



MÔNICA CRISTINA PEREIRA MONTEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DOS GÊNEROS
ASPERGILLUS E *PENICILLIUM* EM SOLOS
PRESERVADOS DO CERRADO**

**LAVRAS – MG
2012**

MÔNICA CRISTINA PEREIRA MONTEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DOS GÊNEROS *ASPERGILLUS* E
PENICILLIUM EM SOLOS PRESERVADOS DO CERRADO**

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

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

**LAVRAS - MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Monteiro, Mônica Cristina Pereira.

Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*
em solos preservados do cerrado / Mônica Cristina Pereira Monteiro.
– Lavras : UFLA, 2012.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luis Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Alta pluviosidade. 2. Baixa pluviosidade. 3. Diversidade. 4.
Identificação morfológica. 5. Celulase. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 589.23044

MÔNICA CRISTINA PEREIRA MONTEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DOS GÊNEROS *ASPERGILLUS* E
PENICILLIUM EM SOLOS PRESERVADOS DO CERRADO**

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

APROVADA em 06 de julho de 2012

Dr. Romildo da Silva	IFSMG
Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dr. Marcelo Ângelo Cirillo	UFLA

Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS - MG
2012**

A minha mãe Ilva, pelo exemplo de vida,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Luís Roberto Batista, pela grande oportunidade, pelo respeito, pelo aprendizado e pela paciência. Muito Obrigada!

Ao Professor Ludwig H. Pfenning, pela disposição para me ajudar sempre, pela generosidade, por sempre me atender.

À Professora Rosane Freitas pela disponibilidade, oportunidade e confiança.

Ao Professor Marcelo Cirillo, pela disposição, pelo auxílio que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Roberta H. Picolli, pela cooperação, por sempre atender minhas necessidades.

Ao Professor Disney Ribeiro Dias, pela disponibilidade, pontualidade e generosidade.

A todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante as disciplinas.

A todos os membros da banca pela contribuição para este trabalho.

A minha mãe Ilva, as minhas irmãs Aline e Monaliza, por sempre acreditarem em mim.

A minha avó Guilhermina, por fazer meus dias felizes.

Ao Rodolfo pelo apoio, amizade, pela disponibilidade e atenção.

As minhas amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos - DCA, Fabiana, Michelle, Elisângela, Abiah, Taís, Gislaine, Erika, Caroline, Samanta, Luísa, Eloá, Rafaela, Thamara, Thaianne, Priscilla e Noelly, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

À Bibiane, por sempre me apoiar, pela atenção, confiança e pelos momentos compartilhados.

Agradecimento especial à Daiani Maria da Silva e Fabiana Reinis Franca Passamani, amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos - DCA, pela paciência e por me ensinarem todos os passos da identificação morfológica de fungos. Vocês foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigada!

Ao Lucas Magalhães, Marcelo Passamani, Teotônio, Leopoldo, Júlio Louzada e Patrícia Gomes Cardoso, pessoas generosas e atenciosas. Muito Obrigada!

Aos estagiários do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos - DCA, Wendel, Sávio, Diogo, Thaiana pelo auxílio.

Aos laboratoristas da Universidade, Edinho, Ivani, Tina, Cleuza e Eliane pela disposição e atenção.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia, Departamento de Ciência do Solo e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, que permitiram a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto.

À Capes, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos.

O mestrado era um sonho muito distante, mas, com muita persistência, consegui realizá-lo! Obrigada a todos vocês que me permitiram um dia sonhar e continuar sonhando!

AGRADECIMENTO À FAPEMIG

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo apoio ao programa Biota Minas, Edital 14/2009. Título da Proposta: “Diversidade microbiana associada a frutos e solo do cerrado brasileiro”. Linha temática 2: ampliação de inventários de espécies em áreas consideradas prioritárias. Sob a coordenação da professora e pesquisadora Dra. Rosane Freitas Schwan.

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa a
emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e de toda arte”.*

Albert Einstein

RESUMO

Este estudo foi realizado com objetivo de investigar a diversidade de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em solos do cerrado, assim como avaliar de forma qualitativa a produção da enzima celulase. As amostras de solo foram coletadas durante os períodos de alta e baixa pluviosidade, em regiões conservadas de cerrado pertencentes aos municípios de Arcos, Luminárias e Passos, no Estado de Minas Gerais. Para este estudo foram coletadas trinta amostras de solos dessas regiões. O isolamento de fungos filamentosos presentes nesses solos foi realizado através da técnica de diluição seriada. Foi realizado o isolamento em dois meios de cultura, DG18 e CMA e em seguida foram incubados a 25° C por um período de sete dias. Foram identificados no período de alta pluviosidade 86 isolados e no período de baixa pluviosidade 97 isolados, totalizando 183 isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As espécies mais abundantemente encontradas foram: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ostianus* e *Penicillium citrinum*. Em relação aos isolados da espécie *Aspergillus sulphureus*, estes apresentaram o maior índice enzimático para a produção da enzima celulase. Trabalhos realizados com fungos presentes em solos de ecossistemas naturais são importantes, uma vez que existem poucas informações sobre esses tipos de fungos no bioma cerrado e no Estado de Minas Gerais. Portanto, o estudo torna-se necessário principalmente com o propósito de contribuir para o conhecimento da diversidade microbiológica em regiões nativas pouco estudadas.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Cerrado. Diversidade. *Penicillium*.

ABSTRACT

This study was conducted with the objective to investigate the fungi diversity *Aspergillus* and *Penicillium* genus in cerrado soils and to evaluate qualitatively the cellulase enzyme production. Soil samples were collected during periods of high and low rainfall in conserved cerrado regions belonging to municipalities of Arcos, Luminárias and Passos in the Minas Gerais State. For this study were collected thirty soils samples of these regions. The filamentous fungi isolation present in these soils was performed by serial dilution technique. Isolation was performed in two culture media, DG18 and CMA and then were incubated at 25°C for a period of seven days. In the high rainfall period were identified 86 isolates and low rainfall 97 isolates, totaling 183 isolates belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera. The most abundant species found were: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ostianus* and *Penicillium citrinum*. In relation to the isolates of the species *Aspergillus sulphureus*, these presented the highest enzyme level for the production of the cellulase enzyme. Works done with fungi present in soils of natural ecosystems are important, since there are little information about these types of fungi in the cerrado biome and in the Minas Gerais State. Therefore, the study is needed primarily for the purpose to contribute to the knowledge of microbial diversity in native regions poorly studied.

Keywords: *Aspergillus*. Cerrado. Diversity. *Penicillium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Localização do bioma cerrado no Brasil	19
Figura 2 Morfologia do conidióforo de <i>Aspergillus</i>	28
Figura 3 Morfologia do conidióforo de <i>Penicillium</i>	31
Figura 4 Localização dos municípios de Arcos, Luminárias e Passos – MG	36
Figura 5 As amostras de solo coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do centro.....	37
Figura 6 Processo de coleta das amostras de solo, a) Cerca de 20cm de solo foi extraído com auxílio de um trado, b) Armazenamento do solo em sacos plásticos estéreis.	37
Figura 7 Figura (a e b); isolamento em meio de cultura DG18, onde pode ser observada a dominância do gênero <i>Penicillium</i>	44
Figura 8 Figura (a), espécie <i>Aspergillus japonicus</i> identificada com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas. <i>Aspergillus japonicus</i> em CYA a 25° C, (b) estruturas microscópicas em microscopia de luz, vesícula com 16 – 33 µm de diâmetro, (c) conídios apresentam 4-5µm de diâmetro, textura dos conídios espinhosos e com formato variando entre globoso a subgloboso.	45
Figura 9 Espécies de <i>Aspergillus</i> identificadas com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas	45
Figura 10 Isolados selecionados para posterior estudo taxonômico. Colônias crescidas em MEA a 25°C.	47
Figura 11 Mapa percentual para espécies de fungos percentual para espécies de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> em função das regiões e de diferentes períodos estacionários	54

Figura12 Mapa percentual para espécies de fungos do gênero <i>Penicillium</i> em função das regiões e de diferentes períodos estacionários.....	56
Figura13 Halo de degradação da celulose por isolados de <i>Aspergillus sulphureus</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização geográfica dos pontos de amostragem em três diferentes localidades de cerrado no estado de Minas Gerais - Brasil	38
Tabela 2. Isolados identificados em três regiões preservadas de cerrado no período de alta e baixa pluviosidade.....	51
Tabela 3. Síntese das estatísticas para variáveis classificadas como espécies de fungos para o gênero <i>Aspergillus</i>	54
Tabela 4. Síntese das estatísticas para as variáveis classificadas como regiões	55
Tabela 5. Síntese das estatísticas para variáveis classificadas como espécies de fungos para o gênero <i>Penicillium</i>	57
Tabela 6. Síntese das estatísticas para variáveis classificadas como regiões.....	57
Tabela 7. Cálculo do índice enzimático para cinco isolados de <i>Aspergillus sulphureus</i>	58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Mapa Percentual para espécies de fungos do gênero *Aspergillus* em função das regiões e de diferentes períodos estacionários..... 54
- Gráfico 2 Mapa Percentual para espécies de fungos do gênero *Penicillium* em função das regiões e de diferentes períodos estacionários..... 56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2	REVISÃO DE LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
2.1	Características gerais do bioma cerrado	Erro! Indicador não definido.
2.2	O solo como micro-habitat para fungos filamentosos	Erro! Indicador não definido.
2.3	Os gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Erro! Indicador não definido.
2.3.2	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> produtores de celulases	Erro! Indicador não definido.
2.4.	Importância deste estudo e contribuição para o conhecimento de fungos em solos do cerrado mineiro	Erro! Indicador não definido.
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.1	Localização das áreas estudadas..	Erro! Indicador não definido.
3.2	Amostragem.....	Erro! Indicador não definido.
3.3	Isolamento de fungos do solo	39
3.3.1	Purificação e preservação dos isolados	Erro! Indicador não definido.
3.4	Identificação de fungos filamentosos	39
3.4.1.2	Identificação de espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4.1.2.1	Identificação de espécies do gênero <i>Penicillium</i>	Erro! Indicador não definido.
3.5	Teste qualitativo da produção da enzima celulase	Erro! Indicador não definido.
3.6	Análises estatísticas	Erro! Indicador não definido.
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO ..	Erro! Indicador não definido.
4.1	Isolamento de fungos do solo	Erro! Indicador não definido.3
4.2	Identificação morfológica de isolados pertencentes aos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3	Análise de correspondência simples (CA)	Erro! Indicador não definido.
4.4	Teste qualitativo para a enzima celulase	Erro! Indicador não definido.

5 CONCLUSÃO.....Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAErro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a conservação da biodiversidade representa um dos maiores desafios, devido ao elevado nível de perturbações antrópicas dos ecossistemas naturais, e uma das principais consequências dessas perturbações é a fragmentação dos ecossistemas, o que reduz a quantidade de habitat.

O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, sendo superado em área apenas pela floresta amazônica, o bioma é um ambiente em mosaico, formado por diferentes fitofisionomias. A área coberta por cerrados no Brasil representava originalmente cerca de 23% do seu território, estendendo-se por vários Estados .

Em relação à diversidade, o cerrado é considerado um *hotspots* e apresenta um grande número de espécies endêmicas e atualmente é um dos biomas mundiais mais ameaçados.

As atividades antrópicas têm provocado uma série de alterações na paisagem terrestre, o avanço indiscriminado causado pela expansão da agricultura e agropecuária, tem ameaçado esse bioma.

Apesar de sua importância biológica, o cerrado tem sido o foco de poucos estudos sobre sua diversidade, principalmente relacionada aos microrganismos. A microbiota do solo é pouco conhecida, os microrganismos do solo são fundamentais para a manutenção dos ecossistemas terrestres.

Os fungos constituem uma parte importante da biomassa do solo, processos como agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, estabelecimento de relações simbióticas e controle de pragas e doenças são realizados com a participação efetiva dos fungos.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, são causadores de degradação de alimentos, biodeterioração e patogênicos ao homem e animais. Entretanto, esses microrganismos são muito interessantes, não só em termos de

aplicação biotecnológica, mas também para a economia devido às suas propriedades metabólicas.

Algumas espécies desses gêneros são utilizadas em biotecnologia, sendo fontes de diversas enzimas, produtores de diversos compostos interessantes, dentre esses compostos destacam-se a produção de compostos orgânicos, antibióticos e micotoxinas.

Este trabalho foi realizado com objetivo principal de isolar e identificar fungos em solos preservados de cerrado, através de métodos morfológicos em três diferentes localidades do cerrado, nos períodos de alta e baixa pluviosidade e selecionar fungos produtores de celulase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do bioma cerrado

O primeiro relato detalhado do cerrado brasileiro foi fornecido por Eugene Warming em 1892, onde as principais características da vegetação do cerrado mineiro foram descritas. Após publicações de obras importantes de Eiten (1972), Goodland (1971) e Ratter et al. (1973) o cerrado recebeu atenção internacional (OLIVEIRA; MARQUIS, 2002).

O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, sendo superado em área somente pela floresta amazônica, correspondendo uma área de 2.000.000 Km², representa cerca de 23% do território brasileiro. O bioma estende-se pelos Estados: Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Piauí, região Oeste da Bahia e em fragmentos nos Estados: Maranhão e Paraná; como pode ser observado na figura 1 (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997; SANO et al., 2010).

Em relação a sua vegetação, em geral o cerrado inclui fitofisionomias que podem variar desde florestas (Cerradão) apresentando árvores medindo entre 12 a 15 m de altura, possui plantas arbustivas (Cerrado *Sensu strictu*) com vegetação entre 2 a 8 m de altura, cobrindo cerca de 20 a 70% da área de superfície, possui também muitas plantas herbáceas e matas ciliares (KLINK; MACHADO, 2005; RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

A distribuição dos principais tipos de vegetação regional ou global geralmente é aceita que são determinados pelo clima. O cerrado é considerado uma das savanas mais úmidas do planeta, apresenta uma sazonalidade evidente entre estações chuvosas e secas, as temperaturas médias anuais são de 18°C a 28° C (BOND; PARR, 2010; DIAS, 1997; FERREIRA et al., 2003).

O clima dessa região é estacional, nos meses de outubro a março é

caracterizado por um período chuvoso, seguido por um período seco nos meses de abril a setembro, apresenta uma precipitação média anual de 1.500 mm (KLINK; MACHADO, 2005).



Figura 1 Localização do bioma cerrado no Brasil
Fonte: Sano et al., (2010).

A região do cerrado oferece uma oportunidade única para estudar os ecossistemas contrastantes em áreas relativamente pequenas. As regiões de savanas compreendem formações tropicais e subtropicais, caracterizados por árvores e arbustos de tamanhos variados, sendo que os principais padrões de crescimento estão relacionados com a alternância das estações (CASTRO et al., 2008; SILVA; FRANCO; GOMES, 2010).

Segundo Mittermeier et al. (2005) a vegetação do cerrado possui adaptações ao estresse causado pela baixa umidade e também ao fogo, queimadas são comuns no período seco, essa adaptação inclui árvores com cascas grossas (súber espesso), folhas resistentes à dessecação e alta capacidade de regeneração, sendo que a fitofisionomia diversificada do bioma está também relacionada com as características do solo.

Em relação ao solo, são bastante intemperizados, são geralmente ácidos e pobres em nutrientes, possui baixa disponibilidade de Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Boro (B), Cobre (Cu), Molibdênio (Mo) e Zinco (Zn) entretanto apresenta uma alta concentração de alumínio (Al), esses são fatores importantes, porque vão determinar a variação fisionômica que o cerrado apresenta (LOPES, 1996)

Segundo Myers et al. (2000) o cerrado apresenta a maior diversidade biológica entre as savanas mundiais, sendo considerado um *hotspots*. Os *hotspots* de biodiversidade são áreas que possuem um grande número de espécies, sendo estas espécies ameaçadas, raras ou endêmicas, devido a essas características, são consideradas áreas de alta prioridade para conservação.

Estima-se que existam cerca de 160.000 espécies de plantas, animais e fungos, muitos dos quais são endêmicos deste bioma. O cerrado desempenha importante papel ecológico, pois funciona como um corredor para as espécies habitantes da mata atlântica e da floresta amazônica (QUIRINO et al., 2009).

Apesar de a biodiversidade ser elevada, o bioma é explorado economicamente, o qual vem sofrendo perdas de grandes áreas, as áreas prioritárias para conservação não chegam a 3% do bioma, segundo dados do IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA) grande parte da sua vegetação original já foi desmatada em cerca de 48,37%, o direcionamento de políticas para selecionar áreas prioritárias para conservação para a criação de novas unidades de conservação são cada vez mais necessárias

(INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010; KLINK; MACHADO, 2005).

Estimativas apontam que, caso as tendências de ocupação, continuem causando grandes perdas de áreas nativas do cerrado, o bioma poderá ser totalmente extinto no ano de 2030 (MACHADO et al., 2004).

A preservação e conservação da biodiversidade representam um dos maiores desafios, no Brasil a agricultura cobre cerca de um terço da área de terra, a produção aumentou consideravelmente nas últimas décadas e espera-se expandir ainda mais, devido à crescente demanda por alimentos e produção de biocombustíveis. As consequências ambientais causadas pela expansão da agricultura apontam riscos para os ecossistemas, causando a perda da diversidade assim como dos recursos naturais (SPAROVEK et al., 2010).

A região do cerrado é conhecida pela sua rica diversidade, no entanto, essa diversidade de flora e fauna vem concorrendo com as atividades agrícolas, hoje o cerrado também é um lugar de plantações de culturas, grandes monoculturas estão cobrindo as regiões de cerrado, um exemplo é o que vem ocorrendo no Sul de Minas Gerais (GIANNETTI et al., 2011).

Apesar do solo do cerrado ser pobre em nutrientes, esse fator não foi um obstáculo para a ocupação de grandes extensões de terra para a agricultura, para torná-los produtivos para fins agrícolas é aplicado o uso de fertilizante e calcário no solo (KLINK; MACHADO, 2005).

Em relação à agricultura, a partir da década de 70, ocorreu uma rápida expansão em grande escala comercial, segundo dados do IBGE no ano de 2004 a produção de grãos na região correspondia cerca de 28% da produção total de grãos no Brasil (RONDON NETO et al., 2010).

As principais culturas valiosas para o país são: o cultivo do café e soja. O café está entre os *commodity* mais comercializados do mundo, atualmente existem grandes áreas de café cultivadas em regiões de cerrado. Em relação à

cultura de soja, áreas concentradas de cultivo de soja nos Estados Unidos, Argentina e Brasil, juntos correspondem a 188 milhões de toneladas, o que é mais de 80% de toda produção mundial de soja (BARKER, 2004).

Dados demonstram que a agricultura está aumentando cada vez mais e de forma rápida nas regiões do cerrado, causando preocupações com o equilíbrio do ecossistema. No entanto é preciso buscar o equilíbrio entre produção agrícola e a conservação dos recursos naturais brasileiros, optando pelo desenvolvimento de forma sustentável (GREEN et al., 2007).

Para tentar reverter essa situação, em 2009 o governo lançou um plano para combater o desmatamento no cerrado, o objetivo é frear o ritmo da devastação do bioma, esses planos incluíram monitoramento e controle, ordenamento territorial e apoio às atividades produtivas sustentáveis (BRASIL, 2009).

Portanto, iniciativas para a preservação precisam ser tomadas, além da mudança na forma como a biodiversidade é tratada no cerrado, espera-se também implementação de políticas para a conservação e o uso sustentável de seus recursos, bem como sua efetiva monitoração seja realizada (KLINK; MACHADO, 2005).

2.2 O solo como micro-habitat para fungos filamentosos

O solo pode ser definido como um sistema complexo, dinâmico e vivo. A complexidade do solo é determinada por numerosas e diversas interações entre os componentes físicos, químicos e biológicos do solo. O solo apresenta uma variedade de micro-habitats com gradientes físico-químicos diferentes e condições ambientais descontínuas (BUSCOT, 2005; TORSVIK; OVREAS, 2002; ZHANG; XU, 2008).

O solo também pode ser entendido como o resultado da combinação de

matéria orgânica e mineral inconsolidados que fornece habitats para uma ampla variedade de organismos no qual interagem (ADL, 2003). Os microrganismos adaptam-se a esses micro-habitats e formam consórcios, interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (TORSVIK; OVERAS, 2002).

Portanto, o solo representa um ambiente altamente heterogêneo para a microbiota que nele habita (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), sendo que a complexidade desse sistema é definida pelas diversas e numerosas interações entre os componentes físicos, químicos e biológicos que são modulados pelas condições ambientais do solo (BUSCOT, 2005).

Atualmente sabe-se que o tipo de solo também influencia a estrutura das comunidades microbianas, em função do tamanho de partículas, pH, capacidade de intercâmbio de íons e o conteúdo de matéria orgânica. Uma ampla faixa de fatores controla a estrutura e diversidade das comunidades microbianas no solo, como exemplo, raízes das plantas. As raízes das plantas liberam uma variedade de compostos no entorno, incluindo etileno, carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos e enzimas, os quais são fatores que vão controlar a estrutura e diversidade de organismos no solo (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Em relação à diversidade de microrganismos presentes em solos, segundo Moreira e Siqueira (2006) quando se fala em biodiversidade e extinção de espécies, a mídia sempre se refere às espécies vegetais e animais que vivem acima do solo. As comunidades de organismos micro e macroscópicos, as quais habitam o solo por não estarem visíveis aos olhos humanos raramente são mencionadas e por isso geralmente são negligenciadas.

O conhecimento da diversidade microbiana e a função desses microrganismos em solos ainda não estão completamente elucidados, devido às limitações metodológicas e taxonômicas, embora os métodos usados em diversidade estejam avançando tanto para grupos de bactérias quanto para

fungos, existem questões que ainda não estão claras, como a associação entre a diversidade e função desses microrganismos (KIRK et al., 2002).

Os microrganismos representam as formas de vida mais abundante e diversificada do planeta, sua diversidade funcional e estrutural possui certa relevância, pois os microrganismos estão envolvidos em mais de 80% das reações que ocorrem no solo. As comunidades microbianas desempenham um papel significativo para a manutenção e equilíbrio ecológico dos ecossistemas, uma vez que estão envolvidos em importantes processos do solo (KASANA, 2011; NANNIPIERI, 2003; ZELLER et al., 2001).

Portanto, a população microbiana do solo é essencial para a manutenção dos ecossistemas terrestres, pois é responsável por seu envolvimento na dinâmica da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes (BADIANE et al., 2001). Os microrganismos do solo possuem um papel na produtividade e qualidade do solo, a função dos fungos do solo é complexa e fundamental (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Particularmente, a diversidade, dinâmica e estruturas das comunidades fúngicas do solo ainda são pouco conhecidas, devido à grande dificuldade de cultivar esses microrganismos, principalmente micorrizas. Estima-se que aproximadamente 80 a 90% dos microrganismos presentes no solo não são cultivados por métodos clássicos (AMANN et al., 1995; VAN ELSAS et al., 2000).

Os fungos são organismos extremamente importantes para o funcionamento dos ecossistemas, embora estejam entre os organismos mais importantes do mundo, existem informações limitadas ou incompletas para a maioria das espécies (MUELLER et al., 2004; MUELLER; SCHMIT, 2007).

O número hipotético para fungos é cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos no planeta, porém apenas cerca de 70.000 espécies foram descritas, permanecendo 1.430.000 espécies ainda não descritas, os habitats inexplorados

podem ser uma fonte de muitas espécies desconhecidas, inclusive o solo (HAWKSWORTH, 1991).

Os processos de agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, estabelecimento de relações simbióticas e o controle de pragas e doenças são realizados com a participação efetiva dos fungos. Muitos fungos que habitam o solo são considerados sapróbios, decompondo a matéria orgânica e contribuindo para a ciclagem dos nutrientes, outros formam micorrizas com diversas espécies de plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; PFENNING; ABREU, 2006).

Os gêneros de fungos filamentosos mais comumente encontrados são representantes de *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Esses microrganismos possuem a capacidade de secretar enzimas no meio ambiente e essas enzimas auxiliam na degradação de produtos e compostos, fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são amplamente empregados em processos biotecnológicos, devido à produção de enzimas importantes (SCHUSTER et al., 2002).

Outro grupo de fungos do solo que se destacam são os que formam simbiose mutualística com as plantas denominadas micorriza arbuscular (MA). Esta simbiose é caracterizada pela formação de estrutura simbiótica nas raízes com colonização intracelular do córtex, formação de hifas enroladas e outras profusamente ramificadas (denominadas arbúsculos) e micélio extra-radicular que cresce solo adentro além da rizosfera (VOLESKY, 1995; LEYVAL, 1997).

Estes fungos formadores de micorriza arbuscular (FMAs) são cosmopolitas, com ocorrência abundante mesmo em áreas com elevado grau de degradação e são encontrados em quase todas as famílias de espécies herbáceas e arbóreas, especialmente aquelas de interesse para recuperação ambiental

(SIQUEIRA et al., 2007).

Portanto, os fungos são de extrema importância, porque fornecem uma base para estimar o papel funcional desses microrganismos em seus ecossistemas naturais, uma vez que pode-se explorar esses microrganismos economicamente (WANG; HYDE; SOYTONG, 2008).

2.3 Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

A família *Trichocomaceae* compreende uma família grande de fungos, é conhecida por apresentar impactos positivos e negativos sobre as atividades humanas. As espécies mais conhecidas nessa família pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011).

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli, em seguida os autores Tom e Church em 1926, publicaram a primeira monografia sobre o gênero, as espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas e passou a ser um dos grandes gêneros de fungos estudados. Uma descrição completa sobre o gênero foi realizada por Rapper e Fennel em 1965, onde foi reconhecido cerca de 132 espécies e 18 variedades (BENNETT, 2010; GEISER et al., 2007).

Atualmente o gênero *Aspergillus* compreende mais de 260 espécies, embora esse gênero tenha sido estudado desde 1729, a sistemática está em um estado de fluxo, além das características morfológicas e da utilização das técnicas moleculares, as espécies podem ser caracterizadas através de seus perfis de metabólitos secundários, coloração dos conídios, por sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água, através de seu crescimento no meio de cultura Creatine Sucrose Agar - CREA (SAMSON; VARGA, 2009).

Este gênero é considerado cosmopolita e amplamente distribuído na natureza, o isolamento de espécies em solos e em plantas caídas é muito comum,

o gênero possui uma abundância maior nas regiões de climas tropicais e subtropicais (KLICH, 2002; PITT; HOCKING, 1997)

Em relação à morfologia do gênero, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo então principal característica macroscópica utilizada para classificação, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco. Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem ser divididas em seções: *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii*. As espécies mais comumente estudadas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri*, são economicamente importantes, pois, algumas produzem micotoxinas (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

As espécies tipicamente produzem um conidióforo, asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo estende-se a partir da célula pé e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar à vesícula, na qual as células conidiogênicas métulas e fiálides são formadas. As vesículas podem ter várias formas características. Espécies que possuem o conídio diretamente ligado às fiálides; são denominadas de unisseriadas. Outras espécies apresentam estruturas especializadas que ficam entre a vesícula e as fiálides, designadas métulas, e a presença dessas estruturas caracteriza essas espécies como bisseriadas, como pode ser observado na Figura 2 (KLICH, 200; KOZAKIEWICZ, 1989; RAPER; FENNELL, 1965).

A taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri* tem sido estudada por muitos taxonomistas e constantemente revisada, tradicionalmente critérios morfológicos como cor, forma, tamanho e ornamentação dos conídios têm sido utilizados para classificar isolados, no entanto, as espécies podem variar significativamente nas características morfológicas e fisiológicas. Portanto, para uma identificação

inequívoca de um isolado às vezes é necessário utilizar técnicas moleculares e bioquímicas, o principal esforço taxonômico têm se concentrado em *Aspergillus niger* Agregado (PARENCOVA et al., 2001; SAMSON et al., 2004).

Em relação à importância econômica, *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, muitos isolados são utilizados na produção de diversos produtos, porém algumas espécies são responsáveis por diversas desordens em várias plantas, são considerados patógenos oportunistas, entre os patógenos comuns encontram-se as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (VARGA et al., 2004).

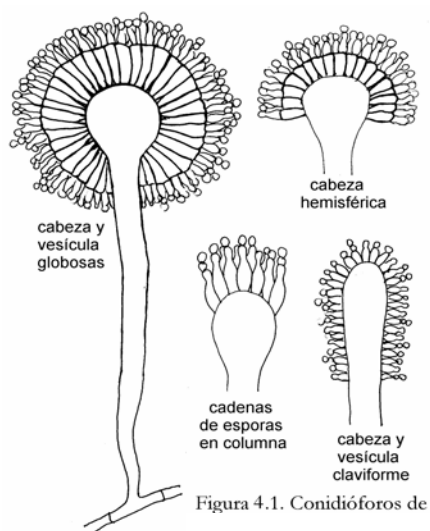


Figura 4.1. Conidióforos de

Figura 2 Morfologia do conidióforo de *Aspergillus*

Fonte: Kozakiewicz (1989).

Para Perrone et al. (2007) o gênero *Aspergillus* apresenta impactos positivos e negativos, e é responsável por diversas doenças em plantas e produtos vegetais. As espécies mais comuns são *A. niger*, *A. flavus*, *A.*

parasiticus, *A. ochraceus* e *A. alliaceus*. Esses microrganismos contaminam produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheita, processamento e manuseio e muitas espécies são produtoras de metabólitos secundários tóxicos.

Dentre os metabólitos secundários tóxicos encontra-se a ocratoxina (A), sendo uma das micotoxinas mais comum produzida naturalmente, essa toxina recebeu atenção devido aos seus efeitos tóxicos e por sua alta incidência em diversos produtos alimentícios e por ter apresentado efeitos nefrotóxicos, cancerígenos, imunotóxicos, teratogênicos e genotóxicos para todas as espécies de animais testadas (BAU et al., 2005).

Outra micotoxina amplamente estudada é a aflatoxina. Produzida por microrganismos pertencentes ao gênero *Aspergillus* da seção *flavi*, sendo que as espécies principais produtoras dessa micotoxina são as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Essa micotoxina apresenta efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (KLICH, 2000).

Estudos realizados para detectar fungos produtores de aflatoxinas em produtos alimentícios economicamente importantes como café, milho, leite, soja têm sido realizados (BARKICI, 2000; SOLIMAN et al., 2002). A contaminação por micotoxinas em vários produtos alimentares e agrícolas é um problema importante nos trópicos e subtropicais, onde as condições climáticas, práticas agrícolas e o armazenamento são favoráveis ao crescimento e produção de toxinas. As aflatoxinas, tricotecenos, ocratoxinas, zearalona, fumonisinas são micotoxinas de maiores impactos agroeconômicos (HUSSEIN; BRASEL, 2001; KUMAR et al., 2008; ZAIN, 2011).

O gênero *Penicillium* foi classificado como pertencente ao Filo *Ascomycota*, classe *Eurotomyces* a ordem *Eurotiales* e pertencentes à família *Trichocomanaceae*, com sua fase teleomófica pertencente aos gêneros *Eupenicillium* ou *Talalomyces*. Este gênero *Penicillium* é considerado

importante no que se refere à contaminação alimentar, são amplamente distribuídos no mundo todo, estão presentes em solos, no ar, vegetação em deterioração (PITT, 2002).

As espécies pertencentes a esse gênero têm sido utilizadas como modelo em estudos básicos, porém muitas pesquisas aplicadas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, micoparasitismo, utilização de seus metabólitos secundários para diversas indústrias, são fontes de enzimas de interesse industrial e novos fármacos para a indústria farmacêutica (PALLU, 2010).

Porém, algumas espécies desse gênero também são produtoras de micotoxinas. A importância desses compostos tóxicos varia muito, sendo regida pelos fatores ecológicos e biológicos para cada espécie. As espécies *Penicillium citrinigrum* e *Penicillium islandicum* produzem toxinas potentes, mas como ambas são raras na natureza, as toxinas produzidas por essas espécies não são consideradas importantes (PITT, 2002). Com base nas características culturais e morfológicas, principalmente os arranjos dos conidióforos e conídios, *Penicillium* foi dividido em quatro subgêneros *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* e *Furcatum* (DENG et al., 2012; PITT; HOCKING, 1997).

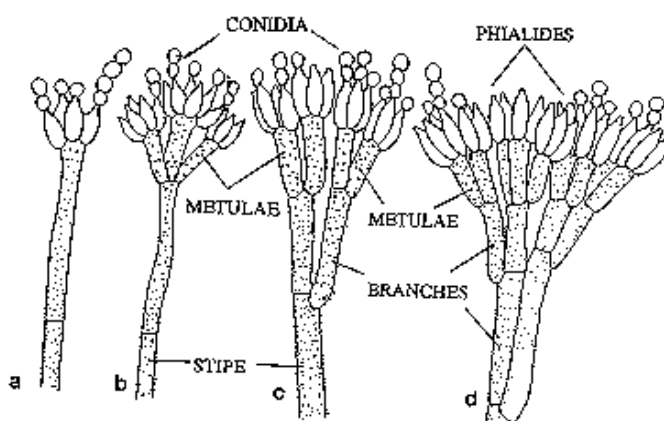


Figura 3 Morfologia do conidióforo de *Penicillium*.

Fonte: Kozakiewicz (1989).

Penicillium também é relatado como patógeno oportunista de plantas, espécies desse gênero encontram-se amplamente distribuídas, apresentam impactos negativos e positivos. Muitas espécies de *Penicillium* são reconhecidas por produzirem metabólitos tóxicos, as micotoxinas mais importantes encontradas em alimentos são ocratoxina A, pantulina, critinina e citreoviridina (PITT, 2002).

Em muitas regiões tropicais e subtropicais, o clima permite a produção agrícola durante o ano todo, porém, essas mesmas condições, alta umidade e ótimas temperaturas também são propícias ao desenvolvimento de fungos. A deterioração de grãos armazenados é um problema para a economia (RIBEIRO et al., 2003).

Doenças de pós-colheita podem causar grandes perdas em diversos produtos agrícolas, a produção de frutos cítricos geralmente é produzida em regiões subtropicais, muitas vezes distantes do mercado consumidor, sendo inevitável o seu armazenamento e conseqüentemente o desenvolvimento dos fungos (YAHYAZADEH et al., 2008).

Os fungos estão entre os principais fatores que podem afetar a comercialização de frutas cítricas, perdas econômicas na produção de citrus podem ser enormes. A indústria de citrus envolve uma grande quantidade de recursos financeiros no mundo todo, existem diversos fatores que podem modificar a produção de citrus, sendo a presença de fungos uma das mais relevantes. Em particular a presença de fungos como *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* (GÓMEZ-SANCHIS et al., 2012).

O fungo de coloração verde em citrus conhecido como *Penicillium*

digitatum é geralmente mais prevalente, sendo um dos grandes patógenos de frutas cítricas no mundo todo. Outro fungo de coloração azulada denominado *Penicillium italicum* é de importância relativamente menor, porém ambas as espécies causam uma das doenças mais destrutivas em citrus (LEE et al., 2011; YAHYAZADEH et al., 2008).

Numerosas espécies do gênero *Penicillium* apresentam um valor particular, as espécies mais conhecidas nesse aspecto são *Penicillium notatum*, produtor do antibiótico - penicilina. Na indústria de alimentos destacam-se *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, essas estão associadas na produção de determinados tipos de queijos (CHAVEZ et al., 2006).

2.3.1 *Aspergillus* e *Penicillium* produtores de celulases

Os fungos são microrganismos comercialmente importantes, os quais estão amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em substratos diversos desde solos a animais, atuam na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem dos nutrientes (GRIMM et al., 2005; WHITE et al., 2002).

Nos últimos anos as enzimas tornaram-se uma ferramenta para obtenção de diversos produtos industriais. Enzimas como celulases, pectinases e hemicelulases têm uma ampla aplicação em vários processos biotecnológicos (BAHT, 2000). Os fungos filamentosos estão entre os principais microrganismos utilizados, são particularmente interessantes, devido a facilidades de cultivo e por serem bons produtores de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006).

As enzimas celulolíticas produzidas por fungo são enzimas amplamente empregadas incluindo o seu uso em vários processos na indústria de alimentos, na indústria têxtil, produção de bebidas, detergentes e papel (BAHT, 2000).

A celulose é um polissacarídeo abundante, para uma hidrólise eficiente da celulose requer uma ação coordenada de um complexo de enzimas. A classificação das celulasas, é de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, se divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG, EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica, exoglucanases (ExG, EC 3.2.1.74), que atuam na região externa da celulose e β -glicosidases (BG, EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010; PICART et al., 2007) .

Dentre as espécies mais conhecidas do gênero *Aspergillus* encontram-se *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ustus* *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus niger* , para o gênero *Penicillium*, *Penicillium brasilianum* , *Penicillium echinulatum*. *Penicillium pinophilum*, (BHAT, 2000; CAMASSOLA; DILLON, 2007; JORGENSEN et al., 2003; KROGH et al., 2004; PRADO, 2002).

O conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção microbiana tornara-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização desses organismos na busca de soluções nas áreas de saúde, alimentos, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada. A extraordinária atividade desses microrganismos está notavelmente baseada na diversidade metabólica e capacidade genética (BURKE, 2011).

2.4 Contribuição para o conhecimento das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em solos de regiões preservadas de cerrado

Em relação à diversidade de fungos do solo, existem poucas informações sobre a influência das comunidades fúngicas em solos do bioma cerrado, particularmente no Estado de Minas Gerais. A existência de poucas informações sobre o conhecimento da diversidade no cerrado mineiro culminou

no desenvolvimento de um projeto multidisciplinar realizado pela Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SECTES) juntamente com a Fundação Biodiversitas, esse projeto foi responsável pela elaboração de um diagnóstico sobre o estado atual do conhecimento da biodiversidade no Estado de Minas Gerais - subsídio ao Projeto Biota Minas, no qual este estudo se insere.

Este estudo, juntamente com o Projeto Biota Minas, fornece informações sobre a microbiota do solo do cerrado mineiro. A implementação do Biota Minas como meta para ampliar e difundir o conhecimento sobre a biodiversidade permitirá ao Estado aperfeiçoar as bases dos planejamentos e das políticas de proteção e utilização racional de seus recursos biológicos (DRUMOND et al., 2008).

Os fungos relatados neste estudo são comuns em solos, espécies identificadas neste trabalho contribuem para os ciclos biogeoquímicos em ecossistemas naturais e cultivados (WAKELIN et al., 2004). No entanto, nenhum inventário completo de fungos do solo foi produzido para uma única região geográfica.

Portanto, o estudo de fungos do solo em cerrados de regiões preservadas de cerrado torna-se necessário e de grande importância, principalmente com o propósito de contribuir para o conhecimento da diversidade de fungos em regiões pouco estudadas. Estudos envolvendo taxonomia, ecologia e bioprospecção de fungos provenientes do cerrado mineiro deverão ser realizados, uma vez que os ecossistemas nativos são conhecidos por possuir uma ampla diversidade biológica, e podem ser fontes de produtos biotecnologicamente importantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização das áreas estudadas

As áreas de estudo, estão localizadas no Estado de Minas Gerais, os municípios estudados foram Arcos, Luminárias e Passos, os quais possuem regiões conservadas de cerrado. A região de Arcos está localizada na zona do alto São Francisco, região Centro-Oeste do Estado de Minas Gerais, nas seguintes coordenadas geográficas (20°17'29" S e 45°32'23" W), a região de

Luminárias encontra-se na região Sul de Minas nas coordenadas (21°31'26"S e 44°54'11"W) e a região de Passos encontra-se também localizada na região Sul do Estado sendo as coordenadas (20°43'08"S e 46°36'35" W).

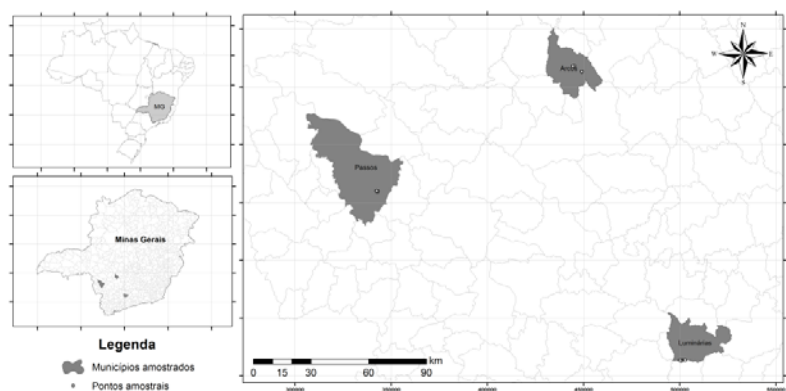


Figura 4 Localização dos municípios de Arcos, Luminárias e Passos – MG.

3.2 Amostragem

O estudo foi realizado a partir de duas coletas no período úmido e seco nas três localidades do Estado de Minas Gerais, foram coletadas trinta amostras de solo. Foram coletadas 5 amostras compostas por área de estudo. Para o processamento das amostras foi utilizado um total de 300 g de solo coletado nessas regiões. Para cada ponto de amostragem, 12 subamostras foram coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do centro como pode ser observado na figura 5.

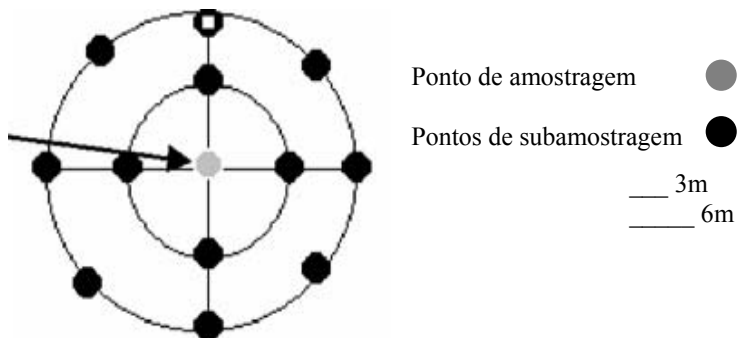


Figura 5 As amostras de solos coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do centro.

As amostras de solo foram extraídas com o auxílio de um trado previamente lavado com álcool e flambado, cerca de 20 cm de profundidade de solo foram extraídas e em seguida foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o Laboratório de Microbiologia dos Solos (DCS) da Universidade Federal de Lavras – UFLA, como pode ser observado na Figura 6.



Figura 6 Processo de coleta das amostras de solo, a) Cerca de 20cm de solo foi extraído com auxílio de um trado, b) Armazenamento do solo em sacos plásticos estéreis.

As amostras foram armazenadas em câmara fria com temperatura de 4°

C até o processamento das amostras. A localização geográfica dos pontos de amostragem foi realizada através de dados obtidos a partir de GPS, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 Localização geográfica dos pontos de amostragem em três regiões diferentes.

Região	Amostragem	Localização
Arcos	Ponto 1	21°37'51,0"S; 044°58'22,7"W
	Ponto 2	21°37'50,6"S; 044°58'22,7"W
	Ponto 3	21°37'51,5"S; 044°59'11,0"W
	Ponto 4	21°37'55,3"S; 044°59'29,3"W
	Ponto 5	21°37'54,6"S; 044°59'54,0"W
Luminárias	Ponto 1	20°16'27,7"S; 045°29'14,6"W
	Ponto 2	20°14'47,9"S; 045°25'35,9"W
	Ponto 3	20°14'51"S; 045°31'40,8"W
	Ponto 4	20°14'48,6"S; 045°31'33,4"W
	Ponto 5	20°14'58,0"S; 045°31'54,0"W
Passos	Ponto 1	20°49'57,7"S; 046°30'29,3"W
	Ponto 2	20°49'56,8"S; 046°30'30,1"W
	Ponto 3	20°49'48,0"S; 046°30'54,9"W
	Ponto 4	20°49'47,1"S; 046°30'54,5"W
	Ponto 5	20°49'47,8"S; 046°30'51,5"W

3.3 Isolamento

Para o isolamento de fungos presentes nas amostras de solos, pesou-se 10,0 g de solo coletado, o solo foi adicionado em 90,0 mL de água peptonada (1,0 %) esterilizada. Cada amostra foi homogeneizada em *shaker* com 120 de rpm, por um período de 30 minutos. Foi realizada a técnica de diluição em série em dois meios de cultivo diferentes. Diluições sucessivas até 10^{-3} foram realizadas e em seguida uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada nos meios de cultivo, DG18 (Dicloram 1,0 mL; Peptona bacteriológica, 5,0; KH_2PO_4 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; Glicerol, 220 g; Cloranfenicol 1 mg; Ágar, 15,0 g; água Destilada, 1000 mL) e CMA (Filtrado de fubá de milho cozido 30,0g; Ágar, 15,0 g e água Destilada 1000 mL, nesse meio foi acrescentado o antibiótico cloranfenicol 50 mg.) e em seguida espalhada com uma alça de *drigalski*. As

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

3.3.1 Purificação e preservação dos isolados

Após a obtenção de colônias puras em meio de cultivo *Extract Malt Agar* (MA 2%), os isolados foram preservados em microtubos contendo papel filtro, e foram depositados na coleção de fungos do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos – UFLA.

3.4 Identificação de fungos filamentosos

Colônias que apresentaram características morfológicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram inoculadas em meios de cultivo e temperaturas padronizadas de acordo com manuais de identificação (KLICH, 2002; PITT, 2000).

3.4.1.2 Identificação de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*

Isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram inoculados nos seguintes meios de cultivo: CYA, a 25°C e 37 °C e MEA a 25°C, com a seguinte formulação CYA (K₂HPO₄ 1,0g; Concentrado de Czapek 10,0 mL; Solução metálica 1mL; Extrato de Levedura 5,0g; Agar 15,0g; Sacarose 30,0 g e água destilada 1000 mL), *Extract Malt Agar* (MEA, Extrato de Malte 20,0g; Peptona Bacteriológica 1,0g; Glicose 20,0g; Agar 20 e água destilada 1000 mL) e em seguida foram incubados por um período de sete dias a 25°C.

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 conforme Klich (2002).

Após o preparo de lâminas utilizando o corante azul de metileno foram observadas as características microscópicas a partir do meio de cultura CYA 25°C, como tipo de ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura das metálas e fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídios, forma e cor do cleistotécio/escleródios. Os isolados de *Aspergillus* foram identificados conforme o manual de identificação de *Aspergillus* descrito por Klich (2002).

3. 4.1.2.1 Identificação de espécies do gênero *Penicillium*

Os isolados pertencentes ao gênero *Penicillium* foram inoculados em meio de cultivo padronizados conforme mencionados na literatura, CYA a 25°C e 37 °C, MEA a 25° C e CREA a 25° C. Os meios de cultivo descritos continham a seguinte formulação, CYA (K₂HPO₄ 1,0g; Concentrado de Czapek 10,0 mL, Solução metálica 1 mL , Extrato de Levedura 5,0g; Agar 15,0g; Sacarose 30,0 g , e água destilada 1000 mL), o meio de cultivo *Extract Malt Agar* (MEA , Extrato de Malte 20,0g; Peptona Bacteriológica 1,0g; Glicose 20,0g; Ágar 20 e água destilada 1000 mL) e Creatine Sucrose Agar (CREA, Creatine, 3,0 g; Sacarose, 30g; HCl, 0,5 g; MgSO₄, 0,5 g, K₂HPO₄ 3H₂O, 0,5g; FeSO₄ 7 H₂O 0,01g; e Água destilada 1000 mL).

Após a inoculação nos meios de identificação, estes foram armazenados conforme recomendado na literatura. Lâminas foram confeccionadas a partir de colônias puras em meio de cultivo MEA a 25°C e posteriormente as caracterizações macroscópicas e microscópicas foram avaliadas.

Para a identificação das espécies de *Penicillium* 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 características microscópicas, como tipo de ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura das metálas e fiálides, diâmetro, forma e textura dos conídios. As espécies de *Penicillium* foram identificadas com base em publicações de Pitt (2000), sendo essas identificações amparadas por Pitt e Hocking (1997).

3.5 Teste qualitativo para produção da enzima celulase

Para determinar a atividade qualitativa de celulase, 135 isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram inoculados em meio de cultura Ágar Carboximetilcelulose. O respectivo meio apresenta a seguinte composição: Ágar (1,8 %), Carboximetilcelulose (1,0 %), Tampão Acetato de Na⁺ 0.1 M. pH 5.0 (500 mL).

A carboximetilcelulase foi dissolvida em 200 mL de tampão acetato de Na; 0.1 M com pH5 em agitador magnético e posteriormente foi adicionado 300 mL do respectivo tampão e Ágar. Os isolados foram incubados a 25°C por um período de setes dias.

Após o período de incubação, foi avaliada a produção qualitativa para a enzima celulase, utilizando uma solução reveladora. A revelação foi realizada adicionando-se solução aquosa de iodo (KI 0,67%, iodo 0,33% m/v) na superfície, deixando-a em contato por 3 a 5 minutos como proposto por Kasana et al. (2008) .

O cálculo do índice enzimático (IE) foi realizado mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia como proposto por Hankin e Anagnostakis (1975).

Onde;

$$IE = \text{Diâmetro do Halo} / \text{Diâmetro da Colônia}$$

3.6 Análises estatísticas

Convém ressaltar que a aplicação da análise de variância e testes de comparação de médias não foi utilizado, uma vez que, para o uso destas técnicas tem como suposição de que as amostras sejam independentes e normalmente distribuídas. O problema é que estas suposições não se aplicam nos dados de incidência e identificação dos isolados, por serem de contagens e muitos dispersos em relação às regiões avaliadas. Assim sendo, os dados foram organizados em tabelas de contingência, tornando-se possível aplicar a técnica de análise de correspondência simples (GREENAKE & BLASIUS, 2006), possibilitando a construção dos mapas perceptuais com a interpretação dos resultados dados pela distribuição gráfica das variáveis analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de fungos do solo

As amostras de solos foram coletadas em duas épocas, alta pluviosidade no mês de janeiro de 2010 e baixa pluviosidade no mês de Agosto de 2010. Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* provenientes de solos das regiões de Arcos (MG), Luminárias (MG) e Passos (MG) foram isolados. Foram realizadas contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) em meio de cultura DG18 e CMA. Para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) levou-se em conta fungos que cresceram nas diluições entre 10^{-1} a 10^{-3} em triplicata, foram consideradas placas que continham colônias entre 15 a 150 Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Tabelas com as respectivas contagens

das unidades formadoras de colônias encontram-se em anexo.

Em um total de trinta amostras de solos analisadas foram obtidos 813 isolados. Foram encontrados isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em ambos os meios de cultivo, a técnica de diluição em série foi realizada. O método de diluição em série é comumente utilizado para o isolamento e para estimativas quantitativas de fungos. Neste trabalho essa técnica demonstrou-se efetiva no isolamento desses fungos presentes nas amostras de solos.

Foi constatado que isolados do gênero *Aspergillus* foram encontrados em todas as amostras, no entanto, fungos do gênero *Penicillium* foram encontrados de forma dominante em todos os pontos amostrados, colônias desse gênero apresentaram crescimento rápido e esporulação abundante no meio de cultivo DG18 conforme a figura 7.

Penicillium possui uma distribuição cosmopolita no solo e em vegetais em decomposição, sendo que seus conídios são dispersos facilmente pelo ar (PITT, 2000). O gênero constitui-se também como um importante produtor de metabólitos secundários, a vantagem mais provável de um organismo produtor de metabólitos secundários, é que eles podem permitir a sobrevivência do organismo em seu nicho ecológico, muitos desses organismos vivem saprofiticamente no solo, onde estão expostos a um ambiente hostil e uma gama diversificada de organismos competidores (FOX; HOWLETT, 2008).

A produção desses metabólitos por *Penicillium* podem conferir uma predominância do gênero, devido à capacidade antagônica frente a outras espécies (GOMEZ et al., 2007). A diversidade e dominância da população de fungos em solos dependem da ocorrência de habitats específicos para determinadas espécies e para que ocorra uma alta diversidade de fungos (CHRISTESEN; FRISVAD; TUTHILL, 2000).

Essas observações corroboram com resultados obtidos neste estudo, onde foi verificada a predominância do gênero *Penicillium*, resultados semelhantes foram obtidos por Auer et al. (2006) e Markovina et al. (2005). Outro fator que pode justificar a alta incidência de *Penicillium* neste estudo pode estar relacionada com a técnica de isolamento e o meio de cultura utilizado.

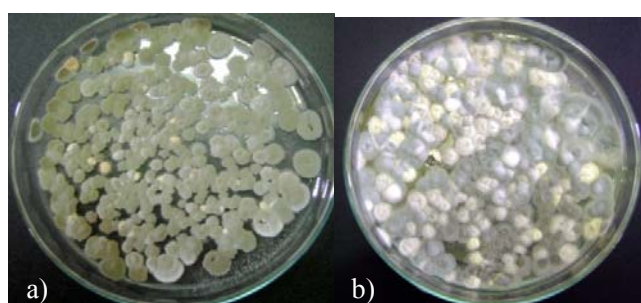


Figura 7 Figura (a e b); isolamento em meio de cultura DG18, onde pode ser observada a dominância do gênero *Penicillium*.

4.2 Identificação morfológica de isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Analisando as características morfológicas dos fungos foram identificados 183 isolados, pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Sendo identificados no período de alta pluviosidade 86 isolados e no período de baixa pluviosidade 97 isolados. O gênero dominante de acordo com o número de espécies encontradas foi o gênero *Penicillium*, com dezoito espécies identificadas, este foi encontrado em todas as amostras analisadas, isolados do gênero *Aspergillus* também foram constatados em todas as amostras, porém em menor abundância com apenas oito espécies identificadas. Para a identificação dos isolados foram analisadas as características morfológicas como pode ser

observado na Figura 8.

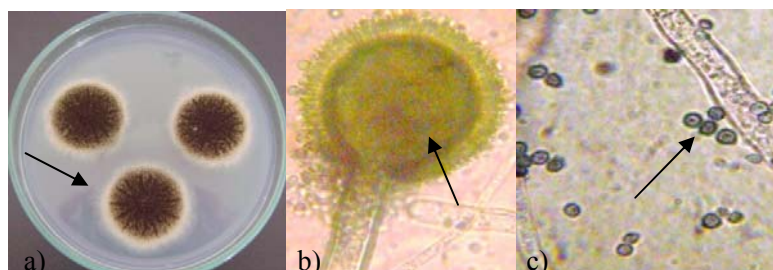


Figura 8 Figura (a), espécie *Aspergillus japonicus* identificada com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas. *Aspergillus japonicus* em CYA a 25° C, (b) estruturas microscópicas em microscopia de luz, vesícula com 16 – 33 μm de diâmetro, (c) conídios apresentam 4-5 μm de diâmetro, textura dos conídios espinhosos e com formato variando entre globoso a subgloboso.

Para a identificação morfológica de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* a coloração das colônias pode representar um fator importante, pois permite a diferenciação das diversas seções pertencentes ao gênero, facilitando posteriormente a identificação dos isolados até espécies. As espécies de *Aspergillus* identificadas neste estudo foram pertencentes às Seções *Flavi*, *Circundatii* e *Nigri* como podem ser observadas na figura 9.

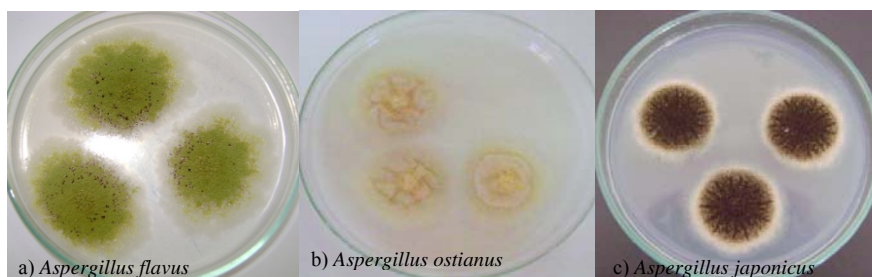


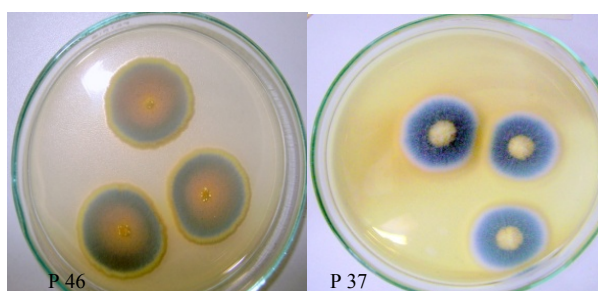
Figura 9 Espécies de *Aspergillus* identificadas com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas, é possível observar as respectivas Seções *Flavi*, *Circundatii* e *Nigri*.

Para alguns isolados encontrados neste estudo não foi possível realizar a identificação somente com base nas características morfológicas, utilizando os manuais de identificação para *Penicillium* descritos por Pitt (2000) e Pitt e Hocking (1997), sendo necessárias outras técnicas complementares para a identificação e confirmação das espécies, as características morfológicas dos isolados.

Foram encontrados 13 morfotipos com características morfológicas distintas para o gênero *Penicillium*, as quais diferem das espécies descritas nos manuais de identificação, os isolados foram caracterizados e selecionados para posterior estudo, a figura 10 apresenta alguns dos isolados não identificados.

As principais características distintas observadas em 13 morfotipos foram: coloração da colônia, tamanho das colônias após o período de sete dias de incubação, textura dos conidióforos, tamanho e textura dos conídios. Essas características são importantes para estudos taxonômicos baseados na morfologia, uma vez que o gênero encontra-se subdividido em seções de acordo com arranjos dos conidióforos e dos conídios. Essas características em conjunto ou isoladamente permitem uma distinção clara das principais seções do gênero.

Os 13 morfotipos foram encaminhados para a Universidade do Minho, Praga – Portugal. Estudos envolvendo a técnica de MALDI-TOF serão utilizados para uma discriminação mais detalhada dos isolados.



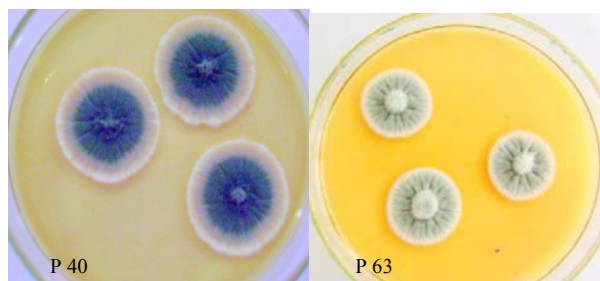


Figura 10 Isolados selecionados para posterior estudo taxonômico. Colônias crescidas em MEA a 25°C. *P - região de Passos.

Utilizando a identificação morfológica como ferramenta para este estudo, foram encontradas oito espécies para o gênero *Aspergillus* (*A. flavus*; *A. japonicus*; *A. foetidus*; *A. niger*; *A. ochraceus*; *A. tubigenis*; *A. sulphureus*; *A. ostianus*) e dezoito espécies para o gênero *Penicillium* (*P. citrinum*; *P. decubens*; *P. solitum*; *P. glabrum*; *P. expansum*; *P. simplicissimum*; *P. carnescens*; *P. wakismanii*; *P. citrionigrum*; *P. crhysogenum*; *P. raistrick*; *P. minioluteum*; *P. minczinsk*; *P. varibile*; *P. corylophilum*; *P. comune*; *P. brevicompactum* e *P. pinophilum*) totalizando 26 espécies identificadas, como pode ser observado na tabela 2.

A maioria das espécies encontradas neste estudo é referida como isolado do solo, espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são amplamente distribuídas e ocorre em diversos substratos principalmente no solo (DOMSCH et al. 1993; ELLIS 1971; RAPER & FENELL 1977). As espécies *Penicillium citrinum* e *Aspergillus flavus* se destacaram em relação à ocorrência, sendo consideradas mais abundantes em relação ao número de isolados encontrados neste estudo.

Isolados pertencentes à seção *Citrina*, são abundantes e apresentam uma distribuição mundial, sendo muito comuns em solos (PITT, 2000). A distribuição das espécies pode estar relacionada ao clima, *Penicillium citrinum* geralmente é encontrado em solos subtropicais e presentes em menor frequência

em solos de regiões temperadas (HOUBRAKEN et al., 2011; PITT; HOCKING, 2009).

Esta espécie é relatada como extremamente comum este fungo é conhecido por produzir metabólitos secundários tóxicos, a produção desses metabólitos pode conferir um benefício na natureza fornecendo uma vantagem competitiva ao colonizar um novo substrato (ABBOTT, 2002; PITT, 2000). Essa espécie já foi isolada a partir de diversas fontes, em solo tropical, cereais, especiarias, ambientes fechados e em ambientes hipersalinos (CANTRELL et al., 2006; SAMSON; FRISVARD, 2004).

Outra espécie frequentemente isolada foi *Aspergillus flavus*. Espécies do gênero *Aspergillus* apresentam ampla distribuição. *Aspergillus flavus* é relatado como patógeno oportunista, sapróbio e amplamente distribuído na natureza, sendo uma espécie extremamente comum em solos (KLICH, 2002). Estas observações corroboram com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que a espécie *Aspergillus flavus* foi comumente isolada a partir de amostras de solos.

Isolados de *Aspergillus flavus* são encontrados tanto em solos cultivados quanto em solos de ecossistemas naturais. Em um estudo realizado por Barbaruah et al. (2012) onde foi avaliada a população de Hyphomycetes em solos cultivados e não cultivados, foi constatado que dentre as espécies com maior frequência de isolados encontra-se *Aspergillus flavus*, sendo este detectado em solos de áreas cultivadas com arroz e em locais não cultivados

Estudos realizados por Donner et al. (2009) avaliaram comunidades de *Aspergillus* Seção *Flavi* em solos cultivados com milho. O estudo de *Aspergillus flavus* em solos cultivados dá-se devido ao fato de que essa espécie é descrita na literatura como produtora de micotoxinas, particularmente as aflatoxinas, o que confere uma relevância de estudos em solos cultivados, trabalhos com essa finalidade foram realizados por Horn, Greense e Dorner

(1995) e Razzaghi-Abyaneh et al. (2006).

Estudos realizados por Chen et al. (2011) detectaram *Aspergillus flavus* em solos e caracterizaram produção de uma substância fungistática contra o patógeno *Alternaria brassicicola*, onde ocorreu inibição da germinação de seus conídios. O solo a principal fonte de *Aspergillus flavus*, um fator que pode justificar a ampla distribuição dessa espécie, é que esta pode estar relacionada com a produção de numerosos conídios que são facilmente dispersos pelo ar (BARROS et al., 2005; HEDAYATI et al., 2007).

A espécie menos abundantemente encontrada para o gênero *Aspergillus* foi *Aspergillus tubigenis* e para o gênero *Penicillium* foram: *Penicillium carneceus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium citreonigrum* e *Penicillium raistrick*. É conhecido que o tipo de vegetação pode influenciar na diversidade de fungos, existem evidências que certos grupos de fungos estão associados a determinados tipos de vegetação. O cerrado vem sofrendo grandes alterações devido à agricultura e agropecuária, essas alterações provocam mudanças físico-químicas na estruturação dos solos bem como mudanças no tipo de vegetação.

A diversidade da comunidade fúngica do solo, pode tornar-se reduzida em habitats com baixa diversidade florística, assim como queimadas e manejo de áreas cultivadas podem afetar a diversidade de fungos (KLICH, 2002). O conhecimento da micobiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram pode levar ao descobrimento de novos processos metabólicos utilizados por esses organismos.

Tabela 2 Isolados identificados em três regiões preservadas de cerrado no período de alta e baixa pluviosidade.

Gênero	Espécie	Alta pluviosidade			Baixa pluviosidade		
		Regiões de cerrado em Minas Gerais - Brasil					
		Arcos	Luminárias	Passos	Arcos	Luminárias	Passos
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	8	0	11	2
	<i>Aspergillus foetidus</i>	0	6	4	1	4	5
	<i>Aspergillus japonicus</i>	0	1	9	0	0	0
	<i>Aspergillus níger</i>	0	0	2	0	1	0
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	1	0	1	0	0
	<i>Aspergillus ostianus</i>	2	1	0	0	11	0
	<i>Aspergillus sulphureus</i>	1	1	5	0	4	0
	<i>Aspergillus tubigenis</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	0	0	0	4	0	1
	<i>Penicillium carneceus</i>	0	0	1	0	0	0
	<i>Penicillium citreonigrum</i>	0	0	0	0	1	0
	<i>Penicillium citrinum</i>	5	8	0	1	8	6
	<i>Penicillium comune</i>	0	0	0	2	0	0
	<i>Penicillium corylophilum</i>	0	0	0	0	2	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	0	0	0	3	1

“continua”

Tabela 2 “conclusão

Gênero	Espécie	Estação úmida			Estação seca		
		Regiões de cerrado em Minas Gerais – Brasil					
		Arcos	Luminárias	Passos	Arcos	Luminárias	Passos
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium decubens</i>	1	1	0	0	0	0
	<i>Penicillium expansum</i>	1	0	0	0	0	0
	<i>Penicillium glabrum</i>	3	5	1	1	2	2
	<i>Penicillium minioluteum</i>	0	0	0	0	2	0
	<i>Penicillium minczinsk</i>	0	0	0	1	0	1
	<i>Penicillium pinophilum</i>	3	2	5	0	0	0
	<i>Penicillium raistrick</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	2	4	0	1	8	3
	<i>Penicillium solitum</i>	0	0	0	2	1	0
	<i>Penicillium varibile</i>	0	0	2	0	0	0
	<i>Penicillium waskmanii</i>	0	0	0	3	0	0
Total: 183		18	30	38	17	58	22

4.3 Análise de correspondência simples (CA)

Em função dos resultados obtidos pela aplicação da análise de correspondência simples (CA) para espécies de fungos para o gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nas três regiões e nas duas diferentes épocas de coleta, foi possível observar que existem evidências estatísticas de que há uma relação entre as espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* com as regiões preservadas de cerrado nos diferentes períodos estacionários. A determinação desses agrupamentos, bem como, a estimação dos componentes foi feita mediante aos resultados das contribuições observadas para os perfis linha e coluna (Tabelas 3 e 4) em relação aos componentes utilizados para a construção do mapa perceptual. Dessa forma, pontos localizados no mesmo quadrante com maiores contribuições foram determinantes para a realização dos agrupamentos ilustrados em círculos na Gráfico1.

Por meio do Gráfico1 observou-se que para gênero *Aspergillus*, a espécie *Aspergillus ochraceus* está associada à região de Arcos durante o período de baixa pluviosidade, permanecendo distantes de outras espécies. Para os isolados de *Aspergillus japonicus* observou-se que sua incidência está mais associada à região de Passos no período de alta pluviosidade. Para as espécies *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus tubigenis* e *Aspergillus ostianus* e *Aspergillus flavus* decorrente dos resultados não foram estabelecidas associações com as regiões e os diferentes períodos de pluviosidade.

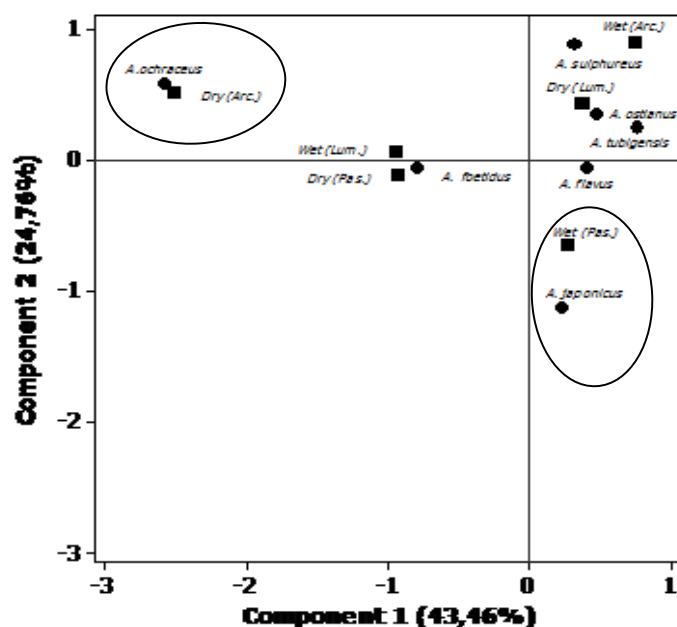


Figura 11 Mapa Percentual para espécies de fungos do gênero *Aspergillus* em função das regiões e de diferentes períodos estacionários.

Para melhor entendimento da interpretação do mapa perceptual (Figura 11) o componente 1 e 2 representam a distribuição das espécies e regiões em um gráfico bidimensional que explicam 68,22% da variabilidade amostral. Na interpretação desses componentes é fato que a variabilidade dos pontos se decompõe em cada componente, dessa forma, os coeficientes especificados em Contribuição (Tabela 3) indicam o quanto cada ponto contribuiu para a determinação da direção dos eixos. Por fim, as coordenadas especificadas em Coordenadas (Tabela 3) representam os escores obtidos para cada componente.

Tabela 3 – Síntese das estatísticas para as variáveis classificadas como espécies.

Espécies	Componente 1		Componente 2	
	Coord	Contr	Coord	Contr
<i>A. flavus</i>	0,389	0,08	-	0,00
<i>A. japonicus</i>	0,222	0,01	-	0,62
<i>A. foetidus</i>	-	0,37	-	0,00

“continua”

<i>A.sulphureu</i>	0,306	0,01	0,880	0,22
<i>A.ochraceu</i>	-	0,36	0,576	0,03
<i>A.tubigensi</i>	0,748	0,03	0,248	0,00
<i>A.ostianus</i>	0,460	0,111	0,347	0,111

Componente 1 e 2 referem-se, respectivamente, à decomposição da variabilidade para o primeiro e segundo componente; Coord refere-se às coordenadas utilizadas para a plotagem dos perfis; Contr. refere-se a contribuição de cada espécie na formação dos componentes 1 e 2.

De forma, análoga a interpretação dos valores descritos na Tabela 3, procede-se com a interpretação referente às contribuições e coordenadas obtidos para os componentes em relação às variáveis regiões com diferentes períodos estacionários conforme a tabela 4.

Tabela 4 Síntese das estatísticas para as variáveis classificadas como regiões.

Região	Componente 1		Componente 2	
	Coord.	Contr.	Coord.	Contr.
Ch (Arc.)	0.733	0.059	0.897	0.156
Sec	-2.519	0.351	0.515	0.026
Ch	-0.956	0.252	0.070	0.002
Sec	0.364	0.110	0.428	0.267
Ch (Pas.)	0.272	0.055	-0.645	0.545
Sec	-0.943	0.172	-0.105	0.004

Componente 1 e 2 referem-se, respectivamente, à decomposição da variabilidade para o primeiro e segundo componente; Coord refere-se às coordenadas utilizadas para a plotagem dos perfis; Contr. refere-se a contribuição de cada espécie na formação dos componentes 1 e 2. *Ch, Chuvosa, * Sec, Seca.

Para o gênero *Penicillium* as análises de correspondência incluíram as seguintes espécies: *Penicillium glabrum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium minioluteum*.

A incidência da espécie *Penicillium pinophilum* encontra-se associada à região de Passos durante o período de alta pluviosidade. É possível observar a ocorrência de uma associação das espécies *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium minioluteum* na região de Luminárias durante o período de baixa pluviosida-

de. Em se tratando da região de Arcos, a espécie *Penicillium glabrum* encontram-se associada a esta região durante o período de alta pluviosidade. Tais agrupamentos podem ser verificados na Figura 12.

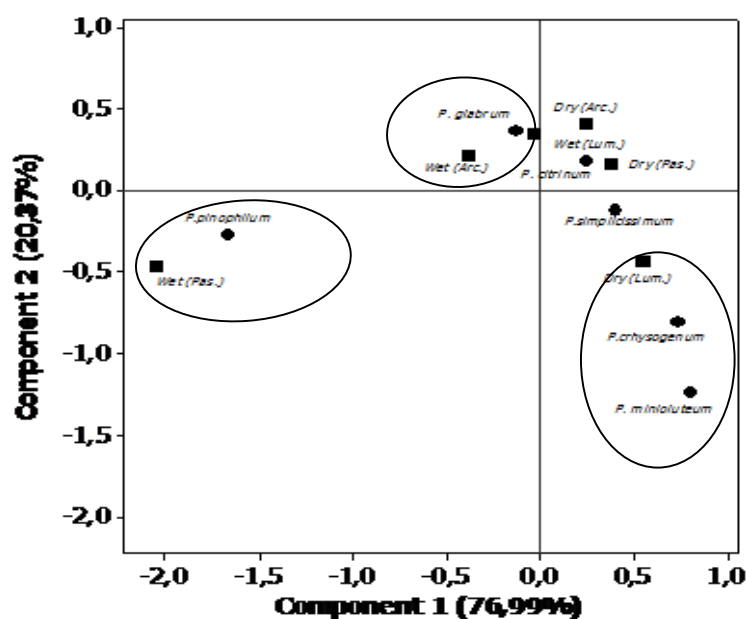


Figura 12 Mapa Percentual para espécies de fungos do gênero *Penicillium* em função das regiões e de diferentes períodos estacionários

A análise utilizada neste estudo ressaltou-se uma separação de grupos de fungos para algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* nas áreas amostradas nos diferentes períodos estacionários, entretanto convém ressaltar que a formação de grupos considerados heterogêneos entre si podem estar relacionado com as características intrínsecas do habitat para cada região analisada, fatores como temperatura e precipitação podem influenciar no desenvolvimento destes fungos. Os resultados que justificam os agrupamentos encontram-se descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 Síntese das estatísticas para as variáveis classificadas como espécies de fungos do gênero *Penicillium*.

Espécies	Component 1		Component 2	
	Coord.	Contr.	Coord.	Contr.
<i>P. citrinum</i>	0.246	0.047	0.187	0.103
<i>P. glabrum</i>	-0.131	0.007	0.371	0.202
<i>P. simplicissimum</i>	0.393	0.078	-0.113	0.024
<i>P. crhysogenum</i>	0.734	0.060	-0.805	0.273
<i>P. minioluteum</i>	0.795	0.035	-1.233	0.320
<i>P. pinophilum</i>	-1.667	0.773	-0.271	0.077

Componente 1 e 2 referem-se, respectivamente, à decomposição da variabilidade para o primeiro e segundo componente; Coord refere-se às coordenadas utilizadas para a plotagem dos perfis; Contr. refere-se a contribuição de cada espécie na formação dos componentes 1 e 2.

Tabela 6 Síntese das estatísticas para as variáveis classificadas como regiões.

Região	Component 1		Component 2	
	Coord.	Contr.	Coord.	Contr.
Ch (Arc.)	-0.378	0.052	0.220	0.066
Sec (Arc.)	0.247	0.005	0.419	0.056
Ch (Lum.)	-0.034	0.001	0.351	0.246
Sec (Lum.)	0.547	0.191	-0.436	0.460
Ch (Pas.)	-2.052	0.703	-0.464	0.136
Sec (Pas.)	0.379	0.048	0.170	0.036

Componente 1 e 2 referem-se, respectivamente, à decomposição da variabilidade para o primeiro e segundo componente; Coord refere-se às coordenadas utilizadas para a plotagem dos perfis; Contr. refere-se a contribuição de cada espécie na formação dos componentes 1 e 2. * Ch, Chuvosa, * Sec, Seca.

4.4 Teste qualitativo para a enzima celulase

A seleção de isolados produtores de celulase foi realizada com isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, testes foram realizados com 135 espécies identificadas com base nas características morfológicas. Dentre os isolados testados, apenas vinte foram produtores, porém cinco isolados se destacaram quanto à produção qualitativa de celulase, esses isolados foram capazes de formar o halo de degradação da celulose ao redor das colônias. Os cinco isolados pertencem ao gênero *Aspergillus* e foram identificados como

Aspergillus sulphureus. Essa espécie apresentou potencial para o teste qualitativo da enzima celulase como pode ser observado na figura 13.

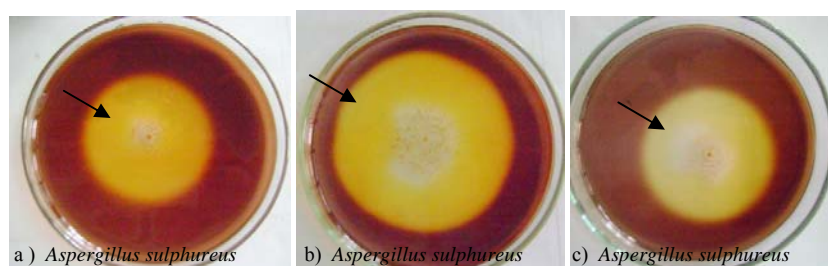


Figura 13 Halo de degradação da celulose por isolados de *Aspergillus sulphureus* crescidos em CMC a 25°C por um período de sete dias.

Foi calculado o Índice Enzimático (IE) para cada isolado de *Aspergillus sulphureus* que apresentaram potencial de degradação como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 Cálculo do índice enzimático para cinco isolados de *Aspergillus sulphureus*.

Espécie – Cod. isolado	Diâmetro (halo)	Diâmetro (colônia)	IE
<i>Aspergillus sulphureus</i> - (Ar 07)	6,0	2,5	2,4
<i>Aspergillus sulphureus</i> - (Ar 13)	5,0	2,0	2,5
<i>Aspergillus sulphureus</i> - (Lm 11)	4,0	1,7	2,3
<i>Aspergillus sulphureus</i> - (Lm 02)	3,6	1,2	3,0
<i>Aspergillus sulphureus</i> - (Lm 06)	3,0	1,3	2,3

O isolamento de microrganismos produtores de enzimas é de grande importância, existe uma busca por novas enzimas e melhoria de suas aplicações biotecnológicas. O método qualitativo empregado neste estudo é fácil, rápido e permite fazer uma triagem dos microrganismos produtores de celulases em placas. Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* são reconhecidas por serem

aplicadas em diversos processos biotecnológicos, muitas espécies apresentam potencial para a produção de diversas enzimas.

Estudos realizados por Lu et al. (2003) demonstraram que a espécie *Aspergillus sulphureus* é capaz de secretar enzimas como β - manase, xilanase, β - glucanase, pectinases e celulase. Neste estudo apenas esta espécie foi potencialmente produtora da enzima celulase.

Foram obtidos cinco isolados de *Aspergillus sulphureus* capazes de produzir a enzima celulase, onde apresentou um potencial para a produção, esses isolados foram oriundos de solos, os fungos que decompõem substâncias celulósicas geralmente ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Espécies do gênero *Aspergillus* são relatadas como potencialmente produtora de celulases. Em um trabalho realizado por Escobar et al. (2007) foram testados dez isolados oriundos de substratos vegetais quanto a produção da enzima celulase, dentre esses dez isolados, oito apresentaram atividade celulolítica, entretanto a espécie *Aspergillus sulphureus* não foi mencionada.

Conforme demonstrado na tabela 7, é possível observar que os valores dos índices enzimáticos (IE) para os diferentes isolados de *Aspergillus sulphureus* foram semelhantes. Estudos visando à otimização e as condições de cultivo bem como atividade específica da celulase serão desenvolvidos.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que as espécies de fungos filamentosos encontradas foram: *A. flavus*; *A. japonicus*; *A. foetidus*; *A. niger*; *A. ocrhaceus*; *A. tubigenis*; *A. sulphureus*; *A. ostianus*, *P. citrinum*; *P. decubens*; *P. solitum*; *P. glabrum*; *P. expansum*; *P. simplicissimum*; *P. carnescens*; *P. wakismanii*; *P. citrionigrum*; *P. crhysogenum*; *P. raistrick*; *P. minioluteum*; *P. minczinsk*; *P. varibile*; *P. corylophilum*; *P. comune*; *P. brevicompactum* e *P. pinophilum*.

Isolados identificados como *Aspergillus sulphureus* foram melhores produtores nas condições testadas.

Em relação à diversidade nas áreas de coletas, esta se comportou de forma homogênea, não foram detectadas diferenças significativas nas áreas estudadas. Existiram associações entre grupos de fungos para com as regiões nos diferentes períodos estacionários pelas amostras estudadas. Os resultados obtidos neste estudo fornecem informações da micobiota de *Aspergillus* e *Penicillium* habitantes com evidências estatísticas de apresentarem incidência relevante em solos preservados de cerrado em Minas Gerais e subsídio para sua conservação

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S, P. Mycotoxins and indoor moulds. **Indoor Environment Connections**, Rockville, v. 3, n. 4, p. 14-24, 2002.

ADL, S. M. **The ecology of soil decomposition**. Wallingford: CABI, 2003.

AMANN, R. I. et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Review**, Bethesda, v. 59, p. 143 - 169, 1995.

AUER, C. G. et al. Fungos em acículas de serrapilheira de *Pinus taeda* L. em povoamentos com diferentes idades. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 3, p. 433-438, set./dez. 2006.

BARBARUAH, B ; CHUTIA, M ; BORUAH, P . Soil hyphomycetes population dynamics in disturbed and undisturbed tropical soils of north-eastern india. *afican journal of microbiology research*. India. v. 6 , p. 5344-5352 . jul 2012.

BADIANE, N. N. Y, et al. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 18, p. 229-238, 2001.

BARROS, G. et al. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile . **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 85, p. 2349–2353, 2005.

BASS, D.; RICHARDS, T. A. Three reasons to re-evaluate fungal diversity 'on Earth and in the ocean. **Fungal Biology Reviews**, Manchester, v. 25, p. 159-164, 2011.

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

BENNET, J. W. **An Overview of the Genus *Aspergillus***. 2010. Disponível em: <<http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergilluschl.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2012.

BHAT, M. K. Research review paper cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.

BOND, W. J.; PARR, C. L. Beyond the forest edge: ecology, diversity and conservation of the grassy biomes. **Biological Conservation**, Essex, v. 143, p. 2395-2404, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Desmatamento no cerrado Brasileiro**. Brasília, 2009. (Comunicado).

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

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2196–2204, Dec. 2007.

CANTRELL, S. A. et al. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. **Mycological Research**. Cambridge, v. 110, n. 8, p. 962-970, Aug. 2006.

CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives Microbiology**, Berlin, v. 190, p. 129-139, 2008.

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

CHAVEZ, R. et al. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, p. 413-433, 2006.

CHEN, Y. T. et al. Characterization of a fungistatic substance produced by *Aspergillus flavus* isolated from soil and its significance in nature. **New Biotechnology**, Taichung, v. 28, n. 6, p. 679-683, Oct. 2011.

CHRISTENSEN, M.; FRISVAD, J. C.; TUTHILL, D. E. *Penicillium* species diversity in soil and some taxonomic and ecological notes. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. **Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. London: Academic, 2000.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DIAS, B. F. S. Cerrados: uma caracterização. In: DIAS, B. F. S. **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Brasília: FUNATURA, 1997.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W. & ANDERSON, T.H.. Compendium of soil fungi. v.I. San Francisco, Academic Press.1993.

DONNER, M. et al .Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of various maize fields among three agroecological zones of nigeria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 37-44, Jan. 2009.

DRUMMOND, G. M. et al. **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais: subsídio ao Programa Biota Minas**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

ESCOBAR, I et al. Seleção de fungos produtores de celulases a partir de substratos vegetais. In. Congresso Brasileiro de Micologia. 5, 2007. Recife. **Resumos...** Recife UFPE, 2002. P.246.

ELLIS, M.B. Dematiaceus Hyphomycetes. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 1971.

ELTEM, R. et al. Colonial and morphological characteristics of Some *Aspergillus* Fr.:Fr. Species isolated from Vineyards in Manisa and Üzmir Provinces (Turkey). **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 28, p. 287-298, 2004.

FERREIRA, L. G. et al. Seasonal landscape and spectral vegetation index dynamics in the Brazilian Cerrado: an analysis within the Large-Scale Biosphere–Atmosphere Experiment in Amazonia (LBA). **Remote Sensing of Environment**, New York, v. 87, p. 534-550, 2003.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 481-487, Dec. 2008.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, London, 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**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

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

GOMEZ, E. et al. Fungal abundance and distribution as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. **Biology and fertility of soils**, Berlin,

v. 43, n. 3, p. 373-377, 2007.

GÓMEZ-SANCHIS, J. et al. Detecting rottenness caused by *Penicillium* genus fungi in citrus fruits using machine learning techniques. **Expert Systems with Applications**, New York, v. 39, p. 780-785, 2012.

GREEN, V. S et al. Tillage impacts on soil biological activity and aggregation in a Brazilian Cerrado Oxisol. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 92, p. 114-121, 2007.

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

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HE, C. et al. Isolation and Identification of a Strain of *Aspergillus Tubingensis* With Deoxynivalenol biotransformation capability. **International Journal of Molecular Sciences**. Beijing, v. 9, n. 12, p. 2366-2375, Dec. 2008.

HEDAYATI , M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, New York, v. 153, p. 1677-1692, June 2007.

HORN, B. W.; GREENSE, R. L.; DORNER, J. W. Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in Southwestern georgia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2472-2475, 1995.

HOUBRAKEN, J. et al. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 70, p. 53-138, 2011.

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

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Amsterdam, v. 167, p. 101-134, 2001.

JORGENSEN, H. et al. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 851-861, 2003.

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

KIRK, O et al. Industrial enzyme applications . **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 345-351, 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservação do cerrado. **Megadiversidade**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 148-151, jul. 2005.

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

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002b. 116 p.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, Netherlands, v. 161, p. 1-188, 1989.

KRISHNA, P. et al. *Aspergillus Tubingensis* Reduces the pH of the Bauxite Residue (Red Mud) Amended Soils. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.167, n. 1/4, p. 201-209, 2005.

KRZYSKO-LUPICKA, T. et al. The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 549-552, 1997.

KUMAR, V. et al. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, p. 891-905, 2008.

LEE, M. H. et al. Mutations of β -tubulin codon 198 or 200 indicate thiabendazole resistance among isolates of *Penicillium digitatum* collected from citrus in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 150, p. 157-163, 2011.

LOPES, A. S. Soils under cerrado: a success story in soil management. **Better Crops International**, Atlanta, v. 10, n. 2, p. 9-15, 1996.

LU, W. et al. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2/3, p. 305-311, Feb. 2003.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do cerrado brasileiro**. Brasília: Conservação Internacional. 2004. 26 p. (Relatório Técnico não publicado).

MARKOVINA, A. et al. Diversity of the Trichocomaceae in the Katandra nature reserve, Central Coast, NSW, Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 964- 973, Sept. 2005.

MITTERMEIER, R. A. et al. Uma breve história da conservação da

biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n. 1, p. 14-21, 2005.

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

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

MUELLER, G. M. et al. **Biodiversity of fungi**: inventory and monitoring methods. Burlington: Elsevier Academic, 2004. 777 p.

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

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

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

OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. **The Cerrados of Brazil Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University, 2002.

OLIVER, C.; TORTA, L.; CATARA, V. A polyphasic approach to the **identification of ochatoxin Aproducing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily**. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, p. 147-154, 2008.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungosdo gênero e interação com cana-de-açúcar**. 2010.129 p. Tese (Doutorado em Ciências) -

Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

RAPER, K.B. & Fenell, D.I. . The genus *Aspergillus*. Malabar, Robert and Krieger Malabar.1977.

PARENICOVA, L. Combined Molecular and Biochemical Approach Identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as Two Species. **Applied and environmental microbiology**. V.67.n.2.p. 521–527. Feb. 2001.Dinamarca.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 53-66, 2007.

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

PICART, P. et al. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, p. 108-113, 2007.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. **Australia**: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 2000. 197 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

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

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.).**Integration of modern taxonomic methods of *Penicillium* and**

***Aspergillus* classification.** Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 9-49.

QUIRINO, B. F. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 59-70, 2009.

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

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 223-230, 1997.

RAZZAGHI-ABYANEH, M. et al. A survey on distribution of *Aspergillus* section Flavi in corn field soils in Iran: populations patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. **Mycopathologia**, Heidelberg, v. 161, 183-192, 2006.

RIBEIRO, S. A. L. et al. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 223-229, jun. 2003.

RONDON NETO, R. M. et al. Análise florística e estrutural de um fragmento de floresta ombrófila mista montana, situado em Criúva, RS – BRASIL. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 29-37 29.

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

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**,

Utrecht, v. 49, p. 1-251, Jan. 2004.

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

SIQUEIRA, J. O. et al. Tópicos em Ciência do Solo 2007, 5, 219.

SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, n. 16, n. 1, p. 99-111, Jan. 2007.

SCHOENLEIN, N. C. et al. Fungos anamorfos do solo da região dos lagos no Município de Santa Gertrudes, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, p. 667-678, 2008.

SCHUSTER, S. et al. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 426-435, 2002.

SOLIMAN, K. M. et al. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 1669-1675, Nov. 2002.

SPAROVEK, P. G. et al. Brazilian agriculture and environmental legislation: status and future challenges. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 44, p. 6046-6053, 2010.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Cellulase activity of a hermotolerant *Aspergillus niveus* isolated from desert soil. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 1, p. 14-18, Jan. 1992.

TAUK-TORNISIELO, S. M. et al. Soilborne filamentous fungi in Brasil. **Journal Basic Microbiological**, Weinheim, v. 45, p. 72-82, Jan. 2005.

THIE, B. I. **Avaliação da microbiota de grãos de café e dos metabólitos fungicos na qualidade da bebida**. 2010. -- p. Tese (Doutorado em -----) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2010.

THOM, C.; RAPER, K. B. A manual of the *Aspergilli*. In: KLICH, M. A. **Identifiication of common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureauvoor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

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

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627-640, 2004.

WAKELIN, S. A. et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and fertility of soils**, Berlin, v. 40, n. 1, p. 36-43, 2004.

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

WANG, X. et al. Chemical Epigenetics Alters the Secondary Metabolite Composition of Guttate Excreted by anAtlantic-Forest-Soil-Derived *Penicillium citreonigrum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 73, p. 942-948, 2010.

YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 1445-1450, 2008.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, Oxford, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZELLER, V. et al. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north south gradient in the European Alps. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 639-649, 2001.

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

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R.; **Biotechnol. Prog.** 1995, 11, 235.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K.; **Mycorrhiza** 1997, 7, 139.

ANEXO

Tabela 1	Número médio das unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas na região de Arcos -MG, durante o período de alta pluviosidade e baixa pluviosidade.....	75
Tabela 2	Número médio das unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas na região de Luminárias -MG, durante o período de alta pluviosidade e baixa pluviosidade	75
Tabela 3	Número médio das unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas na região de Passos -MG, durante o período de alta pluviosidade e baixa pluviosidade.....	76

Tabela 1 Número médio das unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas na região de Arcos - MG, durante o período de alta pluviosidade e baixa pluviosidade.

Amostras analisadas Arcos - MG	Isolamento em DG18%	
	Estação Úmida- UFC/g	Estação Seca -
Amostra 1	9×10^{-2}	$7,13 \times 10^{-2}$
Amostra 2	$3,3 \times 10^{-4}$	$9,26 \times 10^{-2}$
Amostra 3	$5,8 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$
Amostra 4	$9,3 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-2}$
Amostra 5	$8,9 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-4}$

Amostras analisadas Arcos - MG	Isolamento em CMA	
	Estação Úmida -UFC/g	Estação Seca -
Amostra 1	$3,6 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$
Amostra 2	$4,4 \times 10^4$	$1,24 \times 10^4$
Amostra 3	$9,3 \times 10^2$	$8,7 \times 10^2$
Amostra 4	$1,23 \times 10^3$	$1,08 \times 10^2$
Amostra 5	$4,56 \times 10^2$	$3,2 \times 10^3$

Tabela 2 Número médio das unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas na região de Luminárias - MG, durante o período de alta pluviosidade e baixa pluviosidade

Amostras analisadas Luminárias - MG	Isolamento em DG18%	
	Estação Úmida- UFC/g	Estação Seca -
Amostra 1	$5,9 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3$
Amostra 2	$3,36 \times 10^4$	$3,56 \times 10^3$
Amostra 3	$1,27 \times 10^3$	$1,07 \times 10^4$
Amostra 4	$4,7 \times 10^3$	$3,06 \times 10^3$
Amostra 5	$4,93 \times 10^2$	$7,03 \times 10^3$

Amostras analisadas Luminárias - MG	Isolamento em CMA	
	Estação Úmida -UFC/g	Estação Seca -
Amostra 1	$3,7 \times 10^2$	$4,16 \times 10^3$
Amostra 2	$3,73 \times 10^4$	$3,13 \times 10^3$
Amostra 3	$8,23 \times 10^2$	$1,28 \times 10^4$
Amostra 4	$6,36 \times 10^3$	$4,66 \times 10^3$
Amostra 5	$5,1 \times 10^4$	$4,03 \times 10^3$

Tabela 3 Número médio das unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas na região de Passos - MG, durante o período de alta pluviosidade e baixa pluviosidade.

Amostras analisadas Passos - MG	Isolamento em DG18%	
	Estação Úmida- UFC/g	Estação Seca -
Amostra 1	$3,53 \times 10^2$	$4,8 \times 10^3$
Amostra 2	$5,5 \times 10^2$	$3,36 \times 10^2$
Amostra 3	$1,08 \times 10^3$	$1,25 \times 10^3$
Amostra 4	$1,10 \times 10^3$	$1,21 \times 10^3$
Amostra 5	$5,0 \times 10^2$	$6,63 \times 10^2$
Amostras analisadas Passos - MG	Isolamento em CMA	
	Estação Úmida -UFC/g	Estação Seca -
Amostra 1	$6,46 \times 10^3$	$3,25 \times 10^3$
Amostra 2	$4,9 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$
Amostra 3	$7,76 \times 10^3$	$1,16 \times 10^3$
Amostra 4	$9,13 \times 10^3$	$7,56 \times 10^3$
Amostra 5	$7,8 \times 10^3$	$9,33 \times 10^3$