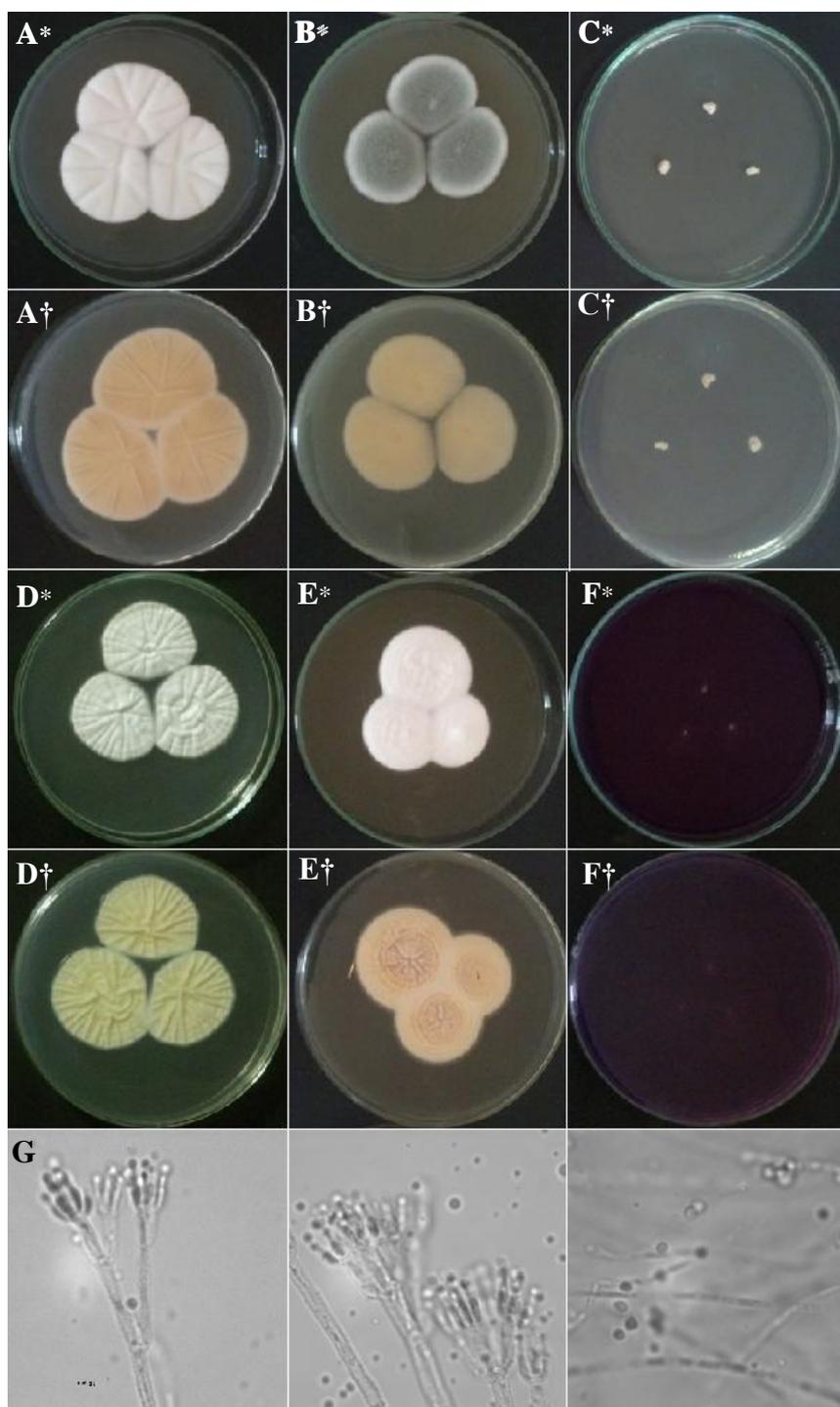
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 65** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 42.



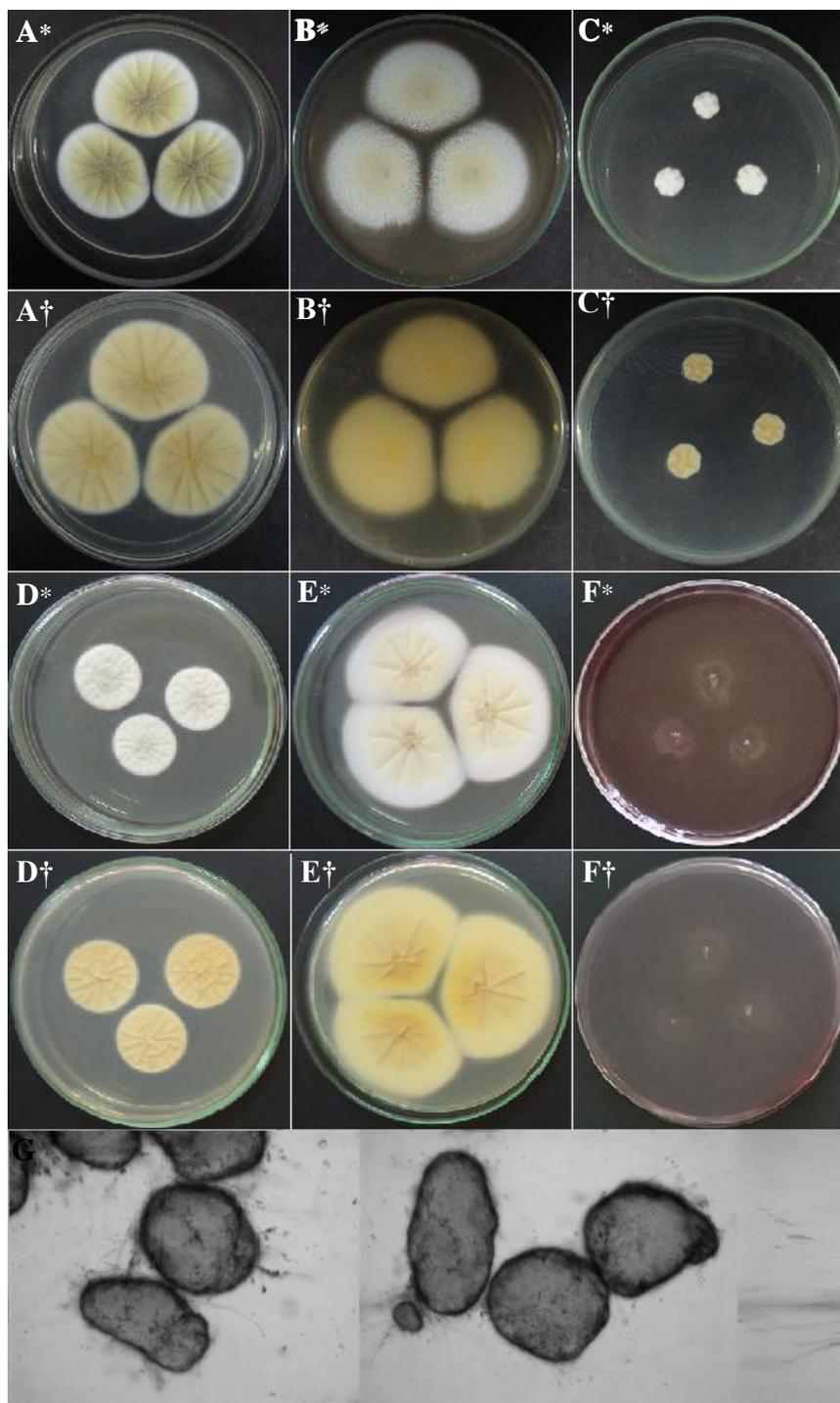
A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 66** – Caracterização do morfotipo *Penicillium* sp. 43.



A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

**Figura 67** – Caracterização do morfotipo *Talaromyces* sp. 01.



A: CYA 25 °C; B: MEA 25 °C; C: CYA 37 °C; D: CYA 30 °C; E: YES 25 °C; F: CREA 25 °C; G: características microscópicas. \* frente da placa; † reverso da placa.

### 3.3 Análises filogenéticas

Na taxonomia microbiana, mais evidentemente em taxonomia fúngica, progressivamente tem se tornando mais claro que, os dados associados como por exemplo, avaliação de micotoxinas, metabólitos secundários e análises moleculares, podem muitas vezes ser mais bem aplicados que dados para uma finalidade específica. Ou seja, uma abordagem de múltiplas técnicas gera dados de qualidade, que são mais precisos e úteis (SIMÕES et al., 2013).

A caracterização morfológica é dificultosa em vários aspectos, além disso, a escassez de chaves de identificação de espécies recentemente identificadas e o surgimento de novas espécies todos os anos, faz da identificação morfológica uma verdadeira persecução indefinida. Contudo, a identificação genética, hoje bastante habitual, torna esta busca mais simplificada, uma vez que há bancos de dados prontamente disponíveis para comparações específicas.

Nesse contexto, 40 morfotipos não identificados foram selecionados para análises filogenéticas, contudo apenas 22 desses apresentaram boas sequências que foram utilizadas para a construção as árvores a seguir.

Visagie e colaboradores (2014) revisando todas as espécies de *Penicillium* corretamente identificadas, sugeriu que a região ITS seja doravante utilizada como código de barras desse gênero. Apesar disto, as árvores geradas utilizando de sequências de ITS não foram informativas, pois não separaram as espécies, e portanto, não são aqui mostradas.

As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do GenBank e os resultados se encontram na Tabela 7. A maioria das espécies apresentou porcentagem de identidade alta, maior que 98%. Entretanto, esta análise somente norteia a construção das árvores, pois muitas vezes resultados quase perfeitos nessa ferramenta, ainda representam espécies diferentes (BENSON et al., 2013).

Árvores com todas as seções de *Penicillium* e *Talaromyces*, cujas as espécies foram similares no GenBank foram construídas a fim de confirmar e identificar as seções e espécies as quais pertenciam os morfotipos (dados não mostrados). No entanto, grande parte dos morfotipos ficaram distantes a estas seções nas árvores, mostrando que as espécies semelhantes encontradas no GenBank não eram filogeneticamente próximas. Deste modo, foi gerada uma árvore com ao menos duas espécies de referência de cada seção, para ambos os gêneros analisados (Figuras 68 e 69).

Os morfotipos *Penicillium* sp. 09, *Penicillium* sp. 01, *Penicillium* sp. 24 e *Eupenicillium* sp. 03 pertencem a seção Lanata-Divaricata; *Penicillium* sp. 18 e *Penicillium* sp. 23 pertencem a seção Sclerotiora; *Penicillium* sp. 10, *Penicillium* sp. 29, *Penicillium* sp. 38, *Penicillium* sp. 19 e *Penicillium* sp. 32 estão dentro da seção Citrina. *Penicillium* sp. 03, *Penicillium* sp.15 e *Eupenicillium* sp. 02 pertencem a seção Ramosa e provavelmente são a mesma espécie. Já o morfotipo *Penicillium* sp. 26 ficou entre as seções Ramigena e Gracilenta, podendo corresponder a uma seção nova, devido a distância de seu ramo ao de ambas as seções (Figura 68).

Na análise filogenética, os morfotipos não identificados da seção Citrina corresponderam a uma única espécie, entretanto, apresentaram em placa algumas características bastantes distintas entre si, como por exemplo reverso preto em YES, produção de pigmentação solúvel vermelha em MEA, crescimentos diferentes em CYA 30 °C. Contudo, avaliando estas características em conjunto, e as espécies com sequências mais próximas no Genbank, os morfotipos possivelmente pertencem a espécie *Penicillium cairnsense* descrita em Houbraken e Samson (2011). No entanto, a avaliação de mais regiões como  $\beta$ -tubulina e camodulina são necessárias para a confirmação.

Os morfotipos *Penicillium* sp. 03, *Penicillium* sp.15 e *Eupenicillium* sp. 02 possivelmente também correspondem a mesma espécie, e esta é muito próxima a *P. raistrickii* (Figura 68).

Todos os morfotipos de colorações amarelas e avermelhadas corresponderam no Genbank a espécies de *Talaromyces* (Tabela 7). O gênero *Talaromyces* apresenta espécies altamente coloridas (colônias e pigmentos amarelos, laranjas, rosas, vermelhos e marrons), fiálides aciculadas ou raramente ampuliformes e conídios usualmente elipsoidais a cilíndricos, raramente globosos, como os morfotipos encontrados (SAMSON et al., 2011; VISAGIE et al., 2015; YILMAZ et al., 2014).

Todavia, na árvore de *Talaromyces* (Figura 69) os morfotipos *Penicillium* sp. 05, *Penicillium* sp. 02, *Penicillium* sp. 13, *Penicillium* sp. 20, *Penicillium* sp. 39 e *Talaromyces* sp. 01 não se agruparam a nenhuma seção e apresentaram ramos longos, indicando grande distância das espécies de referência. Isso pode indicar que estes morfotipos são de seções novas dentro de *Talaromyces* ou podem pertencer a outros gêneros diferentes de *Penicillium* e *Talaromyces*. Além disso, os morfotipos *Penicillium* sp. 13 e *Penicillium* sp. 02 foram considerados a mesma espécie, assim como *Penicillium* sp. 20 e *Penicillium* sp. 39.

As análises apresentadas no presente estudo contribuíram bastante na busca da identificação dos morfotipos não identificados, entretanto é necessária a adição de mais genes e árvores combinadas destes, para se precisar a quais espécies os morfotipos pertencem ou se são espécies novas, como é acreditado para alguns destes.

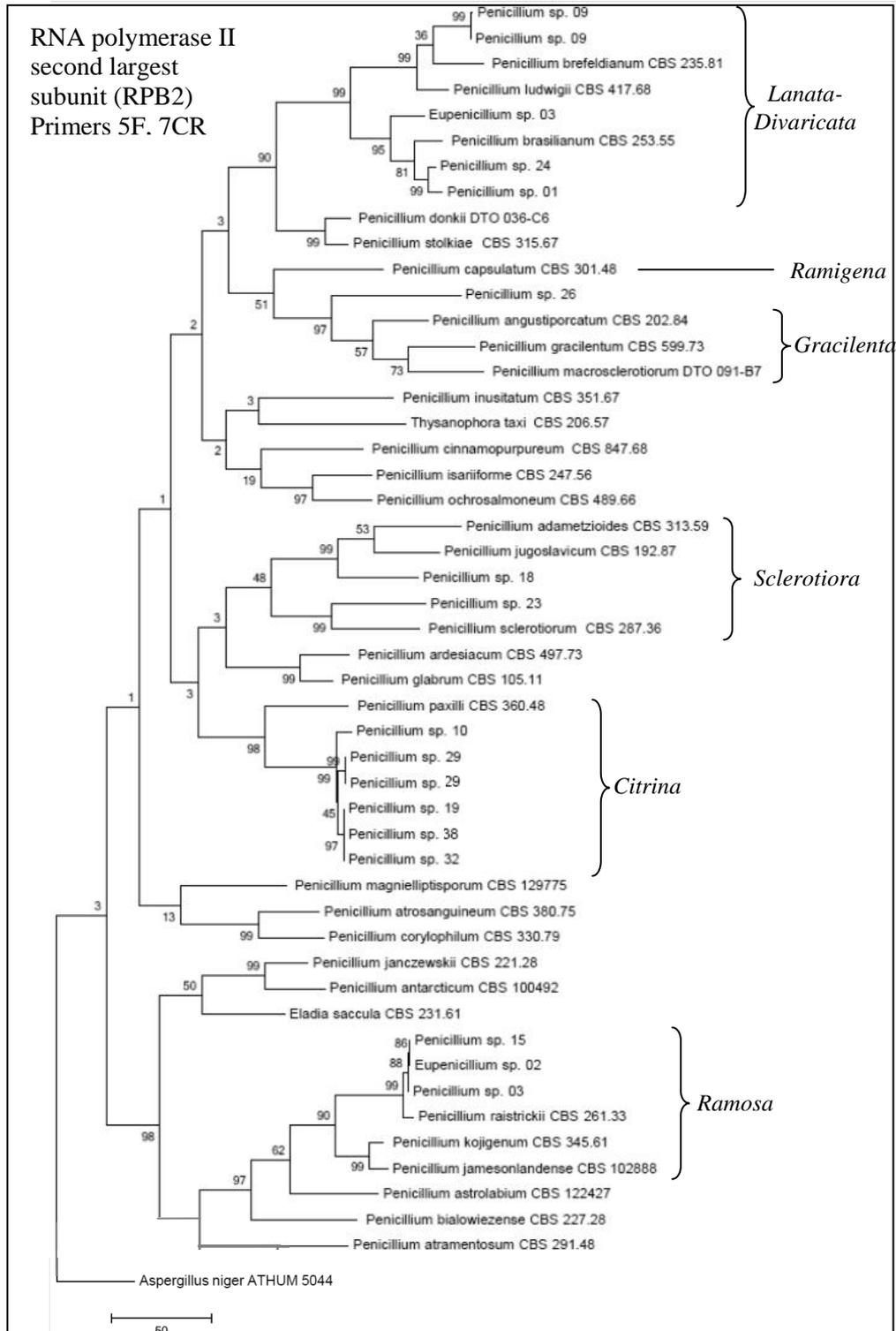
**Tabela 7** – Morfotipos analisados e sequências de referência correspondentes à região gênica RPB2 depositadas no GenBank.

Morfotipo	Tamanho das sequências (pb)	Espécie	Sequências mais similares encontradas no GenBank (Janeiro/2016)	
			Identidade (%)	Número de Acesso
<i>Penicillium</i> sp. 09	677	<i>Penicillium curticaule</i>	96	KF296417.1
<i>Penicillium</i> sp. 18	1091	<i>Penicillium multicolor</i>	99	EU427262.1
<i>Eupenicillium</i> sp. 02	704	<i>Penicillium raistrickii</i> CBS	99	JN606589.1
<i>Penicillium</i> sp. 03	704	<i>Penicillium raistrickii</i> CBS	98	JN606589.1
<i>Penicillium</i> sp. 29	1071	<i>Penicillium quebecense</i> CBS	97	JN606622.1
		<i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> DTO	97	KM089541.1
		<i>Penicillium cairnsense</i> DTO	97	KM089463.1
		<i>Penicillium miczynskii strain</i> CBS	97	JN606623.1
<i>Penicillium</i> sp. 39	1034	<i>Talaromyces ruber strain</i> CBS	93	JX315715.1
<i>Penicillium</i> sp. 13	1097	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS	99	JX965285.1
		<i>Talaromyces ruber strain</i> CBS	99	JX315715.1
<i>Penicillium</i> sp. 19	827	<i>Penicillium quebecense</i> CBS	98	JN606622.1
		<i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> DTO	98	KM089541.1
		<i>Penicillium cairnsense</i> DTO	98	KM089463.1

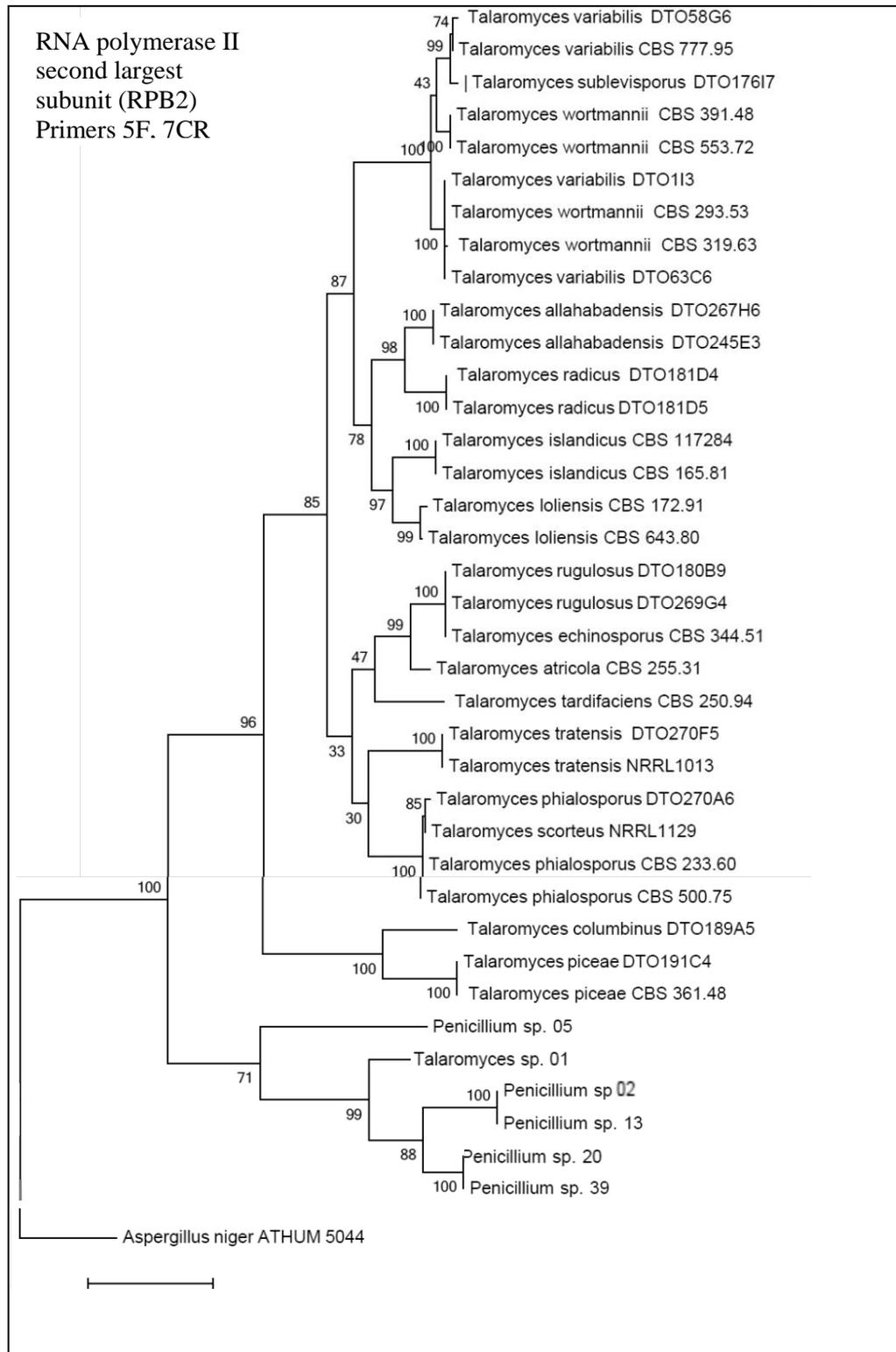
		<i>Penicillium miczynskii</i> CBS	98	JN606623.1
<i>Penicillium</i> sp. 23	890	<i>Penicillium adametzii</i> CBS	99	JN121455.1
		<i>Penicillium chrzaszczii</i> CBS	98	JN606628.1
<i>Penicillium</i> sp. 32	685	<i>Penicillium quebecense</i> CBS	98	JN606622.1
		<i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> DTO	98	KM089541.1
		<i>Penicillium miczynskii</i> CBS	98	JN606623.1
<i>Penicillium</i> sp. 05	1084	<i>Talaromyces albobiverticillius</i> CBS	98	KM023310.1
		<i>Talaromyces erythromellis</i> CBS	98	KM023290.1
<i>Penicillium</i> sp. 20	1102	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS	99	JX965285.1
		<i>Talaromyces ruber strain</i> CBS	99	JX315715.1
		<i>Penicillium quebecense</i> CBS	98	JN606622.1
<i>Penicillium</i> sp. 10	909	<i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> DTO	98	KM089541.1
		<i>Penicillium cairnsense</i> DTO	99	KM089463.1
		<i>Penicillium miczynskii</i> CBS	98	JN606623.1
<i>Penicillium</i> sp. 29	959	<i>Penicillium quebecense</i> CBS	98	JN606622.1
		<i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> DTO	98	KM089541.1
		<i>Penicillium cairnsense</i> DTO	98	KM089463.1

		<i>Penicillium miczynskii</i> CBS	98	JN606623.1
<i>Penicillium</i> sp. 15	792	<i>Penicillium raistrickii</i> CBS	99	JN606589.1
<i>Penicillium</i> sp. 26	994	<i>Penicillium gracilentum</i> CBS	84	JN121537.1
<i>Penicillium</i> sp. 02	775	<i>Talaromyces apiculatus</i> CBS	97	KM023287.1
<i>Eupenicillium</i> sp. 03	1013	<i>Penicillium skrjabinii</i>	95	EU427252.1
		<i>Penicillium quebecense</i> CBS	98	JN606622.1
<i>Penicillium</i> sp. 38	1049	<i>Penicillium aurantiacobrunneum</i> DTO	98	KM089541.1
		<i>Penicillium cairnsense</i> DTO	98	KM089463.1
		<i>Penicillium miczynskii</i> CBS	98	JN606623.1
<i>Penicillium</i> sp. 09	534	<i>Penicillium brefeldianum</i> NRRL	94	EU021658.1
<i>Penicillium</i> sp. 24	922	<i>Penicillium skrjabinii</i>	98	EU427252.1
<i>Penicillium</i> sp. 01	1083	<i>Penicillium skrjabinii</i>	98	EU427252.1
		<i>Penicillium paraherquei</i>	97	KJ527380.1
<i>Talaromyces</i> sp. 01	1078	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS	95	JX965285.1
		<i>Talaromyces ruber</i> CBS	95	JX315715.1

**Figura 68** – Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia utilizando duas espécies de cada seção de *Penicillium* (editada).



**Figura 69** – Árvore consenso obtida pelo método de máxima parcimônia do gênero *Talaromyces* (editada).



### 3.4 Avaliação das espécies produtoras de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

Todas as espécies de *Aspergillus* consideradas, segundo a literatura, produtoras de micotoxinas foram testadas quanto à produção de ocratoxina A e aflatoxinas pelo método de plug ágar em cromatografia de camada delgada (Figura 70), além dessas, as espécies ainda não identificadas de *Aspergillus* e *Penicillium* também foram avaliadas em relação a produção ambas as micotoxinas.

As seções *Nigri* e *Circumdati* são costumeiramente produtoras de ocratoxina A, assim como algumas espécies de *Penicillium*, já as seções *Flavi* e *Ochraceorosei* são produtoras das aflatoxinas B e G (PITT, 2000b).

Todos isolados de *A. carbonarius* foram produtores de OTA (Tabela 8). Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, 100% dos isolados desta espécie são produtores de OTA, porém, alguns autores afirmam que alguns isolados de *A. carbonarius* podem não produzi-la (BAU et al., 2005).

Nenhum isolado de *A. niger* var. *niger*, *A. niger* agregado e da seção *Circumdati* foram produtores de OTA (Tabela 8). Em substratos mais propícios à produção de ocratoxina A, como por exemplo uva e cereais, apenas de 5 a 30% dos espécimes de *A. niger* são produtores da mesma (ROCHA-ROSA et al., 2002; BATTILANI et al., 2003). Leong e colaboradores (2007), avaliando o solo de vinhedos na Austrália encontraram 113 isolados de *A. niger*, destes apenas três eram produtores de OTA.

Os 5 isolados de *A. flavus* foram produtores das aflatoxinas B1 e B2 e os 24 isolados de *A. parasiticus* foram produtores de afl. B1, B2, G1 e G2 (Tabela 8). Estas espécies sempre produzem o mesmo conjunto de aflatoxinas e, como já mencionado, este fato é fundamental no auxílio a identificação, visto que estas espécies possuem coloração e aspectos macro e micromorfológicos muito semelhantes. Estima-se que aproximadamente 70 a 80% dos espécimes de ambas as espécies sejam produtores (KLICH, 2002b).

O isolado de *A. ochraceoroseus* não foi produtor das aflatoxinas avaliadas (Tabela 8). Cary e colaboradores (2009), avaliando a presença de genes de aflatoxina e esterigmatocistina em *A. ochraceoroseus* confirmou a produção destas pelos os isolados testados. Contudo, o número de isolados dessa espécie é muito pequeno, e oriundos de um mesmo local na Costa do Marfim. Assim, o *A. ochraceoroseus* identificado pode definitivamente não ser produtor de aflatoxinas, ou não expressar a produção do mesmo, devido as condições encontradas no solo brasileiro. Em todo modo, estudos futuros são necessários para se compreender melhor este espécime.

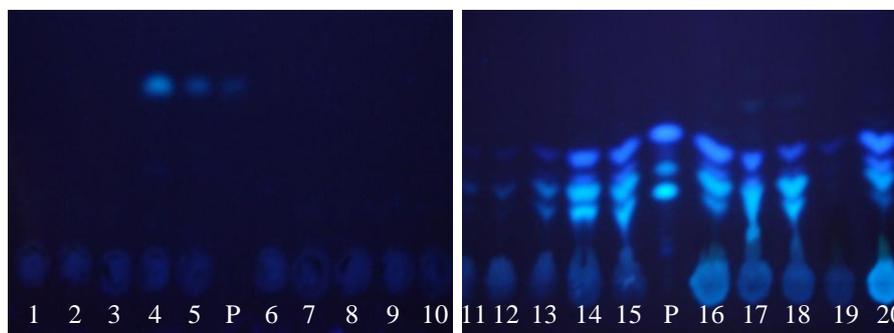
O isolado de *A. sulphureus* e os morfotipos não identificados dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* não foram produtores de ocratoxina A e das aflatoxinas testadas, como apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8** – Produção de ocratoxina A (OTA) e Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) por espécies potencialmente produtoras e morfotipos não identificados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Seção	Nº de Isolados	Espécies	OTA	B1 B2	G1 G2
<b>Seção Nigri</b>	8	<i>A. carbonarius</i>	+	<i>n</i>	<i>n</i>
	45	<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	-	<i>n</i>	<i>n</i>
	9	<i>A. niger</i> agregado	-	<i>n</i>	<i>n</i>
<b>Seção Ochraceorosei</b>	1	<i>A. ochraceoroseus</i>	-	<i>n</i>	<i>n</i>
<b>Seção Circumdati</b>	1	<i>A. sulphureus</i>	-	<i>n</i>	<i>n</i>
<b>Morfotipos não identificados</b>	4	<i>Aspergillus</i> sp. 01 ao 03	-	-	-
	786	<i>Penicillium</i> sp. 01 ao 43	-	-	-
<b>Seção Flavi</b>	5	<i>A. flavus</i>	<i>n</i>	+	-
	24	<i>A. parasiticus</i>	<i>n</i>	+	+

(+) ocorreu produção da micotoxina; (-) não ocorreu produção da micotoxina; (*n*) não foi testado.

**Figura 70** – Placa de cromatografia de camada delgada para os testes de produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

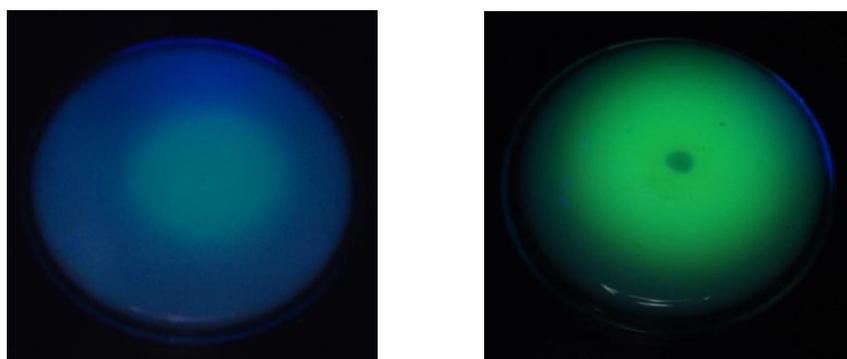


Ocratoxina A (à esquerda) e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (à direita). P = Padão das micotoxinas. 1 a 3 isolados de *A. niger* var. *niger*; 4 e 5 isolados de *A. carbonarius*; 6 a 8 *A. niger* agregado; 9 e 10 *A. niger* var. *niger*; 11 a 20 *A. parasiticus*.

### 3.5 Avaliação da produção de citrinina pelos métodos plug ágar e Coconut Agar

Todos 78 isolados de *P. citrinum* avaliados pelo método de Coconut Agar foram produtores de citrinina. Este método foi descrito recentemente por Mohamed e colaboradores (2013), e ainda não é muito discutido na literatura, entretanto, mostrou-se bastante eficiente e de fácil visualização, principalmente após o tratamento ácido (Figura 71).

**Figura 71** – Produção de citrinina em placa de Coconut Agar.

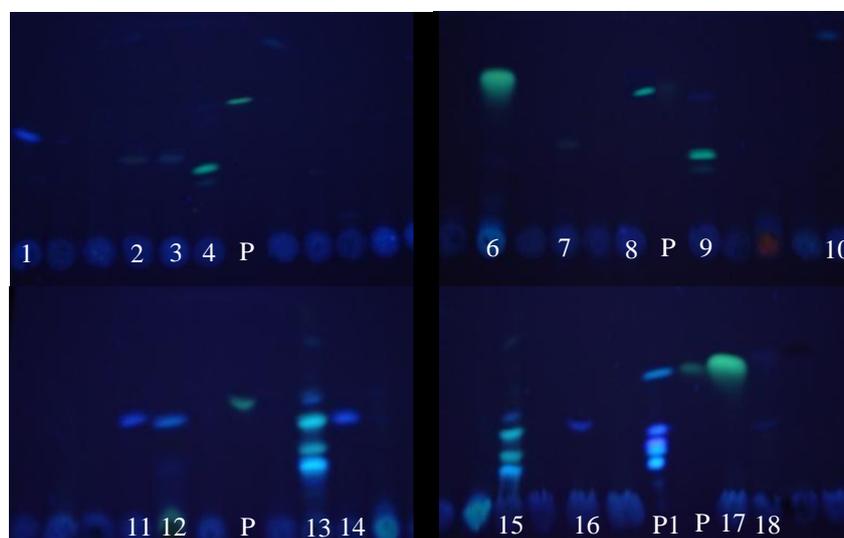


Isolado CA2M211. Sem adição de ácido (à esquerda) e com adição de ácido (à direita).

Todos morfotipos de *Penicillium* não identificados foram avaliados sobre a produção de citrinina pelo método de plug ágar. Destes, os morfotipos *Penicillium* sp. 04, 19 e 27 apresentaram bandas verdes, paralelas ao padrão de citrinina, correspondendo a produção da citrinina (Figura 72). Este resultado é de grande importância pois, pode auxiliar na taxonomia destas espécies, assim como na descrição das mesmas, visto que, este critério é bastante utilizado pelos taxonomistas de *Aspergillus* e *Penicillium*.

Na realização do teste de citrinina, foi observado que diversos isolados dos morfotipos não identificados produziram outras substâncias luminescentes à luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm (Figura 72). Diante disso, a realização de mais testes bioquímicos é necessária para conhecimento destas substâncias que podem auxiliar na identificação dos morfotipos, e corresponder a novas fontes de compostos de interesse industrial.

**Figura 72** – Placa de cromatografia de camada delgada dos testes de produção de citrinina, OTA e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.



P = Padrão de citrinina; P1 = Padrão de Ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.  
 1= *Penicillium* sp. 42; 2= *Penicillium* sp. 14; 3= *Penicillium* sp. 10; 4= *Penicillium* sp. 18; 5= *Penicillium* sp. 20; 6= *Penicillium* sp. 04; 7= *Penicillium* sp. 03; 8= *Penicillium* sp. 27; 9= *Penicillium* sp. 05; 10= *Penicillium* sp. 17; 11= *Penicillium* sp. 29; 12= *Penicillium* sp. 35; 13= *Penicillium* sp. 01; 14= *Penicillium* sp. 12; 15= *Penicillium* sp. 09; 16= *Penicillium* sp. 13; 17= *Penicillium* sp. 19; 18= *Penicillium* sp. 32.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização das técnicas de identificação morfológica é imprescindível para se ter resultados confiáveis.

As micotoxinas foram grande auxílio na identificação de algumas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*.

O presente instrumento servirá de guia para futuras comparações das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* encontradas em solo brasileiro.



## 5 CONCLUSÃO

O solo da área Canga apresentou maior estimativa da população fúngica, seguido de Eucalipto, Capim, Cerrado e Mata. Contudo o número de espécies e isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foi maior em Capim seguidamente de Eucalipto, Cerrado, Canga e Mata.

Os 1984 isolados obtidos de 88 morfotipos diferentes mostram a grande diversidade dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nos solos avaliados.

Pela avaliação morfológica foi possível a identificação de 12 espécies de *Aspergillus*, 22 espécies de *Penicillium* e 4 de *Talaromyces*. Estes espécies são integrantes de sete seções de *Aspergillus*, onze de *Penicillium* e três de *Talaromyces*. O número de isolados e de espécies do gênero *Penicillium* foi muito superior ao de *Aspergillus* em todas as áreas analisadas.

O primeiro relato de *Aspergillus ochraceoroseus* exteriormente à Costa do Marfim, mostra a importância de trabalhos de pesquisa básica como este, dado que esta espécie é comumente produtora de micotoxinas, o que pode acarretar riscos em áreas agrícolas.

Não foi possível a identificação de 50 morfotipos e estes representam grande possibilidade de espécies novas com potencial biotecnológico. Estes passam a compor a Coleção de Microrganismos do Departamento de Ciências de Alimentos (CCDCA).

Apesar da maioria dos morfotipos apresentarem alta porcentagem de identidade genética com as espécies de referência encontradas no Genbank, as análises moleculares foram inconclusivas, não identificando nenhum dos morfotipos analisados.

Todos isolados da espécie *A. carbonarius* foram produtores de ocratoxina A, de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas B1 e B2 e *A. parasiticus* foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Todos

isolados de *P. citrinum* foram produtores de citrinina, assim como os morfotipos *Penicillium* sp. 04, 19 e 27. Várias substâncias luminescentes não identificadas foram produzidas pelos morfotipos não identificados, o que pode auxiliar na identificação desses morfotipos e caracterizarem compostos de interesse industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.

BARTOLI, A.; MAGGI, O. Four new species of *Aspergillus* from Ivory Coast soil. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 71, n. 3, p. 383-394, 1978.

BATTILANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 633-636, 2003.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p.125-130, 2005.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 36-42, 2013.

CARY, J. W. et al. Characterization of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflatoxin/sterigmatocystin biosynthetic gene cluster. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 352-362, 2009.

CARY, J. W. et al. Functional and phylogenetic analysis of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflQ (ordA) gene ortholog. **Mycologia**, v.104, n. 4, p. 857-864, 2012.

DOUGLAS-KING, J. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.

FERRACIN, L. M. et al. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 241-248, 2009.

FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Diversidade de Trichocomaceae isolada de solo e serrapilheira de Floresta Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 4, p. 405-413, 2012.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOEB, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov.. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 442-453, 2005.

GAMS, W. The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil. In: WINTERHOFF, W (Ed.). **Fungi in vegetation science**. Netherland: Kluwer Academic, 1992. p. 183-223.

HEPPERLE, D. **SeqAssem©**: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Klein Raden: Sequantix, 2004. Disponível em: <<http://www.sequantix.de>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

HOCKING, A.D.; PITT, J.L. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 488-492, 1980.

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

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

HUISING, E. J. et al. Estratégia e modelo de amostragem para avaliar a biodiversidade do solo. In: Moreira, F. M. S.; Huising, E. J.; Bignell, D. E. (Eds.). **Manual de Biologia dos Solos Tropicais: Amostragem e Caracterização da Biodiversidade**. Lavras: Editora da UFLA; 2008. p. 43-78.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Dados meteorológicos**. Disponível em <<<http://www.inmet.gov.br>>> acesso 6 set. 2015.

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

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002b. 116 p.

KLICH, M. A. et al. A. Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. **Mycologia**, v. 95, n. 6, p. 1252-1260, 2003.

KLICH, M. A. et al. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamaris* and *A. ochraceoroseus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 605-609, 2000.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, v. 25, p. 5-80, 2012.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 124-133, 2007.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.

MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. 2006. 50 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2006.

MARKOVINA, A. L.; PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; CARTER, D. A.; MCGEE, P. A. Diversity of the *Trichocomaceae* in the Katandra Nature Reserve, Central Coast, NSW, Australia. **Mycological Research**, v. 109, n. 9, p. 964-973, 2005.

MOHAMED, S. et al. An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 214-219. 2013.

MONTEIRO, M.; PASSAMANI, F. R. F.; TERRA, M.; SILVA, D. M.; CIRILLO, M. A.; BATISTA, L. R. Soilborne fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera in a preserved region of the Brazilian Cerrado biome. **Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 14-22, 2016.

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

OKUDA, T. Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variations in culture conditions. **Mycologia**, v. 86, p. 259-262, 1994.

OKUDA, T. et al. Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Eds.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 83-99.

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semi-arid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49-54, 2013.

PARENICOVA, L. et al. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 521-527, 2001.

PAUL, E.A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4th ed. Londres, UK: Elsevier Academic Press, 2015. 59 p.

PERRONE, G. et al. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.1, p. 680-685, 2006.

PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from brazilian Cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.

PITT, J. I. A. **Laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science Australia. 2000a. 187 p.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v.56, n. 1, p. 184-192, 2000b.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PUANGSOMBAT, P.; SANGWANIT, U.; MAROD, D. Diversity of soil fungi in different land use types in Tha Kum-Huai Raeng forest reserve, Trat Province. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 44, p. 1162-1175, 2010.

RIVERA, K. G.; SEIFERT, K. A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 139-158, 2011.

ROCHA-ROSA, C. A. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 408-414, 2002.

SAMSON R. A. et al. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. In: SAMSON R. A. et al. (Eds). **Introduction to food-borne fungi**. Netherlands: CBS, 1996. p. 261-269.

SAMSON, R.A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v.70, p. 159-183, 2011.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesq. agropec. bras.**, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SIMÕES, M.F. et al. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Eds.). **Management of Microbial Resources in the Environment**. Netherlands : Ed. Springer, 2013. 530 p.

SOUZA, C. N. et al. Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 6., 2010, Brasília, DF. **Anais...**Brasília, DF, 2010.1 CD-ROM.

SUSCA, A. et al. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 10, p. 1154-1160, 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAUK, S. M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, n.4, . 299-301, 1990.

TEIXEIRA, A. F. S. **Densidade e diversidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em áreas do Quadrilátero ferrífero**. 2015. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An introduction**. 12th ed. USA: Pearson Education, 2016. 960 p.

VARGA, J. et al. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Eds). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 397-411.

VISAGIE, C.M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

VISAGIE, C.M. et al. Five new *Talaromyces* species with ampulliform-like phialides and globose rough walled conidia resembling *T. verruculosus*. **Mycoscience**, v. 56, n. 5, p. 486-502, 2015.

YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 175-341, 2014.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species**. 3rd ed. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group, 2010. 426 p.

ZHOU, J.Z. et al. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 326-334, 2002.



### **CAPITULO 3:**

## **Composição e riqueza da comunidade de *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de solos do Quadrilátero Ferrífero**

### **1 INTRODUÇÃO**

O solo é um componente muito importante na biosfera terrestre, funcionando no sistema de produção agrícola e também na manutenção da qualidade ambiental. Pode ser caracterizado como uma máquina viva e dinâmica que desempenha inúmeras funções no ecossistema terrestre. E por ser um ambiente heterogêneo, permite o desenvolvimento de uma grande diversidade de organismos. A população que habita o solo inclui macrofauna, mesofauna, microfauna e microbiota. Assim, este deve ser definido como um ecossistema e não apenas como um substrato (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O termo biodiversidade tem sido amplamente empregado, tanto na literatura científica quanto na mídia popular, mas nem sempre sua definição é clara, podendo ser usado com diferentes significados. De uma maneira mais simples o termo biodiversidade é usado como sinônimo de riqueza de espécies, referindo-se apenas ao número de espécies presente numa determinada área. A definição quantitativa de diversidade inclui não apenas o aspecto variedade como também uma medida de abundância relativa das espécies (BARROS, 2007).

A importância de se estudar a diversidade microbológica está relacionada à expansão do conhecimento acerca das estratégias e limites de adaptação evolutiva, bem como da importância dos microrganismos para a sustentabilidade da vida no planeta; ao uso dos padrões de diversificação dos mesmos para fins de monitoramento e previsão de alterações ambientais; ao entendimento de como os microrganismos afetam a biologia dos organismos superiores, e ao desenvolvimento de comunidades microbianas como

modelos para estudos de interações biológicas, evolutivas e ecológicas (STALEY et al., 1997).

A diversidade de fungos filamentosos no habitat solo é afetada por numerosos fatores bióticos e abióticos, tais como sua natureza física, química e pelo tipo de vegetação predominante (BEHERA et al., 2014). Fatores como o tamanho das partículas e agregados do solo, composição e quantidade de matéria orgânica podem influenciar a ocorrência e a distribuição espacial dos fungos (BUÉÉ et al., 2009; RAMOS, 2016). Além disso, as ações antrópicas como urbanização, desmatamento, mineração e mudanças no uso da terra têm alterado este habitat e ameaçado a sua biodiversidade (ZARI, 2014).

O estudo da riqueza e composição da microbiota do solo pode contribuir para o conhecimento taxonômico das espécies e de sua diversidade, além das possíveis funções que estas populações podem estar desempenhando nesse sistema.

A identificação de fungos adaptados a solos com predominância de determinados metais ou substâncias químicas, como os solos próximos às áreas de mineração, permitem o entendimento da composição dos principais grupos dominantes nestes ambientes e a identificação de estirpes de metabolismo diferenciado com possibilidade de utilização em diferentes processos. Entretanto, os conhecimentos disponíveis a respeito da composição e função de comunidades microbianas de ambientes minerados ainda são incipientes.

Com base nessas considerações, o trabalho visou a avaliação da diversidade, riqueza e composição das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* nas áreas Mata, Cerrado, Canga, Capim e Eucalipto, assim como correlacionar a ocorrência e abundância dessas espécies aos componentes químicos e físicos dos solos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização das áreas de coleta

O estudo foi realizado em diferentes áreas da mina Córrego do Meio (19°51'41.23"S; 43°48'11.13"O), pertencentes à empresa Vale (Sabará – MG). A extração de minério ferro nessa mina foi totalmente desativada no ano de 2006. As cinco áreas avaliadas (Figura 73), descritas na Tabela 9, se localizam na unidade morfoestrutural do Quadrilátero Ferrífero e estão inseridas na sub-bacia hidrográfica do Rio das Velhas.

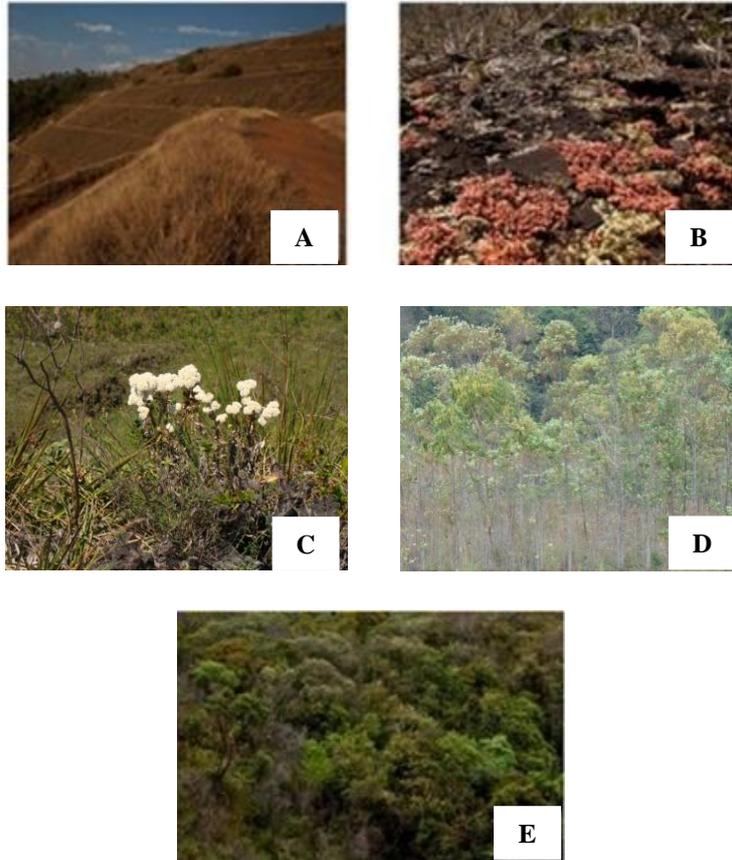
O clima predominante da região é tropical de altitude, Cwa de acordo com a classificação de Köppen, caracterizado por verões quentes e úmidos e invernos secos e frios. A precipitação média anual está em torno de 1700 mm, com pequeno período seco (Figura 74) e temperatura média em torno de 22°C.

**Tabela 9** – Abreviações, descrição das áreas avaliadas e identificação geográfica dos pontos de coleta na Mina Córrego do Meio.

Área	Descrição	Altitude (m)	Pontos de Coleta
EU	Área de reflorestamento vegetada predominantemente com <i>Eucalyptus</i> spp.	926 a 971	0624909
			7803671
CA	Área em processo de recuperação ambiental após mineração de ferro, revegetada com capim gordura ( <i>Melinis minutiflora</i> )	1041 a 1060	0625824
			7803430
CE	Vegetação de cerrado preservada e com baixo grau de antropismo	992 a 1006	0625152 7803184
CG	Ambiente rupestre bastante preservado sobre afloramentos rochosos	1196 a 1201	0632410 7806420
MT	Vegetação secundária em diferentes estágios de regeneração natural, originalmente pertencente à Mata Atlântica	880 a 966	0625403 7803336

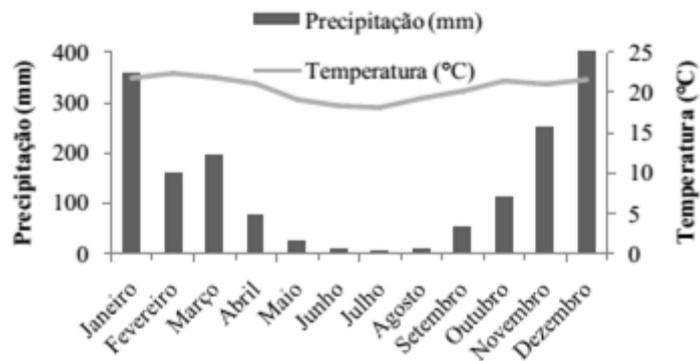
EU: Eucalipto; CA: Capim; CE: Cerrado; CG: Canga e MT: Mata.

**Figura 73**– Áreas amostradas na Mina Córrego do Meio, Sabará, MG, Brasil.



A: Capim; B: Canga; C: Cerrado, D: Eucalipto e E: Mata.  
Fonte: Teixeira, 2015 (modificado).

**Figura 74** – Precipitação (mm) e temperatura média compensada ( $^{\circ}$  C) para Belo Horizonte no período de 2000 a 2013.



Fonte: INMET.

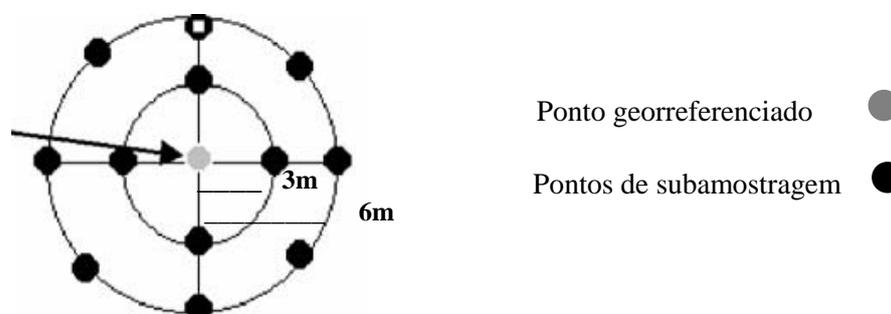
## 2.2 Desenho amostral e coleta

As amostras foram coletadas conforme Huising e colaboradores (2008), para amostragem de fungos do solo. A coleta foi realizada no período de 23 a 27 de setembro de 2013. Foram coletadas quatro amostras (repetições) por área de estudo, estas denominadas Eucalipto (EU), Capim (CA), Canga (CG), Cerrado (CE) e Mata (MT). Os locais de coleta foram georreferenciados (Tabela 9) e plotados no mapa (Figura 76).

Para cada amostra, 12 subamostras foram coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do ponto georreferenciado como observado na Figura 75. Cada subamostra foi extraída com o auxílio de um trado, na profundidade de 0 a 20 cm.

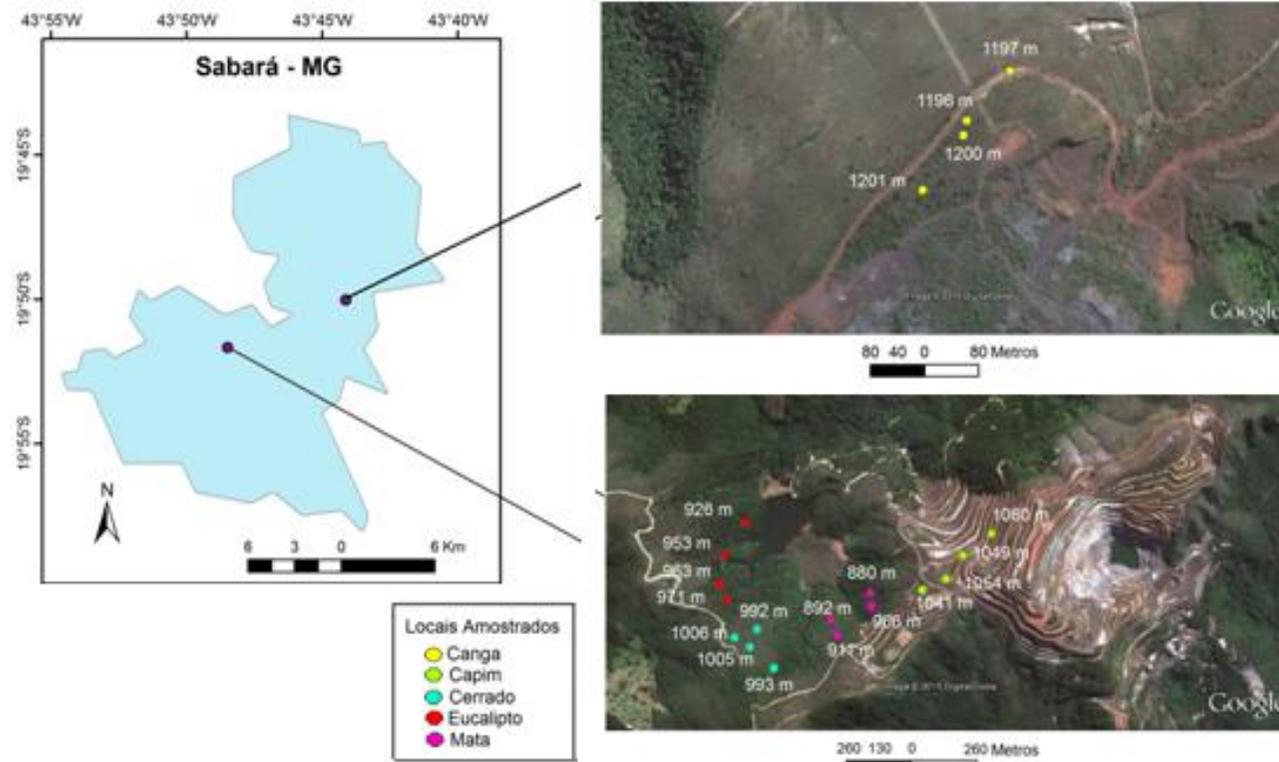
Foram retirados por amostra aproximadamente 500 g de solo, entretanto para o isolamento de fungos foi utilizado 30 g de solo coletado em cada amostra dessas regiões. As amostras compostas de solo foram homogêneas, armazenadas em sacos plásticos e colocadas em isopor para transporte até o Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde ficaram armazenadas em freezer  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até início do processamento. Parte de cada amostra foi enviada para os Laboratórios de Análises de Fertilidade do solo do DCS/UFLA para caracterizações química e física (Apêndice B).

**Figura 75** – Esquema de amostragem do solo.



Dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do ponto georreferenciado.  
 Fonte: Huising et al., 2008.

**Figura 76** – Pontos de coleta, CeBio - Mina do Córrego do Meio, Sabará, MG.



Rosa: Mata, Azul: Cerrado, Verde: Capim, Vermelho: Eucalipto e Amarelo: Canga.  
 Fonte: Teixeira, 2015 (modificado).

### 2.3 Análise de dados

Cada área foi considerada como uma unidade amostral ou repetição. Assim, a abundância total (soma do número de espécimes isolados de todas as espécies) e a abundância por espécie (número de espécimes isolados de cada espécie) foram calculadas para cada área.

A riqueza observada (número absoluto de espécie em cada área) foi comparada entre os sítios amostrados através de curvas de rarefação (estimativa de MaoTau), geradas com auxílio do programa EstimateS 9.1 (COLWELL, 2012) com 500 aleatorizações, considerando o número de espécimes isolados em cada área como medida do esforço amostral.

Foram consideradas espécies raras aquelas que apresentaram um indivíduo apenas por área, e estas foram contabilizadas (número absoluto). Também foi realizado o cálculo da porcentagem de espécies raras por área, considerando a riqueza total como 100%.

O índice de diversidade de Shannon-Weiner ( $H'$ ) foi calculado utilizando o software de análise de dados científicos PAST (Paleontological Statistics) (HAMMER et al., 2001).

Para comparar a composição e a abundância da comunidade nas áreas de Eucalipto (EU), Capim (CA), Canga (CG), Cerrado (CE) e Mata (MT), foi utilizada a técnica multivariada de ordenação, (Multidimensional Scaling - MDS), com dados qualitativos (presença e ausência) e quantitativos (abundância) para cada uma das vinte unidades amostrais. Utilizou-se o índice de similaridade de Bray-Curtis e a análise de similaridade (ANOSIM), para testar a existência de diferença significativa nesses parâmetros entre as áreas. Estas análises foram realizadas no programa Primer (CLARK e GORLEY, 2001).

Para as espécies que apresentaram pelo menos 40 isolados em todas as áreas amostradas, foi utilizada a análise de espécies indicadoras (DUFRÊNE e LEGENDRE, 1997), que verifica a fidelidade das espécies as áreas e cujos resultados são expressos pelo valor de indicação (VI) e pela

significância, dada pelo teste de permutação de Monte Carlo, considerando significância em 0,05. Esta análise foi processada pelo programa PC-ORD para Windows versão 4.14 (McCUNE e MEFFORD, 1999).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para demonstrar a ordenação e abundância das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* encontradas nas cinco áreas avaliadas e para identificar quais atributos do solo mais se relacionaram a elas. As cinco áreas avaliadas, os atributos químicos do solo e as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram transformados em coordenadas correspondentes à sua projeção sobre os eixos de ordenação, ou autovalores, que representam o peso de cada variável em cada componente (eixo) e com um coeficiente de correlação variando entre -1 e +1, esta análise foi feita no software R (versão 2.11.1, 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Diversidade, Riqueza e Composição

Com um esforço amostral de 6 placas por diluição (três de DRBC e três de DG18), para cada uma das quatro amostras de solo, das cinco áreas avaliadas foram obtidos 1984 espécimes de 88 morfotipos distintos.

A área Eucalipto foi a que apresentou maior índice de diversidade Shannon-Weiner ( $H'$ ) (1,15), seguida por Capim (1,10), Cerrado (0,90), Canga (0,85) e por fim, Mata (0,80) (Tabela 10). Muitos autores descrevem que números menores que 2,0 para  $H'$  indicam baixa diversidade de espécies, entretanto, este índice é sensível a espécies raras e, quanto maior o número de espécies raras, menor o valor do índice (ZANZINI, 2007). A porcentagem de espécies raras foi alta em todas as áreas (Tabela 10).

A riqueza observada foi maior em Capim, Eucalipto, Cerrado, Canga e Mata nessa sequência (Tabela 10). Os dados apresentados na curva de rarefação (Figura 77) corroboram esse resultado, mostrando que, a partir do esforço amostral de aproximadamente 300 isolados, a riqueza é diferente entre as áreas amostradas.

**Tabela 10** – Diversidade, Riqueza, número de espécies e total de espécimes isolados nas áreas Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado e Mata.

Área	( $H'$ )	Riqueza	Nº. de espécies raras*	% espécies raras
Eucalipto	1,15	41	19	46
Capim	1,10	42	19	45
Canga	0,85	23	07	30
Cerrado	0,90	27	11	41
Mata	0,80	17	06	35

$H'$  = Índice de Diversidade de Shannon-Weiner. \* Espécies com um isolado apenas na área; assumindo - morfotipo igual a espécie.

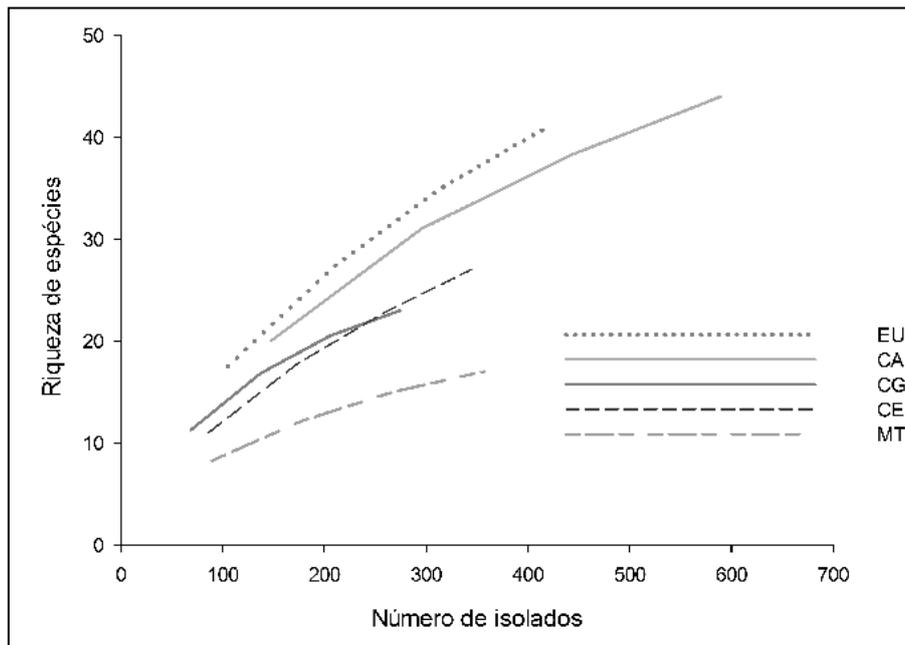
A riqueza e a diversidade de espécies dependem, além da própria natureza da comunidade, do esforço amostral despendido, uma vez que o número de espécies aumenta com o aumento do número de indivíduos amostrados (BARROS, 2007).

Considerando o mesmo esforço amostral, a riqueza de espécies de Canga e Mata foi inferior as demais. Esta ocorrência pode concernir aos elevados valores encontrados para a maioria dos elementos do solo nas amostras de Canga (Apêndice B), que podem ter limitado o desenvolvimento de algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e, a dificuldade de dispersão de esporos na área Mata.

As curvas de rarefação permitem avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies presentes em determinado local e, quando a curva estabiliza, significa que a riqueza total foi obtida. Como pode se observar na Figura 77, nenhuma das curvas se estabilizaram, indicando que o esforço amostral não foi suficiente para determinar adequadamente a comunidade. Este fato deve-se provavelmente ao elevado número de espécies raras, pois estas foram no mínimo 30% do número de espécies encontradas nas áreas (Tabela10).

Ademais, a riqueza de espécies e sua abundância no solo alteram-se muito em centímetros - devido aos microsítios; cada partícula do solo pode ser habitada por uma comunidade microbiana, a qual pode ser muito distinta da adjacente devido as condições ambientais díspares (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; PAUL, 2015; ZHOU et al., 2002). Deste modo a curva de rarefação para o estudo de espécies microbianas do solo dificilmente assumirá forma assintótica, ou seja, quase paralela ao eixo X. Este fato possivelmente só ocorrerá em comunidades muito definidas e equilibradas.

**Figura 77** – Representação gráfica da curva de rarefação da riqueza observada de *Aspergillus* e *Penicillium* nas áreas: Capim (CA), Eucalipto (EU), Canga (CG), Cerrado (CE) e Mata (MT).



Verificando a riqueza e diversidade de *Aspergillus* e *Penicillium* na área Capim - onde ocorreu por 65 anos a exploração de minério de ferro, pode-se dizer que este solo está novamente vivo e recuperado com relação a estes gêneros. Entretanto não é possível inferir sobre os danos causados por esta exploração a demais microbiota presente no solo.

As áreas avaliadas apresentaram baixo número de espécies compartilhadas e, a composição de cada amostra e área pode ser visualizada no apêndice A, e na Tabela 11 a seguir.

**Tabela 11** – Composição das espécies mais freqüentes nas diferentes áreas e amostras.

ESPÉCIE	EU 1	EU 2	EU 3	EU 4	CA 1	CA 2	CA 3	CA 4	CG 1	CG 2	CG 4	CG 6	CE 1	CE 2	CE 3	CE 4	MT 6	MT 7	MT 8	MT 9
<i>A. aculeatus</i>	■											■	■	■					■	
<i>A. carbonarius</i>			■		■	■										■				
<i>A. niger</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>A. parasiticus</i>					■	■	■	■			■	■	■	■	■					
<i>A. tubingenses</i>					■	■			■		■	■	■	■	■					
<i>Eupenicillium 01</i>			■	■	■	■	■	■							■					
<i>P. brevicompactum</i>	■	■			■	■	■	■	■						■		■	■	■	■
<i>P. citrinum</i>				■	■	■	■	■	■					■						■
<i>P. corylophilum</i>	■	■	■		■	■	■	■							■					■
<i>P. glabrum</i>	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				■
<i>P. janthineum</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
<i>P. oxalicum</i>					■	■	■	■						■	■	■	■	■		■
<i>P. paxilli</i>	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
<i>P. simplicissimum</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Penicillium sp. 17</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Penicillium sp. 18</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Penicillium sp. 19</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

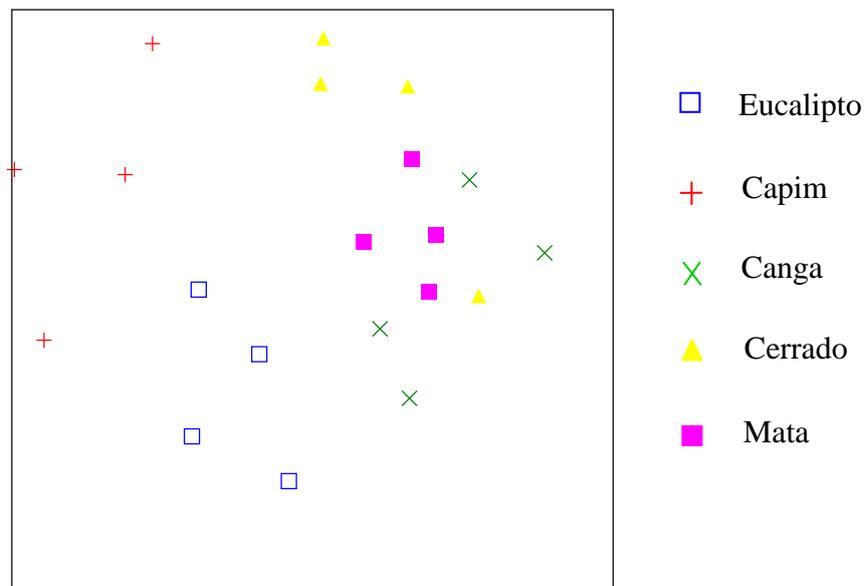
■ = presença da espécie.

Apenas *A. niger*, *P. citrinum*, *P. oxalicum* e *P. simplicissimum* foram encontrados em todas as áreas. Estas espécies são encontradas em solos de todos continentes em abundância. As espécies *A. aculeatus*, *P. brevicompactum* foram isoladas em quatro amostras e também são corriqueiras do solo (KLICH, 2002 e PITT, 2000a). Já *Penicillium* sp. 17 e *Penicillium* sp. 19 apenas não foram encontrados em Capim.

A baixa similaridade na composição das espécies entre as áreas pôde ser mostrada por meio da análise de ordenação MDS, que evidenciou a separação espacial da maioria das amostras (Figura 78).

As quatro amostras de Eucalipto e Capim, assim como duas amostras de Cerrado se mostraram bastante distintas das outras áreas. Já as amostras de Canga e Mata e duas amostra de Cerrado foram similares em composição. Pela Figura 78 também é possível observar que a composição de todas as amostras de Capim, Eucalipto e Canga e uma amostra de Cerrado foi pouco similar entre seus pares.

**Figura 78** – Diagrama da comparação das 20 amostras em termos de composição de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* pela análise multivariada de ordenação (MDS).



Este resultado foi corroborado pela análise de dados de similaridade (ANOSIM), mostrando que a composição das espécies difere parcialmente entre as áreas ( $R$  global = 0,6531;  $P$  = 0,0001). A comparação par a par da composição das espécies nas áreas pode ser vista na Tabela 12, onde os números destacados são aqueles que diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12** – Valores da ANOSIM para composição de espécies nas áreas Capim, Eucalipto, Canga, Cerrado e Mata.

	EU	CA	CG	CE	MT
EU		<b>0,0343</b>	<b>0,0272</b>	<b>0,0268</b>	<b>0,0260</b>
CA	<b>0,0343</b>		<b>0,0304</b>	<b>0,0256</b>	<b>0,0310</b>
CG	<b>0,0272</b>	<b>0,0304</b>		0,2019	0,0834
CE	<b>0,0268</b>	<b>0,0256</b>	0,2019		0,4295
MT	<b>0,0260</b>	<b>0,0310</b>	0,0834	0,4295	

EU = Eucalipto; CA = Capim; CG = Canga; CE = Cerrado e MT = Mata. Valores sombreados diferem entre si.  $p < 0,05$ .

A similaridade entre Canga, Cerrado e Mata possivelmente está relacionada a menor riqueza encontrada nessas áreas. Avaliando a Tabela 11, oito das 17 espécies mais encontradas são comuns a Canga, Cerrado e Mata.

A maior riqueza encontrada em Eucalipto e Capim diferenciou a composição dessas áreas das demais. O elevado número de isolados, assim como da riqueza nas amostras de Capim eram previstos, devido a fácil dispersão de esporos e a abundante rizosfera.

Conquanto, a presença de *Eucalyptus* spp. têm sido associada ao ressecamento, empobrecimento e consequente esterilização do solo, além da conhecida produção de substâncias alelopáticas (LIMA, 1993), fatos que não condizem com a alta riqueza microbiana observada. Entretanto, Santos e colaboradores (1998), avaliando a diversidade de fungos em solos de floresta

de eucaliptos também encontraram número elevado de espécies fúngicas, principalmente do gênero *Penicillium*.

Já foi bem estudado que plantas têm importantes efeitos na microbiologia do solo, principalmente porque diferentes espécies de plantas liberam diferentes nutrientes e componentes orgânicos no solo (GRAYSTON et al., 1998). Em alguns estudos, são observadas diferenças significantes na comunidade microbiana do solo associadas com diferentes espécies vegetais. Pfuller e colaboradores (2000), atribuem variações de número e riqueza de microrganismos à cobertura vegetal do solo, a qual, possivelmente promove menor oscilação térmica do solo e maior efeito rizosférico nas populações.

Estes fatores, juntamente com fatores abióticos, como a composição química do solo das diferentes áreas, a exposição ao sol e à chuvas, foram determinantes na composição da riqueza e *Aspergillus* e *Penicillium* nas áreas avaliadas.

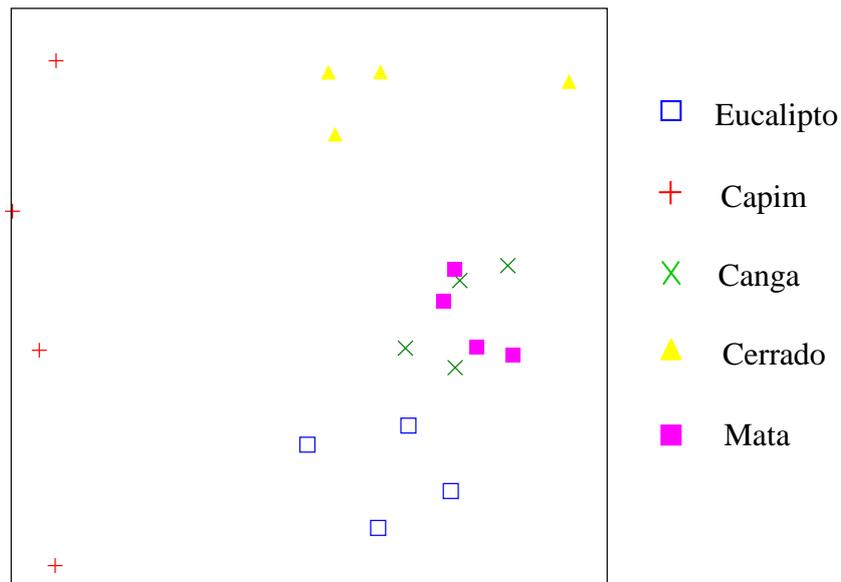
### 3.2 Abundância e análise de espécies indicadoras

De maneira geral, abundância é o termo utilizado para o número total de indivíduos de uma mesma espécie e, somando-se todas as áreas, as espécies mais abundantes foram *P. janczewskii* (43), *A. niger* var. *niger* (45), *P. waksmanii* (47), *A. aculeatus* (54), *P. glabrum* (66), *P. janthinellum* (66), *P. citrinum* (78), *P. oxalicum* (116), *Penicillium* sp. 17 (330), *Penicillium* sp. 19 (347), e *P. simplicissimum* (363), que juntas correspondem a 78% de todos os isolados (Apêndice A). Somente *Penicillium* sp. 17 e 19 compreendem 34% dos espécimes isolados. Dessa forma, a identificação desses morfotipos é de grande importância para definir a população do gênero *Penicillium* nessas áreas. O gênero *Penicillium*, assim como na literatura, foi dominante nos solos avaliados, pois foi superior tanto em riqueza quanto em número de isolados ao *Aspergillus*.

A heterogeneidade da comunidade quanto a distribuição das abundâncias das espécies nas regiões amostradas é melhor visualizada por meio da análise de ordenação MDS (Figura 79). Segundo o gráfico de ordenação espacial, posicionaram-se distantes as amostras de Capim, Eucalipto e Cerrado, o que sugere que seus valores de abundância de espécies são distintos. Já as amostras de Canga e Mata ficaram próximas, indicando similaridade.

Tanto em riqueza quanto em abundância das espécies, as amostras de Canga foram similares as de Mata. Isso presumivelmente em consequência da proximidade dos componentes químicos e físicos encontrados em ambas as áreas, geralmente mais relacionados, que das demais (Apêndice C). A cobertura vegetal de ambas as áreas é bastante distinta e não explica os resultados encontrados, já que mata apresenta espécies arbóreas e Canga vegetação de Campo Rupestre, herbáceo-arbustiva, sendo esta última mais próxima a observada em Cerrado.

**Figura 79** – Comparação das 20 amostras em termos de abundância das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* pela análise multivariada de ordenação (MDS).



O resultado gerado pela ANOSIM, confirma a maioria das observações feitas pelo gráfico, mostrando que a abundância das espécies difere parcialmente entre as áreas ( $R$  global = 0,6417;  $P = 0,0001$ ) (Tabela 13). Entretanto indica que apenas duas amostras de Canga, uma amostra de Mata e também uma amostra de Cerrado foram similares. A comparação par a par da abundância de espécies nas áreas pode ser vista na Tabela 13, onde os números destacados diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 13** – Valores da ANOSIM para abundância de espécies nas áreas Capim, Eucalipto, Canga, Cerrado e Mata.

	EU	CA	CG	CE	MT
EU		<b>0,0301</b>	<b>0,0290</b>	<b>0,0285</b>	<b>0,0311</b>
CA	<b>0,0301</b>		<b>0,0285</b>	<b>0,0232</b>	<b>0,0279</b>
CG	<b>0,0290</b>	<b>0,0285</b>		0,0922	0,2575
CE	<b>0,0285</b>	<b>0,0232</b>	0,0922		<b>0,0278</b>
MT	<b>0,0311</b>	<b>0,0279</b>	0,2575	<b>0,0278</b>	

EU = Eucalipto; CA = Capim; CG = Canga; CE = Cerrado e MT = Mata. Valores sombreados diferem entre si.  $p < 0,05$ .

Em uma comunidade grande porcentagem das espécies são classificadas como raras, em detrimento daquelas poucas consideradas como abundantes e dominantes (GOMES e FERREIRA, 2004). Deste modo, o baixo número de espécies abundantes é comum.

A maioria das espécies raras não foi identificada e, mesmo que em menores números, a identificação dessas espécies é de grande importância na avaliação da comunidade fúngica dos solos analisados. A identificação das espécies de Canga são particularmente importantes em virtude das características deste solo. Possivelmente muitos microrganismos que habitam este solo, com altas concentrações de ferro são *sui generis*, ou seja,

únicos e incomparáveis, podendo representar espécies novas com grande potencial biotecnológico.

*A. aculeatus* foi mais abundante em Cerrado, assim como *Penicillium* sp. 19. As espécies *P. janthinellum* e *P. waksmanii* foram isoladas em maior número em Eucalipto. *P. oxalicum*, *P. citrinum* e *P. simplicissimum* foram mais comumente encontradas em Capim e as espécies *P. glabrum* e *Penicillium* sp. 17 foram dominantes em Mata.

Reforçando estes dados de abundância, a análise de espécies indicadoras evidenciou que, das dez espécies com mais de 40 isolados em todas as áreas (Apêndice A), cinco apresentaram preferência significativa por alguma das cinco áreas amostradas (Tabela 14).

**Tabela 14** – Resultados da análise de espécies indicadoras (ISA) nas áreas Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado e Mata.

Área	Espécie	IV%	p
Eucalipto	<i>P. janthinellum</i>	56,1	0,0494
Capim	<i>P. simplicissimum</i>	51,2	0,0006
Eucalipto	<i>P. waksmanii</i>	93,6	0,0004
Mata	<i>Penicillium</i> sp. 17	39,7	0,0144
Cerrado	<i>Penicillium</i> sp. 19	37,2	0,0382
Canga	-	-	-

VI = valor de indicação; significância dada pelo teste de permutação de Monte Carlo, considerando  $p < 0,05$ .

A Análise de Espécies Indicadoras (ISA) é uma ferramenta na determinação das preferências das espécies identificadas por habitats que apresentam características ambientais específicas. Este método combina informação sobre a concentração da abundância de uma espécie em um determinado grupo de unidades amostrais e da fidelidade da ocorrência desta espécie em um certo grupo de amostras (DUFRÊNE e LEGENDRE, 1997).

Valores Indicativos (VI) são calculados para cada espécie dentro de cada grupo, e estes são testados estatisticamente, de forma a diferenciá-los do acaso, pelo teste de Monte Carlo com 1000 repetições. Com isso, uma espécie só é considerada indicadora de um habitat quando apresenta o maior índice de Espécies Indicadoras para o referido habitat e a significância do teste de Monte Carlo superior a 95% (MACHADO et al., 2008).

Dessa forma, quanto maior a porcentagem do valor de indicação (VI), maior a possibilidade da presença da espécie no local analisado. A espécie *P. waksmanii* foi isolada em quantidades expressivas em todas as quatro amostras de Eucalipto e em menor número em poucas outras amostras e, como resultado apresentou VI de 93,6%. As demais espécies estavam presentes em quase todas amostras, dessa forma apresentaram menores valores de indicação.

Como já mencionado anteriormente, as espécies *P. janthinellum* e *P. simplicissimum* são bastante comuns à maioria dos solos do mundo, não sendo consideradas boas indicadoras. Ademais, em razão da cobertura vegetal, as áreas Capim, Eucalipto e Mata são ambientes corriqueiros, nos quais não são necessárias espécies indicadoras.

Ao contrário, nas áreas Cerrado e Canga, a avaliação de espécies indicadoras é importante, visto que Cerrado é considerado um hotspot de preservação (BRASIL, 2015), e Canga corresponde a afloramentos rochosos endêmicos do Brasil, com alta concentração de ferro, pouco conhecida, embora bastante ameaçada (ATAÍDE et al., 2011; SHUSTER et al., 2012; SKIRYCZ et al., 2014). Em vista disso, um desequilíbrio na comunidade microbiana pode indicar perturbações a estas áreas e auxiliar na preservação destes ambientes inestimáveis. Contudo não foi encontrada nenhuma espécie indicadora de Canga pelo método utilizado e, apenas *Penicillium* sp. 19 foi considerado espécie indicadora de Cerrado, mas apresentou valor de indicação baixo.

Nessa perspectiva, é extremamente importante a busca de métodos de avaliação da diversidade de microrganismos no solo e também de formas

de utilização desses dados como indicadores do estado da qualidade do solo (OLIVEIRA, 2004).

Há poucos trabalhos na literatura que visam o estudo exclusivo dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* no solo, e a maioria destes é sobre solos de grandes culturas. Devido ao exposto, a comparação através de índices de diversidade não é possível. Não obstante, isso mostra a importância de trabalhos como este, que avaliam a riqueza e composição da comunidade de dois, dos gêneros mais importantes de fungos filamentosos, em solos com características únicas, como a Canga. Estes estudos podem ser utilizados posteriormente como ferramentas para biologia da conservação e avaliação ambiental dessas áreas.

### 3.3 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) mostra que as duas componentes principais foram responsáveis por ao menos 79% da variação total para todas as áreas. Estes valores e os valores da primeira e da segunda componentes principais estão em destaque na Tabela 15.

**Tabela 15** – Variância dos Componentes Principais das áreas Mata, Cerrado, Canga, Capim e Eucalipto.

Área	Componente Principal	Autovalor	% da variância	% acumulada da variância
Mata	Componente 1	16.17	<b>55.77</b>	55.77
	Componente 2	8.09	<b>27.91</b>	<b>83.68</b>
Cerrado	Componente 1	17.97	<b>46.07</b>	46.07
	Componente 2	13.41	<b>34.38</b>	<b>80.45</b>
Canga	Componente 1	16.60	<b>47.42</b>	47.42
	Componente 2	11.29	<b>32.25</b>	<b>79.67</b>
Capim	Componente 1	17.20	<b>49.14</b>	49.14
	Componente 2	11.19	<b>31.99</b>	<b>81.13</b>
Eucalipto	Componente 1	21.06	<b>56.91</b>	56.91
	Componente 2	10.95	<b>29.59</b>	<b>86.51</b>

O resultado das PCA realizadas para cada área (Figura 80) demonstra que alguns fatores (atributos do solo) foram altamente associados à ocorrência e abundância das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* nos solos. Devido ao elevado número de dados gerados, apenas as interações mais fortes entre atributos e espécies foram avaliadas.

Na área Mata, a primeira componente, que explicou 56% da variação dos dados, segregou verticalmente em dois grupos distintos (esquerda e direita) as 17 espécies analisadas. No entanto, a segunda componente principal segregou fortemente e64, e63, e40, e36, e1 e e85, possivelmente dividindo as espécies em três grupos distintos (Figura 80).

Em Mata, a espécie *Penicillium* sp. 19 foi possivelmente influenciada por Al, ou seja, quanto maior a quantidade de Al (até certo ponto), maior será a abundância dessa espécie no solo. O contrário ocorreu para os atributos de vetores opostos a esta espécie, como potássio. A concentração de Al no solo de Mata, segundo a classificação dos teores de nutrientes (ALVAREZ et al., 1999) foi considerada alta (Apêndice C) e, *Penicillium* sp. 19 pode ser resistente a este metal. As espécies *Penicillium* sp. 39, *A. foetidus*, *Penicillium* sp. 41, *P. glabrum* e *P. citrinum* foram provavelmente muito influenciadas positivamente por Zn, P, Ca, Mn e Mg respectivamente, pois seus vetores, de mesmo sentido, estão quase sobrepostos no gráfico, já *Penicillium* sp. 17 foi influenciada negativamente por cobre.

O gráfico gerado para Cerrado, apresentou vetores de maiores ângulos, ocupando maior área (Figura 80). Isso demonstra que as espécies e os nutrientes do solo ficaram pouco agrupados. Ainda assim, as espécies *P. simplicissimum* e *Penicillium* sp. 27 foram influenciadas por S e Mn respectivamente e *P. brevicompactum* foi associada a K e Mg. *A. aculeatus* foi negativamente relacionado ao S e *A. niger* agregado ao Fe. Os outros atributos do solo influem, tanto positiva quanto negativamente, de forma menos pronunciada na abundância das espécies estudadas.

O gráfico de Canga mostrou que os vetores de nove espécies ficaram sobrepostos aos vetores dos nutrientes do solo, o que pode caracterizar forte interação (Figura 80). São estas: *Eupenicillium* sp. 02 (Mg), *P. janthinellum* (Mg), *P. spinulosum* (Zn), *Penicillium* sp. 16 (Ca), *A. niger* (P), *P. cosmopolitanum* e *Penicillium* sp. 21 (M.O.), *Penicillium* sp. 20 (Al) e *A. niger* agregado (Cu). As espécies *Penicillium* sp. 19 e *A. aculeatus* apresentaram interação negativa com Mg e *Penicillium* sp. 17 com K.

Em capim, a segunda componente que explicou 32% da variação dos dados, agrupou horizontalmente quase todos os vetores, formando um grande grupo (Figura 80). As espécies que apresentaram interação positiva com os atributos do solo foram: *P. chrysogenum* (Mn), *T. minioluteus* (S), *P. janczewskii* (P), *Talaromyces* sp. 01 (M.O.), *P. fellutanum* (Mg), *P. citreoningrum* (Cu), *Eupenicillium* sp. 01 (pH) e *P. janthinellum* (Al). As espécies que apresentaram interação negativa com os atributos do solo foram *Eupenicillium* sp. 02 e *P. raistrickii* ao Fe, Mn e K, *P. paxilli* ao Cu, *P. citrinum* ao S, *T. variabilis*, *Penicillium* sp. 04 e *T. minioluteus* ao P e *A. carbonarius* a Zn e Ca.

Eucalipto obteve o gráfico mais esparso, com menor influência entre as espécies e os atributos do solo. Os vetores de enxofre, cobre, ferro e fósforo apresentaram menor comprimento, indicando baixa correlação com as espécies e demais atributos (Figura 80). O atributo pH foi correlacionado as espécies *P. decumbens* e *P. corylophilum*, fósforo foi relacionado a espécie *Aspergillus* sp. 01, zinco a espécie *Penicillium* sp. 17 e manganês e potássio a espécie *P. glabrum*. Potássio foi inversamente correlacionado a *P. citrinum*, zinco a *T. funiculosus* e *Eupenicillium* sp. 02 e M.O a *A. carbonarius*.

Não foi verificada uma mesma interação entre espécie e atributo do solo entre as áreas avaliadas. Este fato demonstra que as comunidades microbianas no solo são verdadeiramente influenciadas localmente por diversos fatores bióticos e abióticos, sendo cada comunidade, com indivíduos da mesma espécie ou não, muito diferentes entre si.

A presença desses constituintes do solo em maior ou menores valores podem interferir na comunidade de *Aspergillus* e *Penicillium* no solo. No entanto, a presença e a abundância das espécies avaliadas também podem alterar (dentro de um nicho ecológico) a concentração de alguns elementos e no pH do solo. Afinal, os fungos são os grandes responsáveis pela decomposição do material biológico em matéria orgânica e minerais (PAUL, 2015).

Os fungos, utilizando seu aparato enzimático, atuam no processo de mineralização, convertendo compostos orgânicos a inorgânicos. Este processo controla a disponibilidade de nutrientes para as plantas e a ciclagem destes para o planeta (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006, PAUL, 2015). Segundo a literatura, *Penicillium* é o gênero de fungos filamentosos mais ordinariamente encontrado no solo, e *Aspergillus* é reconhecido como excelente produtor de diversas enzimas extracelulares. Dessa forma, ambos os gêneros são de grande importância, e de maneira evidente estão envolvidos na mineralização da matéria orgânica do solo (MOS) nos solos avaliados.

A decomposição e mineralização da MOS sofrem grande influência das intervenções feitas no solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) e, possivelmente por esse motivo, os gráficos gerados para cada área avaliada foram distintos. Além disso, o próprio processo de mineralização, que adiciona tipos e quantidades diferentes de nutrientes no solo, afeta a diversidade e a abundância de espécies nos nichos ecológicos (MADIGAN et al., 2010).

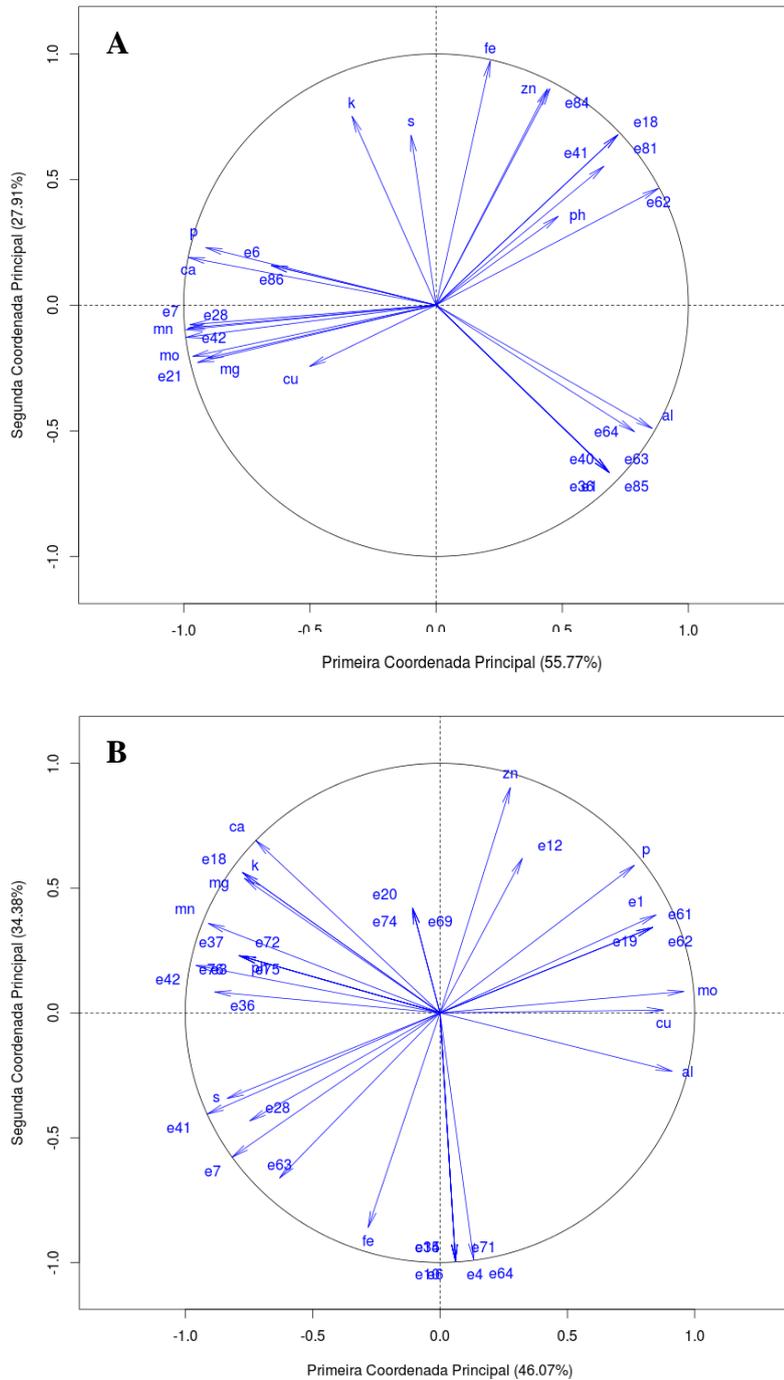
O fosforo é um dos nutrientes mais requeridos para a manutenção da vida e, em solos brasileiros, é um dos menos disponíveis. Apesar das concentrações de P estarem muito baixas em todas as áreas analisadas (Apêndice C), algumas espécies como *Aspergillus* sp. 01, *A. niger*, *A. foetidus* e *P. janczewskii* tiveram correlação positiva com esse nutriente e podem representar espécies solubilizadoras de fosfato, o que necessita ser

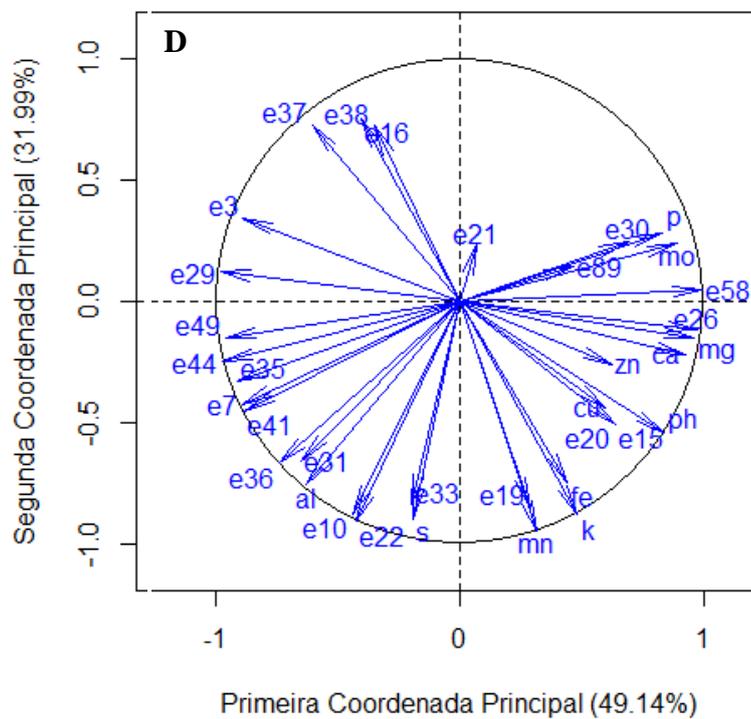
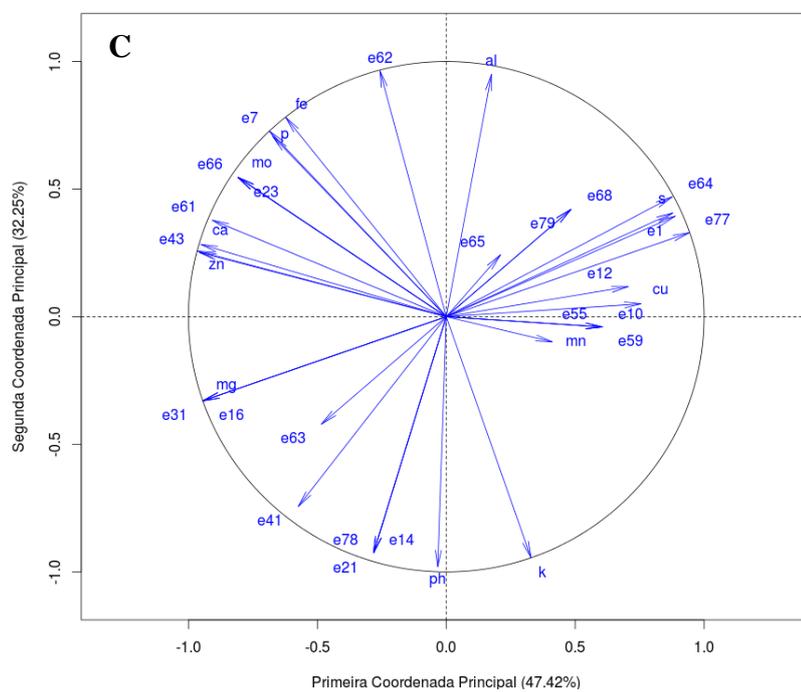
investigado, visto que essa característica dos fungos deve ser considerada em um cenário de esgotamento das reservas de fósforo (MENDES et al., 2013).

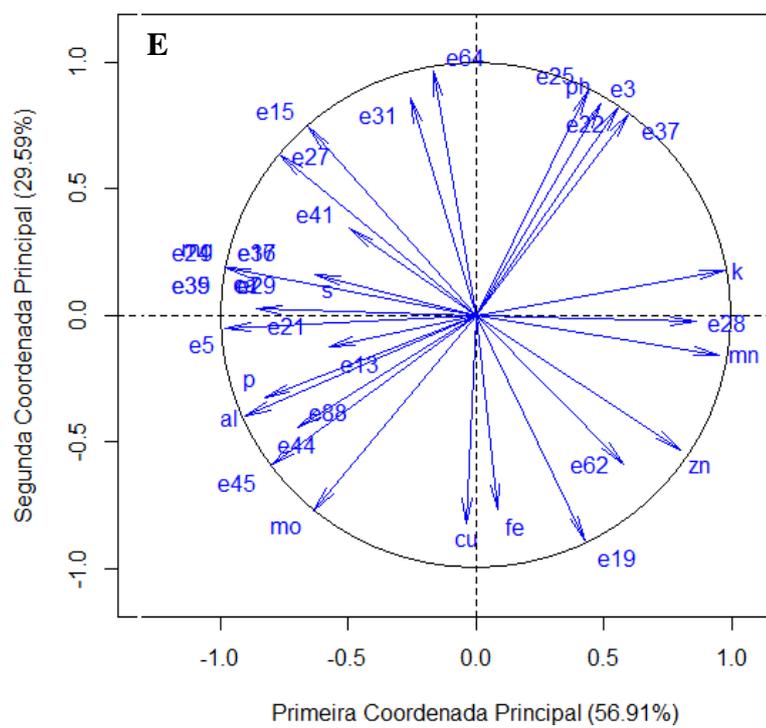
A concentração dos elementos manganês e enxofre em todas as áreas foi considerada alta; os valores de cobre foram elevados em Cerrado, Eucalipto e Mata; alumínio e ferro estavam em quantidades excessivas em Canga, Cerrado, Eucalipto e Mata, e zinco apresentou alta concentração em Mata (Apêndice C). Estes elementos em altas concentrações exercem ação inibitória nos microrganismos através do bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas e polinucleótidos, bloqueio de sistemas de transporte de nutrientes, deslocação e substituição de ions essenciais (BRUINS et al., 2000).

Nesse sentido, todas as espécies encontradas nas áreas com elevado acúmulo desses elementos possivelmente são resistentes aos mesmos, pois foram capazes de manter suas funções metabólicas na presença de altas concentrações desses elementos. Estas espécies podem ser utilizadas na biorremediação de locais contaminados com esses elementos, principalmente as espécies fortemente correlacionada a estes, como *Penicillium* sp. 17, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum* entre outras.

**Figura 80** – Diagramas das PCAs correlacionando atributos do solo a abundância de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* para: (A) Mata, (B) Cerrado, (C) Canga, (D) Capim e (E) Eucalipto.







As espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estão abreviadas como no apêndice E.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada riqueza e diversidade encontrada na area Capim indica que este solo possivelmente está recuperado dos anos de exploração de minério de ferro.

Os alta diversidade e riqueza observada de *Aspergillus* e *Penicillium* na área Eucalipto expõe a adaptação e dominância desses dois gêneros em solos, visto que espécies de *Eucaliptus* empobrecem o solo e produzem substâncias alelopáticas.

Várias espécies com pouco ou nenhum relato no Brasil, foram encontradas e passam a compor a Coleção de Cultura do Departamento de Ciências de Alimentos (CCDCA).

Nenhuma espécie foi indicadora das duas áreas de grande interesse ecológico, Canga e Cerrado.



## 5 CONCLUSÃO

As áreas Capim e Eucalipto apresentaram as maiores riquezas e abundância de isolados, quando comparadas a Cerrado, Canga e Mata. Além disso, o gênero *Penicillium* foi dominante em todas as áreas avaliadas.

Os solos estudados são bastante distintos entre si, o que refletiu na riqueza, composição e abundância das espécies.

As comunidades dos gêneros analisados são compostas por um número pequeno de espécies dominantes e número elevado de espécies raras.

Os resultados obtidos demonstram a grande diversidade de *Penicillium* e *Aspergillus* em solos com diferentes graus de ação antrópica, e representam uma contribuição relevante para o conhecimento da microbiota desse ecossistema.

Alguns constituintes dos solos avaliados foram altamente associados à ocorrência e abundância das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* nas diferentes áreas.

Possivelmente as espécies encontradas nesse trabalho são resistentes a Fe, Mn, Cu, Al e S e podem ser utilizadas na biorremediação de sítios contaminados por esses elementos, além de outras aplicações biotecnológicas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, V. H. et al. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Eds.). **Recomendações para o uso corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5º Aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. p. 25-32.

ATAÍDE, E. S.; CASTRO, P. T. A.; FERNANDES, G. W. Florística e caracterização de uma área de Campo Ferruginoso no Complexo Minerário Alegria, Serra de Antônio Pereira, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. **Revista Árvore**, v.35, n.6, p.1265-1275, 2011.

BARROS, R. S. M. **Medidas de diversidade biológica**. Juiz de Fora: Ed. UFJF, 2007. 13 p. Relatório de disciplina.

BEHERA, B. C. et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 97-110, 2014.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 198-207, 2000.

BUÉÉ, M. et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v. 184, p. 449-456, 2009.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER v5: user manual/tutorial**. Plymouth: Primer-E, 2001. 91 p.

COLWELL, R. K. et al. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages. **Journal of Plant Ecology**, v. 5, p. 3-21, 2012.

DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. **Ecological Monographs**, v. 67, n. 3, p. 345-366, 1997.

GOMES, A. S.; FERREIRA, S. P. **Análise de dados ecológicos**. Niterói: Ed. UFF, 2004. 30 p. Apostila.

GRAYSTON, S. J. et al. Selecting influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biol. Biochem.**, v. 30, p. 369-378, 1998.

HAMMER Ø; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4; p. 1-9, 2001.

HELLAWELL, J.M. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. In: Mellanby, K. (ed). **Pollution Monitoring Series**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 546 p.

HUISING, E. J. et al. Estratégia e modelo de amostragem para avaliar a biodiversidade do solo. In: Moreira, F. M. S.; Huising, E. J.; Bignell, D. E. (Eds.). **Manual de Biologia dos Solos Tropicais: Amostragem e Caracterização da Biodiversidade**. Lavras: Editora da UFLA; 2008. p. 43-78.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 6 set. 2015.

MACHADO, E. L. M. et al. Efeitos do substrato, bordas e proximidade espacial na estrutura da comunidade arbórea de um fragmento florestal em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 278-302, 2008.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12th ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MCCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **PC-ORD multivariate analysis of ecological data**. Gleneden Beach: MjM Software Design, 1999. 237 p.

MENDES, G. O. et al. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79:, p. 4906-4913, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

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

OLIVEIRA, V. C. **Atividade enzimática, população e análise de DNA da biodiversidade microbiana do solo em agroecossistemas do semi-árido**. 2004. 127 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2004.

PAUL, E.A. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 4th ed. Londres: Elsevier Academic Press, 2015. 59 p.

PFÜLLER, E. E. Dinâmica da população microbiana sob sistema de plantio direto e convencional, Fundacep, Cruz Alta, RS. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DE SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2000, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria, 2000.1 CD-ROM.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing, reference index**. Version 2.11.1. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing, 2010.

SANTOS, V. B.; WELLBAUM, C.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. Fungos filamentosos do solo da Ilha dos Eucaliptos na Represa do Guarapiranga em São Paulo, SP. **Acta. bot. bras.**, v. 12, n. 1, p. 101-110, 1998.

SHUSTER, D. L. et al. Cosmogenic  $^3\text{He}$  in hematite and goethite from Brazilian “canga” duricrust demonstrates the extreme stability of these surfaces. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 329-330, p. 41-50, 2012.

SKIRYCZ, A. et al. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-9, 2014.

STALEY, J.T. Biodiversity: are microbial species threatened? **Current opinion biotechnology**, v. 8, p. 340-345, 1997.

TEIXEIRA, A. F. S. **Densidade e diversidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em áreas do Quadrilátero ferrífero**. 2015. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

ZANZINI, A. C. S. **Descritores de riqueza e diversidade em espécies em estudos ambientais**. 2007. 40 p. Monografia (Especialização em Manejo de Florestas Nativas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ZARI, M. P. Ecosystem Services Analysis in Response to Biodiversity Loss Caused by the Built Environment. **S.A.P.I.E.N.S**, v. 7, p. 1-14, 2014.

ZHOU, J.Z. et al. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 326–334, 2002.

**Apêndice A**– Número de isolados de cada espécie obtidos em cada área Eucalipto, Capim, Canga, Cerrado, Mata e o total de isolados de cada espécie em todas as áreas.

<b>ESPÉCIE</b>	<b>EUCALIPTO</b>	<b>CAPIM</b>	<b>CANGA</b>	<b>CERRADO</b>	<b>MATA</b>	<b>TOTAL</b>
<i>A. aculeatus</i>	1	0	5	47	1	<b>54</b>
<i>A. candidus</i>	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>A. carbonarius</i>	2	5	0	1	0	<b>8</b>
<i>A. clavatus</i>	0	0	0	2	0	<b>2</b>
<i>A. flavus</i>	4	1	0	0	0	<b>5</b>
<i>A. foetidus</i>	0	0	0	2	1	<b>3</b>
<i>A. niger var. niger</i>	1	9	12	9	14	<b>45</b>
<i>A. niveus</i>	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>A. ochraceoroseus</i>	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>A. parasiticus</i>	0	17	6	1	0	<b>24</b>
<i>A. sulphureus</i>	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>A. tubingenses</i>	0	1	5	3	0	<b>9</b>
<i>Aspergillus sp. 01</i>	2	0	0	0	0	<b>2</b>
<i>Aspergillus sp. 02</i>	0	0	1	0	0	<b>1</b>

(Continua)

<i>Aspergillus</i> sp. 03	1	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>Eupenicillium</i> sp. 01	25	12	0	1	0	<b>38</b>
<i>Eupenicillium</i> sp. 02	0	32	2	0	0	<b>34</b>
<i>Eupenicillium</i> sp. 03	12	0	0	0	0	<b>12</b>
<i>P. brevicompactum</i>	1	1	0	4	4	<b>10</b>
<i>P. chrysogenum</i>	4	6	0	0	0	<b>10</b>
<i>P. citreonigrum</i>	1	4	0	0	0	<b>5</b>
<i>P. citrinum</i>	6	62	1	1	7	<b>78</b>
<i>P. corylophilum</i>	8	3	0	1	0	<b>12</b>
<i>P. cosmopolitanum</i>	0	0	1	0	0	<b>1</b>
<i>P. crustosum</i>	1	1	0	0	0	<b>2</b>
<i>P. decumbens</i>	10	0	0	0	0	<b>10</b>
<i>P. fellutanum</i>	0	2	0	0	0	<b>2</b>
<i>T. funiculoss</i>	3	0	0	0	0	<b>3</b>
<i>P. glabrum</i>	20	0	0	5	41	<b>66</b>
<i>P. janczewskii</i>	0	43	0	0	0	<b>43</b>
<i>P. janthineum</i>	37	27	2	0	0	<b>66</b>
<i>P. miczynskii</i>	0	4	0	0	0	<b>4</b>

							(Continua)
<i>P. multicolor</i>	0	0	0	1	0	<b>1</b>	
<i>T. mineoluteus</i>	4	6	0	0	0	<b>10</b>	
<i>P. oxalicum</i>	9	64	0	40	3	<b>116</b>	
<i>P. paxilli</i>	10	25	0	1	0	<b>36</b>	
<i>P. raistrickii</i>	0	11	0	0	0	<b>11</b>	
<i>T. purpurogenus</i>	2	0	0	0	0	<b>2</b>	
<i>P. sclerotiorum</i>	1	1	0	0	5	<b>9</b>	
<i>P. simplicissimum</i>	52	186	38	52	35	<b>363</b>	
<i>P. solitum</i>	0	0	0	11	11	<b>22</b>	
<i>P. spinulosum</i>	1	0	4	0	0	<b>5</b>	
<i>T. variabilis</i>	2	3	0	0	0	<b>5</b>	
<i>P. waksmanii</i>	44	3	0	0	0	<b>47</b>	
<i>Penicillium sp. 01</i>	1	0	0	0	0	<b>1</b>	
<i>Penicillium sp. 02</i>	0	1	0	0	0	<b>1</b>	
<i>Penicillium sp. 03</i>	1	0	0	0	0	<b>1</b>	
<i>Penicillium sp. 04</i>	0	18	0	0	0	<b>18</b>	
<i>Penicillium sp. 05</i>	0	1	0	0	0	<b>1</b>	
<i>Penicillium sp. 06</i>	1	1	0	0	0	<b>2</b>	

(Continua)

<i>Penicillium</i> sp. 07	1	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 08	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 09	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 10	0	0	1	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 11	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 12	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 13	1	9	0	0	0	<b>10</b>
<i>Penicillium</i> sp. 14	0	0	1	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 15	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 16	0	0	6	3	0	<b>9</b>
<i>Penicillium</i> sp. 17	93	0	95	11	131	<b>330</b>
<i>Penicillium</i> sp. 18	0	0	3	6	1	<b>10</b>
<i>Penicillium</i> sp. 19	49	0	77	129	92	<b>347</b>
<i>Penicillium</i> sp. 20	0	0	3	0	0	<b>3</b>
<i>Penicillium</i> sp. 21	0	0	4	0	0	<b>4</b>
<i>Penicillium</i> sp. 22	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<i>Penicillium</i> sp. 23	0	0	3	0	0	<b>3</b>
<i>Penicillium</i> sp. 24	0	0	0	6	0	<b>6</b>

(Continua)

<i>Penicillium</i> sp. 25	0	1	0	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 26	0	0	0	3	0	3
<i>Penicillium</i> sp. 27	0	0	0	1	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 28	1	0	0	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 29	0	0	0	1	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 30	0	0	0	1	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 31	0	0	0	1	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 32	0	0	2	0	0	2
<i>Penicillium</i> sp. 33	0	0	1	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 34	0	0	1	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 35	1	0	0	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 36	0	0	0	0	8	8
<i>Penicillium</i> sp. 37	1	0	0	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 38	1	0	0	0	0	1
<i>Penicillium</i> sp. 39	0	0	0	0	1	1
<i>Penicillium</i> sp. 40	0	0	0	0	1	1
<i>Penicillium</i> sp. 41	1	0	0	0	1	2
<i>Penicillium</i> sp. 42	1	0	0	0	0	1

						(Conclusão)
<i>Penicillium</i> sp. 43	2	0	0	0	0	2
<i>Talaromyces</i> sp. 01	0	17	0	0	0	17
<b>TOTAL</b>	<b>419</b>	<b>590</b>	<b>274</b>	<b>344</b>	<b>357</b>	<b>1984</b>

Número de isolados total na amostra e área.

**Apêndice B** – Dados analíticos dos componentes do solo das amostras de Mata, Cerrado, Canga, Eucalipto e Capim.

<b>AMOSTRA</b>	<b>pH</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>	<b>H + Al</b>	<b>M.O</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>B</b>	<b>S</b>
<b>MATA 6</b>	4,7	74,00	1,71	0,40	0,20	1,70	6,60	3,70	23,20	132,51	30,30	2,54	0,19	12,14
<b>MATA 7</b>	4,7	60,00	1,42	0,10	0,30	2,40	10,99	3,99	2,10	73,58	20,32	2,16	0,13	10,34
<b>MATA 8</b>	4,5	60,00	2,00	0,80	0,50	1,50	9,83	5,43	2,68	79,91	111,56	5,05	0,15	9,06
<b>MATA 9</b>	4,7	60,00	2,60	1,00	0,70	1,40	9,83	5,96	2,20	92,18	109,14	2,36	0,13	13,08
<b>CERRADO 1</b>	4,9	44,00	2,60	0,40	0,10	1,60	7,87	4,45	0,96	87,49	16,24	2,45	0,10	10,78
<b>CERRADO 2</b>	4,9	48,00	1,42	0,60	0,20	1,40	6,30	3,14	1,01	103,86	26,21	1,91	0,13	11,23
<b>CERRADO 3</b>	4,9	40,00	0,84	0,30	0,10	1,30	7,04	3,41	0,71	121,53	19,12	2,10	0,06	11,23
<b>CERRADO 4</b>	5,1	60,00	1,13	0,70	0,20	0,90	5,05	2,87	0,84	98,06	28,27	1,95	0,06	11,23
<b>CANGA 1</b>	5,2	62,00	1,42	0,80	0,20	0,60	9,81	7,34	1,82	76,95	14,61	0,37	0,19	10,78
<b>CANGA 2</b>	4,1	50,00	8,31	1,40	0,20	1,90	37,29	14,14	2,60	511,10	15,29	0,36	0,26	12,14
<b>CANGA 4</b>	4,3	54,00	2,91	0,60	0,10	2,30	23,91	10,28	1,46	257,43	11,81	0,61	0,24	16,61
<b>CANGA 6</b>	4,4	58,00	2,60	0,30	0,10	1,40	19,15	6,53	1,33	101,39	26,68	1,45	0,31	18,26

(Conclusão)

<b>AMOSTRA</b>	<b>pH</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>	<b>H + Al</b>	<b>M.O</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>B</b>	<b>S</b>
<b>EUCALIPTO 1</b>	4,7	36,00	2,30	0,10	0,10	2,60	12,28	5,26	0,99	216,07	19,13	3,61	0,10	17,15
<b>EUCALIPTO 2</b>	4,7	42,00	1,42	0,10	0,10	2,60	12,28	5,09	0,82	95,60	23,73	2,54	0,13	18,26
<b>EUCALIPTO 3</b>	4,8	44,00	1,42	0,10	0,10	1,80	6,60	4,76	0,77	80,43	20,75	2,26	0,13	15,05
<b>EUCALIPTO 4</b>	4,7	30,00	2,60	0,20	0,30	3,40	15,33	5,26	0,48	98,54	9,44	2,64	0,13	19,40
<b>CAPI M 1</b>	5,9	36,00	3,53	0,40	0,20	0,10	1,49	1,07	0,33	42,94	48,74	0,39	0,21	42,41
<b>CAPI M 2</b>	5,8	16,00	4,81	0,70	0,30	0,10	1,33	1,18	0,58	32,16	25,11	0,53	0,17	15,56
<b>CAPI M 3</b>	6,1	48,00	7,21	2,20	0,70	0,10	1,49	1,41	1,13	65,46	56,19	1,65	0,21	30,47
<b>CAPI M 4</b>	6,0	30,00	11,05	1,30	0,50	0,10	1,65	1,64	0,41	32,75	35,59	0,36	0,15	27,31

**Apêndice C** – Teores médios químicos e físicos nas áreas Capim (CA); Canga (CG); Cerrado (CE); Eucalipto (EU) e Mata (MT).

	<b>pH</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>	<b>H+ Al</b>	<b>SB</b>	<b>t</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>m</b>
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>-----mg dm<sup>-3</sup>-----</b>		<b>-----cmolc dm<sup>-3</sup>-----</b>							<b>-----%-----</b>	
<b>CA</b>	5,9 m	32,5 b	6,6 Mb	1,1 b	0,4 b	0,1 Mb	1,5 Mb	1,6 b	1,7 b	3,1 b	48,9 m	7,4 Mb
<b>CG</b>	4,5 b	56,0 m	3,8 Mb	0,8 b	0,1 Mb	1,5 A	22,5 MA	1,1 b	2,6 m	23,6 MB	5,2 Mb	57,8 A
<b>CE</b>	4,9 b	48,0 m	1,5 Mb	0,5 b	0,1 Mb	1,3 A	6,5 A	0,7 b	2,1 b	7,3 m	10,9 Mb	63,4 A
<b>EU</b>	4,7 b	39,5 b	1,7 Mb	0,1 Mb	0,1 Mb	2,6 MA	12,1 MA	0,3 Mb	2,9 m	12,5 B	2,9 Mb	87,5 MA
<b>MT</b>	4,6b	68,5 m	1,9 Mb	0,6 b	0,4 b	1,7 A	9,8 MA	1,2 b	2,9 m	11,0 B	10,5 Mb	60,7 A

	<b>M.O.</b>	<b>P rem</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>Argila</b>	<b>Silte</b>	<b>Areia</b>
	<b>g Kg<sup>-1</sup></b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>-----mg dm<sup>-3</sup>-----</b>					<b>-----dag Kg<sup>-1</sup>-----</b>			
<b>CA</b>	13,3 b	17,1	0,61 b	43,33 B	41,91 A	0,74 m	0,19 b	28,94MA	20,50	32,75	46,75
<b>CG</b>	95,7 MB	14,6	1,80 B	236,72 A	17,10 A	0,70 b	0,25 b	14,45A	20,50	17,50	62,00
<b>CE</b>	34,7 m	20,8	0,88 b	102,74 A	22,46 A	2,10 A	0,09 Mb	11,12A	27,50	36,75	35,75
<b>EU</b>	50,9 MB	12,6	0,77 b	122,66 A	18,26 A	2,76 A	0,12 Mb	17,46A	35,75	34,00	30,25
<b>MT</b>	47,7 B	17,8	8,56 A	94,55 A	67,83 A	3,3 A	0,15 b	11,15A	30,50	42,25	27,25

Classificação dos teores de nutrientes (Alvarez et al., 1999): A: Alto; MA: Muito Alto; B: Bom; MB: Muito Bom; m: Médio; b: Baixo; Mb: Muito Baixo.

**Apêndice D** – Correlação dos Componentes Principais para as áreas Mata, Cerrado, Canga, Capim e Eucalipto.

	Mata		Cerrado		Canga		Capim		Eucalipto		
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	
<b>e1</b>	0.69	0.67	<b>e1</b>	0.85	0.39	<b>e1</b>	0.89	0.39	<b>e1</b>	0.89	0.39
<b>e6</b>	-0.65	0.16	<b>e3</b>	-0.79	0.23	<b>e7</b>	-0.69	0.73	<b>e7</b>	-0.69	0.73
<b>e7</b>	-0.98	-0.08	<b>e4</b>	0.06	-0.99	<b>e10</b>	0.61	-0.04	<b>e10</b>	0.61	-0.04
<b>e18</b>	0.72	0.68	<b>e6</b>	0.06	-0.99	<b>e12</b>	0.71	0.12	<b>e12</b>	0.71	0.12
<b>e21</b>	-0.94	-0.23	<b>e7</b>	-0.82	-0.58	<b>e14</b>	-0.28	-0.93	<b>e14</b>	-0.28	-0.93
<b>e28</b>	-0.98	-0.09	<b>e10</b>	0.06	-0.99	<b>e16</b>	-0.94	-0.33	<b>e16</b>	-0.94	-0.33
<b>e36</b>	0.69	-0.67	<b>e12</b>	0.32	0.62	<b>e21</b>	-0.28	-0.93	<b>e21</b>	-0.28	-0.93
<b>e40</b>	0.69	-0.67	<b>e15</b>	0.06	-0.99	<b>e23</b>	-0.81	0.55	<b>e23</b>	-0.81	0.55
<b>e41</b>	0.66	0.55	<b>e18</b>	-0.78	0.56	<b>e31</b>	-0.94	-0.33	<b>e31</b>	-0.94	-0.33
<b>e42</b>	-0.99	-0.13	<b>e19</b>	0.84	0.34	<b>e41</b>	-0.57	-0.74	<b>e41</b>	-0.57	-0.74
<b>e62</b>	0.88	0.46	<b>e20</b>	-0.11	0.42	<b>e43</b>	-0.96	0.25	<b>e43</b>	-0.96	0.25
<b>e63</b>	0.69	-0.67	<b>e28</b>	-0.75	-0.43	<b>e55</b>	0.61	-0.04	<b>e55</b>	0.61	-0.04
<b>e64</b>	0.79	-0.50	<b>e34</b>	0.06	-0.99	<b>e59</b>	0.61	-0.04	<b>e59</b>	0.61	-0.04
<b>e81</b>	0.72	0.68	<b>e36</b>	-0.88	0.08	<b>e61</b>	-0.91	0.38	<b>e61</b>	-0.91	0.38

(Continua)

<b>e84</b>	0.45	0.86	<b>e37</b>	-0.79	0.23	<b>e62</b>	-0.26	0.96	<b>e62</b>	-0.26	0.96	<b>e62</b>	-0.26	0.96
<b>e85</b>	0.69	-0.67	<b>e41</b>	-0.91	-0.41	<b>e63</b>	-0.48	-0.42	<b>e63</b>	-0.48	-0.42	<b>e63</b>	-0.48	-0.42
<b>e86</b>	-0.65	0.16	<b>e42</b>	-0.96	-0.96	<b>e64</b>	0.88	0.47	<b>e64</b>	0.88	0.47	<b>e64</b>	0.88	0.47
<b>pH</b>	0.48	0.35	<b>e61</b>	0.84	0.84	<b>e65</b>	0.21	0.24	<b>e65</b>	0.21	0.24	<b>e65</b>	0.21	0.24
<b>k</b>	-0.33	0.75	<b>e62</b>	0.84	0.84	<b>e66</b>	-0.81	0.55	<b>e66</b>	-0.81	0.55	<b>e66</b>	-0.81	0.55
<b>P</b>	-0.91	0.23	<b>e63</b>	-0.63	-0.63	<b>e68</b>	0.48	0.42	<b>e68</b>	0.48	0.42	<b>e68</b>	0.48	0.42
<b>Ca</b>	-0.98	0.19	<b>e64</b>	0.13	0.13	<b>e77</b>	0.94	0.33	<b>e77</b>	0.94	0.33	<b>e77</b>	0.94	0.33
<b>Mg</b>	-0.91	-0.21	<b>e69</b>	-0.11	-0.11	<b>e78</b>	-0.28	-0.93	<b>e78</b>	-0.28	-0.93	<b>e78</b>	-0.28	-0.93
<b>Al</b>	0.86	-0.49	<b>e71</b>	0.06	0.06	<b>e79</b>	0.48	0.42	<b>e79</b>	0.48	0.42	<b>e79</b>	0.48	0.42
<b>M.O.</b>	-0.96	-0.20	<b>e72</b>	-0.79	-0.79	<b>pH</b>	-0.03	-0.98	<b>pH</b>	-0.03	-0.98	<b>pH</b>	-0.03	-0.98
<b>Zn</b>	0.44	0.86	<b>e74</b>	-0.11	-0.11	<b>k</b>	0.33	-0.94	<b>k</b>	0.33	-0.94	<b>k</b>	0.33	-0.94
<b>Fe</b>	0.21	0.97	<b>e75</b>	-0.79	-0.79	<b>P</b>	-0.67	0.71	<b>P</b>	-0.67	0.71	<b>P</b>	-0.67	0.71
<b>Mn</b>	-0.99	-0.10	<b>e76</b>	-0.79	-0.79	<b>Ca</b>	-0.95	0.28	<b>Ca</b>	-0.95	0.28	<b>Ca</b>	-0.95	0.28
<b>Cu</b>	-0.50	-0.24	<b>pH</b>	-0.79	-0.79	<b>Mg</b>	-0.94	-0.33	<b>Mg</b>	-0.94	-0.33	<b>Mg</b>	-0.94	-0.33
<b>S</b>	-0.10	0.68	<b>K</b>	-0.77	-0.77	<b>Al</b>	0.18	0.95	<b>Al</b>	0.18	0.95	<b>Al</b>	0.18	0.95
			<b>P</b>	0.76	0.76	<b>M.O.</b>	-0.81	0.55	<b>M.O.</b>	-0.81	0.55	<b>M.O.</b>	-0.81	0.55
			<b>Ca</b>	-0.72	-0.72	<b>Zn</b>	-0.96	0.26	<b>Zn</b>	-0.96	0.26	<b>Zn</b>	-0.96	0.26

(Conclusão)

	<b>Mg</b>	-0.78	-0.78	<b>Fe</b>	-0.62	0.78	<b>Fe</b>	-0.62	0.78	<b>Fe</b>	-0.62	0.78
	<b>Al</b>	0.91	-0.23	<b>Mn</b>	0.41	0.41	<b>Mn</b>	0.41	-0.10	<b>Mn</b>	0.41	-0.10
	<b>M.O.</b>	0.96	0.09	<b>Cu</b>	0.76	0.05	<b>Cu</b>	0.76	0.05	<b>Cu</b>	0.76	0.05
	<b>Zn</b>	0.28	0.90	<b>S</b>	0.88	-0.10	<b>S</b>	0.88	0.41	<b>S</b>	0.88	0.41
	<b>Fe</b>	-0.28	-0.86									
	<b>Mn</b>	-0.91	0.36									
	<b>Cu</b>	0.88	0.01									
	<b>S</b>	-0.84	-0.34									

C1 e C2 = Componente 1 e 2.

**Apêndice E** – Espécies avaliadas na Análise de Componentes Principais

<b>e1=</b> <i>A. aculeatus</i>	<b>e19=</b> <i>P. chrysogenum</i>	<b>e37=</b> <i>P. paxilli</i>	<b>e55=</b> <i>Penicillium</i> sp. 10	<b>e73=</b> <i>Penicillium</i> sp. 28
<b>e2=</b> <i>A. candidus</i>	<b>e20=</b> <i>P. citreonigrum</i>	<b>e38=</b> <i>P. raistrickii</i>	<b>e56=</b> <i>Penicillium</i> sp. 11	<b>e74=</b> <i>Penicillium</i> sp. 29
<b>e3=</b> <i>A. carbonarius</i>	<b>e21=</b> <i>P. citrinum</i>	<b>e39=</b> <i>T. purpurogenus</i>	<b>e57=</b> <i>Penicillium</i> sp. 12	<b>e75=</b> <i>Penicillium</i> sp. 30
<b>e4=</b> <i>A. clavatus</i>	<b>e22=</b> <i>P. corylophilum</i>	<b>e40=</b> <i>P. sclerotiorum</i>	<b>e58=</b> <i>Penicillium</i> sp. 13	<b>e76=</b> <i>Penicillium</i> sp. 31
<b>e5=</b> <i>A. flavus</i>	<b>e23=</b> <i>P. cosmopolitanum</i>	<b>e41=</b> <i>P. simplicissimum</i>	<b>e59=</b> <i>Penicillium</i> sp. 14	<b>e77=</b> <i>Penicillium</i> sp. 32
<b>e6=</b> <i>A. foetidus</i>	<b>e24=</b> <i>P. crustosum</i>	<b>e42=</b> <i>P. solitum</i>	<b>e60=</b> <i>Penicillium</i> sp. 15	<b>e78=</b> <i>Penicillium</i> sp. 33
<b>e7=</b> <i>A. niger</i>	<b>e25=</b> <i>P. decumbens</i>	<b>e43=</b> <i>P. spinulosum</i>	<b>e61=</b> <i>Penicillium</i> sp. 16	<b>e79=</b> <i>Penicillium</i> sp. 34
<b>e8=</b> <i>A. niveus</i>	<b>e26=</b> <i>P. fellutanum</i>	<b>e44=</b> <i>T. variabilis</i>	<b>e62=</b> <i>Penicillium</i> sp. 17	<b>e80=</b> <i>Penicillium</i> sp. 35
<b>e9=</b> <i>A. ochraceoroseus</i>	<b>e27=</b> <i>T. funiculosus</i>	<b>e45=</b> <i>P. waksmanii</i>	<b>e63=</b> <i>Penicillium</i> sp. 18	<b>e81=</b> <i>Penicillium</i> sp. 36
<b>e10=</b> <i>A. parasiticus</i>	<b>e28=</b> <i>P. glabrum</i>	<b>e46=</b> <i>Penicillium</i> sp. 01	<b>e64=</b> <i>Penicillium</i> sp. 19	<b>e82=</b> <i>Penicillium</i> sp. 37
<b>e11=</b> <i>A. sulphureus</i>	<b>e29=</b> <i>P. implicatum</i>	<b>e47=</b> <i>Penicillium</i> sp. 02	<b>e65=</b> <i>Penicillium</i> sp. 20	<b>e83=</b> <i>Penicillium</i> sp. 38
<b>e12=</b> <i>A. tubingenses</i>	<b>e30=</b> <i>P. janczewskii</i>	<b>e48=</b> <i>Penicillium</i> sp. 03	<b>e66=</b> <i>Penicillium</i> sp. 21	<b>e84=</b> <i>Penicillium</i> sp. 39
<b>e13=</b> <i>Aspergillus</i> sp. 01	<b>e31=</b> <i>P. janthineum</i>	<b>e49=</b> <i>Penicillium</i> sp. 04	<b>e67=</b> <i>Penicillium</i> sp. 22	<b>e85=</b> <i>Penicillium</i> sp. 40
<b>e14=</b> <i>Aspergillus</i> sp. 02	<b>e32=</b> <i>Aspergillus</i> sp. 03	<b>e50=</b> <i>Penicillium</i> sp. 05	<b>e68=</b> <i>Penicillium</i> sp. 23	<b>e86=</b> <i>Penicillium</i> sp. 41
<b>e15=</b> <i>Eupenicillium</i> sp. 01	<b>e33=</b> <i>P. miczynskii</i>	<b>e51=</b> <i>Penicillium</i> sp. 06	<b>e69=</b> <i>Penicillium</i> sp. 24	<b>e87=</b> <i>Penicillium</i> sp. 42
<b>e16=</b> <i>Eupenicillium</i> , sp. 02	<b>e34=</b> <i>P. multicolor</i>	<b>e52=</b> <i>Penicillium</i> sp. 07	<b>e70=</b> <i>Penicillium</i> sp. 25	<b>e88=</b> <i>Penicillium</i> sp. 43
<b>e17=</b> <i>Eupenicillium</i> sp. 03	<b>e35=</b> <i>T. mineoluteus</i>	<b>e53=</b> <i>Penicillium</i> sp. 08	<b>e71=</b> <i>Penicillium</i> sp. 26	<b>e89=</b> <i>Talaromyces</i> sp. 01
<b>e18=</b> <i>P. brevicompactum</i>	<b>e36=</b> <i>P. oxalicum</i>	<b>e54=</b> <i>Penicillium</i> sp. 09	<b>e72=</b> <i>Penicillium</i> sp. 27	