

PPG
-
BIO
NOR
TE



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA- REDE
BIONORTE**

CINTIA
RIBEIRO DE
SOUZA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS XILANOLÍTICOS E
CELULOLÍTICOS ASSOCIADOS AO TRATO
DIGESTÓRIO DE STENOCHIRONOMUS (DIPTERA:
CHIRONOMIDAE) EM RIACHOS DE FLORESTA
AMAZÔNICA E CERRADO NO NORTE DO BRASIL**

CINTIA RIBEIRO DE SOUZA

2022

PALMAS

TO 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**DIVERSIDADE DE FUNGOS XILANOLÍTICOS E CELULOLÍTICOS
ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO DE *STENOCHIRONOMUS*
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EM RIACHOS DE CERRADO E
FLORESTA AMAZÔNICA NO NORTE DO BRASIL**

CINTIA RIBEIRO DE SOUZA

Palmas - TO

2022

CINTIA RIBEIRO DE SOUZA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS XILANOLÍTICOS E CELULOLÍTICOS
ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO DE *STENOCHIRONOMUS*
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EM RIACHOS DE CERRADO E
FLORESTA AMAZÔNICA NO NORTE DO BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Paula Benevides de Morais
Coorientador: Prof. Dr. Alex Fernando
de Almeida

**Palmas - TO
DEZEMBRO/2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Cintia Ribeiro de

DIVERSIDADE DE FUNGOS XILANOLÍTICOS E
CELULOLÍTICOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO DE
STENOCHIRONOMUS (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EM RIACHOS DE
CERRADO E FLORESTA AMAZÔNICA NO NORTE DO BRASIL / Cintia
Ribeiro de Souza – Palmas: TO, 2022.

101 f.: il.

Orientadora: Paula Benevides de Morais
Co-orientador: Alex Fernando de Almeida.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Tocantins,
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia –
Rede BIONORTE, 2022.

CDU xxx

CINTIA RIBEIRO DE SOUZA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS XILANOLÍTICOS E
CELULOLÍTICOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO DE
STENOCHIRONOMUS (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EM
RIACHOS DE CERRADO E FLORESTA AMAZÔNICA NO NORTE
DO BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do
Tocantins, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 09/12/2022

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 PAULA BENEVIDES DE MORAIS
Data: 02/02/2023 19:41:04-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Paula Benevides de Moraes (Orientadora)
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 SOLANGE CRISTINA CARREIRO
Data: 06/02/2023 08:38:52-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Solange Cristina Carreiro
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente
 TAIDES TAVARES DOS SANTOS
Data: 02/02/2023 20:19:44-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Taídes Tavares dos Santos
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Documento assinado digitalmente
 CAIO DE OLIVEIRA GORGULHO SILVA
Data: 01/02/2023 04:55:29-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Caio de Oliveira Gorgulho
Danmarks Tekniske Universitet

Documento assinado digitalmente
 ELISANDRA SCAPIN
Data: 08/02/2023 10:44:07-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Elisandra Scapin
Universidade Federal do Tocantins

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Ribeiro de Souza (*in memoriam*) e Lúcia Nogueira de Souza, que me deram a vida e são minha fonte de inspiração diária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo fortalecimento e cuidado diário, por nunca me abandonar e colocar pessoas extraordinárias no meu caminho. Àquela que esteve à frente de todas as batalhas segurando minha mão, minha Nossa Senhora, Rainha do Céu!

Agradeço à minha família, minha fonte de inspiração diária na caminhada. Meus pais Lucia e José (*in memoriam*), Kennuy Brams e Jhulienny Ribeiro, obrigada pela paciência e cuidado!

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Paula Benevides de Moraes por ter me aceitado como orientanda e principalmente pela paciência e disponibilidade em ensinar como ser uma profissional comprometida.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida por, pacientemente, tirar todas as dúvidas sobre o universo das enzimas e orientar a melhor forma de conduzir os experimentos.

À minha parceira e amiga que o doutorado me deu de presente, Mayra Netto, com quem pude aprender e dividir as alegrias e os desafios dessa jornada!

À Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte (PPG-Bionorte), pela oportunidade de qualificação ofertada.

Ao Instituto Federal do Tocantins, pela concessão do afastamento, possibilitando que eu pudesse me dedicar, durante quatro anos, exclusivamente às atividades do doutorado.

Aos colegas de laboratório que, com muita disposição e entusiasmo, me auxiliaram quando necessário, o Dr. Taídes Tavares, Dra. Jéssica Barros e Dra. Eskálath Morganna.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia - LAMBIO, minha 2^a casa durante os cinco anos! Em especial às amigas Cristiane Coelho e Márcia Regina Marson pela ajuda nos experimentos, disponibilidade de materiais e técnicas adotadas.

À equipe Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e Biocombustíveis - LAPEQ, na pessoa do Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda por ceder seu espaço e equipamentos para análises e em especial à Me. Larissa Gualberto por todo o apoio nas horas extras de trabalho.

Aos amigos que sempre se fizeram presentes durante essa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão do financiamento da pesquisa.

Muito obrigada e que Deus os abençoe!

“Tudo posso n’Aquele que me fortalece”

(Filipenses 4, 13)

SOUZA, Cintia Ribeiro de. **Diversidade de fungos xilanolíticos e celulolíticos associados ao trato digestório de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em riachos de Cerrado e Floresta Amazônica no norte do Brasil.** 2022. 101f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2022.

RESUMO

Fungos e insetos podem estabelecer uma relação profícua. O estudo destas interações traz relevantes contribuições ao conhecimento da biodiversidade fúngica e a compreensão de mecanismos de interações ecológicas mutualistas. Em ambientes tropicais, há uma escassez de informações taxonômicas sobre fungos, embora o interesse por biotecnologias de origem microbiana, incluindo enzimas, metabólitos e atividades antagonistas deste grupo, seja crescente na indústria mundial. Assim, o objetivo deste trabalho é conhecer a diversidade de fungos associados ao trato digestório de insetos do gênero *Stenochironomus* e seu potencial de produção de xilanases e celulases. A primeira fase do estudo foi conduzida em riachos de baixa ordem de Floresta Amazônica e de Cerrado, onde insetos foram coletados e tiveram seus tratos digestórios analisados para obtenção de amostras fúngicas e posterior purificação e identificação. Foi avaliada a atividade enzimática dos isolados fúngicos para celulases e xilanases. A segunda fase do estudo envolveu a seleção de fungos testados na primeira fase para avaliação do potencial enzimático através do cultivo em estado sólido utilizando um resíduo agroindustrial, a casca da soja. Posteriormente, foram realizados testes de cultivo *in vitro* de consórcios entre diferentes espécies fúngicas para selecionar as associações compatíveis que poderiam potencializar a produção enzimática. Os resultados apontam uma elevada diversidade de espécies fúngicas associadas ao trato digestório de larvas de *Stenochironomus* tanto em riachos de Floresta Amazônica quanto em Cerrado, sendo maior nos primeiros. Além disso, observou-se que a maioria dos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* apresentam habilidade para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas principalmente quando considerados os consórcios fúngicos compatíveis.

Palavras-Chave: Biodiversidade; Interação fungo/inseto, Inseto aquático, Atividade Enzimática; Biotecnologia.

SOUZA, Cintia Ribeiro de. **Diversity of xylanolytic and cellulolytic fungi associated with the digestive tract of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) in Cerrado and Amazon Forest streams in northern Brazil.** 2022. 101f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2022.

ABSTRACT

Fungi and insects establish fruitful interactions. Research on those interactions brings essential contributions to the knowledge of fungal biodiversity and understanding of mechanisms for ecological mutualistic interactions. In tropical environments, it is difficult to obtain taxonomic information about fungi, although the interest in biotechnologies of microbial origin, including enzymes, metabolites and antagonistic interactions in this group, is growing in the industry. Thus, the objective of this work is to contribute to knowledge of the diversity of fungi associated with the digestory tract of insects of the genus *Stenochironomus* and their potential for the production of xylanases and cellulases. The first phase of the study was conducted in low order streams in Cerrado and Amazon Forest where insect larvae were collected and their digestory tract were analyzed to obtain fungal samples that were purified and identified. Enzymatic activity of the fungal strains was tested for the production of cellulases and xylanases. The second phase was the selection of fungal strains for Solid State Culture using soy hulls as substrate. Afterwards tests of consortia of those fungal strains were developed in order to select compatible associations that potentialize enzymatic activity. Results indicate a diversity of fungal species associated with the TD of *Stenochironomus* larvae both in streams of Cerrado and Amazon Forest, where higher diversity was detected. The fungal strains of the genera *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Penicillium* produce cellulolytic and xylanolytic enzymes, mainly when in fungal consortia.

Keywords: Biodiversity; Fungus/Insect Interaction, Aquatic insect, Enzyme Activity; Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Infográfico exibindo os tipos de fungos de água doce. Um riacho de água doce serpenteia por uma zona ribeirinha. Madeira morta submersa e materiais herbáceos, como serapilheira, caem das árvores no riacho e são decompostos por fungos de água doce.....**16**
- Figura 2-** Interações simbióticas entre insetos e microrganismos**18**
- Figura 3-** Mapa dos locais de amostragem de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em riachos de baixa ordem na Reserva Florestal Adolpho Ducke no estado do Amazonas (Bioma Floresta Amazônica) e no Parque Estadual do Lajeado (LSP) no estado do Tocantins, (Bioma Cerrado)Brasil.....**30**
- Figura 4-** Análise dos Componentes Principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos dos riachos amostrados em Floresta Amazônica - Amazonas (A) e Cerrado - Tocantins (T) no norte do Brasil.....**41**
- Figura 5-** Porcentagem de isolados fúngicos do TD de larvas de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) de troncos em Floresta Amazônica (A), troncos em Cerrado (B) e folhas em Cerrado (C) produtores e não produtores de xilanase (XIL) e celulase (CMC).....**41**
- Figura 6-** Diagrama esquemático de interações entre dois diferentes linhagens de fungos, que foram cultivadas adjacientemente (4 cm de distância) em e meios de cultura BDA e MEA....**55**
- Figura 7-** Interações de entrelaçamento mútuo entre diferentes espécies de fungos filamentosos cultivados em meios BDA (fotos da esquerda) e MEA (fotos da direita). A= *P. shearii* x *T. asperellum*. B= *P. paxilli* x *T. asperellum*. C= *A. nomius* x *T. asperellum*. D= *A. sydowii* x *T. asperellum*. E= *P. shearii* x *T. spirale*. F= *P. quebencense* x *T. spirale*. G= *P. paxilli* x *T. spirale*. H= *A. sydowii* x *T. spirale*. I= *P. shearii* x *T. yunnanense*. J= *P. quebencense* x *T. yunnanense*. K= *P. paxilli* x *T. yunnanense*. L= *A. sydowii* x *T. yunnanense*.**63**
- Figura 8-** Interações entre diferentes espécies de fungos filamentosos cultivados em meios BDA (fotos da esquerda) e MEA (fotos da direita). A= *A. nomius*/*T. spirale*, B= *A. nomius*/*T. yunnanense*, C= *P. quebencense*/*T. asperellum*, D= *A. costaricensis*/*T. spirale*, E= *A. costaricensis*/*T. asperellum*, F= *A. costaricensis*/*T. yunnanense*.....**64**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% ID	Porcentagem de similaridade entre sequências de nucleotídeos
1 - D	Simpson Index of Diversity
BDA	Batata Dextrose Agar
BLAST	Basic Local Alignment Search
Bp	Pares de bases
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre
CES	Cultivo em Estado Sólido
CFU	Colony-forming Units
CMC	Carboxymethylcellulase
d	Índice de Margalef
Desv.Pad	Desvio Padrão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	3.5-dinitrosalicylic acid
DT	Digestive tract
FES	Fermentação no Estado Sólido
FPase	Celulase total
FPU	Filter Paper Units
GOD-POD	Glicose Oxidase Peroxidase
H'	Índice de Shannon
IE	Índice Enzimático
ITS	Internal transcribed spacer of the rDNA
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MEA	Malt Extract Ágar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Oxigênio dissolvido
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCA	Análise dos Componentes Principais
PEL	Lajeado State Park
RFAD	Reserva Florestal Adolpho Ducke
SSF	Solid State Cultivation
TD	Trato digestório
XIL	Xilanase

APRESENTAÇÃO

Essa tese apresenta as atividades desenvolvidas a partir do Projeto de Tese durante o período de março de 2018 a dezembro de 2022 ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-Bionorte).

Na primeira parte deste documento, apresentamos uma breve introdução do tema, revisão de literatura, objetivos do trabalho e um fluxograma da metodologia utilizada. Assim, o leitor será esclarecido sobre os conceitos básicos do tema a ser tratado pela tese e terá atualizações com as publicações mais recentes no universo científico.

No Capítulo I intitulado “**Diversidade de fungos celulolíticos e xilanolíticos associados ao trato digestório de larvas de insetos aquáticos em riachos de Floresta Amazônica e Cerrado no Brasil**”, é reportada a ocorrência de uma diversa comunidade de fungos filamentosos no trato digestivo de insetos aquáticos do gênero *Stenochironomus*, bem como seu perfil enzimático. Esse capítulo está publicado na revista *Brazilian Journal of Biology*, volume 82, 25 de agosto de 2022.

No Capítulo II, apresentamos texto do artigo intitulado: “**Coquetel enzimático obtido por consórcios fúngicos isolados do trato digestório de insetos aquáticos para produção de açúcares a partir da hidrólise de casca de soja**” que trata da atividade enzimática de consórcios fúngicos sob cultivo em estado sólido utilizando a casca da soja como substrato, cujo título é: Esse capítulo está sendo preparado para submissão em periódico especializado.

Os resultados, até aqui obtidos, esclarecem por meio dos dados coletados, os aspectos relacionados à diversidade fúngica associada ao TD de larvas aquáticas, bem como traz contribuições com relação aos aspectos qualitativo e quantitativo sobre produção enzimática dos fungos avaliados. Assim, cada etapa deste trabalho permitiu conhecer e avaliar técnicas de cultivo que podem potencializar o uso de espécies fúngicas com a finalidade de produção de enzimas de interesse biotecnológico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 GERAL	11
2.2 ESPECÍFICOS	11
3 FLUXO METODOLÓGICO	12
4 REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1 FUNGOS: CARACTERÍSTICAS E ECOLOGIA	13
4.2 DIVERSIDADE DE FUNGOS EM DIFERENTES ECOSSISTEMAS.....	14
4.3 FUNGOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS TROPICAIS.....	15
4.4 INTERAÇÃO FUNGOS/INSETOS	16
4.5 MICROBIOMAS E SIMBIOSE.....	17
4.6 FATORES QUE AFETAM O MICROBIOMA DE INSETOS	18
4.7 O GÊNERO <i>Stenochironomus</i> KIEFFER, 1910 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)	19
4.8 CELULASES E XILANASES DE ORIGEM FÚNGICA	20
4.9 CULTURA PURA E CONSÓRCIOS FÚNGICOS OU CULTURAS MISTAS.....	22
4.10 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE ENZIMAS FÚNGICAS	23
4.11 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS	25
CAPÍTULO I	27
DIVERSIDADE DE FUNGOS CELULOLÍTICOS E XILANOLÍTICOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO DE LARVAS DE INSETOS AQUÁTICOS EM RIACHOS DE FLORESTA AMAZÔNICA E CERRADO NO BRASIL	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	30
2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS	31
2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	31
2.4 DIVERSIDADE, RIQUEZA E DISTRIBUIÇÃO	32
2.5 <i>SCREENING</i> XILANOLÍTICO E CELULOLÍTICO DA COMUNIDADE FÚNGICA	32
3 RESULTADOS	33
3.1 COMUNIDADES FÚNGICAS	33
3.2 DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE	35
3.3 POTENCIAL ENZIMÁTICO	36
4 DISCUSSÃO	43
4.1 FUNGOS DO TD DE LARVAS DE <i>Stenochironomus</i>	43
4.2 INFLUÊNCIA DO BIOMA NA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES	43
4.3 INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES	45
4.4 PAPEL DO MICROBIOMA NA TD DE LARVAS DE <i>Stenochironomus</i>	46

5 CONCLUSÕES	47
6 AGRADECIMENTOS	47
CAPÍTULO II	49
COQUETEL ENZIMÁTICO OBTIDO POR CONSÓRCIOS FÚNGICOS ISOLADOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS AQUÁTICOS PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES A PARTIR DA HIDRÓLISE DE CASCA DE SOJA.....	49
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 FONTE E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	52
2.2 <i>SCREENING</i> PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES).....	53
2.3 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS	54
2.4 ENSAIO ENZIMÁTICO	54
2.5 DESENVOLVIMENTO DA CULTURA MISTA	55
2.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO INDIVIDUAL E DAS INTERAÇÕES <i>In Vitro</i>	56
2.7 CULTURA MISTA EM CES UTILIZANDO A CASCA DA SOJA.....	56
2.8 SACARIFICAÇÃO DE CASCA DE SOJA.....	57
2.9 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE	57
3 RESULTADOS	58
3.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CES	58
3.2 DESENVOLVIMENTO DOS TESTES DE COMPATIBILIDADE	61
3.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	66
3.4 SACARIFICAÇÃO DE CASCA DA SOJA	69
4 DISCUSSÃO	70
4.1 ESPÉCIES FÚNGICAS PRODUTORAS DE ENZIMAS EM CES	70
4.2 COMPATIBILIDADE DAS ESPÉCIES.....	72
4.3 SACARIFICAÇÃO DE CASCA DE SOJA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	73
5 CONCLUSÕES	74
6 AGRADECIMENTOS	74
7 CONCLUSÃO	75
8 REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estudos têm evidenciado a relação entre fungos e insetos nos mais diversos enfoques (CHEN *et al.*, 2016; VERA-PONCE DE LEÓN *et al.*, 2016), a maior parte deles tem buscado compreender, essencialmente, a relação entre fungos e insetos terrestres. Alguns, por exemplo, investigaram as relações endossimbióticas entre térmitas, formigas e fungos (NYGAARD *et al.*, 2016; BIEDERMANN & VEGA, 2020). Outros trabalham para entender o ambiente intestinal dos insetos e como as comunidades fúngicas associadas estão estruturadas nesse ambiente (STEFANI *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2020). No entanto, pouco se conhece sobre a estrutura dos micobiomas de larvas de insetos aquáticos, bem como os fatores que influenciam essas comunidades.

O trato digestório (TD) de insetos tem sido um modelo para estudos de diversidade de fungos e também para a busca da compreensão das relações simbióticas entre eles (SUH *et al.*, 2005). De acordo com Nguyen *et al.* (2006), mais de 200 novos táxons foram reconhecidos em estudos de fungos associados a besouros micófagos em Basidiomicetos. Besouros de cerca de 25 famílias são fontes de leveduras produtoras de enzimas xilanolíticas de grande interesse industrial.

A compreensão da natureza e dos grupos componentes na simbiose entre fungos e insetos aquáticos é de grande interesse não só por contribuir para uma melhor compreensão da biodiversidade e do papel ecológico dos organismos que interagem, mas também do ponto de vista biotecnológico. Os fungos filamentosos representam uma fonte de biocatalisadores metabolicamente versáteis na descoberta de novos produtos com interesse biotecnológico, tais como fármacos, produtos de biocontrole, enzimas, etc. (GOMES *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2019).

A degradação da biomassa vegetal em ambientes naturais é um processo complexo que envolve diversas comunidades microbianas com a capacidade metabólica de quebrar esses polímeros estruturais. Estudos têm demonstrado que fungos provenientes do TD de insetos aquáticos são microrganismos potencialmente interessantes do ponto de vista biotecnológico devido à sua capacidade de produção enzimática que degradam polímeros complexos (SANTOS *et al.*, 2018, 2019, 2021; SOUZA *et al.*, 2022; TEIXEIRA *et al.*, 2022).

De forma geral, nos ambientes naturais os microrganismos estabelecem consórcios entre si (fungos e/ou bactérias) que desempenham papéis cruciais na degradação da matéria vegetal e, portanto, na ciclagem do carbono (SISTA KAMESHWAR & QIN, 2018). Os polissacarídeos celulose e hemicelulose são os principais constituintes da biomassa vegetal. A deslignificação e a quebra sequencial de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis

são etapas cruciais para a bioconversão de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado. Como bioprodutos, ração, alimentos, extratos enzimáticos e biocombustíveis (KUMAR & CHANDRA, 2020; TIŠMA *et al.*, 2021).

Como um único microrganismo dificilmente abriga toda a variedade de enzimas necessárias para a total desconstrução dos componentes da parede celular, os consórcios microbianos representam uma alternativa interessante para superar alguns problemas relacionados ao uso de linhagens únicas. Isso porque os consórcios microbianos podem compartilhar algumas vias sintéticas e promover a divisão do trabalho entre seus membros ao invés de exigir o potencial máximo de uma única linhagem (RODRIGUES REIS *et al.*, 2018). Além disso, as interações químicas e físicas das espécies permitem um comportamento mais complexo do que as monoculturas (CHE & MEN, 2019; MCCARTY & LEDESMA-AMARO, 2019; QIAN *et al.*, 2020).

Embora a utilização dos consórcios fúngicos tenha muitas vantagens com relação a cultivos puros para a produção de enzimas, existem muitos desafios relacionados ao conhecimento da compatibilidade e reprodutibilidade de espécies cultivadas nos mais diversos substratos. Nesse sentido, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para crescimento de fungos tem se mostrado uma alternativa por impedir que esses resíduos sejam liberados no ambiente sem destinação adequada causando poluição ambiental (SADH *et al.*, 2018), além serem compostos com características químicas e nutricionais interessantes para uso como fonte de crescimento microbiano e produção de enzimas em Cultivo em Estado Sólido (CES) (SALAZAR *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Portanto, além de conhecer a diversidade e compreender as relações da comunidade fúngica associada ao TD de insetos aquáticos, esse estudo analisa qualitativa e quantitativamente a capacidade xilanolítica e celulolítica dessas espécies, bem como desenvolve cultivos mistos de fungos filamentosos isolados do TD de insetos aquáticos visando o aumento da capacidade de produção de enzimas degradantes de material vegetal. Além disso, essa última etapa, utilizando a técnica de Cultivo em Estado Sólido (CES) com resíduos de casca de soja, permitiu avaliar a sacarificação e teor de glicose utilizando coquetéis mínimos de enzimas produzidos por consórcios de fungos filamentosos.

2 OBJETIVOS

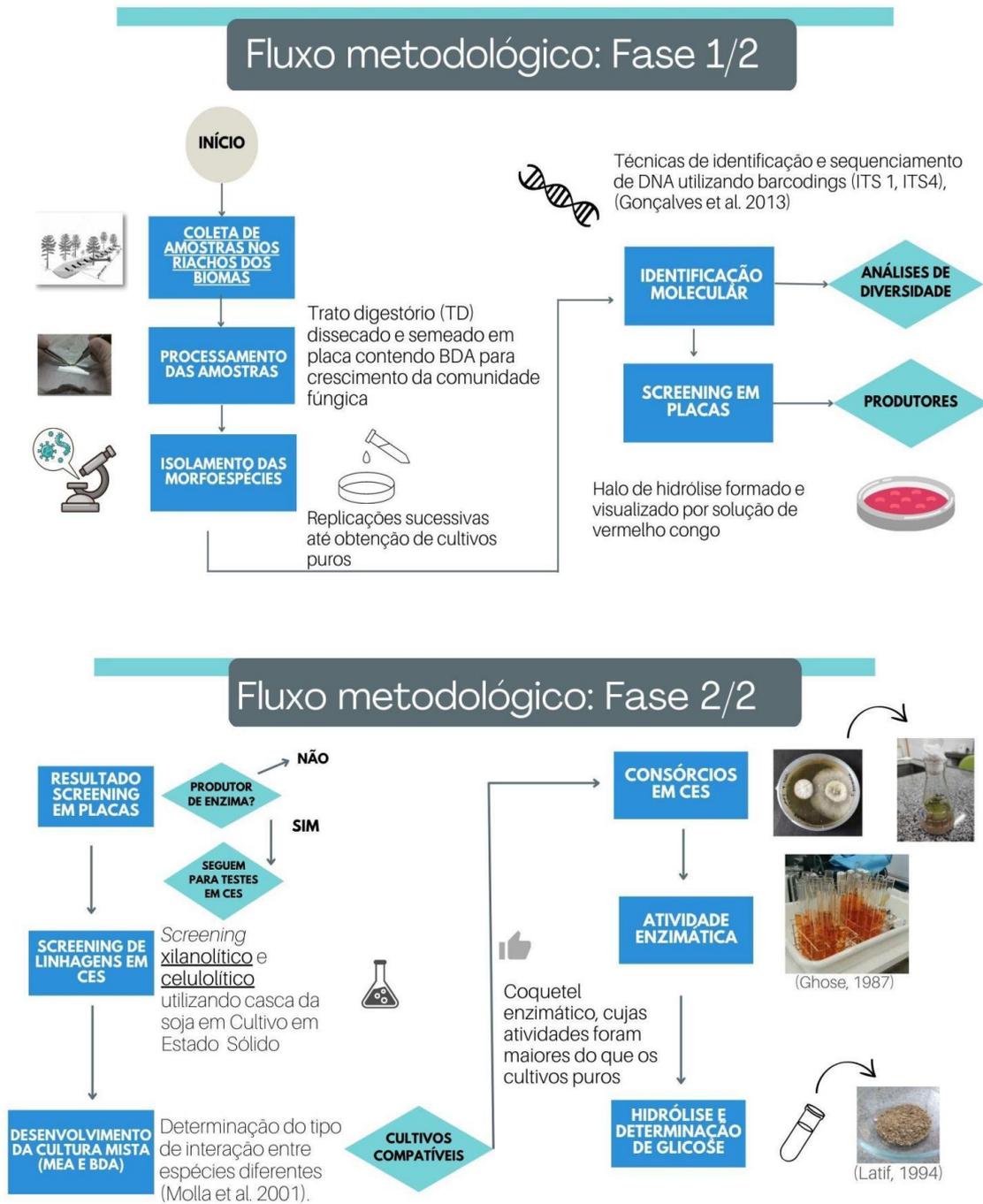
2.1 GERAL

Identificar a diversidade de fungos associados ao trato digestório de insetos do gênero *Stenochironomus* e seu potencial de produção de xilanase e celulase.

2.2 ESPECÍFICOS

- Inventariar a micota associada ao trato digestório de larvas de insetos minadores do gênero *Stenochironomus* em riachos do Parque Estadual do Lajeado (PEL) – Tocantins e da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) – Amazonas;
- Verificar o perfil de produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas desta micota;
- Quantificar a produção enzimática para xilanase e celulase das linhagens produtoras em Cultivo em Estado Sólido (CES) utilizando resíduo agroindustrial como substrato;
- Desenvolver cultivos mistos compatíveis entre fungos filamentosos isolados e verificar o potencial de produção de enzimas degradantes de material vegetal em CES com resíduo agroindustrial;
- Avaliar a sacarificação e teor de glicose utilizando coquetéis mínimos de enzimas produzidos por consórcios de fungos filamentosos em CES.

3 FLUXO METODOLÓGICO



Quadro 1. Quadro esquemático do fluxo metodológico utilizado para desenvolvimento do projeto de tese.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 FUNGOS: CARACTERÍSTICAS E ECOLOGIA

O reino *Fungi* possui extensa variedade de organismos que abrange uma grande diversidade de formas de vida, desde as leveduras microscópicas até cogumelos e trufas gigantes cobrindo hectares de solo (AIME & BREARLEY, 2012). Em 2017 foi estimada a existência de aproximadamente 3,8 milhões de espécies de fungos, e destas, 144 mil foram descritas, até então. Estimativas baseadas em estudos moleculares apontam para uma diversidade de cerca de 5,1 milhões de espécies fúngicas (O'BRIEN *et al.*, 2005; BLACKWELL, 2011). No Brasil, embora a diversidade estimada seja de aproximadamente 15 mil, se conhece apenas 5.719 espécies (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017). A carência de estudos em diversidade de fungos, somada à rápida degradação ambiental, tem exigido um esforço ímpar de descrição de novas espécies, pois o número até agora descoberto é, provavelmente, apenas uma pequena proporção dos que existem.

Com o passar do tempo, os fungos sofreram várias reorganizações taxonômicas dentro de seu próprio reino, levando-os até a sua classificação mais atual que os dividem em sete filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (HIBBET *et al.*, 2007). Nesses filos é possível encontrar uma variedade de representantes, características morfológicas, fisiológicas e reprodutivas.

De natureza cosmopolita, os fungos são organismos ecologicamente, morfolologicamente, fisiologicamente, filogeneticamente e quimicamente diversos que são vistos em quase todos os ambientes, incluindo habitats terrestres, de água doce e marinhos (HEITMAN *et al.*, 2017) e associados à organismos multicelulares, que podem abrigar espécies de fungos pouco estudadas. Estima-se, por exemplo, que o número de fungos na natureza é pelo menos 6 vezes maior que o número das plantas que os abrigam (HAWKSWORTH, 2001). Entretanto, o conhecimento da diversidade dos fungos, principalmente em regiões tropicais e, especialmente no Brasil, é ainda escasso, sendo geralmente restrito às áreas de estudo dos especialistas. Estudos em sítios particulares em regiões temperadas mostram um aumento gradual e contínuo no número de espécies de fungos detectados, e assim, coletas rápidas em sítios tropicais poderão aumentar fortemente a proporção de espécies novas descritas (SCHMIT & MUELLER, 2007).

Os fungos têm papel importante na decomposição de material orgânico em todos os ecossistemas terrestres. A atividade decompositora de fungos é exercida, principalmente, por meio da produção de enzimas extracelulares, como as celulases e pectinases que fazem a

degradação das estruturas rígidas de plantas, que não são digeridas por animais (STAMFORD *et al.*, 1998). É o caso, por exemplo, dos insetos que se alimentam de folhas. Esses preferem folhas e restos vegetais que estejam previamente colonizadas por microrganismos, pois os fungos, juntamente com os processos físicos como atrito e lixiviação, os tornam mais maleáveis. Isso porque ao remover parte da lignina que lhe confere dureza, também fornece energia através da ingestão concomitante desse tipo de alimento (GIMENES *et al.*, 2010). Assim, pode-se dizer, que os fungos se associam a outros seres, e os auxiliam no desenvolvimento e sobrevivência de espécies.

A sistematização do conhecimento sobre as características desses organismos potencialmente úteis na era da biotecnologia tem permitido, por exemplo, sua aplicação em várias áreas da indústria de alimentos, cosméticos, fármacos, etc. A utilização de espécies fúngicas como biocatalisadores metabolicamente versáteis na descoberta de novos produtos e drogas vem sendo continuamente investigada nos mais diversos habitats (EVANGELISTA *et al.*, 2015; CADETE *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2019).

4.2 DIVERSIDADE DE FUNGOS EM DIFERENTES ECOSSISTEMAS

Regiões tropicais são incrivelmente ricas em biodiversidade, além de abrigarem interações entre organismos. Apesar do interesse crescente, nosso entendimento da microbiota e seu papel em ecossistemas tropicais é incompleto, nas palavras de Aime & Brearley (2012). A dificuldade em estimar a diversidade fúngica deriva especialmente de sua natureza efêmera e crítica. Os estudos de Piepenbring *et al.* (2020) reafirmam esta característica e mostram a necessidade de estudos amplos de microhabitats, interações e atividades destes fungos nos ecossistemas.

O Cerrado Brasileiro é uma região semelhante a uma savana que cobre uma grande área do país, aproximadamente equivalente à metade do tamanho da União Europeia. Apesar de sua importância biológica, o bioma tem sido foco de poucos estudos sobre sua diversidade microbiológica. O trabalho de Castro *et al.* (2008) mostrou que, embora esse ecossistema seja frequentemente objeto de estudo de flora e fauna, a comunidade microbiana é negligenciada, o que nos permite inferir sobre a importância da realização de estudos que, entre outras questões, evidenciam e trazem à tona dados sobre a diversidade fúngica nesse bioma.

Outro bioma de relevância mundial que ocorre no Brasil é a Floresta Amazônica. A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo, cobrindo cerca de 3,6% da superfície global, enquanto compreende aproximadamente 40% de toda a floresta tropical. Abriga 10% da biodiversidade conhecida do mundo e potencialmente um quarto das espécies terrestres do

mundo (DIRZO *et al.*, 2014). A Amazônia abriga um grande número de espécies coexistentes e potencialmente interagentes, incluindo microrganismos, que provavelmente compõem uma das mais complexas teias de vida da Terra. Os microrganismos são responsáveis pela maior parte da biodiversidade em qualquer ambiente, incluindo os trópicos (MORA *et al.*, 2011), sendo cruciais para a dinâmica do ecossistema, como a reciclagem de nutrientes (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019) e grande parte da decomposição orgânica do solo. Contudo, a maioria desses microrganismos é desconhecida.

Os primeiros estudos publicados sobre a diversidade de fungos surgem apenas nos últimos dez anos. Zelski (2011, 2015) realizou estudos descrevendo os táxons (inclusive novos táxons) da Amazônia peruana envolvidos na decomposição de madeira submersa, e os trabalhos de Monteiro & Gusmão (2014) e Monteiro *et al.* (2014) descreveram algumas espécies associadas a decomposição de folhas. Um estudo mais recente conduzido na Floresta Nacional do Tapajós, localizada no bioma amazônico, mostrou que essa floresta é um reservatório de alta diversidade fúngica, que merece ser intensamente estudada (NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Assim, é importante ressaltar que a carência de estudos sobre a diversidade de fungos, somada à rápida degradação da Amazônia e do Cerrado, sinalizam a necessidade de estudos intensivos e mais específicos, tendo como objetivo incrementar o conhecimento sobre sua biodiversidade, padrões de distribuição, relação com outras espécies como subsídio ao manejo, conservação e uso de fungos em processos biotecnológicos (AGERER *et al.*, 2000).

4.3 FUNGOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS TROPICAIS

Fungos de água doce foram definidos como "qualquer espécie que dependa de água doce para alguma parte de seu ciclo de vida, ou qualquer espécie que colonize substratos que são predominantemente aquáticos ou semi-aquáticos por natureza" (FRÖHLICH & HYDE, 1999). Compreendem um grupo filogeneticamente diverso de Ascomycota, e estes podem ser definidos como um conjunto ecológico em vez de um grupo taxonômico, indicando que os fungos de água doce ocorrem em linhagens diferentes (EL-ELIMAT *et al.*, 2021).

Os ascomicetos de água doce são fungos presentes em ambientes lênticos e lóticos, onde desempenham um papel crucial na decomposição dos resíduos vegetais submersos. Apesar da relevância desse grupo, poucos estudos quanto a sua biodiversidade e distribuição foram realizados na América do Sul (SHEARER *et al.*, 2015). Os substratos compreendem caules mortos e em decomposição de macrófitas herbáceas aquáticas que crescem em água doce ou madeira em decomposição e folhas em decomposição que caem na água doce da vegetação ribeirinha adjacente (Fig. 1) (WONG *et al.*, 1998).



Figura 1. Infográfico exibindo os tipos de fungos de água doce. Um riacho de água doce serpenteia por uma zona ribeirinha. Madeira morta submersa e materiais herbáceos, como serapilheira, caem das árvores no riacho e são decompostos por fungos de água doce (EL-ELIMAT *et al.*, 2021).

Nos ecossistemas aquáticos, o processamento de matéria orgânica alóctone, proveniente da vegetação adjacente é fundamental para a integridade funcional destes ecossistemas. Os microrganismos heterotróficos – fungos filamentosos, leveduras e bactérias estão envolvidos na degradação de macromoléculas como celulose, hemiceluloses, pectinas, proteínas e ligninas (WRIGHT & COVICH, 2005). Em geral, a participação dos fungos é mais significativa no processo de decomposição do que o das bactérias, mas a relevância destes dois grupos depende principalmente da duração do processo de decomposição e níveis de nutrientes disponíveis (BÄRLOCHER, 1992; ABELHO, 2009; GRAÇA *et al.*, 2015).

4.4 INTERAÇÃO FUNGOS/INSETOS

Ao formarem associações com diversos grupos de organismos, os fungos podem tornar-se essenciais à sobrevivência destes. Os insetos são colonizados cronicamente por microrganismos que não são abertamente patogênicos e muitas vezes são benéficos ou mesmo exigidos pelo inseto hospedeiro. A maioria das células de um inseto saudável é microbiana, e a microbiota é responsável por até 1–10% da biomassa do inseto. Como resultado, um inseto é fundamentalmente uma entidade multiorganismal (DOUGLAS, 2015).

A maioria das interações entre fungos e insetos já estudada ocorre entre Coleoptera (especialmente a Sub-Família Scolytinae) e Ascomicetos, como por exemplo, entre besouros xilófagos e leveduras (GANTER, 2006); entre formigas Attini (Formicidae) e uma complexa comunidade fúngica (CALDERA *et al.*, 2009); entre térmitas Macrotermitinae e o fungo *Termitomyces* (ABE *et al.*, 2000), entre outras associações que focam primariamente em insetos terrestres. Tais interações estão baseadas em fatores alimentares e de maturação dos insetos mutualistas (VEGA & DOWD, 2005). De acordo com Nguyen *et al.* (2006), mais de 200 novos táxons foram reconhecidos em estudos de fungos associados a besouros micófagos em Ascomicetos. Besouros de cerca de 25 famílias são fontes de leveduras produtoras de

enzimas xilanolíticas de interesse industrial. Dessa forma, o TD de insetos tem sido um modelo para estudos de diversidade de fungos e para a busca da compreensão das relações simbióticas entre eles (SUH *et al.*, 2005).

Embora os estudos sobre a associação de insetos e fungos sejam relativamente recentes, alguns autores relatam que existem aproximadamente 250 espécies conhecidas de tricomictos, fungos associados ao trato digestivo de larvas com vida aquática, presentes em diferentes habitats aquáticos sejam dulcícolas ou marinhos (BENCH & WHITE, 2012).

4.5 MICROBIOMAS E SIMBIOSE

Em geral, um inseto é composto por múltiplos habitats para microrganismos, denominados microbiomas, sendo a cutícula externa e o intestino os mais acessíveis (DOUGLAS, 2015). Gurung *et al.* (2019) apontam que a maior parte dos estudos tem focado na interação entre insetos e bactérias. Os autores afirmam que outros membros microbianos, como os fungos, também podem influenciar a história de vida e a aptidão de seus insetos hospedeiros. Argumentam que a ação conjunta e as interações entre diversos membros das comunidades microbianas afetam o inseto hospedeiro.

Os microrganismos podem influenciar a ecologia e a evolução de seus hospedeiros de várias maneiras, incluindo relacionamentos benéficos ou prejudiciais em um evento conhecido como simbiose (MELO *et al.*, 2019) (Fig. 2). A simbiose, definida pela primeira vez por Bary (1879), é um termo amplo que é usado para descrever a "convivência" de longo período entre diferentes espécies e ocorre em todos os reinos da vida e é considerada fundamental nos processos biológicos. Normalmente, o parceiro menor e dependente é chamado de simbiote, enquanto o parceiro maior é chamado de hospedeiro. O efeito que o simbiote tem sobre o hospedeiro define o tipo de relação simbiótica observada (BROWNLIE & JOHNSON, 2009). Microrganismos simbiotes de insetos incluem bactérias, arqueias, fungos e outros eucariontes unicelulares, que podem proteger seus insetos hospedeiros contra patógenos, parasitoides, além de promover a aptidão dos insetos ao contribuir para a nutrição, especialmente fornecendo aminoácidos essenciais, vitaminas B e, no caso de parceiros fúngicos, esteróides (NASIR & NODA, 2003; DOUGLAS, 2015; PALUDO *et al.*, 2018).

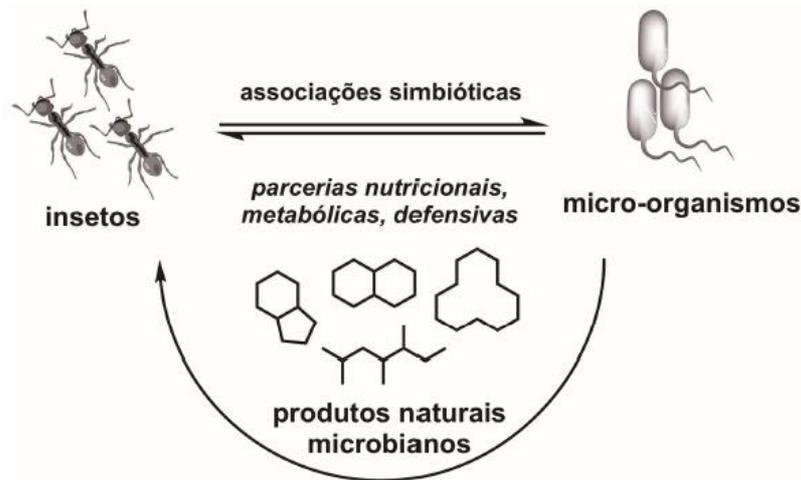


Figura 2. Interações simbióticas entre insetos e microrganismos (MELO *et al.*, 2019)

Já foi evidenciado o papel nutricional que a associação fungos/insetos representa, pois a alimentação de detritos vegetais envolve a digestão de celulose e ligninas, e a resistência ou detoxificação de toxinas do material vegetal (ERIKSSON *et al.*, 1990), que o inseto por si só, não é capaz de fazer satisfatoriamente. Muitos trabalhos têm apontado evidências de que a digestão deste material é realizada através da simbiose com microrganismos, ou seja, fungos podem associar-se ao TD dos insetos auxiliando-o na degradação de material vegetal ao passo que obtém seu alimento (FARRELL *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2018; BELMONT-MONTEFUSCO *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2021). Isso porque, embora os insetos possam produzir celulasas endógenas (POTHULA *et al.*, 2019; SHELOMI *et al.*, 2019), a hidrólise do polissacarídeo é realizada principalmente por enzimas extracelulares produzidas por microrganismos que colonizam o TD dos insetos, especialmente por fungos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* Link (ROJAS-JIMÉNEZ & HERNÁNDEZ, 2015).

4.6 FATORES QUE AFETAM O MICROBIOMA DE INSETOS

Dependendo do ambiente e da variação de seus componentes (vegetação, solo, condições climáticas), é esperado que haja diferenças entre as comunidades fúngicas de diferentes biomas. Em riachos tropicais, por exemplo, a diferença pode ser maior que em ambientes temperados (IRONS *et al.* 1994), ainda mais que a vegetação ripária de ecossistemas tropicais é muito mais diversa resultando em maior complexidade do material a ser digerido (COVICH, 1988). Além da própria disponibilidade de matéria orgânica nos riachos o que é geralmente mais alta nos riachos da Floresta Amazônica do que nos riachos de Cerrado, por exemplo (FRANÇA *et al.*, 2009; WANTZEN, 2014). Um estudo recente que analisou a correlação entre diversidade vegetal e diversidade microbiológica do solo, reforça

essa ideia apontando que a diversidade de plantas aumenta a diversidade de fungos do solo e a resistência microbiana em resposta à invasão de plantas, ou seja, a riqueza de plantas promove, indiretamente, a riqueza de fungos do solo (SHEN *et al.*, 2021).

Embora o ambiente possa representar um fator preponderante na composição dos microbiomas de insetos, o próprio ambiente intestinal parece estabelecer um filtro na estruturação das comunidades, controlando essas populações, característica que pode ser comum entre larvas de insetos que contenham uma microbiota intestinal relativamente simples (CHEN *et al.*, 2016). Isso pode fazer com que algumas espécies de fungos sejam, de fato, colonizadoras e outras sejam consideradas transitórias do trato digestório do inseto. Hammer *et al.* (2017) afirmam que características, como pH alto, estrutura simples do intestino e os rápidos tempos de trânsito que tipificam a fisiologia digestiva de lagartas, por exemplo, podem impedir a colonização microbiana. É comum que a maioria dos insetos, durante o desenvolvimento larval, eliminem severamente as populações microbianas associadas (ENGEL & MORAN, 2013), favorecendo a transitoriedade na colonização por microrganismos intestinais.

Outro fator que pode afetar o microbioma de insetos se refere a disponibilidade e qualidade do substrato. Ou seja, a diversidade de fungos pode ser influenciada pelo substrato de que o inseto se alimenta. Para Berg (1995), folhas, por exemplo, são mais lábeis e representam uma fonte alimentar de qualidade superior a insumos mais refratários como, por exemplo, a madeira, e por esse motivo podem ter a preferência de algumas espécies de larvas, afetando seu microbioma já que esses substratos são a fonte provável dessa comunidade. Alguns estudos demonstraram que microbioma de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) é alterado dependendo da dieta e que determinadas espécies podem ocorrer em maior ou menor número de acordo com o alimento disponível (YANG *et al.*, 2018; OSIMANI *et al.*, 2018; PRZEMIENIECKI *et al.*, 2020).

4.7 O GÊNERO *Stenochironomus* KIEFFER, 1910 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

Os organismos da família Chironomidae são considerados uns dos mais relevantes grupos de insetos aquáticos. Suas larvas são encontradas em diversos ambientes e apresentam variadas relações ecológicas, podendo estar associadas a esponjas de água doce, realizar forésia (associação entre indivíduos de espécies diferentes, na qual uma transporta outra, sem prejuízo a ambas) em outros insetos aquáticos, comensalismo ou ser de vida livre (RICCIARDI, 1994; PINDER, 1995). Frequentemente configuram-se como o grupo mais

abundante entre os invertebrados bentônicos tanto quantitativa como qualitativamente na maioria dos ecossistemas dulcícolas (KONDRATIEFF, 2009).

O gênero *Stenochironomus* foi estabelecido por Kieffer, (1919) e é composto por espécies exclusivamente minadoras de troncos, e suas larvas apresentam algumas características que lhes permitem minar troncos e folhas submersas em avançado grau de decomposição nos ambientes aquáticos tanto lênticos como lóticos (MCKIE & CRANSTON, 2006). Estas larvas apresentam coloração vermelho sangue devido à presença de hemoglobina, característica que possibilita a sobrevivência em áreas mais profundas dos substratos, onde a concentração de oxigênio pode ser baixa ou escassa (BORKENT, 1984; ANDERSEN & SAETHER, 1994). Outra adaptação apresentada por essas larvas é o mento em forma de arado adaptado para fragmentação e o achatamento dorso-ventral do corpo que permitem a capacidade de minação dos substratos (MCKIE & CRANSTON, 2006).

O ciclo de vida é considerado curto. Experimentos realizados em laboratório revelam que estas larvas têm um curto período de vida e que o tempo máximo para a emergência do adulto é de 20 dias (DANTAS *et al.*, 2010). Entretanto, Anderson & Cummins (1979) mostraram que larvas de *Stenochironomus* podem apresentar adaptações às más condições nutricionais (madeira, por exemplo) e prolongar ciclo de vida com baixa atividade metabólica, obtendo apenas carbono digerível suficientes e microrganismos associados. Após a emergência e reprodução, os ovos são depositados em folha de macrófita aquática, folhíço ou raízes, a massa de ovos é gelatinosa fixa ou livre e os ovos são elipsoides (BENTES *et al.*, 2019).

Embora não haja estudos específicos sobre o TD de *Stenochironomus*, o trabalho de Terra & Ferreira (2020) aponta que insetos pertencentes à ordem Diptera, que podem alimentar-se de plantas em decomposição, têm intestino médio oxidante e alcalino e carecem de um ativo microbioma fermentativo (SUSTR *et al.*, 2014). O processo digestivo em larvas de Diptera segue um padrão que indica que a digestão com auxílio de enzimas digestivas pode ocorrer tanto no intestino médio, onde as enzimas são produzidas de forma endógena, como intestino posterior, responsável pela absorção de água e íons, e onde geralmente o inseto abriga diversos microrganismos que auxiliam na digestão da celulose por meio da produção de enzimas celulolíticas (TERRA & FERREIRA, 2012).

4.8 CELULASES E XILANASES DE ORIGEM FÚNGICA

Como mencionado anteriormente, a associação entre fungos e insetos pode ser benéfica à medida em que os microrganismos podem colaborar (ou serem fundamentais) para o processo de nutrição dos insetos. Essa interação simbiótica é possível graças à produção de

enzimas pelos fungos, já que os insetos podem não ser capazes de realizar satisfatoriamente. Enzimas são macromoléculas biológicas produzidas por um organismo vivo, atuantes como catalisadores de reações bioquímicas específicas. Consideradas altamente seletivas, podem acelerar processos biológicos e bioquímicos dentro e fora da célula (GURUNG *et al.*, 2013; SELIȘTEANU *et al.*, 2014).

A produção de enzimas do sistema celulolítico (celulases) e xilanolítico (xilanases) tem sido estudada em fungos, sendo estabelecido que a regulação da mesma é sujeita a indução, repressão catabólica na presença de glicose e expressão constitutiva destas enzimas (SUTO & TOMITA, 2001).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de difícil desestabilidade, e para sua desconstrução é necessário um arsenal enzimático mais complexo. Dentre as variedades de enzimas hemicelulolíticas, podem ser citadas as xilanases (β -1,4- endoxilanase e β -1,4-xilosidase), que são as enzimas principais, com ação na degradação da xilana. As β -1,4-endoxilanase hidrolisam as ligações do tipo β -1,4 da cadeia da xilana produzindo oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -1,4-xilosidase (SOUZA, 2013). Muitos fungos filamentosos são produtores de xilanases. Os níveis de xilanase, a partir de culturas de fungos, são tipicamente maiores do que aqueles, a partir de leveduras ou bactérias (MILALA *et al.*, 2013). As xilanases possuem potencial na clarificação de sucos e vinhos, extração de óleos vegetais, amido, e também atuam melhorando as texturas de produtos de panificação e na conservação das propriedades nutricionais de grãos armazenados (RYTIOJA *et al.*, 2014).

Já a celulose, o principal constituinte estrutural da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo composto por moléculas de D-glicose, unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Em função da linearidade de sua cadeia, as moléculas de celulose se agregam dando origem às fibras, que são embebidas por uma matriz composta por hemicelulose e lignina (OGEDA & PETRI, 2010; BALAT, 2011). A lignina é um composto complexo e aromático, formado basicamente por unidades de fenilpropano. Essa molécula confere rigidez e resistência mecânica à parede celular vegetal, e impermeabilidade em vasos condutores. Na estrutura da célula vegetal, a lignina está ligada aos grupos laterais das hemiceluloses através de ligações covalentes, formando uma matriz complexa que envolve as fibras de celulose (RODRIGUES *et al.*, 2010; FIGUEIREDO, 2016). A celulase é um grupo de três enzimas denominadas endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (BAJAJ & MAHAJAN, 2019) e assim como outras enzimas, são excelentes produtos microbianos quando produzidos por fungos filamentosos, pois as hifas têm a capacidade natural de cobrir a

superfície nutritiva sólida do substrato, e assim tornarem-se fortemente ligadas ao substrato (RAIMBAULT, 1998).

Celulases são utilizadas na indústria de alimentos para clarificação de bebidas provenientes de frutas, como sucos e vinhos, além de participar da estabilidade destes produtos; também é utilizada para melhorar propriedades sensoriais em massas (COELHO, 2008; CASTRO & PEREIRA JR, 2010). Nos últimos anos, a maior aplicação dessas enzimas foca a hidrólise de biomassas para a produção de etanol (DELABONA, 2012).

Dentre os gêneros de fungos mais estudados para produção de enzimas microbianas, destacam-se *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Dias *et al.* (2018) estudaram a produção de celulase e xilanase de linhagens de *Aspergillus niger*, em fermentação em estado sólido com biomassa de sorgo e assim obtiveram uma maximização da produção utilizando peptona como fonte de nitrogênio. *Penicillium oxalicum* produz grandes quantidades de enzimas que degradam a parede celular da planta, como celulase e xilanase (YAN *et al.*, 2017).

4.9 CULTURA PURA E CONSÓRCIOS FÚNGICOS OU CULTURAS MISTAS

Os microrganismos vivem na natureza de forma conjunta em um ecossistema, sendo assim, esses microrganismos não agem como indivíduos, mas atuam como uma comunidade microbiana que muda dinamicamente, onde todas as células interagem e se comunicam umas com as outras. Para utilização ou estudo de uma única espécie de microrganismo há necessidade do isolamento de cada membro da comunidade microbiana. Dessa forma cultura pura, é um conjunto de células de um mesmo microrganismo que foi isolado de uma comunidade de microrganismos (DE ROY *et al.*, 2014).

Culturas mistas ou co-culturas são aquelas em que o inóculo consiste de dois ou mais organismos que crescem em interações mutualísticas e são amplamente utilizadas na produção de antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, alimentos fermentados, compostagem, fermentação láctea e tratamento de resíduos (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2018; UNBAN *et al.*, 2019). As co-culturas de fungos simulam o processo de biodegradação natural e mostraram aumentar certas atividades enzimáticas (SPERANDIO & FILHO, 2021).

A cultura mista é benéfica na produção de enzimas via Cultivo em Estado Sólido (CES), pois os fungos normalmente coexistem simbioticamente em substratos sólidos na natureza (HOLKER *et al.*, 2004), fato que confere vantagens como maior produtividade, adaptabilidade e aproveitamento do substrato em relação ao monocultivo (PERCIVAL-ZHANG *et al.*, 2006).

A cultura mista pode ser realizada entre diferentes organismos, como organismos de diferentes domínios, por exemplo, entre fungos e bactérias (*Aspergillus fumigatus* e

Streptomyces leeuwenhoekii) (WAKEFIELD *et al.*, 2017); diferentes gêneros (*Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca*) (BERTRAND *et al.*, 2013), ou em diferentes espécies (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) (HU *et al.*, 2011). A obtenção de novos metabólitos secundários com atividade biológica e enzimas de interesse, é um dos principais objetivos desta técnica (BERTRAND *et al.*, 2014). Em busca do aumento da produção de substâncias de uso industrial como enzimas e fármacos, a cultura mista tem sido continuamente estudada e adaptada (NONAKA *et al.*, 2011; CHAN-CUPUL *et al.*, 2014).

Em processos de bioconversão, culturas mistas podem influenciar uma melhor utilização do substrato por meio de síntese mais eficiente das enzimas necessárias (KUBICEK, 1992). Esta associação melhora a colonização do substrato, com aumento de rendimento e produção de celulase (DUEÑAS *et al.*, 1995). Culturas mistas de fungos levaram a maior produção de enzima com aumento comparativamente pequeno em sua biomassa celular, o que implica afirmar que as interações sinérgicas, embora não estejam diretamente relacionadas ao aumento do crescimento de biomassa, são responsáveis pelo aumento da produção enzimática (GUTIERREZ-CORREA & TENGARDY, 1997). Culturas mistas também podem fortalecer e acelerar o processo de bioconversão e resultados mais encorajadores foram relatados em bioconversões em estado sólido do que para fermentações submersas. O vital e mais determinante na cultura mista são compatibilidade de linhagens e estado nutricional (CASTILLO *et al.*, 1994; DUEÑAS *et al.*, 1995; GUTIERREZ-CORREA & TENGARDY, 1997).

É uma técnica promissora para obter misturas de enzimas idealmente balanceadas para conversão de biomassa em muitos bioprodutos de interesse industrial. *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. têm sido os táxons mais explorados em diferentes sistemas de culturas mistas para produção de enzimas celulolíticas (TEIXEIRA *et al.*, 2021). Essas linhagens de fungos mostram resultados interessantes em processos submersos e de estado sólido para produção de enzimas, incluindo melhor utilização de substrato, aumento da produção de biomassa, maior adaptabilidade às mudanças nas condições, maior resistência à contaminação e capacidade de superar as limitações nutricionais devido as interações sinérgicas entre parceiros compatíveis (FANG *et al.*, 2013; KOLASA *et al.*, 2014). Embora esses dados apontem para resultados promissores, é possível que outros táxons ainda não estudados apresentem dados semelhantes ou melhores, considerando que a técnica é relativamente recente.

4.10 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE ENZIMAS FÚNGICAS

Enzimas são utilizadas na fabricação de alimentos, rações animais, na indústria de cosméticos, de fármacos, de detergentes, de celulose e papel, têxtil, na indústria química, de couro, na produção de combustíveis e medicamentos. Além dessas finalidades, nos últimos anos, uma diversidade de subprodutos da indústria agrícola ou resíduos agroindustriais têm sido estudada com a finalidade de formular substratos para produção de enzimas (MUKHERJEE *et al.*, 2008; TRAKARNPAIBOON *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2021; JUHNEVICA-RADENKOVA *et al.*, 2021).

O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 11,47 bilhões em 2021 e está projetado para expandir a uma taxa de crescimento anual composta de 6,5% de 2022 a 2030, segundo o GRAND VIEW RESEARCH (2022). A obtenção de enzimas tem sido um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial. A aplicação dessas enzimas, em diferentes setores industriais, deve-se, especialmente, a alguns benefícios operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão, com pouca formação de metabólitos secundários (BAJAJ & MAHAJAN, 2019).

Grande parte das enzimas industriais é produzida por microrganismos, dos quais os maiores produtores são encontrados naturalmente. Esse aspecto vem sendo explorado pela indústria há aproximadamente 50 anos (PATEL *et al.*, 2017). A produção por microrganismos é considerada econômica em grande escala, pois os meios de cultura são relativamente mais viáveis e os ciclos de fermentação são curtos (SANCHEZ & DEMAINE, 2017). Quando comparadas às derivadas de plantas e animais, enzimas provenientes de microrganismos são mais úteis devido à sua grande variedade de atividades catalíticas, rendimento elevado, a facilidade na modificação genética e o acelerado crescimento microbiano em meios que podem ter um custo menor quando comparados à outros tipos (PATEL *et al.*, 2017).

A crescente demanda de celulase está relacionada ao seu relevante uso na indústria têxtil, alimentícia e indústrias de bebidas, papel e celulose, biocombustíveis, detergentes e ração animal (DAVE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013). Comercialmente, a conversão da biomassa celulósica requer a utilização de celulases, tornando o processo caro o que demanda muitos estudos sobre a produção de celulases a partir de uma ampla gama de microrganismos. Portanto, fungos filamentosos têm sido amplamente estudados para esse fim (OLIVEIRA *et al.*, 2014) por serem reconhecidamente produtores de hidrolases, enzimas oxidativas, como celulases, xilanases, amilases e pectinases (MARQUES *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas, devido à abundância e ao baixo custo, a exploração da xilana tornou-se um dos principais objetivos da bioindústria. A bioconversão da hemicelulose tem recebido muita atenção em função de suas aplicações em vários processos industriais, como na indústria de sucos, papel, cervejas, pães, tabaco, tecidos, alimentos, rações, óleos vegetais

e de biocombustíveis, ou seja, com a síntese de produtos de valor agregado (MALGAS *et al.*, 2019; NIETO-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2019). Assim, as xilanases microbianas têm despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores pelo seu potencial biotecnológico para aplicação em escala industrial (BURLACU *et al.*, 2016). Algumas dessas aplicações, por exemplo, são a clarificação de sucos ou cervejas, panificação, amolecimento de frutas para polpas, branqueamento da polpa para sucos, processamento de tabaco, extração de óleos vegetais, recuperação de fibras têxteis, bioconversão de resíduos agrícolas e produção de etanol celulósico (KUMAR *et al.*, 2017, 2018; SHAH *et al.*, 2017).

4.11 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Um dos desafios que a indústria de alimentos enfrenta atualmente é a utilização de subprodutos agroindustriais e resíduos de alimentos. A crescente demanda por produtos alimentícios de origem vegetal, como por exemplo a soja, resultou em um aumento acentuado no desperdício de processamento de alimentos (RADENKOV *et al.*, 2018). Além disso, esses resíduos agrícolas podem ser lançados no meio ambiente sem procedimento de destinação adequado, o que pode causar poluição ambiental e efeitos nocivos aos seres humanos e à saúde animal. A maioria desses resíduos não é tratada e normalmente é queimada ou despejada em aterros não planejados (SADH *et al.*, 2018).

Resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para os processos de cultivo em estado sólido (KAPOOR & NANDAN, 2021). Cascas de soja e farelo de trigo, por exemplo, são subprodutos da indústria de processamento da soja e do trigo e estão comumente disponíveis nas mais diversas localidades do mundo e, portanto, tem potencial como substratos para fermentação industrial. A casca da soja possui uma rica composição celulósica contendo 40-45% de celulose e 30-35% de xilano em base seca (BRIJWANI *et al.*, 2010).

A soja é uma das principais *commodities* produzidas no Brasil, maior produtor mundial, seguido pelos Estados Unidos (EUA). A produção mundial da safra 2021/2022 foi estimada em 352 milhões de toneladas, das quais 271,2 milhões de toneladas foram do Brasil (CONAB, 2022).

A casca de soja é o subproduto do processamento da soja e responde por 5 à 8% da safra de soja. Como coprodutos, as cascas de soja são geradas na proporção aproximada de 50 kg por tonelada de soja (com 13% de umidade) (SIQUEIRA *et al.*, 2008; KARP *et al.*, 2011). É removida mecanicamente durante o processo de descascamento e comercialmente vendida como é ou na forma de *pellets* compactados principalmente para a indústria de rações. Cascas

de soja têm uma composição celulósica rica, notavelmente metade da composição é celulósica (BRIJWANI *et al.*, 2010).

A casca tem valor comercial muito inferior ao do óleo de soja e proteínas, e muitas vezes é incorporada em rações para gado. Alguns esforços de pesquisa se concentraram no pré-tratamento e hidrólise enzimática de cascas em açúcares fermentecíveis comum, a matéria-prima potencial para a produção de etanol (CORREDOR *et al.*, 2008; MIELENZ *et al.*, 2009). Comparativamente, poucas pesquisas, no entanto, examinaram seu potencial como substrato para a produção de enzimas por microrganismos (BRIJWANI & VADLANI, 2011).

O Cultivo em Estado Sólido (CES) também chamado de Fermentação em Estado Sólido (FES) de cascas de soja para a produção de enzimas hidrolíticas é uma forma útil de agregar valor a este subproduto subutilizado e, recentemente tem sido estudada (DE PRETTO *et al.*, 2018; SALAZAR *et al.*, 2020; KARP *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2021; TANRUEAN *et al.*, 2021).

Desta forma, observa-se que o estudo da diversidade de microrganismos potencialmente produtores de enzimas de interesse biotecnológico é de grande relevância para a sociedade, bem como é possível compreender e identificar quais processos e técnicas podem potencializar a capacidade enzimática desses microrganismos. Esses estudos podem ser úteis nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosmética e têxtil, biocombustíveis etc. evidenciando fortes demandas por enzimas que atuem no desenvolvimento de processos industriais de forma sustentável, reduzindo custos de produção e agregando valor a produtos subutilizados.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE DE FUNGOS CELULOLÍTICOS E XILANOLÍTICOS ASSOCIADOS AO TRATO DIGESTÓRIO DE LARVAS DE INSETOS AQUÁTICOS EM RIACHOS DE FLORESTA AMAZÔNICA E CERRADO NO BRASIL

Artigo publicado em *Brazilian Journal of Biology*, vol 82, 2022¹

DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.265681>

¹ Este capítulo apresenta o artigo retraduzido para o Português

Diversidade de fungos celulolíticos e xilanolíticos associados ao trato digestório de larvas de insetos aquáticos em riachos de Floresta Amazônica e Cerrado no Brasil

C. R. Souza^{a,b}, M. F. N. P. Teixeira^a and P. B. Morais^{a*}

^aUniversidade Federal do Tocantins, Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa, Palmas, TO, Brasil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Gurupi, Tocantins, TO, Brasil

*e-mail: moraispb@uft.edu.br

Recebido: 5 de Julho ,2022 – Aceito: 25 de Agosto, 2022

Abstract

The study of the relationship between fungi and insects brings important contributions to the knowledge of fungal biodiversity and to the understanding of mutualistic ecological interactions. This study reports the occurrence of a community of filamentous fungi in the digestive tract (TD) of mining insect larvae belonging to genus *Stenochironomus* in streams of two Brazilian biomes. Fungi were obtained from the digestive tract of larvae found on trunks and leaves of low-order streams in the Amazon Forest and Cerrado in the north of Brazil. The fungal community was screened for xylanolytic and cellulolytic activities. The diversity of fungal species in the TD of larvae is possibly related to the diversity of diets of species of that genus and the diversity of substrates in the ecosystems. The diversity and richness of fungal species were influenced by ecological differences between locations more than by the types of substrates in which they were collected (trunk and leaf). Most fungi in the TD of *Stenochironomus* larvae sampled in leaves exhibited cellulolytic enzyme activity. Such results stress that the mycobiomes of the TD of *Stenochironomus* larvae produce enzymes that contribute to the process of breaking down plant remains in their hosts.

Keywords: biodiversity, fungus-insect interaction, *Stenochironomus*, enzymatic activity.

Resumo

O estudo da relação entre fungos e insetos traz relevantes contribuições para o conhecimento da biodiversidade fúngica e para o entendimento das interações ecológicas mutualísticas. Este estudo relata a ocorrência de uma comunidade de fungos filamentosos no trato digestório (TD) de larvas mineiras de insetos do gênero *Stenochironomus* em riachos de dois biomas brasileiros. Os fungos foram obtidos do trato digestivo de larvas encontradas em troncos e folhas de riachos de baixa ordem na Floresta Amazônica e Cerrado no norte do Brasil. A comunidade fúngica foi triada para atividades xilanolíticas e celulolíticas. A diversidade de espécies fúngicas no TD de larvas possivelmente está relacionada à diversidade de dietas das espécies desse gênero e à diversidade de substratos nos ecossistemas. A diversidade e riqueza de espécies fúngicas foram influenciadas mais pelas diferenças ecológicas entre os locais do que pelos tipos de substratos em que foram coletados (tronco e folha). A maioria dos fungos no TD de larvas de *Stenochironomus* amostradas em folhas exibiu atividade enzimática celulolítica. Tais resultados reforçam que os micobiomas do TD de larvas de *Stenochironomus* produzem enzimas que contribuem para o processo de decomposição de restos vegetais em seus hospedeiros.

Palavras-chave: biodiversidade, interação fungo/inseto, *Stenochironomus*, atividade enzimática.

1 INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos são microrganismos que colonizam praticamente todos os substratos possíveis nos ecossistemas e degradam diversos tipos de substratos orgânicos e alguns inorgânicos (GRAÇA *et al.*, 2016). Participam ativamente dos processos de biodegradação e ciclagem de nutrientes, ajudando, assim, a manter o ecossistema funcionando (VERA-PONCE DE LEÓN *et al.*, 2016). Larvas de insetos do gênero *Stenochironomus* Kieffer (1919) pertencem à ordem Diptera da família Chironomidae, rica em espécies com distribuição mundial, ocorrendo em todas as regiões biogeográficas, exceto na Antártica (PARISE & PINHO, 2016). Essas larvas aquáticas são encontradas minando folhas e troncos submersos em habitats de água doce e, por esse motivo, são considerados verdadeiros xilófagos (PINHO & PEPINELLI, 2014).

Muitos estudos têm buscado entender a relação entre fungos e insetos. Alguns, por exemplo, investigaram as relações endossimbióticas entre térmitas, formigas e fungos (NYGAARD *et al.*, 2016; BIEDERMANN & VEGA, 2020). Outros trabalham para entender o ambiente intestinal dos insetos e como as comunidades fúngicas associadas estão estruturadas nesse ambiente (STEFANI *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2020). No entanto, pouco se conhece sobre a estrutura dos microbiomas de larvas de insetos aquáticos, bem como os fatores que influenciam essas comunidades. Embora as relações simbióticas sejam difíceis de definir, um estudo demonstrou recentemente que o trato digestório (TD) de larvas de insetos aquáticos trituradores do gênero *Phylloicus* spp. (Trichoptera: Calamoceratidae) em regiões de Floresta Amazônica hospedam uma comunidade de fungos filamentosos (presente em 94,9% dos TDs analisados) com algumas evidências de interações com seu hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2018). Estudos argumentam que a comunidade de microrganismos que colonizam o TD de larvas de insetos pode ajudar a complementar a capacidade nutricional do hospedeiro, produzindo enzimas que quebram a parede celular da planta (CALDERÓN-CORTÉS *et al.*, 2012). Como o material vegetal ingerido pelas larvas é altamente refratário, espera-se que microrganismos, como fungos, desempenhem um papel nutricional fundamental para os xilófagos (ALI *et al.*, 2017).

A compreensão da natureza e dos grupos componentes na simbiose entre fungos e insetos aquáticos é de grande interesse não só por contribuir para uma melhor compreensão da biodiversidade e do papel ecológico dos organismos que interagem, mas também do ponto de vista biotecnológico. Os fungos filamentosos representam uma fonte de biocatalisadores metabolicamente versáteis na descoberta de novos produtos e fármacos (GOMES *et al.*, 2018;

ALVES JUNIOR *et al.*, 2019). Assim, este estudo teve como objetivo identificar a diversidade de fungos associados ao trato digestivo de larvas de insetos do gênero *Stenochironomus* que ocorrem em riachos de baixa ordem dos biomas Floresta Amazônica e Cerrado e seu potencial de produção de xilanases e celulases.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A primeira fase do estudo foi realizada em riachos de baixa ordem na Floresta Amazônica (Reserva Florestal Adolpho Ducke – RFAD; Amazonas) em agosto de 2016, e Cerrado (Parque Estadual do Lajeado – PEL; Tocantins) em junho, 2016, no Brasil (Figura 3). Dez pontos de amostragem foram delimitados em cada local em trechos de 200 m de cada córrego. Larvas de insetos ocorreram em apenas cinco riachos da Floresta Amazônica e oito do Cerrado. Essas larvas foram coletadas no substrato disponível (folhas e troncos submersos). Uma rede de imersão em forma de D (malha de 0,500 mm e área de 0,465 m²) foi utilizada para coletar folhas do estoque bentônico ou troncos em estágio avançado de decomposição, que foram triadas em campo para a coleta de larvas mineiras de insetos aquáticos da gênero *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae). As larvas foram identificadas de acordo com TRIVINHO-STRIXINO (2014) por especialistas da área. Cada indivíduo foi transferido para um frasco *Eppendorf* esterilizado contendo 1 mL de solução salina estéril e armazenado por 2 a 4 h em gelo até o processamento no laboratório.

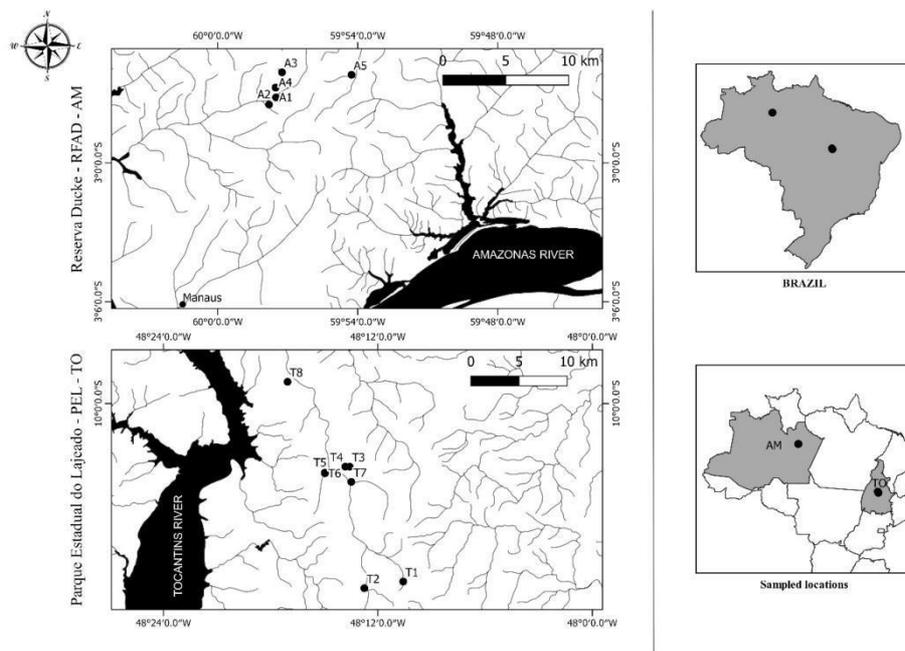


Figura 3. Mapa dos locais de amostragem de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em riachos de baixa ordem na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) no estado do Amazonas

(Bioma Floresta Amazônica) e no Parque Estadual do Lajeado (PEL) no estado do Tocantins, (Bioma Cerrado) Brasil.

2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS

Em laboratório, as larvas foram submetidas à desinfecção da superfície com etanol 70% por 30 segundos e lavadas em água estéril. A dissecação foi realizada com instrumentos esterilizados e estereomicroscópio, e o trato digestório (TD) do inseto mineiro foi cuidadosamente removido, transferido para um tubo e fragmentado com auxílio de um moedor de Teflon previamente esterilizado. Foi adicionada solução salina estéril e, em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi semeada em meio de cultura em placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo batata-dextrose ágar (BDA) suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol em triplicata. As placas foram incubadas a 25°C por até 60 dias. Os isolados fúngicos obtidos foram individualmente transferidos para placas de Petri contendo BDA e incubados a 25±3 °C por sete dias para purificação. Após a obtenção das culturas fúngicas puras, a preservação foi realizada pelo método Castellani (CAPRILES *et al.*, 1989) e depositadas na Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brasil.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Cada indivíduo isolado foi cultivado em placa contendo BDA por 24-48 h e, então, transferido para caldo de extrato de malte (3%), que é um meio mais rico que estimula o crescimento, em agitador rotativo (150 rpm) à temperatura ambiente por sete dias. Em seguida, aproximadamente 40 mg de micélio foram coletadas para extração de DNA com o *Kit Wizard™ Genomic DNA Purification* (Promega, EUA), seguindo o protocolo modificado por Burghoorn *et al.* (2002).

O DNA foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Brasil). Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) foram empregados para amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de rDNA (~600 pb) seguindo o condições de amplificação propostas por Santos *et al.* 2016. Os fragmentos de ITS amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) contendo GelRed™ (Biotium Inc., EUA) e visualizados sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação (Loccus Biotechnology, Brasil). A escada de DNA de 1 Kb (Promega, EUA) foi utilizada como marcador de peso molecular.

Os produtos amplificados foram sequenciados em ambas as direções usando os mesmos iniciadores de PCR em um sequenciador automatizado ABI 3500 XL (*Life Technologies*, EUA) de acordo com Sanger *et al.* (1977) usando um kit de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1* (*Life Technologies*, EUA). O sequenciamento foi realizado pela empresa Myleus Biotechnology (<http://myleus.com/>). Adicionalmente, a amplificação dos genes β -tubulina (Bt2a e Bt2b) foi utilizada para espécies de fungos com baixa variação intraespecífica de acordo com os protocolos estabelecidos por Gonçalves *et al.* (2013).

Todas as sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank usando um algoritmo de alinhamento local para sequências de nucleotídeos BLAST (*Basic Local Alignment Search*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e no CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre*). O alinhamento de sequências das possíveis novas espécies com espécies filogeneticamente próximas e a construção de árvores filogenéticas para confirmação das espécies foram realizados no software MEGA 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004) utilizando o *Neighbor Joining* método com 1.000 vezes *bootstrap*.

2.4 DIVERSIDADE, RIQUEZA E DISTRIBUIÇÃO

A diversidade foi medida através dos índices de Simpson (1-D), Shannon (H'), Margalef e Chao-1, que foram calculados para o número de larvas amostradas de riachos da Floresta Amazônica e Cerrado. As larvas foram consideradas a unidade amostral, sendo os biomas, e não os riachos, a variável de interesse. A β -diversidade foi calculada pelo índice de Whittaker, que mede a substituição na composição de espécies entre substratos e/ou biomas. Os índices foram calculados com 95% de confiança usando o software PAST versão 4.01 (HAMMER *et al.*, 2001).

As variáveis abióticas (altitude, temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade, turbidez, largura, profundidade e velocidade da corrente) de cada riacho foram medidas usando uma sonda multiparamétrica que gerou uma análise de componentes principais (PCA), revelando as variáveis ambientais mais influentes nos riachos de cada bioma.

2.5 SCREENING XILANOLÍTICO E CELULOLÍTICO DA COMUNIDADE FÚNGICA

Toda a comunidade fúngica do TD de larvas de *Stenochironomus* foi testada para a produção de xilanase e celulase através de *screening* em meio sólido contendo xilana ou carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. A produção enzimática foi avaliada através do crescimento da linhagem em uma placa e a revelação do halo de hidrólise usando coloração com vermelho do Congo.

As linhagens foram reativadas em BDA e depois repetidas em triplicata em meio com xilana (*Xylan, Beechwood purified*) ou carboximetilcelulose (CMC) e compostos traço compostos por ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 50; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 50; $Fe (NH_4)_2 (SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 10; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2,5; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05; H_3BO_3 0,05; $Na_2MO 42H_2O$ 0,05; Solução de sais: $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$ 150; KH_2PO_4 250; NH_4NO_3 100; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5) $g \cdot L^{-1}$ e biotina (0,1 $mg mL^{-1}$) 5 mL; 0,2 mL clorofórmio (VOGEL, 1956). Os halos de hidrólise foram revelados de acordo com Maijala *et al.* (1991), onde as placas foram inundadas com 10 mL de solução aquosa de corante vermelho Congo 0,3 g/L (30 min) e descoloridas com solução de cloreto de sódio 1,0 mol / L (15 min).

Após a coloração com vermelho do Congo, os fungos que apresentaram coloração mais clara no meio seletivo (halo de hidrólise) foram considerados produtores de xilanase ou celulase. Um paquímetro digital foi utilizado para medir o diâmetro das colônias e dos halos e assim calcular o índice enzimático (IE) dado pela razão entre essas duas medidas.

3 RESULTADOS

3.1 COMUNIDADES FÚNGICAS

Trinta e cinco larvas de *Stenochironomus* foram coletadas (12 na Floresta Amazônica e 23 no Cerrado) (Tabela 1). Das larvas coletadas no Cerrado, 13 eram habitantes de folhas de plantas caídas nos riachos e dez viviam em troncos submersos. Nos riachos amazônicos, as larvas foram coletadas apenas em troncos submersos. A presença de fungos foi verificada em 100% dos indivíduos coletados em ambos os locais e a média da população fúngica variou de 1,7 a 79 UFC/TD entre os biomas. Os fungos encontrados no TD de larvas de *Stenochironomus* em larvas nos locais amostrados pertenciam a 41 táxons (riqueza total, Tabela 1).

As comunidades de fungos em TD de larvas de *Stenochironomus* apresentaram valores semelhantes de riqueza de espécies (S) e diversidade (Tabela 1), embora o número de larvas amostradas tenha sido quase o dobro no Cerrado do que na Floresta Amazônica. O índice de diversidade de Shannon foi menor no TD das larvas no Cerrado do que na Floresta Amazônica (Tabela 1). Dados os dois substratos diferentes do Cerrado, observou-se que a riqueza (S) foi maior no TD de larvas de folhas do que de troncos, o que também se manteve para o índice de diversidade. O índice Chao - 1, que revela suficiência amostral, foi maior que a riqueza real e maior no TD de larvas de folhas no Cerrado do que em troncos e Floresta Amazônica.

Tabela 1. Número de insetos amostrados, riqueza e diversidade de espécies de fungos filamentosos do trato digestório (TD) de larvas de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em riachos de Floresta Amazônica e Cerrado no Norte do Brasil

Bioma	Substrato	Riacho	Coord. Geográficas	Total de Insetos Coletados	Riqueza (S)	Margalef	Simpson (1 - D)	Shannon (H)	Chao - 1	
Floresta Amazônica	Tronco	A1	02°57'10.30"S; 59°57'30.10"W	N=3	4	6.06	0.95	2.96	54	
		A2	02°57'29.00"S; 59°57'48.00"W	N=3	4					
		A3	02°56'05.30"S; 59°57'14.79"W	N=2	8					
		A4	02°56'44.97"S; 59°57'31.16"W	N=3	3					
		A5	02°56'11.67"S; 59°54'16.00"W	N=1	1					
				N=12	20*					
Cerrado	Tronco	T1	48°10'34.70"O; 10°10'02.30"S	N=3	4	4.15	0.9	2.44	35.5	
		T2	48°12'45.40"O; 10°10'02.30"S	N=2	4					
		T4	48°13'49.30"O; 10°03'33.40"S	N=1	3					
		T5	48°14'58.00"O; 10°03'53.60"S	N=1	1					
		T6	48°14'57.70"O; 10°03'55.90"S	N=1	1					
		T7	48°13'29.10"O; 10°04'25.00"S	N=2	3					
										N= 10
	Folha	T1	48°10'34.70"O; 10°10'02.30"S	N=3	5	5.3	0.93	2.75	68.5	
		T2	48°12'45.40"O; 10°10'02.30"S	N=1	1					
		T3	48°13'34.30"O; 10°03'33.60"S	N=1	1					
		T4	48°13'49.30"O; 10°03'33.40"S	N=2	2					
T6		48°14'57.70"O; 10°03'55.90"S	N=2	2						
T7		48°13'29.10"O; 10°04'25.00"S	N=1	1						
T8		48°17'03.20"O; 09°58'46.30"S	N=3	4						
				N=13	16*					
Riqueza Total				N= 35	41*					

* Número total de táxons excluindo contagens repetidas de cada táxon.

3.2 DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE

Dos tratos digestórios das larvas de *Stenochironomus* amostradas, foram isolados 58 fungos pertencentes a 41 táxons e 13 gêneros (Tabela 2). Os gêneros que apresentaram maior riqueza (S) de táxons foram *Penicillium* (S=11), *Cladosporium* (S=10), *Trichoderma* (S=6) e *Aspergillus* (S=4), respondendo por 75% do número de táxons nas amostras. Esses gêneros, com exceção de *Trichoderma*, ocorreram em ambas as áreas. Entre as espécies, apenas *Cladosporium endophytica* ocorreu em todos os ambientes e substratos (Tabela 2).

O DT de larvas de troncos em riachos da Floresta Amazônica abrigou 20 táxons de fungos pertencentes a 11 gêneros (Tabela 2). Neste bioma os gêneros com maior número de táxons foram *Trichoderma* (S=6) e *Cladosporium* (S=4), o primeiro ocorrendo exclusivamente no TD de larvas da Floresta Amazônica, além de outros seis gêneros (*Acremonium*, *Alternaria*, *Clonostachys*, *Neopestalotiopsis*, *Pyrrhoderma* e *Talaromyces*). *Trichoderma* foi representado por seis táxons, apresentando alta riqueza neste ambiente. As espécies mais frequentes nos riachos da Floresta Amazônica foram *Cladosporium endophytica*, *Cladosporium kenpeggii* e *Penicillium shearii*. Outros gêneros exclusivos de amostras em riachos da Floresta Amazônica foram representados por *singletons* (Tabela 2). Embora a maioria dos táxons tenha ocorrido exclusivamente neste ambiente, dois foram compartilhados com a comunidade fúngica no DT de larvas de troncos em riachos do Cerrado: *Cladosporium kenpeggii* e *Penicillium shearii*.

A partir do TD de larvas de troncos em riachos do Cerrado, foram identificados 13 táxons de fungos pertencentes a três gêneros: *Aspergillus* (S=3), *Cladosporium* (S=3) e *Penicillium* (S=7), sendo esse último o mais abundante (Tabela 2). A partir do DT de larvas mineiras de folhas em riachos do Cerrado, foram identificados 16 táxons de fungos pertencentes a seis gêneros. Os gêneros mais frequentes foram *Cladosporium* (S=6) e *Penicillium* (S=6). Destes, quatro táxons também ocorreram no DT de larvas de troncos em riachos do Cerrado: *Cladosporium endophytica*, *Aspergillus sydowii*, *Penicillium camponotum* e *Penicillium paxilli*. A espécie mais frequente naquele substrato e ambiente foi *Penicillium citrinum*.

Das espécies encontradas em larvas coletadas nos riachos de ambos os locais (Floresta Amazônica e Cerrado), *Cladosporium endophytica*, *Cladosporium kenpeggii* e *Penicillium shearii* apresentaram a maior frequência total de ocorrência (6,9%, 5,2% e 5,2%, respectivamente). Independentemente do substrato, 22 táxons ocorreram apenas no TD de larvas do Cerrado e 15 como *singletons*. *Penicillium mallochii* e *Penicillium paxilli* tiveram

maior frequência de ocorrência (6,9% cada). Dezesete táxons foram isolados apenas no TD de larvas de troncos na Floresta Amazônica, todos ocorrendo como *singletons*.

Sete táxons de *Cladosporium* não puderam ser identificados por ITS, sendo dois de TD de larvas na Floresta Amazônica e cinco no Cerrado (Tabela 2). Um táxon de *Trichoderma* e um de *Penicillium* isolados no TD de larvas em troncos em riachos da Floresta Amazônica e troncos no Cerrado, respectivamente, também não puderam ser identificados em nível de espécie. A β -diversidade calculada pelo índice de Whittaker foi maior entre o TD de larvas de folhas do Cerrado e troncos amazônicos, caracterizando maior heterogeneidade entre esses biomas e substratos (Tabela 3).

Diferenças nos parâmetros físico-químicos da água nos riachos amostrados foram detectadas entre os locais da Floresta Amazônica e os locais do Cerrado (Tabela 4). A altitude média dos riachos da Floresta Amazônica ficou em torno de 54 m, enquanto que os de Cerrado tiveram altitude média de 506 m. A temperatura média dos riachos na Floresta Amazônica foi mais alta do que no Cerrado em cerca de 2 °C. As águas dos riachos da Floresta Amazônica foram ácidas e apresentaram maior condutividade elétrica e profundidade em relação aos riachos do Cerrado.

A Análise dos Componentes Principais (PCA) mostrou que os riachos em cada bioma foram agrupados e, juntos, os componentes 1 e 2 explicaram 73,99% da variação (Figura 4). Os parâmetros ambientais mais influentes nos riachos amazônicos foram temperatura e condutividade, enquanto os riachos do Cerrado foram mais influenciados pela altitude, pH, turbidez, OD e velocidade da corrente.

3.3 POTENCIAL ENZIMÁTICO

Os isolados fúngicos do TD de larvas de *Stenochironomus* apresentaram perfil enzimático responsivo a xilana e celulose. Entre os isolados de troncos em riachos da Floresta Amazônica, 60,9% exibiram atividade xilanolítica e 52,2% exibiram atividade celulolítica (CMCase) (Figura 5A). Neste bioma, os isolados que apresentaram os maiores índices enzimáticos (IE) quando testados para xilanase foram *Cladosporium endophytica* MN577266, *Acremonium fusidioide* MN577262 e *Cladosporium kenpeggii* MN577256 (Tabela 2). Para a celulase, o isolado com maior IE foi *Cladosporium kenpeggii* MT508668.

Entre os isolados do TD de larvas de *Stenochironomus* em troncos de riachos do Cerrado, a mesma porcentagem de atividade enzimática foi observada tanto para celulase quanto para xilanase (77,8%) (Figura 5B). Neste bioma, os seguintes isolados se destacaram por apresentarem o maior IE para xilanase: *Cladosporium endophytica* MN577273, *Cladosporium* sp4 T9STC2 e *Penicillium shearii* MN577260 (Tabela 2). Para atividade

celulolítica, *Aspergillus sydowii* T5STA5 e *Cladosporium endophytica* MN577273 se destacaram com o maior IE (Tabela 2).

Tabela 2. Táxons fúngicos obtidos do trato digestório (TD) de larvas de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em troncos e folhas nos riachos de Floresta Amazônica e Cerrado no norte do Brasil identificados por comparação com sequência BLASTn correspondentes de acordo com banco de dados NCBI GenBank e seus respectivos Índices Enzimáticos (IE)

BIOMA CÓDIGO*	Táxons	IE	IE	Nº de Acesso no GenBank	Nº de pares de bases analisadas	Query cover %	Identidade (%)	Meu número GenBank	
		(Xilanase) Med ± Desv	(Celulase) Med ± Desv						
Troncos de Floresta Amazônica	A5STA1	<i>Acremonium fusidioide</i>	2.42 ± 0.05	1.61 ± 0.08	NR_130687.1	385	100	98.7	MN577262
	A4STB1	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	0	0	NR_163686.1	508	98	100	MN577251
	A2STA3	<i>Aspergillus costaricaensis</i>	1.12 ± 0.12	0.00	MH862988.1	476	100	100	MN954942
	A4STA5	<i>Cladosporium endophytica</i>	1.89 ± 0.3	1.96 ± 0.3	NR_158360.1	468	100	100	MN577241
	A2STB3	<i>Cladosporium endophytica</i>	3.6 ± 0.23	1.73 ± 0.38	NR_158360.1	446	100	99.1	MN577266
	A4STB7	<i>Cladosporium kenpeggii</i>	0.67 ± 0.03	2.18 ± 0.03	KY646222.1	411	100	99.27	MT508668
	A5STA4	<i>Cladosporium kenpeggii</i>	2.21 ± 0.27	1.75 ± 0.03	KY646222.1	456	100	99.56	MN577256
	A1STA4	<i>Cladosporium</i> sp1***	1.46 ± 0.33	1.34 ± 0.00					
	A5STB2	<i>Cladosporium</i> sp2***	1.41 ± 0.59	1.92 ± 0.66					
	A4STA4	<i>Clonostachys rosea</i>	1.15 ± 0.04	1.03 ± 0.01	MH854911.1	410	99	99.76	MN577252
	A1STC2	<i>Fusarium luffae</i>	0	1.03 ± 0.03	MK280807.1	433	100	100	MN577248
	A4STB2	<i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i>	0	1.09 ± 0.01	KM199343.1	434	99	100	MN577253
	A1STA6	<i>Penicillium chermesinum</i>	1.82 ± 0.03	0.00	MH861332.1	259	100	100	MN577265
	A2STC3	<i>Penicillium shearii</i>	1.29 ± 0.28	0.00	AF033420.1	493	100	99.6	MN577249
	A2STC2	<i>Penicillium shearii</i>	1.42 ± 0.2	1.16 ± 0.07	AF033420.1	477	100	99.58	MN577250
	A5STC4	<i>Pyrrhoderma</i> sp***	0	0					
	A2STA1	<i>Talaromyces stolii</i>	1.6 ± 0.1	1.14 ± 0.06	NR_111781.1	473	100	100	MN577254
	A4STA1b	<i>Trichoderma asperellum</i>	0.86 ± 0.34	0	MH021852.1	259	100	100	MN954939
	A4STB5	<i>Trichoderma breve</i>	0	0	NR_154574.1		99	99.57	MT508669
	A1STB1	<i>Trichoderma inhamatum</i>	0	0	MH861135.1	370	100	100	MN954947
	A8STA1	<i>Trichoderma</i> sp***	0	0					
	A4STA1a	<i>Trichoderma spirale</i>	0	0	NR_077177.1	505	100	99.6	MN577239
	A4STA2	<i>Trichoderma yunnanense</i>	0	0	NR_134419.1	309	100	100	MN954943

Troncos de Cerrado	T5STA2	<i>Aspergillus niger</i>	1.16 ± 0.01	1.09 ± 0.03	AY373852.1	615	100	100	MN577245
	T6STA2	<i>Aspergillus niger</i>	1.51 ± 0.04	0.00	AY373852.1	469	100	100	MN954948
	T9STA2	<i>Aspergillus nomius</i>	0.77 ± 0.27	0.00	NR_121218.1	432	100	100	MN954946
	T5STA5	<i>Aspergillus sydowii</i>	1.09 ± 0.03	1.9 ± 0.08	NR_131259.1	448	100	100	MN577244
	T3STC1	<i>Cladosporium endophytica</i>	3.12 ± 0.02	1.88 ± 0.12	NR_158360.1	435	100	100	MN577273
	T2STA1	<i>Cladosporium kenpeggii</i>	1.98 ± 0.1	1.71 ± 0.02	KY646222.1	433	100	100	MN577259
	T9STC2	<i>Cladosporium</i> sp4***	2.56 ± 0.33	1.51 ± 0.11					
	T9STC3	<i>Penicillium mallochii</i>	1.41 ± 0.08	1.34 ± 0.04	NR_111674.1	465	99.57	99	MN954945
	T3STC2	<i>Penicillium cairnsense</i>	1.59 ± 0.2	1.61 ± 0.23	NR_121508.1	341	100	99.12	MN577242
	T2STB4	<i>Penicillium camponotum</i>	1.4 ± 0.24	1.39 ± 0.07	NR_158823.1	449	100	98.66	MN577268
	T7STA1	<i>Penicillium exsudans</i>	1.24 ± 0.03	1.39 ± 0.02	NR_153273.1	305	100	100	MN577247
	T3STA5	<i>Penicillium mallochii</i> **	0	1.42 ± 0.06					
	T3STA4	<i>Penicillium mallochii</i> **	0	1.54 ± 0.04					
	T5STA8	<i>Penicillium paxilli</i>	0	1.31 ± 0.09	MH856391.1	305	100	100	MN577267
	T2STB5	<i>Penicillium paxilli</i>	0	0	MH856391.1	472	100	100	MN577255
	T3STA3	<i>Penicillium paxilli</i>	1.38 ± 0.19	1.5 ± 0.13	MH856391.1	165	100	100	MN577261
	T2STC1	<i>Penicillium shearii</i>	2.14 ± 0.02	0	MH856346.1	252	100	100	MN577260
	T3STA2	<i>Penicillium</i> sp***	1.21 ± 0.25	1.16 ± 0.06					
Folhas de Cerrado	T2SA1	<i>Aspergillus sydowii</i>	2.69 ± 0.39	1.92 ± 0.08	NR_131259.1	413	100	99.76	MN577240
	T2SB6	<i>Cladosporium endophytica</i>	1.98 ± 0.31	1.82 ± 0.29	NR_158360.1	423	100	99.05	MN577269
	T2SB5	<i>Cladosporium halotolerans</i>	2.26 ± 0.25	1.95 ± 0.26	KJ596569.1	266	100	100	MN577258
	T7SC1	<i>Cladosporium</i> sp3***	0	2.06 ± 0.07					
	T9SB1	<i>Cladosporium</i> sp5***	1.56 ± 0.27	1.89 ± 0.03					
	T10SB2	<i>Cladosporium</i> sp6***	1.31 ± 0.03	1.37 ± 0.08					
	T10SB3	<i>Cladosporium</i> sp7***	0	1.39 ± 0.09					
	T10SA1	<i>Curvularia lunata</i>	0	1.1 ± 0.04	LT631353.1	358	100	100	MN577272
	T5SB7	<i>Fusarium pseudonygamai</i>	0	0	MH862656.1	385	100	100	MN577270
	T5SA4	<i>Paraphaeosphaeria arecacearum</i>	0	0	NR_145166.1	379	100	99.74	MN954941
	T2SB4	<i>Penicillium camponotum</i>	1.09 ± 0.17	0	NR_158823.1	512	100	98.63	MN577257

T4SC1	<i>Penicillium citrinum</i>	1.12 ± 0.07	1.54 ± 0.02	MH856132.1	239	100	100	MN577264
T2SC6	<i>Penicillium mallochii</i>	1.07 ± 0.1	0.00	NR_111674.1	470	100	99.58	MN954940
T7SB1	<i>Penicillium multicolor</i>	1.13 ± 0.3	1.22 ± 0.13	JN799647.1	422	100	99.29	MN577246
T3SB2	<i>Penicillium paxilli</i>	0	1.39 ± 0.1	MH856391.1	366	100	100	MN954944
T10SC1	<i>Penicillium quebecense</i>	1.11 ± 0.03	1.11 ± 0.04	NR_121507.1	304	100	100	MN577271
T5SA3	<i>Pennicillium citrinum</i>	1.94 ± 0.27	1.54 ± 0.29	MH856132.1	302	100	100	MN577243

*Código da Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa – Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins;

**Identificado com β -tubulina e não depositado;

*** Prováveis novas espécies. Identificação a nível de espécies não foi possível usando os *primers* disponíveis

Dos fungos encontrados no TD de larvas de *Stenochironomus* em folhas de riachos do Cerrado, 62,5% exibiram atividade xilanólítica e 81,2% exibiram atividade celulolítica (Figura 5C). Nesse bioma e substrato, *Aspergillus sydowii* T2SA1 e *Cladosporium halotolerans* MN577258 se destacaram por apresentarem o maior IE para xilanase (Tabela 2). Na produção de celulase, *Cladosporium* sp3 T7SC1, *Cladosporium halotolerans* MN577258 e *Aspergillus sydowii* MN577240 atingiram os maiores índices enzimáticos (Tabela 2).

Tabela 3. β -diversidade de comunidades de fungos filamentosos do trato digestório (TD) de larvas de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) em riachos de Floresta Amazônica e Cerrado no norte do Brasil

	Troncos de Floresta	Folhas de Cerrado	Troncos de Cerrado
Troncos de Floresta	-	0.944	0.818
Folhas de Cerrado		-	0.655
Troncos de Cerrado			-

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos dos riachos amostrados em Floresta Amazônica e Cerrado no norte do Brasil

Parâmetros*	Floresta Amazônica	Cerrado
Altitude (m)	54 ± 18.05	506 ± 99.5
Temperatura (°C)	25.32 ± 0.4	23.02 ± 0.75
Turbidez	0.87 ± 0.64	1.77 ± 0.87
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5.95 ± 0.36	7.6 ± 1.83
pH	4.54 ± 0.12	6.03 ± 0.61
Conductivity electrical (mS cm ⁻¹)	19.42 ± 3.68	5.99 ± 3.43
Largura (m)	1.98 ± 0.65	2.23 ± 0.87
Profundidade (m)	0.28 ± 0.15	0.20 ± 0.11
Velocidade da correnteza (m s ⁻¹)	0.11 ± 0.05	0.22 ± 0.16

*Média Aritmética ± desvio padrão

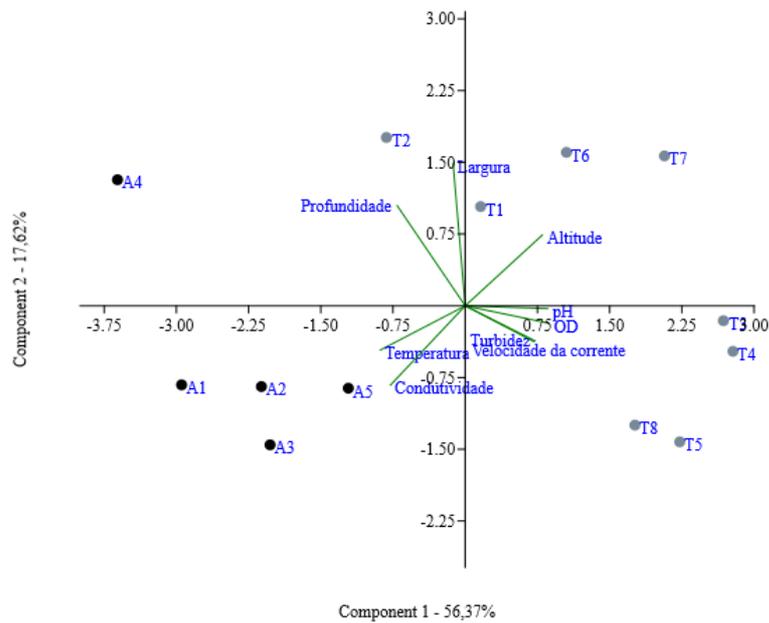


Figura 4. Análise dos Componentes Principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos dos riachos amostrados em Floresta Amazônica - Amazonas (A) e Cerrado - Tocantins (T) no norte do Brasil.

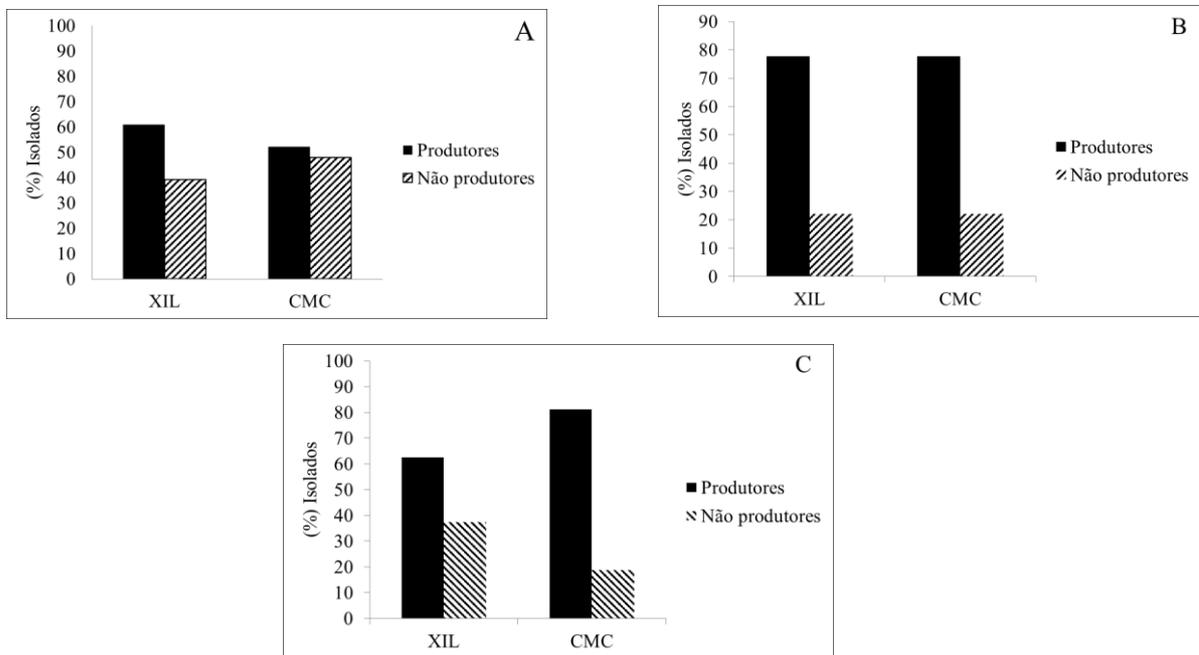


Figura 5. Porcentagem de isolados fúngicos do TD de larvas de *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) de troncos em Floresta Amazônica (A), troncos em Cerrado (B) e folhas em Cerrado (C) produtores e não produtores de xilanase (XIL) e celulase (CMC).

4 DISCUSSÃO

4.1 FUNGOS DO TD DE LARVAS DE *Stenochironomus*

Uma diversa comunidade de fungos dominados por ascomicetos e ocorrendo como *singletons* foi encontrada no TD de larvas de *Stenochironomus* em riachos da Amazônia e Cerrado no Brasil. Em ambos os biomas, os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus* foram prevalentes na comunidade fúngica. Eles diferem da comunidade fúngica encontrada no TD de larvas de *Phylloicus* em riachos das mesmas localidades, nos biomas Cerrado e Floresta Amazônica, em que prevaleceram os gêneros *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* (SANTOS *et al.*, 2018).

Vários autores relatam a abundância desses gêneros associados à TD de insetos (BELMONT-MONTEFUSCO *et al.*, 2020a; TEIXEIRA *et al.*, 2022; ROMÃO *et al.*, 2024). *Penicillium* e *Aspergillus*, que tiveram a maior ocorrência no TD de larvas de troncos em riachos de Cerrado, também foram frequentes em associação com larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) de diversos tipos de criadouros em municípios da Amazônia brasileira (PEREIRA *et al.*, 2009). Fungos do gênero *Penicillium* foram relatados em *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) como um dos gêneros mais frequentes (VERA-PONCE DE LEÓN *et al.*, 2016).

As larvas de dípteros podem adquirir alguns de seus endossimbiontes do próprio ambiente e a estrutura do microbioma pode variar muito devido à especialização da dieta, ciclo de vida, localização e substrato de ocorrência (ALVES JUNIOR *et al.*, 2019). É possível que fungos hospedados no TD de larvas de *Stenochironomus* em riachos da Floresta Amazônica e Cerrado possam estar mais relacionados ao material vegetal ingerido por essas larvas, considerando os gêneros que foram repetidamente encontrados em seus TDs e seu potencial para produção de enzimas, por exemplo, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*.

4.2 INFLUÊNCIA DO BIOMA NA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES

Embora os resultados tenham indicado um microbioma comum entre os biomas e substratos estudados, algumas diferenças foram evidenciadas. Por exemplo, o TD de larvas em folhas em riachos de Cerrado teve o gênero *Cladosporium* como o mais frequente, enquanto fungos do gênero *Penicillium* foram os mais frequentes no TD de larvas em troncos no mesmo ambiente. O gênero *Trichoderma* foi encontrado exclusivamente no TD de larvas em troncos em riachos da Floresta Amazônica. Tal resultado indica que, embora possa haver um microbioma típico do TD de larvas aquáticas que se alimentam de material vegetal, a ocorrência de determinados táxons pode ser influenciada tanto pelas diferenças entre os biomas quanto pelos substratos que são fontes de fungos para o TD de larvas.

A β -diversidade foi alta entre a comunidade fúngica do TD de *Stenochironomus* nos dois biomas amostrados, reforçando a ideia de que o bioma tem grande influência na composição do fungo na dieta dessas larvas. Em lagartas da espécie *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), HANNULA *et al.* (2019) mostraram que os microbiomas refletem seu ambiente (solo) e, como os microbiomas do solo variam temporal e espacialmente, isso também pode impactar o microbioma da lagarta.

A vegetação de cada bioma possui composição fitoquímica diferenciada, e também é provável que a micobiota endofítica e epifítica dessas espécies vegetais seja geograficamente diversa. Assim, conhecendo as variações na fisionomia da mata ciliar da Floresta Amazônica e do Cerrado, e que diferentes espécies de plantas compõem tais matas ciliares, espera-se que o micobioma reflita essas diferenças. Outro trabalho mostrou que existem diferentes comunidades fúngicas nas folhas de diferentes espécies de plantas em riachos (MEDINA-VILLAR *et al.*, 2015). Portanto, deve-se esperar que fatores biogeográficos possam determinar a micobiota intestinal das larvas, uma vez que as larvas dependem de substratos vegetais, que fornecem não apenas os nutrientes, mas também parte do micobioma para elas.

Outra hipótese que explica as diferenças na comunidade fúngica entre os biomas é que a contribuição para os estoques de alimentos disponíveis para as larvas nos riachos pode variar geograficamente e sazonalmente. Tonin *et al.* (2017) encontraram evidências consistentes de sazonalidade na queda da serapilheira na Amazônia e Cerrado. Segundo esses autores, o tempo de entrada de material vegetal é diferente para cada um desses biomas, o que certamente influencia na disponibilidade de alimento para as larvas nesses riachos e, conseqüentemente, na estrutura do micobioma associado.

Embora tenha havido um maior esforço amostral nos riachos do Cerrado, o índice de riqueza (Margalef) e os índices de diversidade (Shannon e Simpson) foram maiores no TD de larvas em riachos amazônicos (Tabela 1). A análise de componentes principais (PCA) mostrou diferenças nos parâmetros ambientais que influenciaram cada córrego, o que pode ter favorecido a distinção entre os índices de diversidade e riqueza. Os parâmetros ambientais mais influentes nos riachos amazônicos foram temperatura e condutividade. Leal *et al.* (2016) ao estudar a avaliação multiescala de mudanças induzidas pelo homem em habitats de afluentes na Amazônia descobriram que o desmatamento da bacia resultou em riachos consistentemente mais quentes e a condutividade pode sofrer influências de cruzamentos de estradas. A Reserva Florestal Adolpho Ducke é vizinha da cidade de Manaus, o que pode ser um condutor das características hídricas dos riachos. Como Lima *et al.* (2022) mostraram, a temperatura da água e outras variáveis ambientais afetam os grupos funcionais de alimentação de insetos aquáticos. Os riachos do Cerrado foram mais influenciados pela altitude, pH,

turbidez, OD e velocidade da corrente. Nesse bioma, os riachos são propensos a intermitência e mudanças em OD e velocidade da corrente podem direcionar os padrões de insetos aquáticos (VALENTE-NETO *et al.*, 2020). Diferenças nas variáveis ecológicas nos biomas, além de contribuir para uma composição vegetal distinta, podem influenciar as estruturas das comunidades microbianas, pois interferem na composição química dos solos e da água (SHI *et al.*, 2011).

4.3 INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES

Nos riachos de Cerrado, foram encontradas diferenças na composição da comunidade fúngica no TD de larvas de *Stenochironomus* mineradoras de folhas e troncos (Tabela 1). Isso indica que o substrato pode influenciar na composição do microbioma no TD de larvas de *Stenochironomus*. Se as larvas adquirem o microbioma através de sua dieta, essa diferença pode ser devido às diferentes comunidades fúngicas de folhas e troncos. Diferentes tecidos vegetais são geralmente colonizados por diferentes comunidades fúngicas (MARTINS *et al.*, 2016), sugerindo que algumas espécies endofíticas podem se desenvolver preferencialmente em certos tipos de tecidos.

As larvas de *Stenochironomus* apresentam adaptações que favorecem sua sobrevivência sob as más condições nutricionais da madeira (ANDERSON & CUMMINS, 1979). No entanto, evidências de observações em campo mostram que a diversidade de substratos foliares é maior do que de troncos e que sua disponibilidade é maior em todos os trechos de riachos tropicais. Embora haja variação sazonal, alguns trabalhos têm demonstrado que, em ecossistemas lóticos, principalmente em riachos de baixa ordem, os detritos foliares são a principal forma de aporte energético (ABELHO, 2009; FIORI *et al.*, 2016).

Verificou-se que a comunidade fúngica associada a larvas em troncos na Floresta Amazônica foi mais xilanolítica do que celulolítica (XIL=60,9% e CMC=52,2%) (Figura 5A). A comunidade fúngica associada a larvas em folhas no Cerrado foi mais celulolítica (XIL=62,5% e CMC=81,2%) (Figura 5C). Corroborando tal resultado, BELMONT-MONTEFUSCO *et al.* (2020b), avaliaram a atividade celulolítica de fungos associados à TD de larvas de *Stenochironomus* de folhas em riachos amazônicos e constataram que 86,6% dos isolados eram produtores desta enzima. Supõe-se, portanto, que uma das adaptações das larvas de *Stenochironomus* esteja relacionada à obtenção de fungos que auxiliam na digestão de materiais mais refratários como troncos ou lábeis como folhas, conforme sua disponibilidade. É possível que tais adaptações ajudem a obter alimentos dos diferentes substratos disponíveis no ambiente.

Outra variável que pode influenciar na composição fúngica é a fase do ciclo e a idade larval. Embora informações sobre detalhes do ciclo de vida de *Stenochironomus* ainda sejam escassas, sabe-se que a duração dos estágios de desenvolvimento dos quironomídeos varia em função das características ambientais. Períodos curtos ocorrem principalmente quando as temperaturas são mais altas, na faixa de 25 °C, quando a duração do período larval é, em média, dez dias (TRIVINHO-STRIXINO, 2014). Essa condição é muito próxima das encontradas nos locais amostrados, o que favorece um ciclo mais curto e resulta em tempo insuficiente para a colonização de espécies fúngicas no TD.

O número de *singletons* foi significativo, tanto em Floresta Amazônica quanto em Cerrado, indicando que poucas espécies realmente colonizaram o TD desse hospedeiro. Embora não haja estudos sobre preferências alimentares de ínstaes larvais de Diptera, pode-se supor que diferentes ínstaes tenham preferências significativas o suficiente para explicar a diversidade de táxons, bem como as baixas frequências de espécies fúngicas. TEIXEIRA *et al.* (2022), ao estudarem a comunidade fúngica TD de larvas aquáticas trituradoras, registraram uma alta ocorrência de *singletons*, conseqüentemente resultando em uma alta diversidade de espécies fúngicas. Os autores atribuíram a fatores como a influência de diferentes condições ambientais, dietas das espécies e ciclos de vida dos insetos.

Os resultados apontam para um microbioma principal comum a diferentes biomas e substratos, sugerindo que, embora existam diferenças nos substratos, alguns táxons fúngicos podem ser selecionados pelas larvas. É possível que o intestino do hospedeiro selecione seu próprio microbioma de acordo com suas necessidades. Shukla *et al.* (2018) observaram que larvas do besouro *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae) podem transformar um alimento inicialmente tóxico em nutritivo selecionando fungos. Assim, apesar da influência do bioma e dos substratos na estrutura do microbioma, é possível que o TD das larvas de *Stenochironomus* estabeleça um filtro ambiental que seleciona seu próprio microbioma, optando por alguns táxons fúngicos em detrimento de outros, resultando em uma comunidade núcleo independente de locais ou substratos dietéticos.

4.4 PAPEL DO MICROBIOMA NA TD DE LARVAS DE *Stenochironomus*

Muitos estudos se concentram na compreensão dos vários papéis do microbioma em larvas de insetos e insetos adultos. Sabe-se que a composição dos microbiomas intestinais em insetos adultos é estruturada através da dieta e do sistema imunológico inato (STEFANI *et al.*, 2016; VERA-PONCE DE LEÓN *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2020). Os presentes resultados mostram uma comunidade fúngica diversificada com potencial para a quebra de xilana e celulose. Embora a maioria dos isolados tenha exibido atividade para a produção de ambas as

enzimas, a avaliação da atividade enzimática por substrato mostrou que os isolados do TD de larvas em troncos no Cerrado foram mais ativos para a produção de xilanase enquanto os isolados do TD de larvas das folhas maior atividade enzimática para celulase.

Sabe-se que a produção de enzimas que quebram a parede celular é regulada no nível transcricional dos fungos filamentosos, o que garante que as enzimas sejam produzidas em condições nas quais o fungo precisa utilizar polímeros vegetais como fontes de energia e carbono (ARO *et al.*, 2005). Além disso, evidências de extensos trabalhos indicam que o ambiente intestinal da larva de Diptera é abundante em organismos endossimbiontes e que alguns produzem enzimas capazes de metabolizar o material lignocelulósico ingerido como alimento (PENNINGTON *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016). Tal resultado pode indicar que os fungos, além de fazerem parte da dieta das larvas, estão adaptados ao substrato, uma vez que podem produzir enzimas necessárias ao processamento do alimento das larvas, como outros trabalhos demonstraram (ARO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2018; SHELOMI *et al.*, 2019).

5 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou uma diversidade significativa da comunidade fúngica associada ao TD de *Stenochironomus* em riachos da Amazônia e Cerrado no norte do Brasil. Evidências indicam que tanto os biomas quanto os substratos podem influenciar a estrutura do microbioma de larvas de *Stenochironomus* e, por esse motivo, a diversidade fúngica foi maior em larvas de riachos amazônicos. Este estudo contribui para o conhecimento dos papéis ecológicos nas interações que ocorrem entre fungos e larvas de insetos do gênero *Stenochironomus*, pois fornecemos evidências da produção de enzimas pelos fungos que auxiliam na digestão dos substratos utilizados como alimento por aqueles larvas. A presença de espécies fúngicas pouco exploradas, que aqui apresentaram resultados interessantes para a produção de enzimas como xilanase e celulase, indica que há boas chances de que novos estudos aprofundem o conhecimento na aplicação biotecnológica do potencial enzimático dessas espécies.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o financiamento do projeto Edital Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia nº 79/2013; a equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins pelo suporte técnico; Dr. Taídes Tavares dos Santos, que nos auxiliou no sequenciamento das amostras de fungos; à equipe do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos – LACIA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

- INPA, em especial a Dra. Neusa Hamada, Dra. Ruth Leila Ferreira-Kepler e Dra. Gizelle Amora Gusmão pelo trabalho de campo na coleta e identificação de larvas de *Stenochironomus*..

CAPÍTULO II

COQUETEL ENZIMÁTICO OBTIDO POR CONSÓRCIOS FÚNGICOS ISOLADOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS AQUÁTICOS PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES A PARTIR DA HIDRÓLISE DE CASCA DE SOJA²

² Artigo em preparação para submissão

Coquetel enzimático obtido por consórcios fúngicos isolados do trato digestório de insetos aquáticos para produção de açúcares a partir da hidrólise de casca de soja

C.R. SOUZA^{a,b}, M.F.N.P. TEIXEIRA^a, A.F. ALMEIDA^c, P.B. MORAIS^a

^a Universidade Federal do Tocantins, Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia e Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa, Palmas, TO, Brasil.

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil.

^c Universidade Federal do Tocantins, Programa De Pós-Graduação em Ciência E Tecnologia de Alimentos, Palmas, TO, Brasil.

ABSTRACT

Consortia of fungi grown on agro-industrial residues represent an alternative for producing enzymatic cocktails in bioconversion processes of lignocellulosic material into fermentable sugars. This study aimed to develop mixed cultures of filamentous fungi isolated from the digestive tract of aquatic insects, to verify the potential for producing plant material degrading enzymes in Solid State Cultivation (SSC) and to evaluate the saccharification and glucose content produced by these consortia. The isolates were obtained from the digestive tract of aquatic insects, and submitted to screening in CES using soybean hulls as substrate for selecting strains with higher cellulite and xylanolytic activities and subsequent compatibility tests. In total, 25 lines were tested in SSC using soybean hulls as substrate. Of these, nine were selected to form 18 interactions, and 12 were considered compatible with forming consortia. The results showed that most fungal consortia resulted in higher production of xylanase and cellulase than monocultures. The *Trichoderma yunnanense*/*Penicillium shearii* consortium increased xylanase production by 9.26 times when compared to *P. shearii* monoculture. The enzymatic hydrolysis of soybean hulls using these consortia's enzymatic cocktails indicated superior results compared to monocultures and the commercial enzyme. Thus, these results demonstrate the importance of continuing to investigate underexplored species for enzyme production and showing alternative techniques for producing enzyme cocktails.

Key-words: Xylanase, Cellulase, mixed culture, synergism

RESUMO

Consórcios de fungos cultivados sobre resíduos agroindustriais representam uma alternativa para a produção de coquetéis enzimáticos em processos de bioconversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis. Os objetivos deste estudo foram desenvolver cultivos mistos de fungos filamentosos isolados do trato digestivo de insetos aquáticos, verificar o potencial de produção de enzimas degradantes de material vegetal em Cultivo em Estado Sólido (CES) e avaliar a sacarificação e teor de glicose produzidos por esses consórcios. Os isolados foram obtidos do trato digestório de insetos aquáticos, submetidos ao *screening* em CES utilizando a casca da soja como substrato, para seleção das linhagens com maiores atividades celulolíticas e xilanolíticas e posterior testes de compatibilidade. No total, 25 linhagens foram testadas em CES utilizando a casca da soja como substrato. Dessas, nove foram selecionadas para formar 18 interações e 12 interações foram consideradas compatíveis para formar consórcios. Os resultados mostraram que a maior parte dos consórcios fúngicos resultou em maior produção de xilanase e celulase quando comparados aos monocultivos. O consórcio *Trichoderma yunnanense*/*Penicillium shearii* aumentou em 9,26 vezes a produção de xilanase quando comparado ao monocultivo de *P. shearii*. A hidrólise enzimática de casca da soja utilizando o coquetel enzimático desses consórcios indicou resultados superiores quando comparados aos monocultivos e à enzima comercial. Assim, esses resultados demonstram a importância de continuar investigando espécies pouco exploradas para produção enzimática, bem como evidencia técnicas alternativas para a produção de coquetéis enzimáticos.

Palavras-chaves: Xilanase, Celulase, cultura mista, sinergismo

1 INTRODUÇÃO

A degradação da biomassa vegetal em ambientes naturais é um processo complexo que envolve diversas comunidades microbianas com a capacidade metabólica de quebrar esses polímeros estruturais. Muitos trabalhos têm demonstrado que fungos provenientes do trato digestório de insetos são microrganismos potencialmente interessantes do ponto de vista biotecnológico devido à sua capacidade de produção de enzimas degradantes de polímeros complexos (SANTOS *et al.*, 2018, 2019, 2021; SOUZA *et al.*, 2022; TEIXEIRA *et al.*, 2022).

Nesse ambiente, fungos podem estabelecer consórcios com outros microrganismos (outros fungos e/ou bactérias) que desempenham papéis cruciais na degradação da matéria vegetal e, portanto, na ciclagem do carbono (SISTA KAMESHWAR & QIN, 2018). Os polissacarídeos celulose e hemicelulose são os principais constituintes da biomassa vegetal. A deslignificação e a quebra sequencial de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis são etapas cruciais para a bioconversão de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado, como bioprodutos, ração, alimentos, extratos enzimáticos e biocombustíveis (KUMAR & CHANDRA, 2020; TIŠMA *et al.*, 2021).

Assim, as espécies de fungos que degradam material vegetal e suas enzimas são alguns dos catalisadores biológicos mais valiosos no desenvolvimento de biorrefinação sustentável (GONZÁLEZ *et al.*, 2021). A hidrólise enzimática da celulose para glicose e outros carboidratos fermentescíveis é uma etapa chave no processo de produção de biocombustíveis. Fungos filamentosos são a principal fonte de enzimas comerciais capazes de hidrolisar materiais vegetais, como resíduos agroindustriais, por exemplo. Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido considerados os mais produtivos e comerciais para produção de enzimas de interesse biotecnológico para produção em escala industrial por muitas empresas em todo o mundo (GUSAKOV, 2011), incluindo seu co-cultivo com outras espécies fúngicas (COPETE-PERTUZ *et al.*, 2019). No entanto, fungos pertencentes a outros gêneros, como por exemplo, *Penicillium*, *Aspergillus*, podem representar alternativas interessantes porque são competitivos para *Trichoderma* em alguns parâmetros cruciais, como nível de produção de proteínas e desempenho hidrolítico da celulase por unidade de atividade ou miligrama de proteína (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013).

Como um único microrganismo (selvagem ou engenheirado) dificilmente abriga toda a variedade de enzimas necessárias para a total desconstrução dos componentes da parede celular, os consórcios microbianos representam uma alternativa adequada para superar alguns problemas relacionados ao uso de linhagens puras. Isso porque os consórcios microbianos

podem compartilhar algumas vias sintéticas e promover a divisão do trabalho entre seus membros ao invés de exigir o potencial máximo de uma única linhagem (RODRIGUES REIS *et al.*, 2018). Além disso, as interações químicas e físicas das espécies permitem um comportamento mais complexo do que as monoculturas (CHE & MEN, 2019; MCCARTY & LEDESMA-AMARO; 2019, QIAN *et al.*, 2020).

Como exemplo, linhagens do gênero *Trichoderma* tem níveis relativamente baixos em atividade de β -glicosidase (OKEKE, 2014) e a maioria dos ascomicetos não tem a capacidade de desconstruir e metabolizar lignina (FERREIRA *et al.*, 2016), sendo os basidiomicetos de podridão branca os organismos mais adequados para esta última tarefa (HIGUCHI 2004; MACIEL *et al.*, 2010).

Apesar das numerosas vantagens da utilização dos consórcios fúngicos com relação a cultivos puros para a produção de enzimas, existem muitos desafios relacionados ao conhecimento da compatibilidade e reprodutibilidade de espécies cultivadas nos mais diversos substratos. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para crescimento de fungos tem se mostrado uma alternativa por minimizar os impactos relacionados ao descarte no ambiente sem destinação adequada causando poluição ambiental (SADH *et al.*, 2018) além de serem compostos com características químicas e nutricionais interessantes para uso como fonte de crescimento microbiano e produção de enzimas em cultivo em estado sólido (CES) (SALAZAR *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Resíduos agroindustriais são, geralmente, considerados os melhores substratos para os processos de cultivos em estado sólido (KAPOOR *et al.* 2011). Cascas de soja, por exemplo, possuem uma rica composição celulósica contendo 40-45% de celulose e 30-35% de xilano em base seca (BRIJWANI *et al.*, 2010), são subprodutos da indústria de processamento de soja e estão comumente disponíveis nos mais diversos países e, portanto, tem potencial como substratos para fermentação industrial. É um resíduo abundantemente produzido em diversos estados brasileiros, porém ainda pouco explorado como substrato para produção de enzimas fúngicas.

Assim, foram objetivos deste estudo desenvolver cultivos mistos de fungos filamentosos isolados do trato digestivo de insetos aquáticos e verificar o potencial de produção de enzimas degradantes de material vegetal em CES com resíduos de casca de soja, bem como avaliar a sacarificação e teor de glicose utilizando coquetéis mínimos de enzimas produzidos por consórcios de fungos filamentosos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 FONTE E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os fungos filamentosos utilizados neste estudo foram isolados do trato digestório de larvas aquáticas do gênero *Stenochironomus* spp. (Diptera: Chironomidae) coletadas em riachos de baixa ordem de Cerrado (Parque Estadual do Lajeado, Tocantins - 10° 06' 05" S 48° 14' 46" O) e Floresta Amazônica (Reserva Adolpho Ducke, Amazonas - 2°55'47.26"S, 59°58'30.61"O) no Brasil. As amostras desses isolados foram preservadas pelo método de Castellani (CAPRILES *et al.*, 1989) e depositadas na Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brasil.

Após a extração, o DNA foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Brasil). Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3 ') (WHITE *et al.*, 1990) foram empregados para a amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de rDNA (~ 600 bp) após condições de amplificação propostas por Santos *et al.* (2016). Os fragmentos de ITS amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) contendo *GelRed*™ (Biotium Inc., EUA) e visualizados sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação (Loccus Biotechnology, Brasil). O 1 Kb DNA *Ladder* (Promega, EUA) foi usado como marcador de peso molecular.

Os produtos amplificados foram sequenciados em ambas as direções usando os mesmos iniciadores de PCR em um sequenciador automatizado *ABI 3500 XL* (Life Technologies, EUA) de acordo com o método Sanger de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977) usando um kit de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1* (Life Technologies, EUA). O sequenciamento foi realizado pela empresa Myleus Biotechnology (<http://myleus.com/>). Adicionalmente, a amplificação dos genes β -tubulina (Bt2a e Bt2b) foi utilizada para espécies de fungos com baixa variação intraespecífica de acordo com os protocolos estabelecidos por (GONÇALVES *et al.*, 2013). Todas as sequências foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank usando um algoritmo de alinhamento local para sequências de nucleotídeos BLAST (*Basic Local Alignment Search*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e no CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Center*) banco de dados (<https://wi.knaw.nl/>). O alinhamento das sequências de possíveis novas espécies com espécies filogeneticamente próximas e a construção de árvores filogenéticas para confirmação das espécies foram realizadas no software MEGA 3.1 (KUMAR, 2004) utilizando o método *Neighbour Joining* com 1.000 vezes *bootstrap*.

2.2 SCREENING PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

Os CES foram realizados utilizando a casca da soja, um resíduo agroindustrial, como biomassa para crescimento fúngico, seguindo adaptações da metodologia proposta por Teixeira *et al.* (2021). A biomassa foi seca, triturada e peneirada em peneira de *mash* 10 (2 mm de abertura). Os cultivos foram realizados em frascos de erlenmeyers de 250 mL contendo 20 g de casca de soja e a umidade do conteúdo foi ajustada para 50% (p/v) pela adição de 20 mL de solução salina (VOGEL, 1956). Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 30 minutos. O inóculo foi preparado em meio BDA por 7 dias, a 30 °C, e os esporos foram suspensos em solução de NaCl 0,85% (p/v). Um volume da suspensão de esporos resultando em uma concentração final de 10^5 esporos por grama de substrato seco foi adicionado. Os esporos e o meio foram devidamente misturados com uma espátula esterilizada e o cultivo estático foi realizado por 5 dias a 30 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados referem-se aos valores médios encontrados.

2.3 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

Após os 5 dias de cultivo, o conteúdo dos frascos foi submetido à extração de enzimas pela adição de 100 mL de água destilada estéril. Os frascos, então, foram incubados em agitador rotativo (150 rpm) por 30 min. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo e um funil de Büchner forrado com papel filtro do tipo Whatman nº 1. O conteúdo filtrado (extrato bruto) foi coletado para medir o volume e, em seguida, mantido a -20 °C até a realização dos ensaios de atividades enzimáticas (IDRIS *et al.*, 2017).

2.4 ENSAIO ENZIMÁTICO

As atividades enzimáticas foram avaliadas de acordo com os métodos recomendado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Commission on Biotechnology* (GHOSE, 1987). As atividades enzimáticas foram definidas em Unidades Internacionais (IU).

A atividade celulásica foi determinada medindo a quantidade de açúcares redutores totais formados a partir do filtro de papel como substrato. A atividade de degradação do filtro de papel (FPase) foi determinada incubando 1,0 mL do extrato bruto com 1,0 mL 0,05 M pH 4,8 de tampão citrato de sódio contendo aproximadamente 50 mg de papel de filtro Whatman nº1 (tiras de 1,0 × 6,0 cm). Após incubação por 60 min a 50 °C, a reação foi encerrada adicionando 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Açúcares redutores foram quantificados de acordo com Miller (1959), usando glicose como padrão e as absorbâncias foram determinadas a 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcares redutores (medido como

glicose) por minuto de reação expressa em U/g.

A atividade xilanolítica foi analisada pela formação de açúcares redutores a partir do substrato xilana pelo método do DNS (MILLER, 1959). A mistura da reação foi composta com 0,2 mL de solução de substrato xilana de Birchwood 1% (p/v) em tampão McIlvaine, 0,1 M pH 5,0. A reação iniciou com a adição de 0,2 mL do extrato enzimático (extrato bruto). Os tubos foram mantidos em banho maria a 60 °C, onde alíquotas de 0,1 mL foram retiradas nos tempos 0 e 5 minutos e adicionadas a 0,1 mL de DNS, paralisando a reação. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcares redutores (medido em xilose), a cada minuto de reação expressa em U/g.

2.5 DESENVOLVIMENTO DA CULTURA MISTA

a. Taxas de crescimento de linhagens de fungos puros

Linhagens de fungos que obtiveram maiores resultados de atividade enzimática em CES, foram selecionadas para avaliação nos testes de cultura mista. Inicialmente, foram individualmente avaliadas quanto à taxa de crescimento com o objetivo de conhecer o comportamento dessas espécies crescidas isoladamente de acordo com a metodologia proposta por Teixeira *et al.* (2021). Discos (aproximadamente 5 mm) contendo pequena porção de meio de cultura e micélio esporulado foram transferidos assepticamente para placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio BDA ou MEA, mantidos a 30 °C e o crescimento das colônias foi monitorado periodicamente por oito dias. Os experimentos foram realizados em duplicata. Esse estudo permitiu classificá-las em dois grupos: fungos de crescimento lento e fungos de crescimento rápido. Os fungos que cobriram toda a placa em 3 dias foram considerados de crescimento rápido e aqueles que precisaram de mais de 3 dias, de crescimento lento.

b. Teste de compatibilidade

Dois discos de ágar (5 mm) de diferentes fungos foram cultivados a 4 cm de distância um do outro para avaliar possíveis interações. Controles corresponderam ao crescimento de uma ou duas colônias do mesmo fungo em uma única placa, inoculadas no centro ou afastadas 4 cm uma da outra, respectivamente.

Linhagens de crescimento lento foram inoculadas três dias antes da linhagem interagente de crescimento rápido para observar o resultado das interações (MOLLA *et al.*, 2001; ALAM *et al.*, 2003). Os cultivos foram incubados a 30 °C e monitorados diariamente

para conhecer suas respostas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO INDIVIDUAL E DAS INTERAÇÕES *In Vitro*

Para ambos os testes (cultura pura e interações) as avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 24 h após a inoculação, durante um período de 192 horas consecutivas ou até que não houvesse mais alterações de tamanho e características das colônias. As interações foram estudadas por cultivos de micélios de dupla oposição direta e os parâmetros registrados foram: taxa de crescimento (crescido individualmente), diâmetro máximo da colônia (crescimento com parceiro e individualmente). Os resultados de outras possíveis interações também foram registrados apropriadamente. As interações entre colônias opostas foram avaliadas visualmente usando uma chave baseada nas observações de Stahl & Christensen (1992) e Molla *et al.* (2001), com o objetivo de classificar o tipo de interação que ocorre entre as diferentes espécies de fungos, conforme Figura 6.

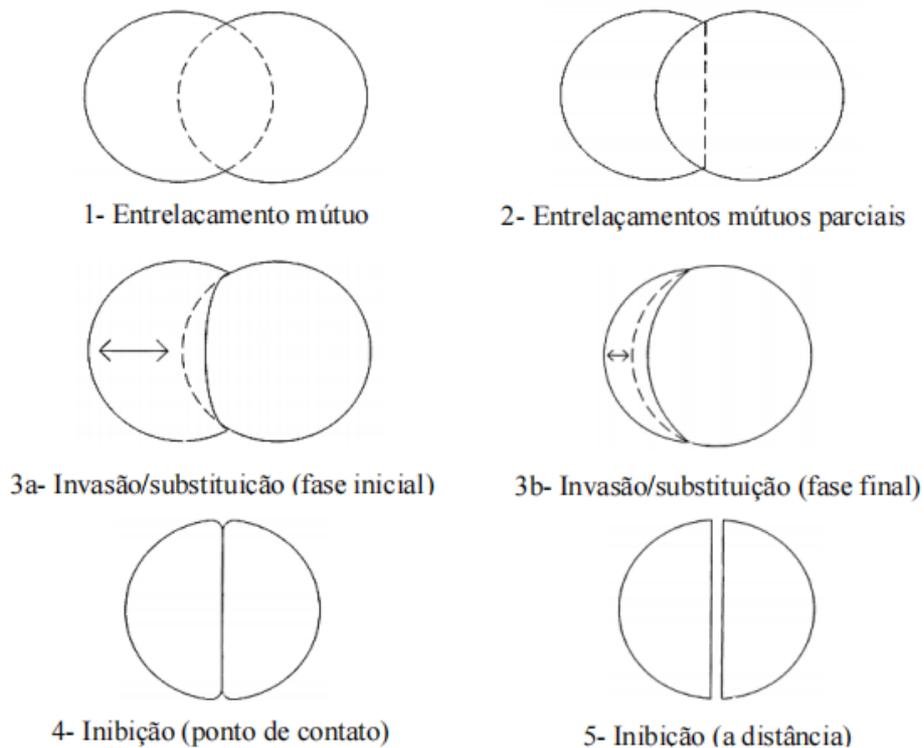


Figura 6. Diagrama esquemático de interações entre duas diferentes linhagens de fungos, que foram cultivadas adjacente (4 cm de distância) em meios de cultura BDA e MEA (MOLLA *et al.*, 2001).

2.7 CULTURA MISTA EM CES UTILIZANDO A CASCA DA SOJA

As interações do tipo “entrelaçamento mútuo” foram selecionadas para os cultivos em casca de soja. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo

20 g de casca de soja seca, triturada e peneirada em peneira de *mash* 10 (2 mm de abertura). A umidade foi ajustada a 50% (p/v) por adição de 20 mL de solução salina (VOGEL, 1956). O inóculo foi preparado em meio BDA por 7 dias, a 30 °C, e os esporos foram suspensos em solução de NaCl 0,85% (p/v), resultando numa concentração final de esporos de 10⁵ esporos por grama de substrato. Para a cultura mista foi inoculado 1 mL de solução de esporos de cada fungo interagente, resultando em 2 mL de suspensão de esporos ou cinco discos de ágar (5 mm) quando a espécie não apresentou esporos suficientes. Os esporos/discos e os substratos foram devidamente misturados com uma espátula esterilizada. Os cultivos foram mantidos sob condições estáticas por 5 dias a 30 °C. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados descritos em valores médios.

2.8 SACARIFICAÇÃO DE CASCA DE SOJA

Os extratos enzimáticos das culturas puras e mistas foram utilizados para avaliar o teor de sacarificação da casca de soja. Os experimentos foram realizados a 50 °C em frascos tipo Erlenmeyer (100 mL) contendo 20 mL de volume de solução tampão McIlvaine (pH 5,0) adicionado 2% (p/v) de biomassa da casca da soja. A sacarificação foi iniciada com a adição de 2% dos extratos enzimáticos (correspondendo a concentrações de 0,3-1,1 FPU para culturas puras e 0,2-1,6 FPU para culturas mistas). Cellic® CTec2 (Novozymes A / S, Bagsværd, Dinamarca) foi usado como padrão a 2,0% (v/v), correspondendo a 0,3 FPU. Os experimentos foram conduzidos em incubadora agitadora a 50 °C com uma velocidade de agitação de 200 rpm por 24 h. As amostras foram retiradas e centrifugadas por 5 min a 3000 rpm. Os açúcares redutores totais foram determinados de acordo com Miller (1959). Os rendimentos de sacarificação foram calculados quantitativamente usando a Equação 1, conforme descrito por Latif *et al.* (1994).

$$\text{Rendimento de sacarificação (\%)} = \frac{\text{açúcar redutor} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) * 0.9 * 100}{\text{substrato} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) * 0.77} \quad (1)$$

2.9 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

Para determinação da concentração de glicose, foi utilizado o método Glicose Oxidase - Peroxidase (GOD-POD) (Glicose Liquiform, Labtest®). Uma alíquota do sobrenadante do experimento de sacarificação, descrito no item anterior, foi misturada aos reagentes de acordo com as instruções do fabricante. Os frascos foram vigorosamente misturados, incubados em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos e as absorbâncias foram determinadas a 505 nm. O

teste foi realizado em triplicata e o resultado calculado de acordo com a Equação 2:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{ABS teste}}{\text{ABS padrão}} \times 100 \quad (2)$$

3 RESULTADOS

3.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CES

No total, 25 espécies de fungos foram identificadas e testadas em CES quanto à capacidade de produzir xilanase e FPase utilizando a casca da soja como substrato (Tabela 5). As espécies com menor e maior atividade para enzimas xilanolíticas foram *Cladosporium halotolerans* (0,175 U/gss) e *Trichoderma asperellum* (36,842 U/gss), respectivamente. Valores intermediários foram observados em *Penicillium quebencense* (29,20 U/gss), *Trichoderma spirale* (17,37 U/gss) e *Aspergillus costaricensis* (10,47 U/gss).

Para atividade celulolítica (FPase), os resultados variaram entre 0,031 U/gss a 1,189 U/gss para *Cladosporium endophytica* (T2SB6) e *Trichoderma yunnanense*, respectivamente. Valores intermediários foram observados em *Penicillium shearii* (0,387 U/gss), *A. costaricensis* (0,353 U/gss) *T. asperellum* (0,350 U/gss) e *Trichoderma inhamatum* (0,343 U/gss) (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação e produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas por fungos filamentosos em cultivo em estado sólido utilizando a casca da soja como substrato

Fungo	Código	Nº de Acesso GenBank	Nº Pares de Bases analisadas	Identidade (%)	Código de depósito do GenBank	Atividade Enzimática (U/gss – unidades por grama de substrato seco)	
						Xilanase	FPase
<i>Acremonium fusidioide</i>	A5STA1	NR130687	385	98,7	MN577262	1,771 ± 0,501	0,357 ± 0,074
<i>Aspergillus costaricensis</i>	A2STA3	MH862988	476	100	MN954942	10,474 ± 0,225	0,707 ± 0,101
<i>Aspergillus niger</i>	T5STA2	AY373852	615	100	MN577245	2,427 ± 1,084	0,257 ± 0,020
<i>Aspergillus nomius</i>	T9STA2	NR121218	432	100	MN954946	8,845 ± 5,326	0,495 ± 0,122
<i>Aspergillus sydowii</i>	T2SA1	NR131259	413	99,76	MN577240	5,886 ± 1,561	0,581 ± 0,041
<i>Cladosporium endophytica</i>	A2STB3	NR158360	446	99,1	MN577266	0,638 ± 0,204	0,320 ± 0,057
<i>Cladosporium endophytica</i>	T2SB6	NR158360	423	99,05	MN577269	3,103 ± 0,754	0,031 ± 0,013
<i>Cladosporium halotolerans</i>	T2SB5	KJ596569	266	100	MN577258	0,175 ± 0,093	0,314 ± 0,079
<i>Cladosporium kenpeggii</i>	A5STA4	KY646222	456	99,56	MN577256	1,206 ± 0,056	0,533 ± 0,021
<i>Clonostachy rosea</i>	A4STA4	MH854911	410	99,76	MN577252	0,310 ± 0,303	0,324 ± 0,072
<i>Penicillium cairnsense</i>	T3STC2	NR121508	341	99,12	MN577242	3,744 ± 2,62	0,467 ± 0,154
<i>Penicillium camponotum</i>	T2STB4	NR_15882	449	98,66	MN577268	2,572 ± 1,388	0,084 ± 0,018
<i>Penicillium chermesinum</i>	A1STA6	MH861332	259	100	MN577265	2,185 ± 0,355	0,555 ± 0,073
<i>Penicillium citrinum</i>	T5SA3	MH856132	302	100	MN577243	2,497 ± 1,66	0,397 ± 0,013
<i>Penicillium exsudans</i>	T7STA1	NR153273	305	100	MN577247	2,669 ± 1,103	0,486 ± 0,102
<i>Penicillium mallochii</i>	T9STC3	NR111674	465	99	MN954945	3,013 ± 0,667	0,138 ± 0,009
<i>Penicillium multicolor</i>	T7SB1	JN799647	422	99,29	MN577246	1,076 ± 0,021	0,183 ± 0,018

<i>Penicillium paxilii</i>	T3STA3	MH856391	165	100	MN577261	9,761 ± 0,440	0,520 ± 0,101
<i>Penicillium quebencense</i>	T10SC1	NR_121507	304	100	MN577271	29,208 ± 1,55	0,328 ± 0,026
<i>Penicillium shearii</i>	T2STC1	MH856346	252	100	MN577260	6,102 ± 1,65	0,774 ± 0,021
<i>Talaromyces stollii</i>	A2STA1	NR111781	473	100	MN577254	0,345 ± 0,190	0,415 ± 0,05
<i>Trichoderma asperellum</i>	A4STA1b	MH021852	259	100	MN954939	36,842 ± 2,686	0,700 ± 0,189
<i>Trichoderma inhamatum</i>	A1STB1	MH861135	370	100	MN954947	6,607 ± 1,90	0,686 ± 0,063
<i>Trichoderma spirale</i>	A4STA1a	NR077177	505	99,6	MN577239	17,369 ± 2,536	0,407 ± 0,018
<i>Trichoderma yunnanense</i>	A4STA2	NR134419	309	100	MN954943	7,884 ± 3,103	1,189 ± 0,071

3.2 DESENVOLVIMENTO DOS TESTES DE COMPATIBILIDADE

Um total de nove espécies fúngicas foram selecionadas de acordo com a produção enzimática (xilanase e/ou FPase) em CES para os ensaios de interação *in vitro*, sendo elas: *T. yunnanense*, *T. spirale*, *T. asperellum*, *A. sydowii*, *A. nomius*, *A. costaricaensis*, *P. shearii*, *P. quebencense* e *P. paxilli*. Primeiramente, essas espécies foram caracterizadas em relação a velocidade de crescimento de forma isolada nos meios BDA e MEA. As espécies do gênero *Trichoderma* foram classificadas como sendo de crescimento rápido, pois tomaram toda a placa em três dias; enquanto que *Aspergillus* e *Penicillium* de crescimento lento (Tabela 6). Em ambos os meios de cultura os fungos cresceram de forma semelhante, porém as espécies do gênero *Penicillium* alcançaram maior tamanho final de colônia e tiveram taxa de crescimento diário maior quando cultivadas em MEA.

Tabela 6. Taxa de crescimento diário e tamanho final de colônias de fungos crescidos em BDA e MEA.

Espécies	BDA		MEA	
	Tamanho Final da Colônia	Taxa Cresc/Dia	Tamanho Final da Colônia	Taxa Cresc/Dia
<i>Trichoderma yunnanense</i>	8,0	2,85	8,0	2,88
<i>Trichoderma spirale</i>	8,0	3,10	8,0	3,40
<i>Trichoderma asperellum</i>	8,0	2,90	8,0	3,00
<i>Aspergillus sydowii</i>	3,1	0,44	2,9	0,45
<i>Aspergillus nomius</i>	8,0	1,14	8,0	1,05
<i>Aspergillus costaricaensis</i>	8,0	1,14	4,8	0,98
<i>Penicillium shearii</i>	2,3	0,33	3,9	0,58
<i>Penicillium quebencense</i>	3,8	0,54	6,0	0,88
<i>Penicillium paxilii</i>	4,0	0,57	8,0	0,58

*Valores médios em cm

Considerando os resultados obtidos na avaliação do crescimento micelial em placas contendo BDA ou MEA, foi possível identificar que os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (crescimento lento) seriam inoculados três dias antes das espécies do gênero *Trichoderma* (crescimento rápido). Assim, 18 interações diferentes foram formadas para verificar quais espécies seriam compatíveis para seguir para os ensaios de cultura mista em CES (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado das interações *in vitro* entre fungos filamentosos cultivados em placas contendo meios BDA e MEA.

Fungos interagentes		Resultado da interação	
		BDA	MEA
<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Penicillium shearii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Penicillium quebencense</i>	Inibição à distância	Inibição à distância
	<i>Penicillium paxilii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Aspergillus costaricaensis</i>	Mutualismo parcial	Inibição ao ponto de contato
	<i>Aspergillus nomius</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Aspergillus sydowii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
<i>Trichoderma spirale</i>	<i>Penicillium shearii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Penicillium quebencense</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Penicillium paxilii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Aspergillus costaricaensis</i>	Inibição ao ponto de contato	Inibição ao ponto de contato
	<i>Aspergillus nomius</i>	Mutualismo parcial	Mutualismo parcial
	<i>Aspergillus sydowii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
<i>Trichoderma yunnanense</i>	<i>Penicillium shearii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Penicillium quebencense</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Penicillium paxilii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo
	<i>Aspergillus costaricaensis</i>	Mutualismo parcial	Inibição à distância
	<i>Aspergillus nomius</i>	Mutualismo parcial	Mutualismo parcial
	<i>Aspergillus sydowii</i>	Entrelaçamento mútuo	Entrelaçamento mútuo

Das interações avaliadas entre fungos do gênero *Trichoderma* com as demais espécies em cultura mista (Tabela 7 e Figura 7), 12 apresentaram entrelaçamento mútuo em ambos os meios (*P. shearii/ T. asperellum*, *P. paxilli/ T. asperellum*, *A. nomius/ T. asperellum*, *A. sydowii/ T. asperellum*, *P. shearii/ T. spirale*, *P. quebencense/ T. spirale*, *P. paxilli/ T. spirale*, *A. sydowii/ T. spirale*, *P. shearii/ T. yunnanense*, *P. quebencense/ T. yunnanense*, *P. paxilli/ T. yunnanense*, *A. sydowii/ T. yunnanense*).

Mutualismo parcial em ambos os meios foi observado em duas interações (*A. nomius/ T. spirale* e *A. nomius/ T. yunnanense*) (Fig 8A e B). Inibição a distância e inibição ao ponto de contato em ambos os meios ocorreu entre *P. quebencense/ T. asperellum* e *A. costaricensis/ T. spirale*, respectivamente (Fig 8C e D). A interação *A. costaricensis/ T. asperellum* apresentou mutualismo parcial em BDA e inibição ao ponto de contato em MEA (Fig. 8E). A interação *A. costaricensis/ T. yunnanense* apresentou mutualismo parcial em BDA e inibição a distância em MEA (Fig. 8F). Os fungos que interagiram por meio de entrelaçamento mútuo foram selecionados para os consórcios em CES para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

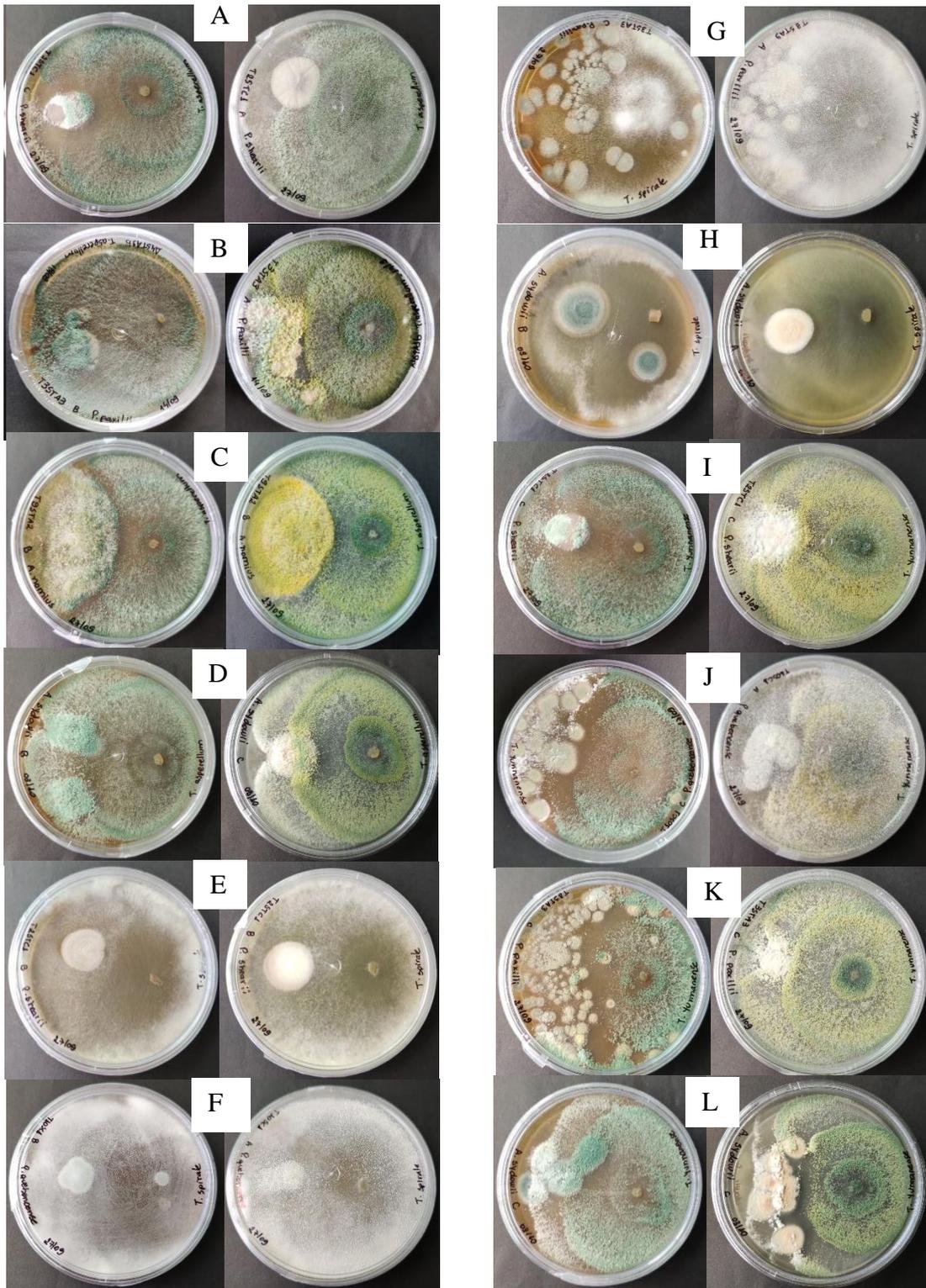


Figura 7. Interações de entrelaçamento mútuo entre diferentes espécies de fungos filamentosos cultivados em meios BDA (fotos da esquerda) e MEA (fotos da direita). A= *P. shearii* x *T. asperellum*. B= *P. paxilli* x *T. asperellum*. C= *A. nomius* x *T. asperellum*. D= *A. sydowii* x *T. asperellum*. E= *P. shearii* x *T. spirale*. F= *P. quebencense* x *T. spirale*. G= *P. paxilli* x *T. spirale*. H= *A. sydowii* x *T. spirale*. I= *P. shearii* x *T. yunnanense*. J= *P. quebencense* x *T. yunnanense*. K= *P. paxilli* x *T. yunnanense*. L= *A. sydowii* x *T. yunnanense*.

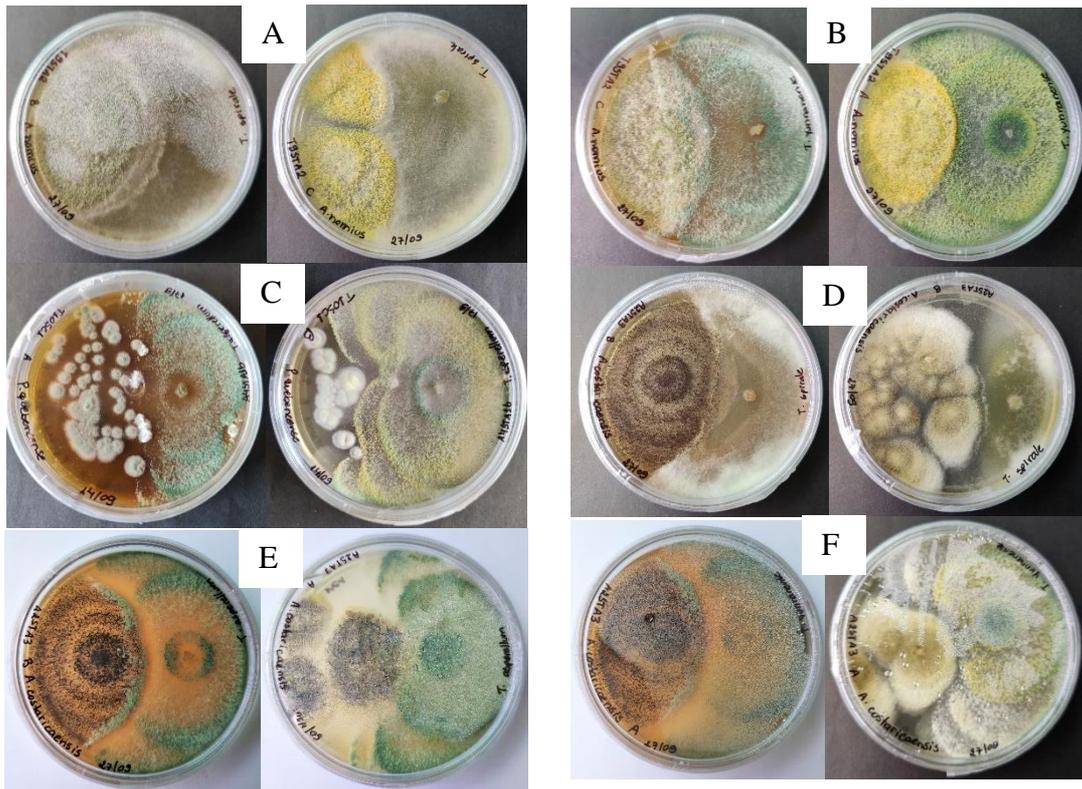


Figura 8. Interações entre diferentes espécies de fungos filamentosos cultivados em meios BDA (fotos da esquerda) e MEA (fotos da direita). A= *A. nomius*/ *T. spirale*, B= *A. nomius*/ *T. yunnanense*, C= *P. quebencense*/*T. asperellum*, D= *A. costaricaensis*/ *T. spirale*, E= *A. costaricaensis*/ *T. asperellum*, F= *A. costaricaensis*/ *T. yunnanense*.

A Tabela 8 mostra que o tamanho máximo de colônias em monocultivo e co-cultivo nos meios BDA e MEA dos fungos que interagiram por meio de entrelaçamento mútuo em ambos os meios foi semelhante.

Tabela 8. Diâmetro máximo de colônias de fungos filamentosos em monocultivos e co-cultivos com entrelaçamento mútuo em placas de Petri usando BDA e MEA como meios de cultura

Fungo	Código	Máximo Diâmetro de Colônia			
		Monocultivo		Co-cultivo	
		BDA	MEA	BDA	MEA
<i>Trichoderma yunnanense</i>	A4STA2	8,00	8,00	7,39	7,39
<i>Trichoderma spirale</i>	A4STA1a	8,00	8,00	7,93	7,94
<i>Trichoderma asperellum</i>	A4STA1b	8,00	8,00	7,22	7,21
<i>Penicillium shearii</i>	T2STC1	2,30	3,90	2,60	2,56
<i>Penicillium quebencense</i>	T10SC1	3,80	6,00	2,37	2,53
<i>Penicillium paxilli</i>	T3STA3	4,00	8,00	2,47	2,99
<i>Aspergillus sydowii</i>	T2SA1	3,10	2,90	2,81	2,61
<i>Aspergillus nomius</i>	T9STA2	8,00	8,00	4,77	4,77

*Valores médios em cm

3.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

As linhagens que interagiram por meio de entrelaçamento mútuo em placas de ágar seguiram para os testes enzimáticos de CES utilizando a casca da soja como biomassa para produção de enzimas hidrolíticas por esses consórcios. Dessa forma, até aqui dois critérios foram utilizados para avaliação dos consórcios: maiores atividades enzimáticas em monocultivo (Tabela 5) e compatibilidade nos testes de interação *in vitro* (Tabela 7).

As culturas mistas foram desenvolvidas por inoculação das linhagens de *Trichoderma* com seu parceiro interagente (*Aspergillus* ou *Penicillium*). Enquanto a atividade xilanolítica de monoculturas variou entre 5,886 U/gss e 36,842 U/gss para *A. sydowii* e *T. asperellum*, respectivamente, a produção de xilanase em culturas mistas variou de 3,992 U/gss a 70,799 U/gss para os consórcios *T. spirale*/*P. paxilli* e *T. yunnanense*/*P. paxilli*, respectivamente (Tabela 9). A produção de FPase entre as monoculturas variou de 0,328 U/gss (*P. quebencense*) à 1,189 U/gss (*T. yunnanense*). Já entre as culturas mistas essa atividade variou de 0,270 U/gss (*T. asperellum*/*A. nomius*) à 1,672 U/gss (*T. asperellum* / *A. sydowii*).

Na Tabela 10 são indicadas as razões de atividades enzimáticas de monoculturas e culturas mistas *versus* a soma das atividades enzimáticas de monoculturas. A atividade xilanolítica de culturas mistas foi maior do que as de monoculturas, exceto para *T. yunnanense*/*P. quebencense*, *T. spirale*/*P. quebencense*, e *T. spirale*/*P. paxilli* e *T. asperellum*/*A. nomius*. A maior atividade de xilanase foi encontrada no cultivo misto de *T. yunnanense*/*P. paxilli* (70,799 U/gss) que apresentou uma razão de 8,98 para *T. yunnanense* e 7,25 para *P. paxilli*. Resultado semelhante ocorreu no consórcio *T. yunnanense*/*P. shearii* que apresentou atividade xilanolítica de 56,520 U/gss e razões de 7,17 e 9,26 para *T. yunnanense* e *P. shearii*, respectivamente.

Um perfil sinérgico de culturas mistas para a produção de FPase foi apresentado por *T. spirale*/*P. paxilli* (1,360 U/gss), *T. asperellum*/*P. shearii* (1,566 U/gss), e *T. asperellum*/*A. sydowii* (1,672 U/gss). Esses consórcios mostraram um aumento da atividade enzimática quando comparados ao somatório de atividades enzimáticas das monoculturas com razões de 1,47, 1,06 e 1,31, respectivamente (Tabela 10). Além desses consórcios, outros se destacaram com maiores atividades de FPase (>2) quando comparados às culturas puras. Foi o caso de *T. yunnanense*/*P. quebencense* vs *P. quebencense* (razão de 4,09), *T. yunnanense*/*P. paxilli* vs *P. paxilli* (razão de 2,58), *T. spirale*/*P. quebencense* vs *P. quebencense* (razão de 2,03), *T. spirale*/*A. sydowii* vs *T. spirale* (razão de 2,14).

Tabela 9. Atividade enzimática de monoculturas e culturas mistas de fungos filamentosos em CES utilizando a casca da soja como biomassa

Monoculturas	Atividade enzimática (U/gss)	
	Xilanase	FPase
<i>T. asperellum</i>	36,842 ± 2,686	0,700 ± 0,189
<i>T. spirale</i>	17,369 ± 2,536	0,407 ± 0,018
<i>T. yunnanense</i>	7,884 ± 3,103	1,189 ± 0,071
<i>P. quebencense</i>	29,208 ± 1,55	0,328 ± 0,026
<i>P. shearii</i>	6,102 ± 1,65	0,774 ± 0,021
<i>P. paxilli</i>	9,761 ± 0,440	0,520 ± 0,101
<i>A. nomius</i>	8,845 ± 5,326	0,495 ± 0,122
<i>A. sydowii</i>	5,886 ± 1,561	0,581 ± 0,041
Culturas Mistas		
<i>T. asperellum/ P. shearii</i>	68,474 ± 6,54	1,566 ± 0,002
<i>T. asperellum/ P. paxilli</i>	46,815 ± 10,34	0,586 ± 0,067
<i>T. asperellum/ A. sydowii</i>	61,254 ± 8,92	1,672 ± 0,225
<i>T. asperellum/ A. nomius</i>	6,250 ± 3,94	0,270 ± 0,088
<i>T. spirale/ P. shearii</i>	34,867 ± 4,156	0,513 ± 0,06
<i>T. spirale/ P. quebencense</i>	5,113 ± 3,24	0,667 ± 0,092
<i>T. spirale/ P. paxilli</i>	3,992 ± 2,17	1,360 ± 0,109
<i>T. spirale/ A. sydowii</i>	30,738 ± 1,99	0,869 ± 0,081
<i>T. yunnanense/ P. shearii</i>	56,520 ± 5,21	1,168 ± 0,123
<i>T. yunnanense/ P. quebencense</i>	30,056 ± 3,388	1,342 ± 0,042
<i>T. yunnanense/ P. paxilli</i>	70,799 ± 5,61	1,339 ± 0,208
<i>T. yunnanense/ A. sydowii</i>	47,550 ± 4,91	0,913 ± 0,173

Tabela 10. Razão entre produção de enzimas xilanase e FPase em monoculturas e culturas mistas produzidas em CES utilizando a casca da soja como biomassa

Cultura mista x Culturas Puras	Razão de atividade enzimática	
	Xilanase	FPase
<i>T. yunnanense/ P. shearii</i> vs. <i>T. yunnanense</i>	7,17	0,98
<i>T. yunnanense/ P. shearii</i> vs. <i>P. shearii</i>	9,26	1,51
<i>T. yunnanense/P. shearii</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	4,04	0,60
<i>T. yunnanense/ P. quebencense</i> vs. <i>T. yunnanense</i>	3,81	1,13
<i>T. yunnanense/ P. quebencense</i> vs. <i>P. quebencense</i>	1,03	4,09

<i>T. yunnanense/ P. quebencense</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	0,81	0,88
<i>T. yunnanense/ P. paxilli</i> vs. <i>T. yunnanense</i>	8,98	1,13
<i>T. yunnanense/ P. paxilli</i> vs. <i>P. paxilli</i>	7,25	2,58
<i>T. yunnanense/ P. paxilli</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	4,01	0,78
<i>T. yunnanense/ A. sydowii</i> vs. <i>T. yunnanense</i>	6,03	0,77
<i>T. yunnanense/ A. sydowii</i> vs. <i>A. sydowii</i>	8,08	1,57
<i>T. yunnanense/ A. sydowii</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	3,45	0,52
<i>T. spirale/ P. shearii</i> vs. <i>T. spirale</i>	2,01	1,26
<i>T. spirale/ P. shearii</i> vs. <i>P. shearii</i>	5,71	0,66
<i>T. spirale/ P. shearii</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	1,49	0,43
<i>T. spirale/ P. quebencense</i> vs. <i>T. spirale</i>	0,29	1,64
<i>T. spirale/ P. quebencense</i> vs. <i>P. quebencense</i>	0,18	2,03
<i>T. spirale/ P. quebencense</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	0,11	0,91
<i>T. spirale/ P. paxilli</i> vs. <i>T. spirale</i>	0,23	3,34
<i>T. spirale/ P. paxilli</i> vs. <i>P. paxilli</i>	0,41	2,62
<i>T. spirale/ P. paxilli</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	0,15	1,47
<i>T. spirale/ A. sydowii</i> vs. <i>T. spirale</i>	1,77	2,14
<i>T. spirale/ A. sydowii</i> vs. <i>A. sydowii</i>	5,22	1,50
<i>T. spirale/ A. sydowii</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	1,32	0,88
<i>T. asperellum/ P. shearii</i> vs. <i>T. asperellum</i>	1,86	2,24
<i>T. asperellum/ P. shearii</i> vs. <i>P. shearii</i>	11,22	2,02
<i>T. asperellum/ P. shearii</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	1,59	1,06
<i>T. asperellum/ P. paxilli</i> vs. <i>T. asperellum</i>	1,27	0,84
<i>T. asperellum/ P. paxilli</i> vs. <i>P. paxilli</i>	4,80	1,13
<i>T. asperellum/ P. paxilli</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	1,00	0,48
<i>T. asperellum/ A. sydowii</i> vs. <i>T. asperellum</i>	1,66	2,39
<i>T. asperellum/ A. sydowii</i> vs. <i>T. asperellum</i>	10,41	2,88

<i>T. asperellum/ A. sydowii</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	1,43	1,31
<i>T. asperellum/ A. nomius</i> vs. <i>T. asperellum</i>	0,17	0,39
<i>T. asperellum/ A. nomius</i> vs. <i>A. nomius</i>	0,71	0,55
<i>T. asperellum/ A. nomius</i> vs. Somatório das atividades culturas puras	0,14	0,23

Valores em negrito representam uma comparação entre coquetéis de enzimas de culturas mistas e o somatório dos coquetéis de enzimas de monoculturas.

3.4 SACARIFICAÇÃO DE CASCA DA SOJA

A casca da soja foi hidrolisada pela preparação de extrato bruto obtido a partir de CES de monoculturas e culturas mistas (Tabela 11), com exceção do consórcio *T. asperellum/ A. nomius* cujas atividades enzimáticas tanto de xilanase quanto de FPase não foram maiores do que os monocultivos dessas espécies. Assim, foi possível determinar a hidrólise do resíduo, o rendimento de sacarificação e a glicose total de oito espécies em monocultivos e 11 culturas mistas formadas por essas espécies.

O coquetel enzimático do consórcio *T. spirale/ A. sydowii* apresentou 37,86 mg de açúcares redutores totais que corresponderam a 11% de rendimento de sacarificação. Esse valor representa um aumento de 2,18 e 1,84 vezes quando comparado ao monocultivo de *T. spirale* e *A. sydowii*, respectivamente. A quantidade de glicose total também aumentou 1,74 e 1,46 vezes quando comparado ao monocultivo de *T. spirale* e *A. sydowii*, respectivamente. Resultados semelhantes ocorreram nos consórcios de *T. spirale/ P. shearii*, *T. asperellum/ P. shearii* e *T. asperellum/ A. sydowii* cujos resultados de açúcares redutores totais, rendimento de sacarificação e quantidade total de glicose foram superiores aos seus respectivos monocultivos. A enzima comercial Cellic® CTec2 usada como padrão nesse experimento que contém celulasas, β -glicosidases e hemicelulasas apresentou como resultado de hidrólise da casca da soja 11,88 mg de açúcares redutores totais que corresponderam a 3,47% de rendimento de sacarificação e 1,99 mg de glicose total.

Tabela 11. Hidrólise do resíduo de casca de soja pelo coquetel enzimático produzido por culturas puras e mistas de fungos filamentosos cultivados em estado sólido

	Hidrólise do resíduo casca da soja (mg total de AR)	Média Rendimento Sacarificação (%)	Glicose (mg total)
Cellic® CTec2	11,88 ± 0,53	3,47 ± 0,22	1,99 ± 0,19
Culturas Puras			
<i>T. asperellum</i>	25,49 ± 1,04	7,44 ± 0,42	1,70 ± 0,21
<i>T. spirale</i>	17,37 ± 1,98	5,07 ± 0,85	1,11 ± 0,51
<i>T. yunnanense</i>	23,40 ± 1,44	6,83 ± 0,55	1,65 ± 0,26
<i>P. quebencense</i>	22,82 ± 1,61	6,67 ± 0,63	1,95 ± 0,36
<i>P. shearii</i>	25,42 ± 1,76	7,42 ± 0,7	0,97 ± 0,09
<i>P. paxilli</i>	26,68 ± 1,89	7,79 ± 0,77	1,26 ± 0,24
<i>A. nomius</i>	30,20 ± 3,08	8,82 ± 1,22	1,45 ± 0,11
<i>A. sydowii</i>	20,57 ± 2,59	6,01 ± 1,07	1,33 ± 0,65
Culturas Mistas			
<i>T. asperellum/ P. shearii</i>	32,09 ± 4,06	9,37 ± 1,61	2,19 ± 0,08
<i>T. asperellum/ P. paxilli</i>	15,01 ± 6,95	4,38 ± 2,64	1,11 ± 0,03
<i>T. asperellum/ A. sydowii</i>	27,33 ± 0,21	7,98 ± 0,08	1,46 ± 0,2
<i>T. spirale/ P. shearii</i>	32,78 ± 0,49	9,57 ± 0,19	1,38 ± 0,09
<i>T. spirale/ P. quebencense</i>	16,34 ± 3,21	4,77 ± 1,23	1,09 ± 0,19
<i>T. spirale/ P. paxilli</i>	22,36 ± 3,92	6,53 ± 1,59	0,91 ± 0,2
<i>T. spirale/ A. sydowii</i>	37,86 ± 0,64	11,06 ± 0,24	1,94 ± 0,36
<i>T. yunnanense/ P. shearii</i>	26,32 ± 0,81	7,69 ± 0,31	1,80 ± 0,36
<i>T. yunnanense/ P. quebencense</i>	21,74 ± 2,59	6,35 ± 0,98	1,18 ± 0,19
<i>T. yunnanense/ P. paxilli</i>	26,55 ± 1,56	7,75 ± 0,59	1,62 ± 0,3
<i>T. yunnanense/ A. sydowii</i>	22,5 ± 0,67	6,57 ± 0,27	1,40 ± 0,12

Condições experimentais: Hidrólise realizada em frascos contendo 20 mL de meio reacional contendo 2% (p/v) de resíduo de casca de soja, pH 5,0 a 50 °C por 24 h

4 DISCUSSÃO

4.1 ESPÉCIES FÚNGICAS PRODUTORAS DE ENZIMAS EM CES

Fungos filamentosos, particularmente espécies do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são conhecidos pela capacidade de produzir enzimas degradantes de material lignocelulósico (MARTIN *et al.*, 2004; MEJIAS *et al.*, 2018; VERDUZCO-OLIVA &

GUTIERREZ-URIBE, 2020), principalmente a espécie *T. reesei* que é amplamente referenciada como espécie produtora de celulase usando resíduos agroindustriais contendo níveis significativos de fibras celulósicas (> 25%) como substrato (CERDA *et al.*, 2017). No entanto, este estudo mostra que outras espécies desses gêneros, ainda pouco exploradas para esse fim, apresentam potencial para produção de xilanases e celulases.

A espécie *T. asperellum*, conhecida na literatura por ser um eficiente agente de biocontrole fitopatológico (SAIN & PANDEY 2016; ZACHOW *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017) apresentou-se como a espécie com maior potencial para produção de xilanases em CES utilizando a casca da soja como substrato. Embora outros trabalhos tenham avaliado o potencial dessa espécie para produção de enzimas (RAYHANE *et al.*, 2019; EZEILO *et al.*, 2019), ainda há muito a se explorar sobre seu potencial para enzimas, como celulase e xilanase, em resíduos agroindustriais. Outras espécies também com potencial para produção dessas enzimas, porém pouco exploradas, até então, foram *P. quebencense* e *P. shearii*.

Um dos maiores desafios na seleção de espécies fúngicas para produção de enzimas está na necessidade de conhecer o complexo de enzimas produzidas durante o processo de degradação de materiais lignocelulósicos (TEIXEIRA *et al.*, 2021). Isso porque as linhagens de fungos podem produzir quantidades diferentes de enzimas nos meios de cultura de acordo com a composição nutricional dos substratos (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013). Souza *et al.* (2022) confirmam essa indicação ao isolar fungos do trato digestório de larvas de insetos mineradores em riachos da Amazônia e do Cerrado com evidências de que o tipo de substrato influencia a ação enzimática de fungos celulolíticos e xilanolíticos, nesse caso, em folhas as espécies foram mais celulolíticas e em troncos mais xilanolíticas.

Os resultados de testes em placas realizados com os mesmos gêneros podem ser diferentes dos que foram encontrados neste trabalho. Espécies do gênero *Trichoderma*, por exemplo, não resultaram em produção de enzimas quando cultivados em placas (SOUZA *et al.*, 2022). Enquanto que espécies desse gênero, em CES utilizando a casca da soja, alcançaram os resultados mais elevados na produção de celulase e xilanase. E o contrário também ocorreu com espécies do gênero *Cladosporium* que apresentou halo de hidrólise no *screening* em placas (SOUZA *et al.*, 2022), porém mostrou baixa atividade enzimática quando comparada aos demais gêneros, quando testada em CES utilizando a casca de soja. Isso reforça a ideia de que a expressão da capacidade enzimática pode estar relacionada ao tipo de substrato disponível e à técnica aplicada e por isso a necessidade de pesquisar técnicas novas que utilizam diferentes substratos.

4.2 COMPATIBILIDADE DAS ESPÉCIES

A maior parte das interações estudadas resultaram em compatibilidade do tipo entrelaçamento mútuo, ou seja, são espécies indicadas para formar consórcios. Esses resultados apontam que os consórcios *T. yunnanense/ P. paxilli* e *T. yunnanense/ P. shearii*, por exemplo, apresentam potencial no que se refere a produção de xilanase em CES quando comparados ao monocultivo dessas mesmas espécies. Embora, ainda representem um desafio para produção em escala industrial, a técnica de cultivo misto demonstra certas vantagens sobre as monoculturas. Quando estudados em escala de laboratório, os cultivos mistos mostram atividades mais altas para várias enzimas diferentes e também têm o potencial de desbloquear genes biossintéticos críticos de interesse industrial (CHIANG *et al.*, 2011; BERTRAND *et al.*, 2014; ABDALLA *et al.*, 2017), entre outros benefícios.

Além de apontar que novas espécies para produção de enzimas em CES devem ser exploradas, nossos resultados mostram que o consórcio entre linhagens compatíveis é promissor para o aumento da capacidade em degradar material lignocelulósico. Os cultivos mistos compatíveis mostraram aumento na produção de xilanase e celulase quando comparados aos monocultivos. As espécies fúngicas utilizadas tem origem no TD de larvas de insetos mineradores de material vegetal em decomposição e o trabalho de Souza *et al.* (2022) mostrou que no TD de um mesmo indivíduo, podem ser encontradas diversas espécies de fungos, que atuam conjuntamente para degradação do material lignocelulósico ingerido pelo inseto. Assim, é esperado que haja maior eficiência na produção de enzimas degradantes quando resulta de um sinergismo entre espécies fúngicas atuando sobre um substrato.

Um dos exemplos dos nossos achados está no aumento de 9,26 vezes (Tabela 10) da produção de xilanase pelo consórcio *T. yunnanense/ P. shearii* quando comparado ao monocultivo de *P. shearii*, por exemplo. Flores *et al.* (2009) demonstraram que o co-cultivo de *P. ostreatus* and *Trichoderma* spp. produz 6 vezes mais atividade enzimática para lacase. Os resultados dos testes de Rodrigues *et al.* (2020) e Wang *et al.* (2022) mostraram que os consórcios construídos entre diferentes espécies fúngicas apresentam melhora na taxa de degradação da lignina do que suas respectivas monoculturas. Isso devido ao fato de que há maior degradação de substratos quando considerado o coquetel enzimático que as espécies podem produzir conjuntamente, evidenciando a importância da contínua aplicação desses extratos enzimáticos para sacarificação de biomassa lignocelulósica. Esses resultados apontam que os consórcios *T. yunnanense/ P. paxilli* e *T. yunnanense/ P. shearii* apresentam potencial no que se refere a produção de xilanase em CES quando comparados aos seus respectivos monocultivos.

4.3 SACARIFICAÇÃO DE CASCA DE SOJA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A sacarificação da casca da soja se mostrou efetiva para avaliar a eficiência dos consórcios fúngicos em relação aos monocultivos, na tarefa de hidrolisar a biomassa lignocelulósica. Do ponto de vista do rendimento de sacarificação, alguns dos cultivos mistos se mostraram ainda mais efetivos para a hidrólise da casca da soja quando comparados a enzima comercial padrão Cellic® CTec2 e aos monocultivos. Espécies produtoras de enzimas atuam para melhorar a preparação da enzima modificando os componentes ou sua proporção (VICTORIA *et al.*, 2017). A produção de enzimas atua sinergeticamente na degradação dos substratos aumentando a hidrólise da biomassa lignocelulósica (BEN TAHER *et al.*, 2017; COPETE-PERTUZ *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2020).

No estudo de Teixeira *et al.* (2021), dentre os consórcios investigados, as combinações entre *T. asperellum* PEC-6/ *P. ostreatus* e *T. asperellum* SB-11/ *A. niger* foram os mais eficazes na biossíntese de xilanase e β -glicosidase e também na sacarificação de resíduos de coroa de abacaxi, com rendimentos de 13,75 e 13,93%, respectivamente. Em experimentos dessa natureza, todo o conjunto de enzimas que atua sobre a biomassa vegetal, inclusive enzimas não analisadas neste trabalho, tem o potencial de influenciar no resultado final. Isso porque, segundo os autores, uma única espécie fúngica atuando de maneira isolada na hidrólise do material vegetal, pode secretar doses mínimas de determinados complexos enzimáticos e por conseguinte, outros sistemas fúngicos, podem aumentar essa atividade. Assim, a sacarificação eficiente resultaria da sinergia entre os componentes enzimáticos e também da proporção dessas preparações.

A avaliação da quantidade de glicose total liberada pela sacarificação da casca de soja apresentou resultados superiores no consórcio *T. asperellum*/ *P. shearii* quando comparados aos monocultivos e à enzima comercial. Outros consórcios, como *T. spirale*/ *A. sydowii* e *T. yunnanense*/ *P. quebencense* apresentaram resultados muito próximos aos da enzima comercial. Estudos que relatam o teor de glicose provenientes da sacarificação de resíduos agroindustriais sem pré-tratamento por enzimas de origem fúngica são raros na literatura, limitando a comparação dos resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, um estudo desenvolvido por Rodrigues *et al.* (2022) utilizando bagaço de cana e farelo de trigo como substratos, demonstrou que as maiores liberações de glicose também foram obtidas utilizando coquetéis enzimáticos produzidos por consórcios fúngicos entre *Aspergillus fumigatus*, *Ganoderma lucidum* e *Trametes versicolor*.

Para o reaproveitamento de resíduos agrícolas em biorrefinarias, comumente são realizadas sacarificações com *blends* enzimáticos comerciais de alto custo responsáveis pela

clivagem de componentes da biomassa lignocelulósica (GARCÍA-CUBERO *et al.*, 2010, CHANDEL *et al.*, 2018). Assim, coquetéis enzimáticos produzidos por consórcios fúngicos, podem ser aplicados para sacarificação de casca de soja, contribuindo para a redução de custos dos processos de bioconversão.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de consórcios fúngicos em cultivo em estado sólido aumentou a produção de enzimas degradantes de material vegetal quando comparadas com as monoculturas. Os resultados indicaram que o consórcio *T. yunnanense*/*P. shearii* aumentou em 9,26 vezes a produção de xilanase quando comparado ao monocultivo de *P. shearii*. No geral, a maior parte dos consórcios fúngicos resultou em maior produção de xilanase e celulase quando comparados aos monocultivos, demonstrando a importância de continuar investigando espécies pouco exploradas para esse fim. A hidrólise enzimática utilizando o coquetel enzimático desses consórcios apresentou resultados promissores quando comparados à hidrólise pela enzima comercial. Assim, esse estudo reforça a importância do desenvolvimento de consórcios fúngicos como uma alternativa promissora na produção de coquetel enzimático eficiente na degradação de material lignocelulósico, inclusive indicando aumento na hidrólise enzimática que consequentemente colabora para diminuição os custos de produção dessas enzimas para diversas aplicações industriais.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o financiamento do projeto Edital Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia nº 79/2013; a equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins pelo suporte técnico; à equipe do Laboratório de Pesquisas em Química Ambiental e de Biocombustíveis – LAPEQ da Universidade Federal do Tocantins UFT, em especial ao Dr Emerson Adriano Guarda, Me Larissa da Silva Gualberto pelo auxílio nas análises de atividade enzimática.

7 CONCLUSÃO

O estudo sobre a comunidade de fungos associada ao trato digestório de larvas de *Stenochironomus*, mostrou que este nicho abriga alta diversidade desses microrganismos, o que em tese, aumenta a atual projeção de diversidade fúngica. Blackwell (2011) projetou a diversidade fúngica em torno de 5,1 milhões de espécies, utilizando-se para isso uma projeção de novas espécies fúngicas associadas a plantas: cada espécie vegetal abrigaria cerca de cinco espécies de fungos em relação espécie-específica. Assim, a adição de espécies fúngicas associadas a larvas aquáticas de insetos poderá ampliar esta diversidade exponencialmente.

Diferenças ambientais entre os riachos e de substratos onde abrigam-se as larvas dos biomas Floresta Amazônica e Cerrado explicam as distintas comunidades fúngicas encontradas. O paradigma da biogeografia de microrganismos que prevaleceu desde o início desta ciência até o surgimento das técnicas moleculares é conhecido como “*everything is everywhere*” ou seja, microrganismos não apresentariam padrões biogeográficos, estando amplamente distribuídos pelo mundo e fatores locais seriam responsáveis pela seleção (AZEVEDO & FARJALLA, 2010). Recentemente, fortes evidências apontaram que microrganismos possuem padrões biogeográficos como os reinos vegetal e animal. Este trabalho aponta também para esta proposição, mostrando que a comunidade fúngica associada a larvas de *Stenochironomus* difere entre substratos - folhas ou troncos; mas também entre os biomas Cerrado e Amazônia, indicando que fatores ambientais intervêm na sua co-ocorrência com as larvas.

A comunidade fúngica apresentou um perfil produtor de enzimas xilanase e celulase que se associa ao seu papel na convivência com as larvas, e aumenta o potencial de biotecnologia de base microbiana da comunidade fúngica tropical. A expressão enzimática por espécies ainda pouco exploradas para fins biotecnológicos indica que novos estudos para o conhecimento da aplicação biotecnológica do potencial dessas espécies, podem gerar resultados satisfatórios.

O desenvolvimento de consórcios microbianos foi adequado a este ambiente da comunidade fúngica de ser colaborativa e consorciada já na natureza. Assim, mostrou-se promissor para a técnica de cultivo em estado sólido utilizando casca de soja como biomassa, uma vez que aumentou a produção das enzimas estudadas. Este estudo mostrou que a hidrólise enzimática utilizando coquetéis mínimos dos consórcios microbianos eleva a atividade xilanásica e celulásica quando comparadas aos monocultivos ou até mesmo à enzima comercial. Assim, o estudo e aplicação de consórcios microbianos para produção de compostos desejáveis tem se tornado um campo cada vez mais promissor devido sua

aplicabilidade para produção industrial das mais diversas atividades e, a ideia do uso de resíduos agroindustriais para esse fim, torna essa possibilidade atrativa do ponto de vista ambiental e econômico. Portanto, fica evidente que essa técnica deve ser continuamente estudada e melhorada, diversificando substratos e espécies que estabeleçam novos consórcios a fim de produzir coquetéis enzimáticos com diversas aplicações biotecnológicas.

8 REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. A.; SULIEMAN, S.; MCGAW, L. J. Microbial communication: A significant approach for new leads. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 461–470, 2017.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; NOUR EL-DIN, M.; REFAAT, B. M. *et al.* Biotechnological Application of Thermotolerant Cellulose-Decomposing Bacteria in Composting of Rice Straw. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 135–143, 2016.

ABE, T.; BIGNELL, D.; HIGASHI, M. **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000.

ABELHO, M. Leaf-litter mixtures affect breakdown and macroinvertebrate colonization rates in a stream ecosystem. **International Review of Hydrobiology**, vol. 94, no. 4, p. 436-451. 2009. <http://dx.doi.org/10.1002/iroh.200811159>.

AGERER, R.; AMMIRATI, J.; BLANZ, P. *et al.* Open letter to the scientific community of mycologists. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, n. 7, p. 981–983, 2000.

AIME, M. C.; BREARLEY, F. Q. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species discovery. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2177–2180, 2012.

ALAM, MD. Z.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ABD-AZIZ, S.; MOLLA, A. H. Optimization of compatible mixed cultures for liquid state bioconversion of municipal wastewater sludge. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 149, n. 1/4, p. 113–126, 2003.

ALI, S. S.; WU, J., XIE, R.; ZHOU, F.; SUN, J. & HUANG, M. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis*. **PLoS One**, vol. 12, no. 7, p. e0181141. 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0181141>.</jrn>

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, W. E. & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, vol. 215, no. 3, p. 403-410. 1990. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

ALVES JUNIOR, S. L.; MÜLLER, C.; BONATTO, C.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; FONGARO, G. & TREICHEL, H. Bioprospection of enzymes and microorganisms in insects to improve second-generation ethanol production. **Industrial Biotechnology** (New Rochelle, N.Y.), vol. 15, no. 6, p. 336-349. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/ind.2019.0019>.

ANDERSEN, T.; SÆTHER, O. A. *Usambaromyia nigrata* gen. n., sp. n., and Usambaromyiinae, a new subfamily among the Chironomidae (Diptera). **Aquatic Insects**, v. 16, n. 1, p. 21–29, 1994.

ANDERSON, N. H. & CUMMINS, K.W. Influences of diet on the life histories of aquatic insects. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, vol. 36, no. 3, p. 335-342, 1979. <http://dx.doi.org/10.1139/f79-052>.

ARO, N., PAKULA, T. & PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 29, no. 4, p. 719-739. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>.

AZEVEDO, F. D & FARJALLA, V. F. Biogeografia de microrganismos: padrões, dificuldades e perspectivas. **Oecologia Australis**. 14(4), p.839-852, 2010. doi:10.4257/oeco.2010.1404.04

BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8711–8724, 2019.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. v. 52 p. 858-875, 2011.

BÄRLOCHER, F. **The Ecology of Aquatic Hyphomycetes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p 225.

BARY, A. **Die Erscheinung der Symbiose**. Verlag Karl J. De Gruyter, 1879. p. 30.

BELMONT-MONTEFUSCO, E. L.; NACIF-MARÇAL, L.; ASSUNÇÃO, E. N.; HAMADA, N. & NUNES-SILVA, C. G. Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects. **Acta Amazonica**, vol. 50, no. 4, p. 346-354. 2020a. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392202000902>.

BELMONT-MONTEFUSCO, E. L.; OLIVEIRA, J. B.; MAR, H. B.; SANTA-ROSA, P. S.; HAMADA, N. & NUNES-SILVA, C. G. Isolamento e potencial enzimático de fungos associados ao intestino de larvas de *Stenochironomus* Kieffer (Insecta: Diptera: Chironomidae). **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, no. 5, p. 28644-28651. 2020b. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n5-347>.

BEN TAHER, I.; BENNOUR, H.; FICKERS, P.; HASSOUNA, M. Valorization of potato peels residues on cellulase production using a mixed culture of *Aspergillus niger* ATCC 16404 and *Trichoderma reesei* DSMZ 970. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 1, p. 183–192, 2017.

BENCH, M. E.; WHITE, M. M. New species and first records of trichomycetes from immature aquatic insects in Idaho. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 295–312, 2012.

BENTES, S.P.C.; HAMADA, N.; FERREIRA-KEPPLER, R.L. Caracterização morfológica de ovos de insetos aquáticos e seus habitats na Amazônia central, Brasil. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R. B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. 2. ed. Manaus: Editora INPA, 2019, p. 724.

BERG, H. B. Larval food and feeding behaviour. In: ARMITAGE, P. D.; CRANSTOM, P. S.; PINDER, L. C. V. (Eds). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. Chapman & Hall, London, UK, 1995, p. 136-168.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N. *et al.* Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid

chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 219–228, 2013.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S. *et al.* Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.

BIEDERMANN, P. H. W. & VEGA, F. E. Ecology and evolution of insect–fungus mutualisms. **Annual Review of Entomology**, vol. 65, no. 1, p. 431–455, 2020.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024910>.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

BORKENT, A. The systematics and phylogeny of the *Stenochironomus* complex (*Xestochironomus harrisius*, and *Stenochironomus*) (Diptera: Chironomidae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Cambridge University Press (CUP), v. 116, n. S128, p. 5–270, 1984.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120–128, 2010.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P. V. Cellulolytic Enzymes Production *via* Solid-State Fermentation: Effect of Pretreatment Methods on Physicochemical Characteristics of Substrate. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

BROWNLIE, J. C.; JOHNSON, K. N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 348–354, 2009.

BURGHORN, H. P.; SOTEROPOULOS, P.; PADERU, P.; KASHIWAZAKI, R. & PERLIN, D. S. Molecular evaluation of the plasma membrane proton pump from *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 46, no. 3, p. 615–624. 2002.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.3.615-624.2002>.

BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: a review. **Scientific Bulletin Series F Biotechnologies**, v. XX, 2016.

CADETE, R. M.; DE LAS HERAS, A. M.; SANDSTRÖM, A. G. *et al.* Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 167, 2016.

CALDERA, E. J.; POULSEN, M.; SUEN, G.; CURRIE, C. R. Insect symbioses: A case study of past, present, and future fungus-growing ant research. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 1, p. 78–92, 2009.

CALDERÓN-CORTÉS, N.; QUESADA, M.; WATANABE, H.; CANO-CAMACHO, H. & OYAMA, K. Endogenous plant cell wall digestion: a key mechanism in insect evolution. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, vol. 43, no. 1, p. 45–71. 2012.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160312>.

- CAPRILES, C. H.; MATA, S. & MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, vol. 106, no. 2, p. 73-79. 1989.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00437084>.
- CASTILLO, M. R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; LINDEN, J. C.; TENDERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 9, p. 967–972, 1994.
- CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. *et al.* Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129, 2008.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. vol.33, n.1, 2010.
- CAVICCHIOLI, R.; RIPPLE, W.J.; TIMMIS, K.N.; AZAM, F., *et al.* Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, 17, p. 569–586, 2019.
- CERDA, A.; MEJÍAS, L.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1059–1068, 2017.
- CHAN CUPUL, W.; HEREDIA ABARCA, G.; MARTÍNEZ CARRERA, D.; RODRÍGUEZ VÁZQUEZ, R. Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*–*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett–Burman experimental design. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 114–121, 2014.
- CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; TERÁN-HILARES, R.; *et al.* Bioconversion of hemicellulose into ethanol and value-added products: commercialization, trends, and future opportunities. **Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products**. p. 97–134, 2018. Elsevier Inc.
- CHE, S.; MEN, Y. Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 9–10, p. 1343–1358, 2019.
- CHEN, B.; TEH, B. S.; SUN, C.; HU, S.; LU, X.; BOLAND, W. & SHAO, Y., Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. **Scientific Reports**, vol. 6, no. 1, p. 29505. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep29505>.
- CHIANG, Y.-M.; CHANG, S.-L.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 137–143, 2011.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Nono levantamento agosto 2022 – safra 2021/2022**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4731-safra-2022-23-producao-de-graos-pode-chegar-a-308-milhoes-de-toneladas-impulsionada-pela-boa-rentabilidade-de-milho-soja-e-algodao>. Acesso em 0/09/2022.

COPETE-PERTUZ, L. S.; ALANDETE-NOVOA, F.; PLÁCIDO, J.; CORREA-LONDOÑO, G. A.; MORA-MARTÍNEZ, A. L. Enhancement of ligninolytic enzymes production and decolourising activity in *Leptosphaerulina* sp. by co-cultivation with *Trichoderma viride* and *Aspergillus terreus*. **Science of The Total Environment**, v. 646, p. 1536–1545, 2019a.

CORREDOR, D. Y.; SUN, X. S.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K. L.; WANG, D. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenerg**, v. 2, n. 1, p. 43–50, 2008.

COVICH, A. P. Geographical and historical comparisons of neotropical streams: biotic diversity and detrital processing in highly variable habitats. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 7, n. 4, p. 361–386, 1988.

DANTAS, G. P. S.; HAMADA, N.; MENDES, H. F. Article a new neotropical species of the genus *Stenochironomus* kieffer (Diptera: Chironomidae) with wood-mining larvae. **Zootaxa**. p. 47–54, 2010.

DAVE, B. R.; SUDHIR, A. P.; PARMAR, P. *et al.* Enhancement of cellulase activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: Optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 108–115, 2013.

DE PRETTO, C.; GIORDANO, R. DE L. C.; TARDIOLI, P. W.; COSTA, C. B. B. Possibilities for producing energy, fuels, and chemicals from soybean: a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 10, p. 1703–1730, 2018.

DE ROY, K.; MARZORATI, M.; VAN DEN ABEELE, P.; VAN DE WIELE, T.; BOON, N. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1472–1481, 2014.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZON, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, 107. p. 517–521, 2012

DIAS, L. M.; DOS SANTOS, B. V.; ALBUQUERQUE, C. J. B. *et al.* Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 708–718, 2018.

DIRZO, R.; YOUNG, H.S.; GALETTI, M. *et al.* Defaunation in the anthropocene. science (80) 345:401–406. In: DOUGLAS, A. E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 17–34, 2014.

DOUGLAS, A. Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms **Annual Review of Entomology**, 60, p.17-34, 2015. DOI:10.1146/annurev-ento-010814-020822.

- DUEÑAS, R.; TENDERDY, R. P.; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 333–337, 1995.
- EL-ELIMAT, T.; RAJA, H. A.; FIGUEROA, M. *et al.* Freshwater fungi as a source of chemical diversity: a review. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 3, p. 898–916, 2021.
- ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects – Diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.
- ERIKSSON, J. E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J. A. O. *et al.* Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, n. 3, p. 1347–1353, 1990.
- EVANGELISTA, D. E.; DE PAULA, F. F. P.; RODRIGUES, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Pectinases from *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): Putative accessory digestive enzymes. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 5–5, 2015.
- EZEILO, U. R.; LEE, C. T.; HUYOP, F.; ZAKARIA, I. I.; WAHAB, R. A. Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 243, p. 206–217, 2019. Academic Press.
- FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X.-Y. *et al.* Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 2, p. 390–398, 2013.
- FARRELL, B. D.; SEQUEIRA, A. S.; O’MEARA, B. C. *et al.* The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). **Evolution**, v. 55, n. 10, p. 2011–2027, 2001.
- FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016.
- FIGUEIREDO, F. C. **Efeito prebiótico de xilo-oligossacarídeos produzidos a partir da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando extração alcalina e hidrólise de xilanasas fúngicas.** 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.
- FIORI, L. F.; CIONEK, V. M.; SACRAMENTO, P. A. & BENEDITO, E. Dynamics of leaf fall from riparian vegetation and the accumulation in benthic stock in neotropical streams. **Revista Árvore**, vol. 40, no. 1, p. 89-96, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-67622016000100010>.
- FLORES, C.; VIDAL, C.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 249–257, 2009.

FRANÇA, J. S.; GREGÓRIO, R. S.; D'ARC DE PAULA, J. *et al.* Composition and dynamics of allochthonous organic matter inputs and benthic stock in a Brazilian stream. **Marine and Freshwater Research**, v. 60, n. 10, p. 990, 2009.

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

GANTER, P. F. Yeast and invertebrate associations. In: ROSA, C.A. & PÉTER, G. (eds.), **Biodiversity and ecophysiology of yeasts: the yeast handbook**. 1 ed. Springer Press, Germany, p. 302-370, 2006.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.; BOLADO, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G. Chemical oxidation with ozone as pre-treatment of lignocellulosic materials for bioethanol production. *Chemical Engineering Transactions*. **Anais...** . v. 21, p.1273–1278, 2010. Italian Association of Chemical Engineering - AIDIC.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GIMENES, K. Z.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI, J. R. I. Decomposição de matéria orgânica alóctone e autóctone em ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 04, p. 1036–1073, 2010.

GOMES, E. C. Q.; GODINHO, V. M.; SILVA, D. A. S.; DE PAULA, *et al.* Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, vol. 22, no. 3, p. 381-393. 2018.<http://dx.doi.org/10.1007/s00792-018-1003-1>.

GONÇALVES, V. N.; CAMPOS, L. S.; MELO, I. S.; PELLIZARI, V. H.; ROSA, C. A. & ROSA, L. H. *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. **Polar Biology**, vol. 36, no. 12, p. 1823-1831. 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00300-013-1403-8>.

GONZÁLEZ, C.; WU, Y.; ZULETA-CORREA, A.; JARAMILLO, G.; VASCO-CORREA, J. Biomass to value-added products using microbial consortia with white-rot fungi. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100831, 2021.

GRAÇA, M. A. S.; FERREIRA, V.; CANHOTO, C.; *et al.* A conceptual model of litter breakdown in low order streams. **International Review of Hydrobiology**, v. 100, n. 1, p. 1–12, 2015.

GRAÇA, M. A. S.; HYDE, K. & CHAUVET, E. Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical – subtropical low order streams. **Fungal Ecology**, vol. 19, p. 182-189, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2015.08.001>.

GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size, Share, **Global Industry Report**, 2022.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.

GURUNG, K.; WERTHEIM, B.; SALLES, F. J. The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 167, n. 3, p. 156–170, 2019.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419–425, 2011.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665–667, 1997.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 173–178, 1999.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HAMMER, T. J.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; JAFFE, S. P.; FIERER, N. Caterpillars lack a resident gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 36, 2017.

HANNULA, S. E.; ZHU, F.; HEINEN, R. & BEZEMER, T. Foliar-feeding insects acquire microbiomes from the soil rather than the host plant. **Nature Communications**, vol. 10, no. 1, p. 1254, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09284-w>.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

HEITMAN, J. H.; BARBARA, J.; HOWLETT; PEDRO W. CROUS *et al.* **The Fungal Kingdom**. American Society of Microbiology, 2017. p. 79-95.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509- 547, 2007.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 80, n. 5, p. 204–214, 2004.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; *et al.* Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 248–252, 2011.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S. S.; SUKUMARAN, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 265–271, 2017.

IRONS, J. G.; OSWOOD, M. W.; STOUT, R. J.; PRINGLE, C. M. Latitudinal patterns in leaf litter breakdown: is temperature really important? **Freshwater Biology**, v. 32, n. 2, p. 401–411, 1994.

JUHNEVICA-RADENKOVA, K.; KVIŠIS, J.; MORENO, D. A.; *et al.* Highly-efficient release of ferulic acid from agro-industrial by-products via enzymatic hydrolysis with cellulose-degrading enzymes: Part I—The superiority of hydrolytic enzymes *versus* conventional hydrolysis. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 782, 2021.

KAPOOR, V.; NANDAN, D. Optimization of physico-chemical parameters for the production of endoxylanase using combined response surface method and genetic algorithm. LAHA, V.; MARÉCHAL, P.; MISHRA, S.K. (eds) **Springer Proceedings in Mathematics & Statistics**, vol 355. Springer, Singapore, p.307–321, 2021.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F. *et al.* Application of the biorefinery concept to produce l-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1765–1772, 2011.

KARP, S. G.; ROZHKOVA, A. M.; SEMENOVA, M. V. *et al.* Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124888, 2021.

KOLASA, M.; AHRING, B. K.; LÜBECK, P. S.; LÜBECK, M. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143–148, 2014.

KONDRATIEFF, B. An introduction to the aquatic insects of North America. 4th Edition. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 28, n. 1, p. 266–267, 2009.

KUBICEK, C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, p.1–27, 1992.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, vol. 5, no. 2, p. 150-163, 2004. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/5.2.150>.

KUMAR, S.; HAP. I.; PRAKASH, J.; SING, S. K.; MISHRA, S.; RAJ. R. Purification, characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI 10.1007/s13205-017-0615-y.

KUMAR, V.; KUMAR, A.; PRATYOOSH, D. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226-235, 2018. DOI: 10.1007/s12033-018-0059-6

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020.

LATIF, F.; IBRAHIM RAJOKA, M.; MALIK, K. A. Saccharification of *Leptochloa fusca* (kallar grass straw) using thermostable cellulases. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 2, p. 107–111, 1994.

LEAL, C. G.; POMPEU, P. S.; GARDNER, T. A. *et al.* Multi-scale assessment of human-induced changes to Amazonian instream habitats. **Landscape Ecology**, vol. 31, no. 8, p. 1725-1745, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10980-016-0358-x>

LIMA, M.; FIRMINO, V. C.; DE PAIVA, C. K. S.; JUEN, L. & BRASIL, L.S. Land use changes disrupt streams and affect the functional feeding groups of aquatic insects in the Amazon. **Journal of Insect Conservation**, vol. 26, no. 2, p. 137-148. 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s10841-022-00375-6>.

LIN, X. L.; YAO, Y.; YAN, C. C.; LIU, W. BIN. *Stenochironomus zhengi* sp. nov. From Dawei Mountain National Park, Yunnan, China (Diptera: Chironomidae). **Zootaxa**, Magnolia Press, 2021.

MACIEL, M. J.; CASTRO E SILVA, A.; TELLES RIBEIRO, H. C. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 0–0, 2010.

MAIJALA, P.; FAGERSTEDT, K. V. & RAUDASKOSKI, M. Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. **The New Phytologist**, vol. 117, no. 4, p. 643-648. 1991. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00968.x>.

MALGAS, S.; MAFA, M. S.; MKABAYI, L.; PLETSCHE, B. I. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1-13, Nov. 2019. DOI: 10.1007/s11274-019-2765-z.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, C. J.; GOMES, E. *et al.* Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66–75, 2018.

MARTIN, N.; REGINA DE SOUZA, S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase Production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 813–819, 2004.

MARTINS, R. T. M. C.; BORGES, A. K. P.; ARMIATO, A. M. & PIMENTA, R. S. Comunidade de fungos endofíticos associados a planta etnomedicinal amazônica *Bellucia grossularioides* (L) Trianna e avaliação de suas propriedades antimicrobianas. **Desafios - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, vol. 3, no. 2, p. 112-122, 2016. <http://dx.doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2016v3n2p112>.

MCCARTY, N. S.; LEDESMA-AMARO, R. Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 181–197, 2019.

MCKIE, B. G.; CRANSTON, P. Aquatic wood-an insect perspective River restoration: Outcomes for key ecosystem processes and trophic relationships. In: GROVE, S. J.; HANULA, J. L., eds. **Insect biodiversity and dead wood: proceedings of a symposium for the 22nd International Congress of Entomology**. Gen. Tech. Rep. SRS-93. Asheville, NC: U.S. Department of Agriculture Forest Service, Southern Research Station. 2006, 109 p.

MEDINA-VILLAR, S.; ALONSO, Á.; VÁSQUEZ DE ALDANA, B. R.; PÉREZ-CORONA, E. & CASTRO-DÍEZ, P. Decomposition and biological colonization of native and exotic leaf litter in a Central Spain stream. **Limnetica**, no. 34, p. 293-310. 2015. <http://dx.doi.org/10.23818/limn.34.23>.

MEJIAS, L.; CERDA, A.; BARRENA, R.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Microbial strategies for cellulase and xylanase production through solid-state fermentation of digestate from biowaste. **Sustainability (Switzerland)**, v. 10, n. 7, 2018.

MELO, P.; PEREIRA, C.; TOMIE, T.; FUKUDA, T. T. H.; PUPO, M. T. Interações simbióticas entre micro-organismos e insetos. **Revista RG News**, 5, p. 48-56, 2019.

MIELLENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532–3539, 2009.

MILALA, M. A.; NOK, A. J.; INUWA, H. M. ;IBRAHIM, S. Isolation, purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus flavus* for possible use in paper industry. **Journal of Science and Technology** Vol. 3, No. 11, 2013.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOLLA, A. H.; FAKHRU’L-RAZI, A.; ABD-AZIZ, S.; HANAFI, M. M.; ALAM, MD. Z. In vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 849–856, 2001.

MONTEIRO, J. S.; GUSMÃO, L. F. P. Two new species of *Ceratosporella* (anamorphic fungi) from Brazilian Amazon Forest. **Nova Hedwigia**, v. 98, n. 3–4, p. 481–490, 2014.

MONTEIRO, J. S.; GUSMÃO, L. F. P.; CASTAÑEDA-RUIZ, R. F. Two new microfungi from Brazilian Amazon Forest: *Atrogeniculata submersa* and *Nigrolentilocus amazonicus*. **Mycotaxon**, v. 127, n. 1, p. 39–45, 2014.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean? **PLoS Biology**, 9, p. 1–8, 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>

MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 353–361, 2008.

NASCIMENTO, F. V.; DE CASTRO, A. M.; SECCHI, A. R.; COELHO, M. A. Z. Insights into media supplementation in solid-state fermentation of soybean hulls by *Yarrowia lipolytica*: Impact on lipase production in tray and insulated packed-bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, p. 107866, 2021.

NASIR, H.; NODA, H. Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): Possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 52, n. 4, p. 175–182, 2003.

NGUYEN, N. H.; SUH, S.-O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232–1241, 2006.

- NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, J. A.; TORO, B. F.; MÉNDEZ-LÍTER, J. A.; CAÑADA, F. J.; PRIETO, A.; EUGENIO, L. I.; MARTÍNEZ, M. J. Exploiting xylan as sugar donor for the synthesis of an antiproliferative xyloside using an enzyme cascade. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2019.
- NONAKA, K.; ABE, T.; IWATSUKI, M. *et al.* Enhancement of metabolites productivity of *Penicillium pinophilum* FKI-5653, by co-culture with *Trichoderma harzianum* FKI-5655. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 12, p. 769–774, 2011.
- NYGAARD, S.; HU, H.; LI, C. *et al.* Reciprocal genomic evolution in the ant–fungus agricultural symbiosis. **Nature Communications**, vol. 7, no. 1, p. 12233, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12233>.
- O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J.-M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 2005.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.
- OKEKE, B. C. Cellulolytic and xylanolytic potential of high β -glucosidase-producing *Trichoderma* from decaying biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581–1598, 2014.
- OLIVEIRA, A. C. D.; FERNANDES, M. L.; MARIANO, A. B. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1503–1511, 2014.
- OSIMANI, A.; MILANOVIĆ, V.; CARDINALI, F. *et al.* The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. **International Journal of Food Microbiology**, v. 272, p. 49–60, 2018.
- PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA-JUNIOR, E. A. *et al.* Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1122, 2018.
- PARISE, A.G. & PINHO, L.C., A new species of *Stenochironomus* Kieffer, 1919 from the Atlantic Rainforest in southern Brazil (Diptera: chironomidae). **Aquatic Insects**, vol. 37, no. 1, p. 1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/01650424.2015.1115078>.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. p.13–41, 2017. Elsevier.
- PENNINGTON, M.J.; PRAGER, S.M.; WALTON, W.E. & TRUMBLE, J.T. *Culex quinquefasciatus* larval microbiomes vary with instar and exposure to common wastewater contaminants. **Scientific Reports**, vol. 6, no. 1, p. 21969, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21969>.
- PERCIVAL ZHANG, Y.H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.
- PEREIRA, E. S.; SARQUIS, M. I. M.; FERREIRA-KEPPLER, R. L.; HAMADA, N. & ALENCAR, Y. B. Filamentous fungi associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in

municipalities of the Brazilian Amazon. **Neotropical Entomology**, vol. 38, no. 3, p. 352-359, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2009000300009>.

PIEPENBRING, M.; MACIÁ-VICENTE, J. G.; CODJIA, J. E. I.; *et al.* Mapping mycological ignorance – checklists and diversity patterns of fungi known for West Africa. **IMA Fungus**, v. 11, n. 1, p. 13, 2020.

PINDER, L. The habitats of chironomid larvae. In: ARMITAGE, P.D., CRANSTON, P.S., PINDER, L.C.V. (eds) **The Chironomidae**. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0715-0_6

PINHO, L. C. & PEPINELLI, M. Ordem Diptera. In: HAMADA, N., J. L.; NESSIMIAN and R. B. QUERINO, eds. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Editora do INPA, p. 447-456, 2014.

POTHULA, R.; SHIRLEY, D.; PERERA, O. P. *et al.* The digestive system in *Zygentoma* as an insect model for high cellulase activity. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212505, 2019.

PRZEMIENIECKI, S. W.; KOSEWSKA, A.; CIESIELSKI, S.; KOSEWSKA, O. Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113265, 2020.

QIAN, X.; CHEN, L.; SUI, Y.; *et al.* Biotechnological potential and applications of microbial consortia. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107500, 2020.

RADENKOV, V.; JUHNEVICA-RADENKOVA, K.; GÓRNAŚ, P.; SEGLINA, D. Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 77, p. 64–76, 2018.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, n° 03, Vol. 1, 1998.

RAYHANE, H.; JOSIANE, M.; GREGORIA, M.; *et al.* From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. **Journal of Environmental Management**, v. 252, p. 109496, 2019.

RICCIARDI, A. Occurrence of chironomid larvae (*Paratanytarsus* sp.) as commensals of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *D. bugensis*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 6, p. 1159–1162, 1994.

RODRIGUES REIS, C. E.; RAJENDRAN, A.; SILVA, M. B.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. The application of microbial consortia in a biorefinery context: understanding the importance of artificial lichens. **Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy**. p.423–437, 2018. Cham: Springer International Publishing.

RODRIGUES, P. O.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; *et al.* Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683–2693, 2020.

RODRIGUES, P. O.; DA SILVA BARRETO, E.; BRANDÃO, R. L.; *et al.* On-site produced enzyme cocktails for saccharification and ethanol production from sugarcane bagasse

- fractionated by hydrothermal and alkaline pretreatments. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, n. 1, p. 95–106, 2022.
- RODRIGUES, R. C. L. B., *et al.* Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1247-1253, 2010.
- ROJAS-JIMÉNEZ, K.; HERNÁNDEZ, M. Isolation of fungi and bacteria associated with the guts of tropical wood-feeding coleoptera and determination of their lignocellulolytic activities. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- ROMÃO, T. C.; MENEZES-FILHO, A. C. P.; HARAKAVA, R.; CASTRO, C. F. S. & MORAIS, P. B. Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of *Phylloicus sp.* (Trichoptera: Calamoceratidae). **Brazilian Journal of Biology** = Revista Brasileira de Biologia, vol. 84, p. e259983, 2024. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.259983>.
- RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; *et al.* Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.
- SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.
- SAIN, S. K.; PANDEY, A. K. Biological spectrum of *Trichoderma harzianum* Rifai isolates to control fungal diseases of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 49, n. 19–20, p. 507–521, 2016. Taylor and Francis Ltd.
- SALAZAR, L. N.; ASTOLFI, V.; OGIMBOSVSKI, T. A. *et al.* Newly Isolated *Penicillium* sp. for cellulolytic enzyme production in soybean hull residue. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Useful microbial enzymes—An introduction. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. p.1–11, 2017.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 74, no. 12, p. 5463-5467, 1977. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- SANTOS, T. T.; LEITE, T. S.; QUEIROZ, C. B.; ARAÚJO, E. F.; PEREIRA, O. L. & QUEIROZ, M. V. High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 120, no. 2, p. 388-401, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12985>.
- SANTOS, T. T.; OLIVEIRA, K. A.; VITAL, M. J. S.; COUCEIRO, S. R. M. & MORAIS, P. B. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus larvae* (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, vol. 13, no. 3, p. 317-325, 2018. <http://dx.doi.org/10.46357/bcnaturais.v13i3.340>.
- SANTOS, T. T.; DE OLIVEIRA, D. P.; CABETTE, H. S. R.; DE MORAIS, P. B. The digestive tract of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) harbours different yeast taxa in Cerrado streams, Brazil. **Symbiosis**, v. 77, n. 2, p. 147–160, 2019.

SANTOS, T. T. DOS; PES, A. M. O.; MORAIS, P. B. DE. A diverse and partially cellulolytic fungal community contributes to the diet of three species of the aquatic insect *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in Amazonian streams. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. suppl 4, 2021.

SANTOS, T. T.; PES, A. M. O.; MORAIS, P. B. A diverse and partially cellulolytic fungal community contributes to the diet of three species of the aquatic insect *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in Amazonian streams. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. suppl 4, 2021.

SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, 2007.

SELIȘTEANU, D.; TEBBANI, S.; ROMAN, M.; PETRE, E.; GEORGEANU, V. Microbial production of enzymes: Nonlinear state and kinetic reaction rates estimation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 23–36, 2014.

SHAH, A. R.; SHAH, R. K.; MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 16, p. 2047-2053, 2006. DOI: 10.1016/j. biortech.2005.10.006.

SHEARER, C. A.; ZELSKI, S. E.; RAJA, H. A. *et al.* Distributional patterns of freshwater ascomycetes communities along an Andes to Amazon elevational gradient in Peru. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 8, p. 1877–1897, 2015.

SHELOMI, M.; LIN, S. S. & LIU, L. Y. Transcriptome and microbiome of coconut rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) larvae. **BMC Genomics**, vol. 20, no. 1, p. 957, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-6352-3>.

SHEN, C.; WANG, J.; HE, J.-Z.; YU, F.-H.; GE, Y. Plant diversity enhances soil fungal diversity and microbial resistance to plant invasion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 11, 2021.

SHI, W.; DING, S. Y. & YUAN, J. S. Comparison of insect gut cellulase and xylanase activity across different insect species with distinct food sources. **BioEnergy Research**, vol. 4, no. 1, p. 1-10. 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-010-9096-0>.

SHUKLA, S. P.; PLATA, C.; REICHEL, M.; STEIGER, S.; HECKEL, D. G.; KALTENPOTH, M.; VILCINSKAS, A. & VOGEL, H. Microbiome-assisted carrion preservation aids larval development in a burying beetle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 115, no. 44, p. 11274-11279, 2018. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1812808115>.

SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; TRES, M. V.; *et al.* Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 102–107, 2013.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008.

- SISTA KAMESHWAR, A. K.; QIN, W. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. **Mycology**, v. 9, n. 2, p. 93–105, 2018.
- SOUZA N. F.; PINHEIRO J. A.; BRÍGIDA A. I. S.; MORAIS, J. P. S.; SOUZA-FILHO, M. M.; ALEXANDRE, L. C.; ROSA, M. F. Nanocelulose e lignina obtidas de fibras do mesocarpo do dendê. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 12., 2013, Florianópolis. Anais... <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/976825>
- SOUZA, C. R.; TEIXEIRA, M. F. N. P & MORAIS, P. B. Diversity of cellulolytic and xylanolytic fungi associated with the digestive tract of aquatic insect larvae in streams of the Amazon Forest and Cerrado in Brazil. **Brazilian Journal of Biology** = Revista Brasileira de Biologia, vol. 82, 8, 2022.
- SPERANDIO, G. B.; FILHO, E. X. F. An overview of *Trichoderma reesei* co-cultures for the production of lignocellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3019–3025, 2021.
- STAHL, P. D.; CHRISTENSEN~, M. In vitro mycelial interactions among members of a soil microfungus community. **Soil Biology and Biochemistry**, Volume 24, Issue 4, p. 309-316, 1992.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microorganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Food Science and Technology**, 18 (4), 1998.
- STEFANI, F. O. P.; KLIMASZEWSKI, J.; MORENCY, M. J.; BOURDON, C.; LABRIE, P.; BLAIS, M.; VENIER, L. & SÉGUIN, A. Fungal community composition in the gut of rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae) from the Canadian boreal forest reveals possible endosymbiotic interactions for dietary needs. **Fungal Ecology**, vol. 23, pp. 164-171. 2016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2016.05.001>
- SUH, S. O.; MCHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D.; BLACKWELL, M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycological Research**, 109: 261– 265. 2005.
- ŠUSTR, V.; STINGL, U.; & BRUNE, A. Microprofiles of oxygen, redox potential, and pH, and microbial fermentation products in the highly alkaline gut of the saprophagous larva of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae). **Journal of Insect Physiology**, 67, 64-69, 2014. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.06.007
- SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305–311, 2001.
- TANRUEAN, K.; PENKHRUE, W.; KUMLA, J.; SUWANNARACH, N.; LUMYONG, S. Valorization of lignocellulosic wastes to produce phytase and cellulolytic enzymes from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* s116w, under semi-solid state fermentation. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 286, 2021.
- TEIXEIRA, M. F. N. P.; SOUZA, C.R. & MORAIS, P.B. Diversity and enzymatic capabilities of fungi associated with the digestive tract of larval stages of a shredder insect in Cerrado and Amazon Forest, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** = Revista Brasileira de Biologia, vol. 82, p. e260039, 2022. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.260039>. 2022.

TEIXEIRA, W. F. A.; BATISTA, R. D.; AMARAL, S. C. C. A.; JÚNIOR, A. C. F.; TERRASAN, C. R. F.; SANTANA, M. W. P. R.; SIQUEIRA, F. G.; PAULA-ELIAS, F. C. & ALMEIDA, A. F. 2021. Minimal enzymes cocktail development by filamentous fungi consortia in solid-state cultivation and valorization of pineapple crown waste by enzymatic saccharification. **Waste Biomass Valorization** 12: 2521–2539

TERRA, W. R., FERREIRA, C. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. **Arthropod Structure & Development**, 56, 2020. 100931.
doi:10.1016/j.asd.2020.100931

TIŠMA, M.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P.; ŠELO, G.; *et al.* *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124997, 2021.

TONIN, A. M.; GONÇALVES JUNIOR, J. F.; BAMBI, *et al.* Plant litter dynamics in the forest-stream interface: precipitation is a major control across tropical biomes. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 10799, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10576-8>.

TRAKARNPAIBOON, S.; SRISUK, N.; PIYACHOMKWAN, K.; SAKAI, K.; KITPREECHAVANICH, V. Enhanced production of raw starch degrading enzyme using agro-industrial waste mixtures by thermotolerant *Rhizopus microsporus* for raw cassava chip saccharification in ethanol production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 47, n. 8, p. 813–823, 2017.

TRIVINHO-STRIXINO, S., 2014. Ordem Diptera. Família Chiromidae. Guia de identificação de larvas. In: N. HAMADA, J.L. NESSIMIAN and R.B. QUERINO, eds. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Editora do INPA, p. 457-660.

UNBAN, K.; KHATTHONGNGAM, N.; SHETTY, K.; KHANONGNUCH, C. Nutritional biotransformation in traditional fermented tea (Miang) from north Thailand and its impact on antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 2687–2699, 2019.

VALENCIA, E. Y. & CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9–18, 2013.

VALENTE-NETO, F.; SILVA, F. H.; COVICH, A. P. & ROQUE, F. O. Streams dry and ecological uniqueness rise: environmental selection drives aquatic insect patterns in a stream network prone to intermittence. **Hydrobiologia**, vol. 847, no. 2, p. 617-628, 2020.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10750-019-04125-9>.

VEGA, F. E.; DOWD, P.F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M., editors. **Insect-fungal associations : ecology and evolution**. Oxford University Press; New York: 2005. p. 211-243.

VERA-PONCE DE LEÓN, A., SANCHEZ-FLORES, A., ROSENBLUETH, M. & MARTÍNEZ-ROMERO, E., Fungal community associated with dactylopius (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. **Frontiers in Microbiology**, vol. 7, pp. 954. 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00954>. PMID:27446001.

- VERDUZCO-OLIVA, R. & GUTIERREZ-URIBE, J. A. Beyond enzyme production: Solid State Fermentation (SSF) as an alternative approach to produce antioxidant polysaccharides. **Sustainability**, v. 12, n. 2, p. 495, 2020.
- VICTORIA, J.; ODANETH, A. & LALI, A. Importance of cellulase cocktails favoring hydrolysis of cellulose. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 547–553, 2017.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42-43.1956.
- WAKEFIELD, J.; HASSAN, H. M.; JASPARS, M.; EBEL, R.; RATEB, M. E. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- WANG, J.; LI, L.; XU, H.; *et al.* Construction of a fungal consortium for effective degradation of rice straw lignin and potential application in bio-pulping. **Bioresource Technology**, v. 344, 2022. Elsevier Ltd.
- WANTZEN, K. M. Cerrado streams - characteristics of a threatened freshwater ecosystem type on the Tertiary Shields of Central South America. **Amazoniana**, 17(3/4), 481-502.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. eds. **PCR protocols a guide to methods and applications**. Cambridge: Academic Press Inc, p. 315-322, 1990. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- WONG, M. K. M.; GOH, T. K.; HODGKISS, I. J. *et al.* Role of fungi in freshwater ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, 7, 1187–1206, 1998.
- WRIGHT, M. S.; COVICH, A. P. The effect of macroinvertebrate exclusion on leaf breakdown rates in a tropical headwater stream. **Biotropica**, v. 37, n. 3, p. 403–408, 2005.
- WU, Q.; SUN, R.; NI, M.; YU, J.; LI, Y.; YU, C.; DOU, K.; REN, J. & CHEN, J. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. **PLoS One** 12, 2017.
- WU, Y.; ZHENG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, G.; ZHENG, H. & HU, F., *Apis cerana* gut microbiota contribute to host health though stimulating host immune system and strengthening host resistance to *Nosema ceranae*. **Royal Society Open Science**, vol. 7, no. 5, p. 192100, 2020. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.192100>
- YAN, Y.-S.; ZHAO, S.; LIAO, L.-S.; *et al.* Transcriptomic profiling and genetic analyses reveal novel key regulators of cellulase and xylanase gene expression in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 279, 2017.
- YANG, S. S.; WU, W. M.; BRANDON, A. M. *et al.* Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). **Chemosphere**, v. 212, p. 262–271, 2018.
- ZACHOW, C.; BERG, C.; MÜLLER, H.; MONK, J.; BERG, G. Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of

phytopathogens. **Journal of Biotechnology**, 10. out. 2016

ZELSKI, S. *Chaetorostrum quincemilensis*, gen. et sp. nov., a new freshwater ascomycete and its Taeniolella-like anamorph from Peru. **Mycosphere**, v. 2, n. 5, p. 593–600, 2011.

ZELSKI, S. E.; RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; SHEARER, C. A. *Conioscypha peruviana* sp. nov., its phylogenetic placement based on 28S rRNA gene, and a report of *Conioscypha gracilis* comb. nov. from Peru. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 319–325, 2015.

ZHAO, C.; DENG, L.; FANG, H. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 93–98, 2018.