
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)

Identificação e caracterização de fungos melanizados com potencial de degradação de tolueno

NOEMI CARLA BARON

Rio Claro
2014



NOEMI CARLA BARON

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MELANIZADOS
COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE TOLUENO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientadora: PROFa. DRA DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Co-orientador: PROF. DR. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Rio Claro
2014

*“Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde outros já foram”*

Alexander Graham Bell

A Deus, pela força nessa caminhada

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois nos momentos mais difíceis foi a fé que mais me ajudou a superar os obstáculos que surgiram;

À minha mais nova família, meu marido Gustavo. Muitas coisas aconteceram, e você sempre estava lá para me ajudar, você foi meu grande companheiro, inclusive nos fins de semana passados dentro do laboratório;

À minha família, meus pais Antonio e Benedita e meu irmão Bruno, sempre presentes e me dando todo o amor, carinho e conselhos de que necessitei;

À minha mais que orientadora Dra. Derlene, que foi mãe, amiga, conselheira, que me transmitiu uma vasta experiência na micologia e na vida. Você, jamais será esquecida, sou eternamente grata pelos anos que me proporcionou;

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, sempre muito compreensivo e prestativo. Agradeço pela oportunidade e por toda a estrutura de seu laboratório tão gentilmente cedida para a execução de grande parte desse projeto;

Ao Dr. Francesc X. Prenafeta-Boldú por toda orientação e aconselhamento dados mesmo à distância;

À Profa. Dra. Dejanira F. de Angelis por todo o auxílio financeiro concedido e por abrir as portas de seu laboratório e mobilizar seu pessoal, especialmente Dilza, Oscar e Márcio, para realização de parte dos experimentos;

À Dra. Nádia Regina Rodrigues do CPQBA – Unicamp por toda ajuda e conselhos na parte de cromatografia gasosa;

Ao “Abelzinho” e aos meus “irmãos” queridos Daniel e Gabriel, obrigada por toda hospitalidade, carinho e todas as gostosuras que me deram! Vou sentir falta do “lanchinho” do Abel, do pudim do Gá e da limonada do Dadá;

Aos companheiros de laboratório no CEIS e no Departamento de Física, em especial Hiléia, Ayumi, Virgínia, Weilan, Dani, Leandro e André, por todas as trocas de experiência no laboratório, pela amizade e pelos ótimos momentos de descontração;

Às todos os amigos, em especial minhas amigas Júlia e Débora, aprendemos muitas coisas juntas e já sinto muita falta da nossa convivência;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto;

À CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido ao longo destes dois anos.

RESUMO

A introdução de xenobióticos no ambiente por ações antrópicas é um quadro que se tornou comum principalmente desde a revolução industrial. O petróleo e seus derivados são os principais poluidores da atualidade. Associada às contaminações, uma séria devastação dos ecossistemas atingidos aconteceu e permanece até os dias de hoje sendo incontáveis os prejuízos já causados à natureza. Na busca da recuperação da homeostase de locais afetados, alternativas para a remoção física, química e biológica de contaminantes foram desenvolvidas. Ao conjunto de técnicas voltadas à remoção biológica de poluentes denominamos biorremediação, atualmente melhor aceito pela comunidade científica, pois a utilização do metabolismo microbiano resulta em baixo ou nenhum impacto negativo para os ecossistemas.

O uso de fungos na biorremediação é crescente, dentre estes os fungos melanizados compõem um grupo de interesse particular. Caracterizados pela coloração negra de suas colônias devido à deposição de melanina em sua parede celular, estudos recentes comprovaram seu envolvimento em processos de biodegradação de hidrocarbonetos, incluindo os BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos). As características extremofílicas e o caráter oligotrófico destes fungos são aspectos importantes que corroboram seu potencial de utilização em processos de biorremediação, bem como para estudos que envolvam a bioprospecção de novos produtos naturais, como enzimas.

Após anos de estudo nosso grupo preservou um número significativo de fungos filamentosos e leveduras melanizados isolados a partir de diferentes substratos ambientais associados a hidrocarbonetos. A partir deste acervo, dentre 200 isolados selecionados buscou-se aqueles com maior potencial para biodegradação de tolueno. Os dados já publicados sobre o tema embasaram o estabelecimento de uma nova proposta para triagem de microfungos assimiladores de BTEX e para a elaboração de frascos adaptados para análise cromatográfica de *headspace*. Além disso, a identificação morfológica e molecular dos 200 isolados resultaram na descoberta de possíveis novas espécies para a ciência. Assim, este trabalho contribuiu com dados sobre o potencial biotecnológico dos fungos melanizados para aplicação em biorremediação, discutidos no capítulo 1, e para a taxonomia e aspectos ecológicos destes micro-organismos, enfatizados no capítulo 2.

ABSTRACT

The introduction of xenobiotics compounds in the environment by human activities has become a common situation since the industrial revolution. Oil and its derivatives are the main polluters nowadays. Associated with the contaminations, a grave devastation of affected ecosystems happened and remains to these days causing unmeasured damage to nature. Searching for recovery of the homeostasis of affected local, alternatives to physical, chemical and biological removal of the contaminants have been developed. The set of techniques that aim the biological removal of organic pollutants is called bioremediation, currently accepted as the best by the scientific community, because the use of microbial metabolism results in low or no negative impact on ecosystems.

The use of fungi in bioremediation is growing, among them melanized fungi form a group of particular interest. Characterized by black pigmentation of their colonies due the deposition of melanin in their cell wall, recent studies have shown its involvement in processes of hydrocarbon biodegradation, including BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes). Extremophilic and oligotrophic characteristics of these fungi are important aspects that corroborate with their potential use in bioremediation processes, as well as studies involving bioprospecting of new natural products, such as enzymes.

After years of study our group has preserved a significant number of melanized yeasts and filamentous fungi isolated from different environmental substrates associated with hydrocarbons. From 200 selected isolates of this collection, it was sought those with the greatest potential for toluene biodegradation. The already published data on the subject based the establishment of a new proposal for screening BTEX-assimilating microfungi and to elaborate adapted bottles for chromatographic analysis of headspace. In addition, morphological and molecular identification of the 200 isolates resulted in the discovery of new putative species to science. This study contributed with data on the biotechnological potential of melanized fungi for application in bioremediation, discussed in chapter 1, the taxonomy and ecology of these microorganisms were emphasized in chapter 2.

Sumário

	Página
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
FUNGOS: BIOTECNOLOGIA E AMBIENTE	12
FONTES ALTERNATIVAS PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS.....	15
FUNGOS MELANIZADOS E A DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
 CAPÍTULO 1: POTENCIAL DE BIODERGRADAÇÃO DE TOLUENO POR FUNGOS MELANIZADOS	 26
APÊNDICE.....	57
 CAPÍTULO 2: OCORRÊNCIA DE FUNGOS MELANIZADOS ASSOCIADOS A HIDROCARBONETOS E POSSÍVEIS NOVAS ESPÉCIES.....	 71
APÊNDICE.....	114

APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

A busca por micro-organismos capazes de degradar moléculas tóxicas resultantes de eventos como derramamentos de petróleo e despejo de resíduos industriais é cada vez mais intensa. Ao conjunto de técnicas de tratamento biológico utilizadas para degradar, reduzir ou eliminar a periculosidade de compostos orgânicos ao meio ambiente e à saúde humana, denominamos biorremediação. Esta tecnologia foi desenvolvida na busca de formas de recuperação de áreas contaminadas e de procedimentos adequados para a manipulação de resíduos. É muito efetiva e promissora para o tratamento de diferentes contaminações, inclusive aquelas envolvendo hidrocarbonetos aromáticos (ALEXANDER, 1999; GADD, 2001; ATLAS; BRATHA, 2002).

Fungos filamentosos são organismos extremamente versáteis no que diz respeito ao seu metabolismo e à sua capacidade de adaptação em diversos tipos de ambiente, incluindo os mais extremos. São comprovadamente capazes de assimilar uma vasta gama de compostos, muitos dos quais classificados como tóxicos para os ecossistemas. O processo de biorremediação contribui para o equilíbrio de um ecossistema e seu sucesso depende, em grande parte, da microbiota existente. Pelas vantagens que oferece em relação às técnicas convencionais, a biorremediação tem conquistado um espaço cada vez maior no meio científico (SEABRA, 2008). Durante muito tempo os micro-organismos mais empregados para esta finalidade foram as bactérias, porém, atualmente a utilização de fungos, especialmente os filamentosos, tem sido recomendada devido à sua maior capacidade de adaptação a condições inóspitas. Esta característica deve-se à sua destacada bioatividade e às suas características morfológicas (GOPINATH et al., 2005), revelando diversas espécies de grande potencial (PRENAFETA-BOLDÚ; SUMMERBELL; DE HOOG, 2006; SINGH, 2006; SATOW et al., 2008).

O tolueno, hidrocarboneto alvo neste estudo, apresenta baixa degradabilidade no ambiente. Sua recalcitrância deve-se à dificuldade na clivagem do anel aromático que compõe a molécula, processo que exige vias metabólicas específicas nem sempre presentes em micro-organismos do solo, e por isso, as contaminações com tolueno acabam por prejudicar os locais afetados por um longo período (SINGH, 2006). Além da lenta degradação, o tolueno é altamente tóxico aos seres vivos. É um supressor do sistema nervoso central que quando inalado em doses muito elevadas pode ser fatal, e que mesmo a baixas concentrações, em exposições crônicas,

pode trazer complicações à saúde (WILBUR; BOSCH, 2004). A intoxicação aguda pelo tolueno pode-se expressar na forma de síndrome de encefalopatia tóxica, que se caracteriza por uma fase inicial de euforia, instabilidade emocional e motora, e alterações da linguagem, que aparecem horas após a exposição, seguidas por um quadro de sonolência e comprometimento das funções motoras e intelectuais, especialmente da memória. Exposições ao tolueno em torno de 600 a 800 ppm, por oito horas consecutivas, podem induzir euforia, excitação, cefaléia, náuseas, até efeitos que podem persistir por alguns dias, como insônia e fadiga muscular (PEDROZO et al., 2002).

Diversos estudos relatam o potencial de utilização de fungos para a degradação de compostos xenobióticos. Estudos recentes apontam para um grande potencial do grupo de fungos melanizados na degradação de monoaromáticos (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001). Isolamentos recorrentes de representantes do grupo, incluindo espécies nunca descritas, vêm sendo feitas a partir de ambientes contaminados com óleo e derivados (DE HOOG et al., 2006; ZHAO et al., 2010; BADALI et al., 2011) bem como a partir de substratos alternativos relacionados com a presença de hidrocarbonetos, como o exoesqueleto de formigas-cortadeiras (HYMENOPTERA: ATTINI) (ATTILI-ANGELIS et al., 2014).

A riqueza de espécies de fungos ainda não descritas é imensa, sendo o grupo dos fungos melanizados um dos que possui um número baixo de representantes conhecidos em relação a outros já bem definidos, muito disso graças à escassez de grupos de pesquisa especializados. São fungos de crescimento mais lento, necessitando de técnicas de isolamento seletivo para uma boa recuperação de substratos de isolamento. Além disso, a extremofilia (capacidade de crescer sob condições extremas, como temperatura, pH, umidade e radiação, por exemplo) e o oligotrofismo (capacidade de crescer quando baixas concentrações de nutrientes estão disponíveis) do grupo torna-os capazes de sobreviver em ambientes inóspitos, onde muitos fungos não conseguem se desenvolver. Assim, o isolamento e a identificação destes fungos trazem associada a grande probabilidade do descobrimento de novas espécies.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FUNGOS: BIOTECNOLOGIA E AMBIENTE

Os fungos constituem um grupo diverso de organismos que desempenham funções essenciais no ambiente, contribuindo para o bem-estar dos seres humanos desde o início das civilizações, sendo utilizados tanto em processos ambientais quanto industriais. São capazes de existir e sobreviver em quase todos os habitats e exercem funções vitais em todos os ecossistemas, regulando o fluxo de nutrientes e energia por meio de sua rede micelial (SINGH, 2006).

Com relação à sua diversidade, os fungos têm atraído a atenção como nunca. Desde a publicação de Hawksworth (1991) estimando em 1.5 milhões o número de espécies de fungos presentes na Terra, alternativas a esta estimativa variando de 0.5 a 9.9 milhões de espécies foram publicadas (HAWKSWORTH, 2001). Eles podem ser encontrados em plantas, detritos, madeira, alimentos, no solo, no ar, na água doce ou salgada, em geleiras, desertos, rochas, associados a vertebrados e invertebrados, não há restrições para sua localização. Como resultado do desenvolvimento de técnicas de isolamento seletivas e do aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, a frequência com que novas espécies de fungos têm sido apresentadas à ciência é avassaladora.

Nas últimas décadas estes micro-organismos passaram a ser amplamente estudados tanto para a caracterização de sua existência, de suas funções e relações ecológicas, quanto no âmbito da biotecnologia ambiental. Nesse aspecto, além de sua importância como decompositores e uso industrial, os fungos apresentam grande potencial de aplicação em processos de degradação de compostos orgânicos nocivos que contaminam o ambiente (GADD, 2001).

Dentre contaminantes de grande interesse como corantes têxteis, polímeros sintéticos e agrotóxicos encontram-se também o petróleo cru e seus derivados. Ao longo do tempo, o petróleo se impôs como fonte de energia essencial e eficaz. A invenção dos motores a gasolina e diesel, fez com que outros derivados, até então desprezados, passassem a ter novas aplicações. Atualmente, além da grande utilização dos seus derivados, centenas de novos produtos foram desenvolvidos e se fazem presentes diariamente em nosso cotidiano, como os plásticos, borrachas

sintéticas, tintas, corantes, adesivos, solventes, detergentes, explosivos, produtos farmacêuticos e cosméticos (PEDROZO et al., 2004). No entanto, apesar dos benefícios, os processos de extração, refino, transporte e armazenamento do petróleo e seus derivados são responsáveis pela liberação de toneladas de hidrocarbonetos, principal constituinte dos mesmos, nos ecossistemas anualmente. Segundo o relatório de sustentabilidade da Petrobrás (2012), do ano 2010 a 2012, 1.289 m³, aproximadamente 1.3 milhões de litros, de petróleo e derivados vazaram para o ambiente no Brasil em 71 ocorrências.

Nesse quadro de contaminações do ambiente, especialmente aquelas envolvendo petróleo e seus derivados é que ganhou espaço a biorremediação, um conjunto de técnicas que visam reduzir ou eliminar os efeitos nocivos de substâncias tóxicas que estejam contaminando um dado ambiente mediante a degradação ou transformação das mesmas por micro-organismos ou plantas (ALEXANDER, 1999). O uso de micro-organismos é mais difundido que o de plantas, pois a fitorremediação geralmente associa-se à remoção de metais pesados (COUTINHO; BARBOSA, 2007), tendo uso mais restrito.

Como vantagens, a biorremediação é um processo altamente viável financeiramente, seu custo é extremamente baixo em comparação com outros processos, principalmente físicos, como extração de vapor do solo, bombeamento, entre outros. As técnicas de biorremediação não utilizam água tratada e nem produtos químicos nocivos ao meio ambiente e, além disso, os processos físicos separam os contaminantes do solo sem destruí-los ou modificá-los quimicamente gerando resíduos, enquanto na biorremediação, através da biodegradação por consumo direto do contaminante como fonte de carbono, ou via cometabolismo, o mesmo não acontece (ALEXANDER, 1999; PRENAFETA-BOLDÚ; SUMMERBELL; DE HOOG, 2006). Entretanto, o processo é lento e frequentemente faz-se necessário o isolamento da área contaminada.

No ambiente contaminado, seja em processos *in situ* (no local da contaminação) ou *ex situ* (quando há remoção do substrato do local), as estratégias de biorremediação incluem tanto a utilização de micro-organismos autóctones, ou seja, encontrados no próprio local onde houve a contaminação (biorremediação intrínseca ou natural), como também a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaugmentação) (BENTO et al., 2003).

A extensão da biodegradação de hidrocarbonetos por leveduras e fungos filamentosos é uma função do ecossistema e das condições ambientais locais. As leveduras predominam na degradação de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos, enquanto nos solos predominam os fungos filamentosos (SINGH, 2006).

Atualmente, o petróleo representa a principal fonte de hidrocarbonetos em nossa sociedade, sendo mais de 90% de sua composição atribuída aos mesmos, e que pode ser dividida em quatro frações (SINGH, 2006):

- Hidrocarbonetos saturados: incluindo alcanos de cadeia curta, ramificados e cicloalcanos;
- Hidrocarbonetos aromáticos: incluindo BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos), hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), naftenoaromáticos e aromáticos sulfurados;
- Asfaltenos: incluindo fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas;
- Resinas: incluindo piridinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas.

Os hidrocarbonetos são moléculas orgânicas compostas essencialmente por átomos de carbono e hidrogênio unidos covalentemente, aos quais podem se juntar átomos de nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S). Naturalmente, formam-se sob pressão e temperatura elevadas no interior da terra, a cerca de 150 quilômetros de profundidade, e migram para regiões de menor pressão mediante a ocorrência de fenômenos geológicos, onde dão origem a substâncias como o petróleo, o carvão e o gás natural (NEIVA, 1986).

Além do petróleo, os hidrocarbonetos estão presentes de inúmeras formas no ambiente ao nosso redor, como no exoesqueleto de insetos e em substâncias diversas de plantas. É importante ressaltar que o contato excessivo com hidrocarbonetos é prejudicial à saúde dos seres vivos em diversos níveis, podendo, por exemplo, levar à ocorrência de danos no metabolismo, envolvendo alterações em reações químicas em escala celular e até mesmo no DNA. No caso de derramamentos de petróleo, o recobrimento físico pode promover alterações estruturais e funcionais no organismo, como danos físicos em órgãos, o qual pode levar à morte por asfixia, aumento da temperatura corpórea, causar perturbações fisiológicas relacionadas à excreção, absorção de água e metabolismo, prejudicar locomoção, reprodução e nas plantas causar o bloqueio da realização da fotossíntese, além de alterações na dinâmica e equilíbrio das populações (reprodução, expectativa de vida, natalidade, mortalidade) e na estrutura e função das comunidades levando a uma perturbação geral de um ecossistema (CETESB, 2014).

O tolueno, ou metil-benzeno, é um hidrocarboneto monoaromático que se encontra agrupado com benzeno, etilbenzeno e os três isômeros de xileno sob o acrônimo de BTEX. O tolueno é muito utilizado como solvente para tintas, revestimentos, gomas, óleos e resinas. Apesar de apresentar baixa polaridade, seu baixo peso molecular faz com que seja solúvel em água afetando o comportamento químico no solo e em água subterrânea (MITRA; ROY, 2011). Possui coeficiente de partição octanol-água baixo (2,73), o que implica em lenta absorção no solo e, conseqüentemente, um transporte preferencial via água (solubilidade de 532 mg/L) (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA, 2004). Assim como outros solventes orgânicos, o tolueno é um composto lipossolúvel, e se acumula nos tecidos gordurosos. Além disso, é um depressor do sistema nervoso central e o abuso em sua inalação pode causar hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e morte (PEDROZO et al., 2002; FOSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994). No ambiente, o tolueno pode permanecer na fase gasosa e se solubilizar na fase aquosa do solo, levando à contaminação do subsolo e aquíferos (SILVA et al., 2002).

Um aspecto interessante relacionado especialmente a vazamentos de derivados de petróleo como a gasolina é a presença de etanol na formulação. Além de o etanol facilitar a contaminação superficial e do subsolo por auxiliar na solubilização de tolueno, a presença do etanol na gasolina traz outro problema associado. Segundo Nunes; Corseuil (2007) em um estudo de monitoramento de 79 meses (6,5 anos) de vazamentos de gasolina constatou a degradação preferencial de etanol, fazendo com que os hidrocarbonetos permaneçam por mais tempo no ambiente. No estudo de Nunes; Corseuil (2007), as taxas de degradação de BTEX chegaram a 93% em 79 meses, no entanto, não havia sinais de consumo dos mesmos até os primeiros 32 meses, nos quais apenas o etanol foi metabolizado. Além disso, Frankenberger (1992) relata que a degradação de tolueno pode resultar em intermediários como o ácido benzoico e compostos fenólicos, os quais em concentrações elevadas apresentam atividade biocida e podem prejudicar as comunidades microbianas que atuam na degradação dos contaminantes.

FONTES ALTERNATIVAS PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS

O levantamento da biodiversidade microbiana associada a ambientes distintos é de grande importância, pois além de permitir o estudo da dinâmica de populações e das funções que

desempenham, pode ainda levar à identificação de novas espécies com capacidade de degradação de compostos xenobióticos, as quais podem ser objeto de grande interesse para a aplicação biotecnológica na recuperação de ambientes contaminados (OLIVEIRA, 2001).

Durante muito tempo a busca por um micro-organismo com potencial para degradação de hidrocarbonetos teve como passo inicial o isolamento a partir de ambientes ricos nesses compostos, como refinarias de petróleo, tanques de combustíveis e solos destinados ao tratamento de hidrocarbonetos (DE HOOG et al., 2006; SATOW, 2005). Nesses ambientes, novas espécies de fungos negros foram descritas, como *Exophiala xenobiotica*, frequentemente encontrada em ambientes ricos em hidrocarbonetos aromáticos e alcanos (DE HOOG et al., 2006), *Cladophialophora psammophila* (BADALI et al., 2011), isolada de solos contaminados com benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, e *Exophiala sideris* (SEYEDMOUSAVI et al. 2011), obtida de minas altamente poluídas com arsênio, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos. Entretanto, a procura por fontes alternativas tem ganhado força na comunidade científica.

As formigas Attini (gênero *Atta*), por exemplo, têm se mostrado substratos promissores para o isolamento de microfungos (PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011). Fungos melanizados estão entre os grupos isolados a partir desse substrato. Little; Currie (2007) relataram pela primeira vez a presença de um representante da ordem Chaetothyriales do gênero *Phialophora* associado a formigas cultivadoras de fungos do gênero *Apterostigma*, considerando-o um possível simbionte dentro do formigueiro. Recentemente Attili-Angelis et al. (2014) descreveram duas novas espécies de *Phialophora*, *P. capiguarae* e *P. attae*, isoladas do exoesqueletos de iças de *Atta capiguara* e *A. laevigata* coletadas durante o período reprodutivo. Outros trabalhos também confirmam a presença dos fungos melanizados em formigas-cortadeiras, como *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. e *Paraphaeosphaeria* spp., obtidas do corpo de operárias de *A. laevigata* (GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012), e *Cladophialophora* sp. (PAGNOCCA et al., 2008). Investigando o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de fungos melanizados isolados de formigas-cortadeiras, nosso grupo de pesquisa encontrou que os mesmos podem assimilar tolueno quando submetidos a uma atmosfera enriquecida com este hidrocarboneto (BARON, 2011).

As formigas-cortadeiras são insetos que vivem em uma sociedade estruturada e com relações de elevada complexidade. Sua comunicação se baseia essencialmente na troca de sinais

químicos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), mediante a produção de feromônios, constituídos por moléculas pequenas e altamente voláteis (CALIMAN, 2008) utilizados para a dispersão rápida de sinais químicos e os hidrocarbonetos cuticulares, que constituem compostos não voláteis (HOWARD; BLOMQUIST, 2005). Acredita-se que a habilidade em tolerar a presença de hidrocarbonetos e sua possível utilização como fonte de carbono e energia esteja relacionada a esse sistema de comunicação das formigas.

Além dos insetos sociais, há outras tantas fontes naturais que podem servir de substrato para o isolamento de fungos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos. Neste trabalho testou-se também a habilidade de assimilação de hidrocarbonetos por fungos obtidos de troncos de *Eucalyptus tereticornis*. Sabe-se que a resina desta planta bem como os óleos essenciais obtidos a partir das folhas são ricos em hidrocarbonetos (NUNES; PIO, 2001; WINTERS et al., 2009) e, por isso, podem representar um ambiente favorável ao desenvolvimento de espécies hidrocarbonoclásticas.

FUNGOS MELANIZADOS E A DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

Denominam-se fungos melanizados aqueles que produzem pigmentos esverdeados, marrons ou negros e os depositam na parede celular do micélio e nas estruturas reprodutivas. Não existe um grande número de estudos envolvendo a caracterização destes pigmentos, mas acredita-se que correspondam a diferentes tipos de melanina (DE HOOG; GRUBE, 2008). Este grupo de fungos é composto por representantes de diversas ordens dentro da classe dos Dothideomycetes, como Chaetothyriales, Capnodiales, Dothideales, Pleosporales e alguns basidiomicetos tratando-se de um grupo polifilético, o qual possui reconhecimento mundial, mas carece de conhecimento ecológico.

A melanina pode ser encontrada em muitos micro-organismos e animais. Suas funções são variadas e baseiam-se nas características de sua estrutura molecular, que as tornam muito estáveis e resistentes a uma gama de processos físico-químicos destrutivos (REVANKAR; SUTTON, 2010). Para os fungos melanizados, ela comprovadamente confere diversas propriedades que os permite habitar ambientes extremos, como tolerância à dessecação (STERFLINGER, 2006); capacidade de sobreviver sob baixa disponibilidade de nutrientes (SATOW et al. 2008); proteção contra estresse e substâncias tóxicas (BUTLER; DAY, 1998);

crescimento em pH ácido (DE HOOG et al., 1994) e resistência à radiação ultravioleta (UV), facilitando a fixação dos fungos epifíticos sobre o limbo foliar, constantemente exposto à incidência dos raios solares. Existem debates sobre a fotoproteção proporcionada pela melanina e a conquista do meio terrestre em latitudes muito altas, como solo Antártico, onde a incidência de raios UV possui níveis elevadíssimos (ONOFRI et al., 2004).

Os fungos melanizados ocupam diversos nichos ecológicos específicos, no entanto, são frequentemente encontrados associados a plantas, detritos vegetais, sendo que a maioria habita o solo (REVANKAR; SUTTON, 2010). Nas últimas décadas tem sido constatada a presença de fungos melanizados em ambientes ricos em hidrocarbonetos (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002; DE HOOG et al., 2006).

De maneira geral, os fungos podem atuar no metabolismo de hidrocarbonetos mediante três mecanismos enzimáticos: cometabolismo, reações de transformação parcial e utilização dos hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia (PRENAFETA-BOLDÚ; SUMMERBELL; DE HOOG, 2006). Segundo Prenafeta-Boldú; Summerbell; De Hoog (2006) o cometabolismo é uma via muito executada por fungos da podridão branca da madeira, também denominados ligninolíticos, onde os mesmos possuem um complexo de peroxidases que atuam na quebra da lignina e enzimas do complexo das lacases e das P450 – monoxigenases atuam na clivagem dos anéis aromáticos, no entanto, a principal fonte de carbono e energia são a celulose e a hemicelulose. A caracterização presença de lacases em fungos melanizados (TETSCH et al., 2005, 2006) os associou a uma rota cometabólica de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, porém, outros estudos já indicavam sua capacidade em utilizá-los como única fonte de carbono e energia, principalmente em relação ao monoaromáticos como o tolueno (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001, 2002). Prenafeta-Boldú, Summerbell e DE HOOG (2006) relataram que a via de degradação de tolueno em fungos melanizados envolve essencialmente a atividade das enzimas do complexo citocromo P-450 monoxigenases. Estas enzimas atuam na oxidação do grupo metil formando um álcool benzílico. Este é sequencialmente oxidado até a formação de ácido benzoico, que é então dihidroxilado dando origem ao ácido protocatecóico, que pode ou não ser convertido em catecol. Ambos podem seguir diretamente para a etapa de clivagem do anel aromático. A fissão do anel aromático libera intermediários do ciclo do ácido cítrico, os quais são incorporados pelo mesmo (Figura 1).

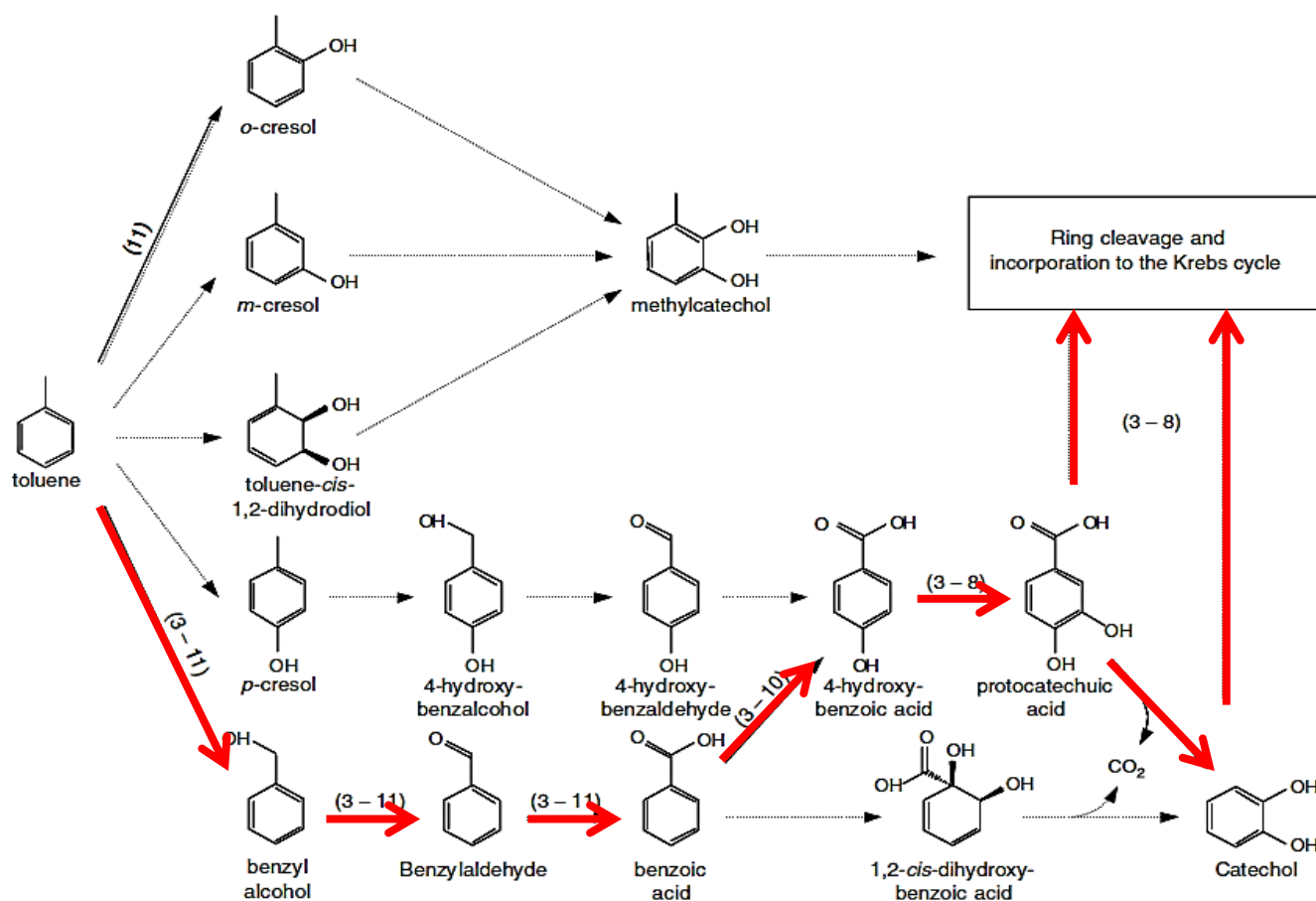


Figura 1. Rotas de degradação de tolueno por fungos e bactérias (PRENFETA-BOLDÚ; SUMMERBELL; DE HOOG, 2006). As setas coloridas em vermelho indicam a principal rota de degradação de tolueno por fungos melanizados que envolve a atividade das enzimas do complexo citocromo P-450 monooxigenases.

Os representantes da ordem Chaetothyriales tratam-se de fungos com uma notável ecologia dupla. Por um lado, eles têm uma capacidade única de se adaptar a ambientes extremos (exposição a produtos químicos tóxicos, alta temperatura, escassez de nutrientes, condições ácidas e/ou secas), enquanto, por outro lado, eles apresentam um significativo potencial patogênico humano (ZHAO et al., 2010). Estudos recentes afirmam que diferentes ecologias (extremófilos x patogênicos) não aparecem combinadas em uma mesma linhagem, mas sim podem ser observadas em linhagens geneticamente relacionadas, referidas como “irmãs gêmeas”, do inglês “*siblings*” (BADALI et al., 2011). Assim, apesar de algumas espécies de fungos melanizados apresentarem potencial como patógenas para humanos e outros vertebrados (DE HOOG et al., 2003), atualmente sabe-se que para tais espécies há uma dualidade de nichos ecológicos, sendo não apenas patógenas, mas micro-organismos de grande interesse

biotecnológico que são capazes de se desenvolver em ambientes ricos em hidrocarbonetos como os BTEX (PRENAFETA-BOLDÚ; SUMMERBELL; DE HOOG, 2006)

A coincidência destas duas características ecológicas em uma única espécie foi observada em *Exophiala dermatitidis*, isolada em abundância tanto em madeira de linhas ferroviárias tropicais tratadas com creosoto quanto de casos clínicos de micoses (SUDHADHAM et al., 2008; VICENTE et al., 2001). Postula-se que frutas silvestres constituem um nicho natural de *E. dermatitidis*, que pode ser ingerida por aves e humanos e, esporadicamente, resulta em micoses.

Com o desenvolvimento das ferramentas de análise molecular, essa divergência entre linhagens ambientais e clínicas pode ser melhor caracterizada. Uijthof et al. (1994) analisando a sequência de DNA da região ITS de *Exophiala dermatitidis*, detectaram dois padrões distintos, que mais tarde foram denominados como genótipos A e B por Matos et al. (2003). A classificação foi baseada nas variações (deleções e substituições) entre as sequências ITS do DNA ribossomal quando comparadas. O genótipo A apresenta maior taxa de mutações e está intimamente associado a linhagens clínicas, enquanto o genótipo B está relacionado às linhagens ambientais (MATOS et al., 2003).

O caráter extremófilo e oligotrófico já descrito para esses fungos, associado a estudos que comprovam sua eficácia em assimilar compostos tóxicos como fonte de carbono e energia, especialmente hidrocarbonetos, faz com que sejam de grande interesse biotecnológico. Conhecer estas espécies, levantar aspectos ecológicos do grupo e explorar o potencial que possuem para biorremediação constituíram os objetivos principais deste trabalho. Considerando-se as duas abordagens deste trabalho (biotecnológica e ecológica/taxonômica) e antecipando a elaboração dos manuscritos a serem publicados, os resultados estão apresentados na forma de capítulos independentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, 1999, 302 p.
- ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A.P.M.; PAGNOCCA, F.C.; NAGAMOTO, N.S.; de VRIES, M.; STIELOW, J.B.; DE DE HOOG, G.S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini), Fungal Diversity, aceito para publicação, 2014.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación, S.A., Madrid, 696p, 2002.
- BADALI, H. et al. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potencial use in bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. Fungal Biology, v. 115, p. 1019-1029, 2011.
- BARON, N.C. Micro-fungos de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis. 2011. 90f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, Brazilian Journal of Microbiology, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.
- BUTLER, M.J.; DAY, A.W. Fungal melanins: a review. Can J Microbiol, Canada, v.44, p.1115–1136, 1998.
- CALIMAN, M.J.F. Caracterização do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de operárias, rainhas virgens e rainhas fisogástricas de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Entomologia), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.
- CETESB. Gerenciamento de Riscos, 2014. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/vazamento-de-oleo/234-efeitos-do-oleo-nos-organismos>> Acesso em 21/01/2014.
- COUTINHO, H.D.; BARBOSA, A.R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. Silva Lusitana, v. 15, n. 1, p. 103 – 117, 2007.
- DE DE HOOG, G.S.; TAKEO, K.; YOSHIDA, S.; GÖTTLICH, E.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Pleoanamorphic life cycle of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. Antonie Leeuwenhoek, Netherlands, v.65, n.2, p.143-153, 1994.
- DE DE HOOG, G.S.; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R.B.; KANTARCIOGLU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.; HAASE, G. Species diversity and

- polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.4767-4778, 2003.
- DE DE HOOG, G.S. et al. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 90, p. 257-268, 2006.
- DE DE HOOG, G.S.; GRUBE, M. Black fungal extreme: preface. In: DE HOOG, G.S.de; GRUBE, M. *Studies in Mycology*, CBS Fungal Biodiversity Centre, The Netherlands, 2008.
- FOSTER, L.M.K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. *Rev. Saúde Pública*, v. 28, n. 2, p 167-172, 1994.
- FRANKENBERGER, W.T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: CALABRESE, E. J. and KOSTECKI, P.T. *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*, Ed. Lewis Publ, Boca Raton, FL. p. 237.
- GADD, G.M. *Fungi in Bioremediation*. British Mycological Society, Cambridge University Press, 481 pp, 2001.
- GOPINATH, S.C.B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, v.46, p.119-126, 2005.
- GUEDES, F. L. A. ; ATTILI-ANGELIS, D. ; PAGNOCCA, F. C. . Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). *Folia Microbiologica* (Prague), v. 56, p. 1-6, 2012.
- HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, n. 95, p. 641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, n. 105, p. 1422 – 1432, 2001.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. *The ants*. Cambridge: Harvard University Press, 1990.
- HOWARD, R.W.; BLOMQUIST, G.J. Ecological, behavioural, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol*, v.50, p.371-393, 2005.
- LITTLE, A. E; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine –microbe symbiosis. *Biology Letters*, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.
- MATOS, T.; HAASE, G.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE DE HOOG, G.S. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. *Antonie Leeuwenhoek*, Netherlands, v.83, p.293-303, 2003.
- MITRA, S.; ROY, P. BTEX: A serious ground-water contaminant. *Research Journal of Environmental Sciences*, v. 5, n.5, p 394-398, 2011.

NEIVA, J. Conheça o Petróleo. 5ª edição, Maity Comunicação e Editora Ltda., Rio de Janeiro, 307 pp., 1986.

NUNES, C.C.; CORSEUIL, H.X. Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. Artigo técnico. Engenharia Sanitária Ambiental, v, 12, n. 3, p. 259 – 265, 2007.

NUNES, T.V.; PIO, C.A. Emission of volatile organic compounds from Portuguese eucalyptus forests. Chemosphere – Global change Science, v. 3, n. 3, p. 239 – 248, 2001.

OLIVEIRA, V.M. Técnicas Moleculares Aplicadas à Caracterização de Microrganismos Biodegradadores. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. Jagariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p.135-144.

ONOFRI, S. ; SELBMANN L. ; ZUCCONI, L. ; PAGANO, S. Antarctic microfungi as models for exobiology. Planetary and Space Science, v. 52, p. 229 – 237, 2004.

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

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X.; SCHNEIDER, M.R.; LINHARES, M.M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Série Cadernos de Referência Ambiental v. 12. GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA; SECRETARIA DO PLANEJAMENTO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA; CENTRO DE RECURSOS AMBIENTAIS – CRA, 229 pp., 2002.

PETROBRÁS – PETRÓLEO BRASILEIRO S..A. Relatório de sustentabilidade 2012. 30 de Janeiro de 2013. Disponível em:
<http://www.petrobras.com.br/rs2012/downloads/RS_portugu%C3%AAs_2012.pdf>. Acesso em 05/11/2013.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X., SUMMERBELL R., DE DE HOOG G.S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. FEMS Microbiological Reviews v. 30, p. 109–130, 2006.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J.T.C.; van GROENESTIJN, W. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

PRENAFETA-BOLDU, F.X.; KUHN, A.; LUYKX, D.M.A.M.; ANKE, H.; GROENESTIJN, J.W.; BONT, J.A.M. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. Mycological Research, v. 105, n. 4, p 477-484, 2001.

REVANKAR, S.G.; SUTTON, D.A. Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v.23, n.4, p. 884 – 928, 2010.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U.G.; ISHAK, H.D.; BACCI, M.Jr.; PAGNOCCA, F.C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. *Microbiology Ecology*, p. 1-12, 2011.

SATOW, M. M. “Screening” de fungos degradadores de hidrocarbonetos complexos. 2005. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado e Licenciatura)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

SATOW, M.M., ATTILI-ANGELIS, D., DE DE HOOG, G. S., ANGELIS, D.F., VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Mycology*, v. 61, p.157–163, 2008.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. *Microbiologia Ambiental (Itamar e João Lúcio)*. Embrapa Meio Ambiente, 2ªEd. Jaguariúna, SP, p. 547-570, 2008.

SEYEDMOUSAVI, S.; BADALI, H.; CHLEBICKI, A.; ZHAO, J.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; DE DE HOOG, G.S. *Exophiala sideris*, a novel black yeast isolated from environments polluted with toxic alkyl benzenes and arsenic. *Fungal Biology*, v. 115, p. 1030 – 1037, 2011.

SILVA, R.L.B.; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.N.; BRILHANTE, O.M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos da Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1599-1607, 2002.

SINGH, H. Mycorremediation: fungal bioremediation. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey, 592p, 2006.

STERFLINGER, K.; PRILLINGER, H. Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in a urban environment (Vienna, Austria). *Antonie Leeuwenhoek*, v.80, p.275-286, 2001.

SUDHADHAM, M. et al. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. *Studies in mycology*, v. 61, p. 145-155, 2008.

TETSCH, L.; BEND, J.; JANßEN, M.; HÖLKER, U. Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. *FEMS Microbiol Lett*, UK, v.245, p.161–168, 2005.

TETSCH, L.; BEND, J.; HÖLKER, U. Molecular and enzymatic characterisation of extraand intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. *Antonie*

Leeuwenhoek, Netherlands, v.90, n.2, p.183-194, 2006.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quimica Nova*, v. 27, n. 3, p. 441 – 446, 2004.

VICENTE, V.A; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEROZ-TELLEZ, F.; CRUZ, L.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in mycology*, v. 61, p. 137-144, 2008.

WILBUR, S.M.A; BOSH, S.B.S. U.S. Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 154p, 2004.

WINTERS, A.J.; ADAMS, M.A.; BLEBY, T.M.; RENNENBERG, H.; STEIGNER, D.; STEINBHECHER, R.; KREUZWIESER, J. Emissions of isoprene, monoterpene and short-chained carbonyl compounds from *Eucalyptus* spp. in southern Australia. *Atmospheric Environment*, v. 43, p. 3035 – 3043, 2009.

ZHAO, J. et al. Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. *Microbial Ecology*, v. 60, p. 149–156, 2010.

CAPÍTULO 1

POTENCIAL DE BIODERGRADAÇÃO DE TOLUENO POR FUNGOS MELANIZADOS

RESUMO

A contaminação ambiental com tolueno é recorrente devido ao seu amplo espectro de utilização em diversas substâncias. Sua recalcitrância e nocividade à saúde são problemas sérios, e norteiam a busca por formas de remoção deste resíduo de locais afetados. Uma alternativa viável e cada vez mais investigada é a biorremediação, munindo-se do metabolismo de micro-organismos como vias de eliminação ou redução dos níveis de compostos xenobióticos no ambiente. A utilização de fungos filamentosos e leveduras em tais processos ganhou espaço devido às suas características morfo-fisiológicas que favorecem seu sucesso, e nesse contexto, os fungos melanizados agregam um caráter extremófilo e oligotrófico que favorece ainda mais sua permanência em habitats inóspitos, nos quais outros micro-organismos não são capazes de sobreviver. Este estudo objetivou a busca por fungos melanizados que possam futuramente ser utilizados em processos de biorremediação de solos contaminados com tolueno. Para isso, um total de 200 isolados de fungos melanizados foram testados quanto à sua capacidade de assimilação de tolueno, mediante avaliação da produção de biomassa quando tolueno foi oferecido como única fonte de carbono orgânico no interior de dessecadores, metodologia inédita proposta neste trabalho. Os dados dos experimentos corroboram com relatos anteriores sobre o grande caráter oligotrófico desses fungos, e a hipótese de serem capazes de assimilar carbono inorgânico, no entanto, não confirmam a capacidade de degradação de tolueno. Outro objetivo consistiu em contribuir com estudos laboratoriais de avaliação da degradação de hidrocarbonetos voláteis, como os BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos), mediante análise cromatográfica de *headspace* estático. A literatura sugere o uso de frascos de Boston com válvulas de teflon em experimentos, porém, trata-se de um aparato de custo inviável para importação. Uma nova proposta para substituição deste aparato foi sugerida, mas ainda há necessidade de revisões.

Palavras-chave: Tolueno, Biodegradação, Fungos melanizados, oligotrofismo, Frascos para *headspace*

INTRODUÇÃO

Em virtude da elevada recalcitrância e nocividade à saúde, os hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos) presentes no diesel e na gasolina principalmente, constituem compostos de grande interesse ambiental (WILBUR; BOSCH, 2004). O tolueno ($C_6H_5CH_3$), por exemplo, tem sido muito utilizado como solvente para diversas substâncias (MITRA; ROY, 2011), mas pode ser letal após uma hora de exposição à concentração de 1800 – 2000 ppm (HOBARA et al. 2000). Além disso, apresenta toxicidade crônica mesmo em pequenas concentrações, pois trata-se de um supressor do sistema nervoso central (WILBUR; BOSCH, 2004; MELQUIADES et al., 2006). Grandes quantidades são introduzidas no ambiente anualmente através do uso da gasolina e dos processos de refinamento de petróleo (FOSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994), resultando em uma situação de risco para os sistemas biológicos.

Como todos os BTEX, o tolueno é miscível em álcoois primários (metanol e etanol), os quais são altamente solúveis em água (SILVA et al., 2002). O etanol tem sido utilizado como ingrediente na formulação da gasolina, como uma estratégia para diminuir a poluição atmosférica mediante o aumento da octanagem (BRITO et al., 2004). No Brasil, até 25% da gasolina comercializada é composta por etanol, o que permite a solubilização de elevadas taxas de tolueno (CIMA, 2013). O envelhecimento dos tanques de estocagem e a falta de manutenção dos mesmos favorece a ocorrência de vazamentos, quando então o etanol carrega para a fase aquosa o tolueno presente na gasolina. Isto permite que o tolueno fique retido no solo não apenas na fase gasosa, aumentando a probabilidade de seu lixiviamento e de contaminação do subsolo e aquíferos (MELQUIADES et al., 2006).

Diante do quadro atual de contaminação com aromáticos voláteis, cresceu o interesse por tecnologias alternativas para o tratamento de áreas contaminadas. Assim, a biorremediação foi desenvolvida baseando-se essencialmente na capacidade dos micro-organismos em degradar compostos poluentes e/ou tóxicos como hidrocarbonetos aromáticos, reduzindo-os a substâncias com peso molecular menor, com maior polaridade, ou a CO_2 e H_2O mediante mineralização da molécula (ALEXANDER, 1994; MARTINS et al., 2005).

Fungos filamentosos e leveduras têm sido amplamente estudados para degradação de compostos orgânicos nocivos (SINGH, 2006). Existem vantagens no uso dos fungos em relação

às bactérias como: grande diversidade de espécies; maior tolerância a estresse osmótico, variação de temperatura e pH; crescimento em ambientes com baixo grau de umidade; necessidade de menor quantidade de nitrogênio; desenvolvimento em ambientes com altas concentrações de gás carbônico; capacidade de degradar moléculas complexas como a lignina e, principalmente, não apresentam restrição quanto ao tamanho da cadeia de hidrocarboneto a ser degradada (GOPINATH; ANBU; HILDA, 2005; SINGH, 2006).

Estudos recentes relataram a presença de fungos melanizados da ordem Chaetothyriales (conhecidos como leveduras negras), em ambientes ricos em hidrocarbonetos derivados do petróleo, como biofiltros para tratamento de tolueno, solo contaminado com óleo e gasolina, madeira tratada com conservantes fenólicos e madeira de ferrovias tratada com creosoto (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002; DE HOOG et al., 2006; ZHAO et al., 2010). O caráter extremófilo deste grupo, associado aos recorrentes isolamentos de seus representantes em ambientes ricos em hidrocarbonetos, sugeriram o potencial destes micro-organismos para utilizá-los em biorremediação.

Zhao et al. (2010) realizaram o isolamento de diversas leveduras negras em meios enriquecidos com hidrocarbonetos monoaromáticos, e obtiveram o crescimento de espécies como *Exophiala xenobiotica*, originalmente isolada de áreas contaminadas com petróleo (DE HOOG et al. 2006), além de *E. bergeri* e *E. dermatitidis*. Prenafeta-Boldú et al. (2001) obtiveram resultados positivos para o metabolismo de tolueno com o isolado *Cladophialophora* sp. T1, mais tarde identificada como *C. psammophila*, em experimentos onde o mesmo foi oferecido como única fonte de carbono e energia.

Uma alternativa eficiente para a avaliação da biodegradação de tolueno é a cromatografia gasosa, a qual garante a detecção e análise precisa da quantidade do composto ao longo do tempo. Desde o surgimento da técnica, na década de 1950, vários tipos de injetores, frascos, colunas e detectores foram desenvolvidos permitindo a análise de diferentes tipos de moléculas. Para hidrocarbonetos aromáticos, a técnica de *headspace* estático é muito utilizada, sendo relativamente simples e de fácil operação (MARTINEZ et al., 2002), embora ainda exija aporte significativo de recursos financeiros. A dificuldade em trabalhar com esses compostos devido a perdas nos processos de análise é outro aspecto a ser considerado, especialmente em experimentos que exigem maiores volumes de gás a ser analisado. Nesse contexto, a utilização de frascos de Boston acoplados a válvulas de politetrafluoretileno (teflon) tipo Mininert® (Figura 1)

é recomendada (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001), no entanto, é um item caro e economicamente inviável quando necessário em grande número.

Os frascos de Boston são feitos em vidro borossilicato, o qual é quimicamente inerte. As válvulas Mininert® são feitas de PTFE (politetrafluoretileno), também conhecido como “teflon”, material inerte a uma vasta gama de substâncias químicas incluindo tolueno. O PTFE é praticamente inerte devido à proteção que os átomos de flúor exercem sobre a cadeia carbonada diminuindo sua reatividade, o que faz com que o material tenha toxicidade essencialmente nula, e também agrega um baixíssimo coeficiente de atrito, dos menores entre todos os materiais sólidos conhecidos. Além disso, é impermeável, mantendo suas propriedades em ambientes úmidos (GESTIS – IFA, 2013).

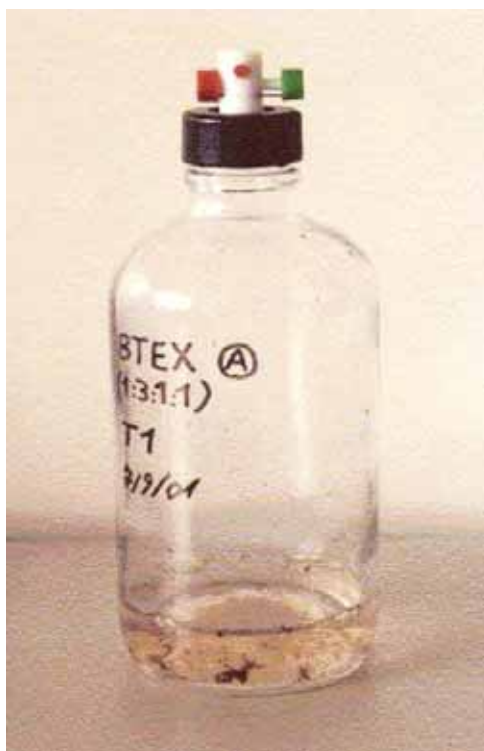


Figura 1. Frasco de Boston acoplado à válvula Mininert®. Imagem cedida por Francesc X. Prenafeta-Boldú.

Este trabalho objetivou selecionar fungos melanizados para aplicação em biorremediação de solos contaminados por tolueno, mediante teste de produção de biomassa em dessecadores com atmosfera saturada e buscar alternativas mais baratas para a substituição dos frascos de Boston visando futura utilização em análises de *headspace* para cromatografia gasosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de fungos melanizados

Um total de 200 fungos estudados obtidos de diferentes trabalhos de isolamento anteriores, investigando substratos diversos associados a hidrocarbonetos, foram selecionados para este trabalho, sendo eles:

- 1 - Solo de oficina mecânica contaminado com óleo de motor de veículos automotores;
- 2 - Solo de *landfarming* de uma refinaria de petróleo;
- 3 - Fragmentos de casca de *Eucalyptus tereticornis*;
- 4 - Exoesqueleto de içás e bitús (fêmeas e machos alados de formigas-cortadeiras) das espécies *Atta capiguara* e *A. laevigata* obtidas durante o período de acasalamento, também conhecido como revoada.

5 - Águas de influência de uma refinaria de petróleo: A refinaria encontra-se posicionada entre dois rios. Um deles (Rio 1), serve como fonte de captação da água, e portanto, não sofre influência dos resíduos da indústria, enquanto o outro (Rio 2) é receptor do efluente industrial. São 7 pontos de coleta de amostras relacionados às atividades da refinaria, sendo eles:

- Rio 1: GPS: 22°42'00,0" (WO); 47°08'06,6" (S);
- Entrada do efluente bruto da refinaria na estação tratamento biológico: GPS: 22°44'18,8" (WO); 47°07'19,2" (S);
- Entrada do efluente na Lagoa de Estabilização da refinaria: GPS: 22°44'26,6" (WO); 47°07'17,5" (S);
- Saída do efluente da Lagoa de Estabilização da refinaria: GPS: 22°44'22,0" (WO); 47°07'43,0" (S);
- Duzentos (200) metros à montante da descarga do efluente tratado da refinaria no Rio 2: GPS: 22°44'43,0" (WO) 47°07'25,3" (S);
- Duzentos (200) metros à jusante da descarga do efluente tratado da refinaria no Rio 2: GPS: 22°44'25,3" (WO) 47°07'35,2" (S);
- Oitocentos (800) metros à jusante da descarga do efluente tratado no Rio 2: GPS: 22°44'22,3" (WO) 47°07'40,8" (S).

Produção de biomassa em atmosfera saturada de tolueno

Os 200 isolados de fungos melanizados foram crescidos em ágar malte 2% por 7 dias e uma alçada da cultura foi inoculada em tubos de ensaio (volume = 10 mL), previamente pesados em balança analítica, contendo 3 mL de meio mineral (2 mL de solução de micronutrientes: FeCl_3 120 mg; H_3BO_3 350 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; KI 10 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 45 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50 mg; $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,25g; NaCl 10,0 g; água destilada q.s.p. 1000 mL; para 1 L de solução de macronutrientes: KH_2PO_4 4,5 g; K_2HPO_4 0,5 g; NH_4Cl 2,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; água destilada q.s.p.1000 mL). Após a inoculação, os tubos foram cobertos com papel alumínio, o qual foi perfurado para permitir a difusão da atmosfera no interior dos mesmos, e organizados no interior de dessecadores. Quatro dessecadores foram montados, cada qual contendo um dos seguintes tratamentos:

1 – Controle positivo de crescimento: inoculação dos isolados em tubos contendo meio mineral adicionado de 4% de glicose. Não havia tolueno no interior do dessecador;

2 – Tratamento T (Tolueno): inoculação dos isolados em tubos contendo meio mineral sem glicose e incubação em atmosfera saturada de tolueno, fornecida por um bquer de 50 mL com 15 mL do hidrocarboneto;

3 – Tratamento T + D (Tolueno + Dibutilftalato): inoculação dos isolados em tubos contendo meio mineral sem glicose e incubação em atmosfera de tolueno fornecida pela mistura de tolueno e dibutilftalato 1:1 (15 mL: 15 mL em bquer de 50 mL);

4 – Controle negativo de crescimento: inoculação dos isolados em tubos contendo meio mineral sem glicose e incubação sem fonte de carbono orgânica para ser assimilada (sem tolueno). Apenas um bquer de 50 mL contendo 30 mL de dibutilftalato foi colocado dentro do dessecador.

O dibutilftalato, utilizado no tratamento T+D, é um solvente orgânico de alta massa molecular, não volátil, e que foi utilizado para retardar a volatilização do tolueno, e por consequência, a saturação da atmosfera dentro do dessecador, o que forneceu um maior tempo para que os isolados pudessem se adaptar à condição inóspita imposta aos mesmos. Com isso, era esperado que a biomassa produzida por isolados positivos para o crescimento assimilando tolueno fosse superior em relação ao tratamento T, onde o tolueno foi fornecido sem o solvente.

Os dessecadores foram fechados e incubados em temperatura ambiente por um período de 25 dias, período considerado suficiente para a produção de biomassa de forma significativa pelos isolados que fossem capazes de metabolizar o tolueno e utilizá-lo como fonte de carbono. Um período de incubação inferior é prejudicial, pois os fungos melanizados apresentam crescimento lento, e além disso, as condições experimentais são adversas e exigem um período de adaptação à condição inóspita oferecida para sua sobrevivência. Após o período de incubação foi avaliado o crescimento de biomassa pela medida de seu peso seco. Os tubos com a biomassa foram submetidos à secagem por 24 horas em estufa a 105°C e então pesados novamente em balança analítica. Os valores de biomassa produzida foram calculados a partir da subtração do valor de tara dos tubos de ensaio, do valor obtido ao final do experimento.

A seleção dos fungos testados foi baseada nos seguintes critérios:

- 1 – Maior biomassa produzida nos tratamentos contendo tolueno (T+D e T) e a;
- 2 - Relação entre a produção de biomassa nesses tratamentos e no controle positivo, selecionando aquelas que tiveram rendimento similar em ambos, o que pode ser indicativo de melhor capacidade de assimilação de tolueno.

Em uma segunda etapa foi realizada a repetição do experimento com 10 isolados selecionados a partir da triagem com os 200 isolados iniciais. Para cada isolado foram preparados tubos em quintuplicata em cada tratamento, e foi excluído o tratamento T+D (Resultados e Discussão). Além disso, na repetição foi adicionada a linhagem *Cladophialophora psammophila* (BADALI et al., 2011) comprovadamente degradadora de tolueno e capaz de utilizá-lo como única fonte de carbono e energia, e por isso, adotada como um padrão para a comparação dos valores de biomassa obtidos.

Estatísticas

As análises estatísticas de significância para os valores de biomassa obtidos no teste em atmosfera saturada e assimilação de tolueno foram realizadas empregando-se o software BioEstat (AYRES et al., 2007). A normalidade dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para confirmar a significância dos valores de biomassa obtidos nos tratamentos foi aplicado o teste estatístico de Kruskal - Wallis, para dados não-paramétricos, utilizando-se o parâmetro de Student-Newman-Keuls com $\alpha = 0,05$.

Adaptação de frascos para análise cromatográfica de *headspace*

Quatro alternativas foram propostas para substituir os frascos de Boston (Tabela 1):

1. Septos de cromatografia de PTFE/Silicone foram acomodados sobre a boca de frascos de borossilicato convencionais, sem borda de rosca. Os frascos foram selados com lacre de alumínio com auxílio de lacrador (RODRIGUES, comunicação pessoal);
2. Frascos reagente da marca Uniglas, incolores, graduados, com tampa de rosca com dispositivo antigotas, resistente até 140°C, segundo a norma ISO 4796, com capacidade de armazenamento de 250mL, altura 143mm e diâmetro externo de 70mm segundo especificações do fabricante. Foram utilizados septos cromatográficos de PTFE/Silicone de 18 mm de diâmetro. A proposta foi a de acoplar um septo de cromatografia na tampa do frasco, que permitisse acessar o *headspace* no interior: a tampa do frasco reagente foi perfurada no centro, gerando um furo com diâmetro de aproximadamente 5 mm. Na parte interna da tampa o septo foi acondicionado e colado à tampa com silicone neutro (Brascoved®). O silicone é um material que proporciona uma vedação eficiente sem interagir com o tolueno.
3. Frasco reagente com tampa perfurada, e uma arruela e quatro parafusos acoplados externamente. Na parte interna um tarugo de PVC foi usinado e perfurado com um diâmetro de 5 a 6 mm e utilizado como suporte para receber os parafusos. O septo foi acomodado na parte interna da tampa antes do tarugo de PVC (Figura 2).
4. A tampa do frasco foi perfurada e nela acoplada na porção interna um engate rápido de mangueiras de jardim, envolvidos por silicone neutro no momento do encaixe. No engate rápido foi acondicionado o septo, o qual foi preso recebendo pressão de um tubo tipo “niple”, rosqueado ao engate rápido. O “niple” é uma união com duas roscas, uma de cada lado. Para a adaptação uma das roscas foi serrada, pois apenas uma rosca era necessária. A Figura 3 mostra as peças utilizadas.

Tabela 1. Propostas de adaptação para substituição dos frascos de Boston com válvulas Mininert®.

Proposta	Ilustração
Frasco com septo sobreposto à boca com lacre de alumínio	
Tampa perfurada com septo acoplado com silicone neutro	
Tampa perfurada com septo acoplado com tarugo de PVC usinado, arruela e parafusos	
Tampa perfurada com septo acoplado em engate rápido (selado com silicone neutro) com “niple”	

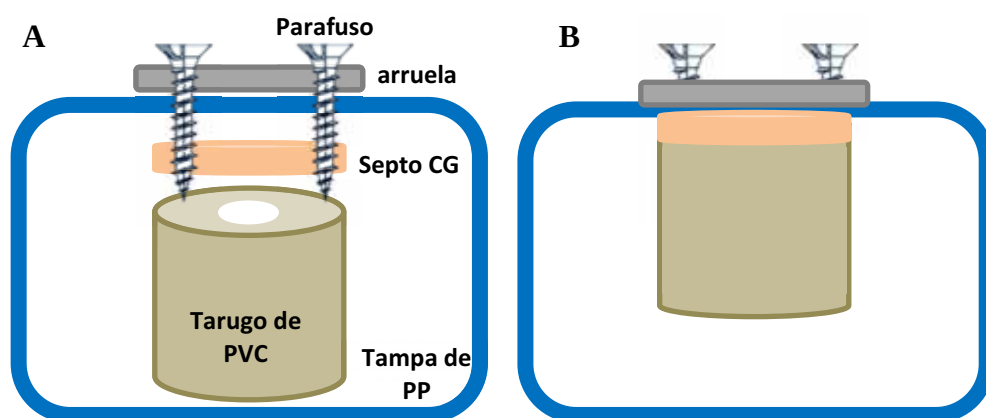


Figura 2. Diagrama esquemático da elaboração da adaptação da tampa do frasco reagente. A – Componentes utilizados na elaboração da adaptação. B – Esquema da configuração da tampa com a adaptação montada. PVC = Policloreto de vinila; PP = Polipropileno; CG = Cromatografia gasosa.

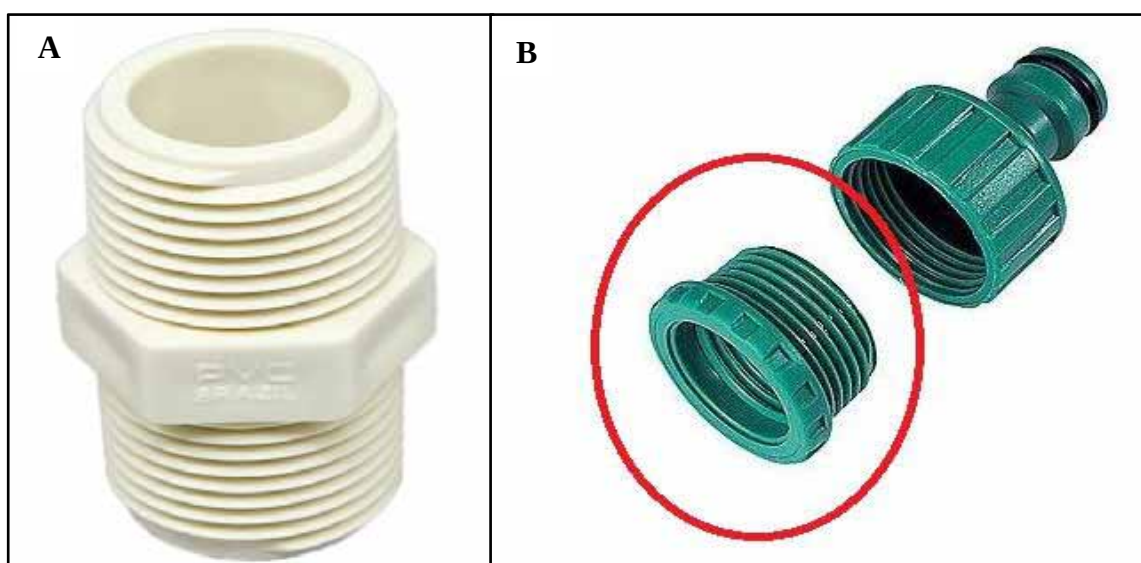


Figura 3. Componentes utilizados para montagem da adaptação: A - "Niple" de policloreto de vinila (PVC). B - Engate rápido para mangueira de jardim em PVC. A porção circulado em vermelho é a que foi utilizada na adaptação.

Teste de vedação dos frascos adaptados propostos

Para cada adaptação proposta foram feitos testes de sua viabilidade, analisando sua vedação. Foram adicionados aos frascos meio mineral ou água deionizada (dependendo da disponibilidade) e tolueno em uma concentração conhecida. A manutenção ou não da concentração interna de tolueno foi avaliada mediante análise do *headspace* em condições estáticas, sendo retiradas amostras a cada hora.

Para as análises utilizou-se cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-2014, com injetor em modo “splitless” à temperatura de 200°C e coluna capilar Restek, modelo RTX®5 composta de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30m x 0,25mm x 0,25µm). Na coluna foi aplicada uma rampa de aquecimento de 60°C a 120°C à taxa de elevação de 20°C por minuto. O gás carreador utilizado foi o nitrogênio a um fluxo de 50 mL/min. O detector utilizado foi do tipo FID (Flame Ionization Detector) alimentado por chama de hidrogênio.

Teste de degradação de tolueno mediante análise cromatográfica de *headspace* estático

Para a adaptação considerada apta foi realizado o teste de degradação de tolueno mediante análise do *headspace* estático por cromatografia gasosa. Dentre os dez isolados selecionados no teste de produção de biomassa em atmosfera saturada, foram escolhidos quatro devido ao número de frascos adaptados disponível. Os quatro isolados são aqueles pertencentes ao gênero *Exophiala*, e também foi testada a linhagem padrão *C. psammophila*. As culturas foram inoculadas na concentração de 10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colônia)/ mL nos frascos adaptados contendo 25 mL de meio mineral (solução de macro e micronutrientes) adicionado de 10 µL de tolueno. De cada frasco foram retiradas amostras do *headspace* medidas no tempo 0 (primeiro dia) e do tempo de 3 a 12 dias diariamente. Os frascos foram preparados em triplicata para cada isolado e para a linhagem padrão, bem como a retirada de amostras também se deu em triplicata para cada frasco. A análise da concentração de tolueno em cromatógrafo gasoso seguiu as mesmas especificações do item anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste em dessecadores para verificação da assimilação de tolueno por fungos melanizados

Os valores de produção biomassa obtidos para cada isolado em cada tratamento encontram-se no "Apêndice" (Tabela 1A). A metodologia de triagem utilizada neste trabalho foi pioneira, pois o método original destina-se especificamente ao isolamento seletivo de micro-organismos assimiladores de compostos voláteis (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001). Aqui a metodologia foi adaptada para testar isolados obtidos anteriormente e analisar sua produção de biomassa, após determinado tempo de incubação tendo tolueno como única fonte de carbono e energia.

Dentre os 200 isolados testados, a média de produção de biomassa nos tratamentos contendo tolueno (T+D e T) foi entre 10 e 20 mg. Baseando-se nos critérios de seleção descritos em Material e Métodos, 34 isolados foram escolhidos e os dados encontram-se dispostos na Tabela 2. A análise estatística de significância aplicada nos dados destes isolados, para comparar as médias dos valores de cada tratamento entre si, indicou que a diferença de produção de biomassa fúngica entre os tratamentos T+D e T não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), entretanto, a diferença foi significativa ($p < 0,05$) quando comparados ambos os grupos com o controle negativo (C-) e com o controle positivo (C+) (Tabela 2A, 3A e Figura 1A).

O teste em dessecadores objetivou a seleção de fungos capazes de crescer (produzir biomassa) em um ambiente contendo tolueno como única fonte de carbono e energia. Assim, os isolados que apresentassem maior produção de biomassa deveriam ser escolhidos. Teoricamente os tratamentos T+D e T apresentariam diferenças de biomassa produzida, provavelmente maior no tratamento T+D, pois como o dibutilftalato retarda a volatilização do hidrocarboneto, as culturas teriam mais tempo para se adaptarem à saturação da atmosfera de tolueno.

A Tabela 2 mostra que 22 dos 34 isolados (64,7%) apresentaram menor produção de biomassa no tratamento T+D em relação o tratamento T, diferentemente do que poder-se-ia esperar. Estes dados indicam que o maior tempo oferecido por este tratamento para a adaptação à condição inóspita do experimento não é necessário, pois os fungos apresentaram desempenho similar nos tratamentos. A Figura 4 apresenta uma representação gráfica dos dados da Tabela 2.

Tabela 2. Seleção de isolados de fungos melanizados em teste de assimilação de tolueno com base na produção de biomassa. C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo); T+D (Tolueno + Dibutilftalato); T (Tolueno)

Código	Biomassa (mg) em cada tratamento			
	C+	C-	T+D	T
D25	12,80	2,00	2,60	17,80
D29	35,80	5,00	8,00	18,20
D30	8,20	15,20	4,30	19,30
D63	48,00	3,40	15,00	17,80
D115	33,70	6,60	6,60	17,20
D119	37,40	2,90	8,10	16,80
D146	32,20	2,50	5,80	18,10
D157	19,00	3,70	18,10	15,00
D164	17,00	2,40	8,40	17,50
D165	11,60	3,80	6,20	17,30
D173	11,70	1,70	3,30	14,10
A107	29,20	4,50	17,30	4,80
A130	18,60	3,90	4,60	17,60
A316	27,30	17,60	5,90	13,70
A340	19,30	16,40	9,50	17,40
A393	22,50	1,80	6,80	17,70
A457	23,70	9,30	4,80	14,20
N21	25,70	3,00	18,30	19,00
N27	35,60	4,30	5,20	18,60
N79	36,90	5,20	17,40	17,20
N82	31,20	17,60	45,80	16,90
N85	21,40	2,40	17,30	16,50
N92	34,60	2,70	17,50	16,60
M114	44,70	9,80	11,30	10,80
4F1	90,30	2,40	18,90	2,50
11F	36,00	2,60	7,90	16,30
14F	534,90	2,20	18,00	4,40
18F	31,20	3,10	17,30	17,50
30F	31,80	12,10	19,30	16,50
33F	31,20	7,90	17,80	16,00
34F	34,00	4,10	3,30	16,30
NR4	92,90	5,00	3,10	17,70
NR7	81,30	1,50	4,80	16,60
NR12	34,70	6,60	17,30	6,50

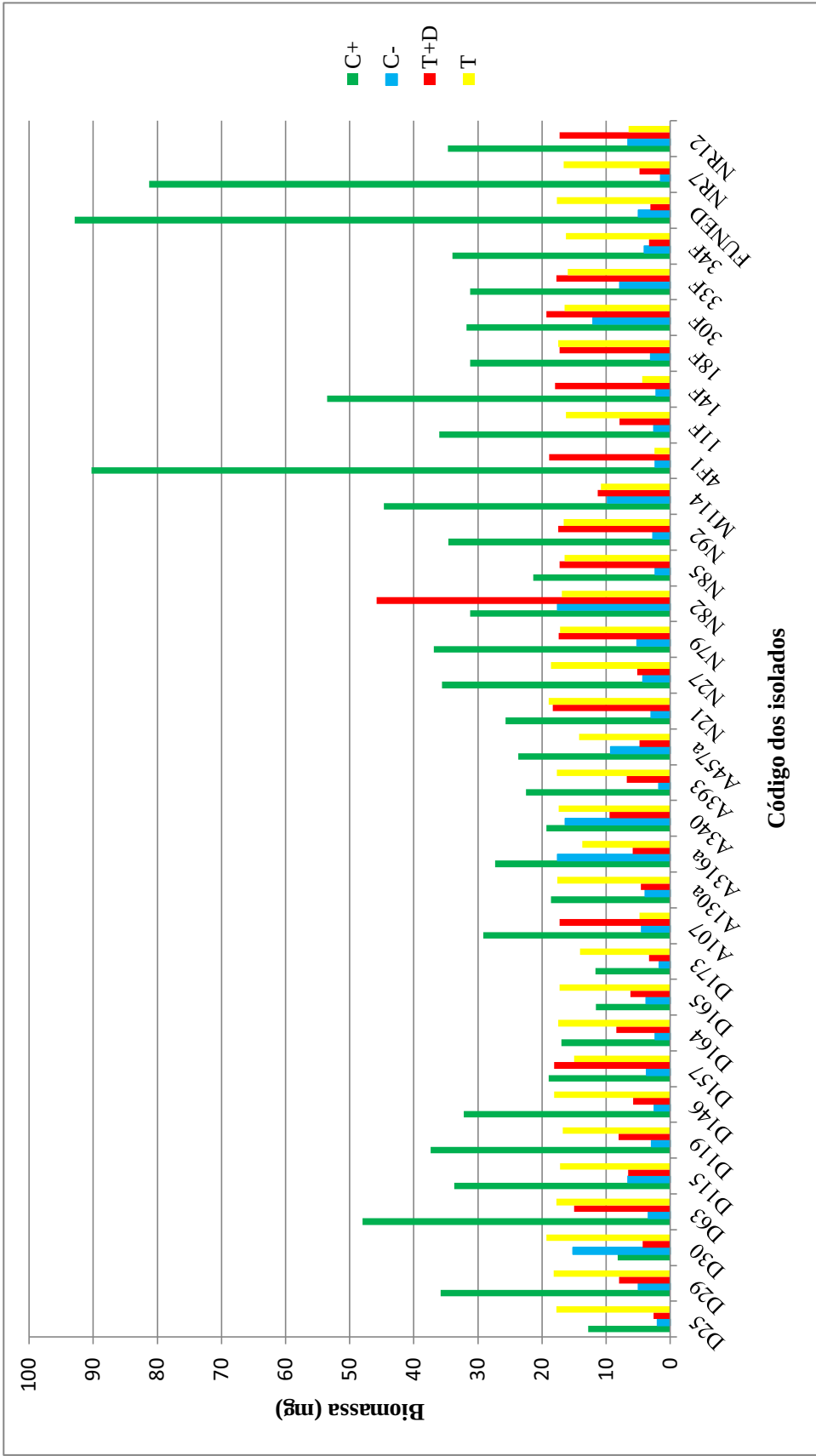


Figura 4. Representação gráfica dos resultados do teste de assimilação de tolueno de 34 isolados (Tabela 2) com base na produção de biomassa. Legenda: C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo); T+D (Tolueno + Dibutylfitalato); T (Tolueno).

Outro fato interessante que pode ser observado nos dados da Tabela 1A é que para muitos isolados houve crescimento significativo (biomassa >10mg) também no tratamento controle negativo. Estes dados corroboram com diversas referências como Satow et al. (2008) e Zhao et al. (2010) que relatam a capacidade de crescimento dos fungos melanizados em condições de escassez nutricional, ressaltando o caráter oligotrófico destes micro-organismos, nesse caso oligocarbonotrófico.

Dos 34 isolados apresentados foram selecionados 10 (Tabela 3), levando em consideração os critérios de seleção e outros aspectos considerados relevantes, como a produção de biomassa no controle negativo, sendo estes:

- A130 e A393: Selecionadas pela relação entre a biomassa nos tratamentos T e C+;
- D30 e N82: Selecionadas pela produção de biomassa superior no tratamento C-, indicando seu forte caráter oligotrófico;
- D29, N27 e NR4: Selecionadas pelo bom desempenho na produção de biomassa no tratamento T;
- D63, 18F e N21: Selecionadas pelo bom desempenho de produção de biomassa nos tratamentos T e T+D.

Tabela 3. Identificação e origem dos 10 isolados selecionados no teste de assimilação de tolueno

Código	Identificação	Substrato de Origem	Nº Acesso Genbank
A130	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	Amostras de águas	JN943395
A393	<i>Paraconiothyrium maculiculis</i>	Amostras de águas	EU754200
NR4	<i>Exophiala alcalophila</i>	Amostras de águas	JF747044
D29	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de Oficina mecânica	JX669013
D30	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de Oficina mecânica	JN391328
D63	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de Oficina mecânica	JN391328
N21	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	Análise morfológica
N27	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	KC492575
N82	<i>Cladosporium perangustum</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	JF499836
18F	<i>Cladosporium perangustum</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	HM148147

Espécies de *Cochliobolus* e seus anamorfos (*Curvularia* e *Bipolaris*) são conhecidos patógenos de plantas, sendo altamente destrutivos quando invadem as lavouras. Parasitam especialmente membros da família Poaceae (gramíneas) (MANAMGODA et al., 2011), e não existem relatos prévios do potencial de degradação de xenobióticos por estes organismos.

O gênero *Paraconiothyrium* foi criado em 2004 por Verkley et al. para acomodar a espécie micoparásita *Coniothyrium minitans*, anamorfos de *Phaeosphaeria* e quatro novas espécies, *P. estuarinum*, *P. brasiliense*, *P. fungicola* e *P. cyclothyrioides*. Celomicetos *Coniothyrium*-like são cosmopolitas e podem ser isolados de ambientes comuns como plantas e solo, no entanto, o potencial biotecnológico de tais fungos já foi descrito, como agentes de controle biológico (CARISSE; EL BASSAM; BENHAMOU, 2001; EL BASSAM et al., 2002), produtores de antibióticos (FUKAMI et al., 2000; TSUDA et al., 2003) e inclusive como biorremediadores (SILVA et al., 2003).

A possível presença de resíduos da refinaria de petróleo no substrato de isolamento das linhagens *Cochliobolus kusanoi* (A130) e *Paraconiothyrium maculiculis* (A393) pode ter atuado como agente impulsionador para o desenvolvimento da capacidade adaptativa de permanecer em ambientes com hidrocarbonetos. Este quadro corrobora com os relatos de grande plasticidade que os fungos melanizados possuem em adaptar-se a condições inóspitas.

O gênero *Cladosporium* compreende espécies cosmopolitas, sendo um dos gêneros mais amplamente distribuídos. São comumente encontrados em plantas e outros detritos, no ar, solo, entre outros materiais (CROUS et al., 2007). Algumas espécies de *Cladosporium* apresentam importância médica, sendo causadoras de micoses pulmonares, por exemplo (de DE HOOG; GARRO, 1995). Potin; Veignie; Rafin (2004) relataram sobre a habilidade de *Cladosporium sphaerospermum* em degradar hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em solo contaminado, levando a uma depleção de 23% dos HPAs em apenas quatro semanas. Atagana; Haynes; Wallis (2005) e Potin; Rafin; Veignie (2004) também relataram a presença de representantes do gênero atuando na degradação de solos contaminados com diversos HPAs e creosoto, indicando que a importância de *Cladosporium* vai além de seu caráter sapróbio e de seu potencial fitopatogênico.

Os isolados do gênero *Cladosporium* selecionados pelo seu bom desempenho no teste de assimilação de tolueno em dessecadores foram encontrados no corpo de machos (bitús) de formigas-cortadeiras. Sabe-se que estes são insetos que vivem organizados em sociedades, nas quais há divisão de trabalho e distinção morfológica dentro das denominadas castas (operárias,

jardineiras, soldados) (SOUZA; SANTOS; DELLA-LUCIA, 2011). Tais sociedades são altamente complexas em diversos aspectos como o sistema de comunicação, baseado essencialmente na troca de sinais químicos, realizados através de feromônios. Sabe-se que estes se tratam de hidrocarbonetos produzidos e armazenados em diversas glândulas existentes na cutícula das formigas (VIANA-BAILEZ; BAILEZ; MALAQUIAS, 2011). Assim, os hidrocarbonetos presentes na cutícula destes insetos podem representar uma fonte de carbono que garanta sua manutenção nesse micro-habitat.

O gênero *Exophiala* apresenta relatos de infecções cutâneas (DE HOOG; GARRO, 1995), especialmente *E. dermatitidis*, no entanto, estudos atuais atentam para a existência de linhagens geneticamente relacionadas, que aparentemente podem até mesmo ser identificadas por análise morfológica e molecular como pertencentes à mesma espécie, mas que não apresentam o caráter clínico das patogênicas. Estas linhagens apresentam outras funções nos habitats em que se encontram. Diversos estudos como Isola et al. (2013), Zhao et al. (2010), Estévez; Veiga; Kennes (2005) e Prenafeta-Boldú et al. (2001) relataram sobre várias espécies de *Exophiala* isoladas e capazes de crescer em ambientes ricos em hidrocarbonetos, incluindo aromáticos como o tolueno. O solo de oficina mecânica, fonte de isolamento das linhagens de *E. dermatitidis* estudadas, constitui um ambiente rico em graxas, óleos e afins utilizados no setor automotivo, que certamente podem ser a fonte de carbono utilizada por estes fungos para seu crescimento e manutenção neste habitat.

Para *E. dermatitidis* a literatura relata a existência de linhagens geneticamente relacionadas caracterizando-as por genótipos, definidos com base em alterações em pares de bases específicos definidos ao longo da região ITS do DNA ribossomal. Com bases nessas alterações dois genótipos foram designados, sendo denominados genótipo A, associado a linhagens clínicas, e genótipo B, associado a linhagens ambientais (UIJTHOF, 1996; MATOS, 2003). Dentre as 44 linhagens de *E. dermatitidis* testadas para a assimilação de tolueno foi possível identificar que 32 representam o genótipo A, 6 representam o genótipo B e 6 não tiveram o genótipo definido. Apesar de a maioria das linhagens teoricamente representar um risco, nunca houve relatos de infecção cutânea causada por *E. dermatitidis* nos trabalhadores da oficina em mais de 30 anos de funcionamento. Esses dados evidenciam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a ecologia destes micro-organismos, pois nesse caso, a característica

determinada pela genotipagem das linhagens confronta com aspectos observados para sua ecologia em seu habitat de origem.

Dentre os 10 isolados selecionados pela metodologia de triagem, quatro linhagens foram utilizadas em um novo experimento para confirmação dos resultados, sendo todas pertencentes ao gênero *Exophiala*: uma linhagem de *E. alcalophila*, e três linhagens de *E. dermatitidis*, sendo duas (D30 e D63) classificadas como genótipo A e a outra (D29) não teve seu genótipo definido. Apesar de as características genóticas indicarem risco em potencial, tratam-se de linhagens ambientais que podem ser futuramente melhor caracterizadas e o caráter patogênico possa vir a ser desvinculado das mesmas. Além disso, em casos de resultado positivo, as técnicas de biologia molecular desenvolvidas até o momento permitiriam a localização, o isolamento e a transferência de genes de interesse para outros micro-organismos para que pudessem ser expressos sem qualquer risco, dentro das normas de biossegurança. Assim, prepararam-se tubos em quintuplicata em cada tratamento para cada linhagem, retirando-se o tratamento T+D, devido à insignificância estatística de produção de biomassa entre este tratamento e o tratamento T. Além disso, a linhagem *Cladophialophora psammophila*, foi usada como referência para a degradação de tolueno. A média dos valores de biomassa obtidos para cada linhagem em cada tratamento pode ser observada na Tabela 4, e uma representação gráfica da mesma encontra-se na Figura 5.

Na Tabela 4 e na Figura 5 pode-se observar que a produção de biomassa com tolueno como único recurso para a aquisição de carbono foi essencialmente a mesma na triagem e na repetição, indicando a confiabilidade do método para a obtenção de dados de biomassa para esse tratamento. No entanto, é possível observar grande aumento na biomassa produzida nos tratamentos controle positivo (C+) e controle negativo (C-), sendo que a biomassa produzida no controle negativo chegou a se igualar à produção de biomassa no dessecador teste que continha tolueno.

Estatisticamente (Tabelas 4A, 5A e Figura 2A) foi possível estabelecer para os dados do experimento de repetição (Tabela 4) que, há significância estatística entre a produção de biomassa no controle positivo e nos demais testes (controle negativo e tolueno), enquanto não há tal diferença significativa entre a produção de biomassa no controle negativo e no tratamento com tolueno, ou seja, a produção de biomassa pelos isolados selecionados foi equivalente quando não havia uma fonte de carbono disponível ou quando a fonte oferecida era o tolueno. Este dado impediu a confirmação de que a biomassa produzida no tratamento T seja realmente advinda da

degradação do tolueno, pois a biomassa produzida no controle negativo, onde a única fonte de carbono disponível era CO₂, indica a ocorrência de assimilação do mesmo.

Considerando que os fungos melanizados constituem um grupo de caráter extremamente oligotrófico, acredita-se que o aumento da biomassa produzida no controle positivo e, especialmente no controle negativo, esteja associada à maior disponibilidade de um elemento essencial para o metabolismo da grande maioria dos seres vivos, o oxigênio.

No experimento de triagem, 200 tubos de ensaio foram acondicionados dentro de um mesmo dessecador durante o período de incubação. Assim, para o controle positivo, apesar da disponibilidade da glicose em abundância, o oxigênio disponível no interior da atmosfera do dessecador pode ter atuado como fator limitante, favorecendo o crescimento dos fungos com metabolismo mais rápido, especialmente as leveduras (NR4, D29 e D63). O mesmo pode ser afirmado para o controle negativo, onde além da ausência da fonte de carbono orgânica, também havia escassez de oxigênio dado o grande número de tubos incubados dentro de um mesmo dessecador.

Tabela 4. Dados da produção de biomassa (mg) durante a triagem e no experimento de repetição das 10 linhagens selecionadas. C+ - Controle Positivo; C- - Controle Negativo; T+D – Tolueno + Dibutilftalato; T – Tolueno

IDENTIFICAÇÃO	Cód	TRIAGEM (mg)				REPETIÇÃO (MÉDIA - mg)		
		C+	C-	T+D	T	C+	C-	T
<i>Cochliobolus kusanoi</i>	130A	18.6	3.9	4.6	17.6	73.8	16.2	15.8
<i>Paraconiothyrium maculicutis</i>	393A	22.5	1.8	6.8	17.7	72.6	18.2	17.7
<i>Exophiala alcalophila</i>	NR4	92.9	5.0	3.1	17.7	100.9	18.2	17.9
<i>Exophiala dermatitidis</i>	D29	35.8	5.0	8.0	18.2	100.8	19.6	17.7
<i>Exophiala dermatitidis</i>	D30	8.2	15.2	4.3	19.3	108.0	18.9	16.5
<i>Exophiala dermatitidis</i>	D63	48.0	3.4	15	17.8	109.2	19.2	18.2
<i>Cladosporium</i> sp.	N21	25.7	3.0	18.3	19.0	71.6	18.2	16.2
<i>Cladosporium</i> sp.	N27	35.6	4.3	5.2	18.6	78.1	17.7	17.4
<i>Cladosporium perangustum</i>	N82	31.2	17.6	45.8	16.9	80.3	16.8	18.3
<i>Cladosporium perangustum</i>	18F	31.2	3.1	17.3	17.5	76.3	16.9	17.4
<i>Cladophialophora psammophila</i>	Cp	-	-	-	-	104.9	25.8	19.1

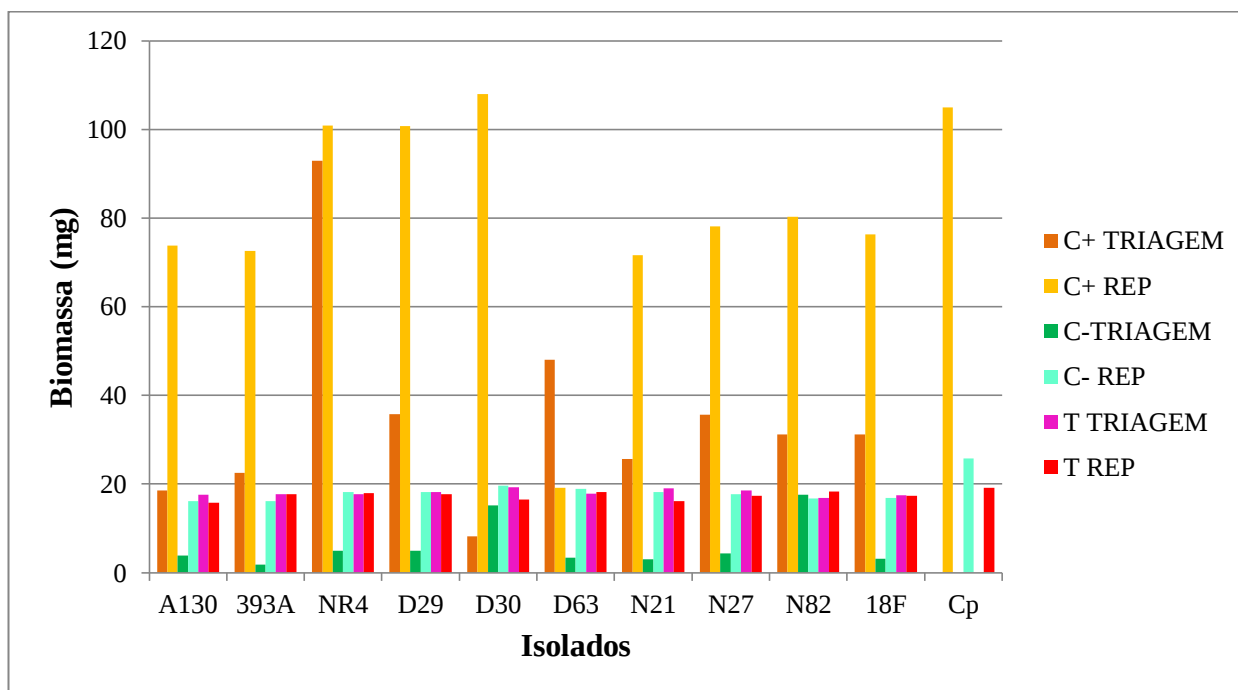


Figura 5. Representação gráfica da produção de biomassa (mg) durante a triagem e no experimento de repetição das 10 linhagens selecionadas excetuando-se o tratamento T+D (Tolueno + Dibutilftalato). **Legenda:** C+ - Controle Positivo; C- - Controle Negativo; T – Tolueno.

Nos experimentos de repetição o número de tubos incubados caiu de 200 para 55 (10 isolados + *C. psammophila* em quintuplicata) tornando maior a disponibilidade de oxigênio para os fungos em todos os tratamentos. Como resposta, os fungos produziram maior biomassa no controle positivo e também no controle negativo, no qual desta vez com uma quantidade suficiente de oxigênio disponível os fungos puderam ativar vias de metabolismo autotrófico, possivelmente nutrindo-se do carbono inorgânico disponível na forma de CO₂.

Para o tratamento T, a manutenção da média dos valores de biomassa produzidos indica que o oxigênio não foi um fator limitante nesse caso. Apesar de os fungos produzirem biomassa no tratamento indicando que suportam a toxicidade da molécula, a alta concentração de tolueno pode ser também inibidora do crescimento a partir de um dado momento. Comparando estatisticamente a produção de biomassa de cada fungo no tratamento T no experimento de repetição (Tabela 6A, 7A e Figura 3A) foi possível constatar que não há diferença significativa na produção de biomassa entre os isolados.

Os isolados A130, D30, N21, N27 e 18F produziram uma quantidade inferior de biomassa em relação às demais, sendo por vezes, significativamente menor. No entanto, nenhum dos

demais isolados se mostrou estatisticamente superior aos outros na produção de biomassa contendo tolueno como única fonte de carbono orgânico disponível, ou seja, A393, NR4, D29, D63 e N82 apresentaram uma maior produção de biomassa, mas todos de forma equivalente.

Com relação à linhagem *C. psammophila*, utilizada como padrão de referência, pois trata-se de uma comprovada degradadora de tolueno, é interessante o fato de ter apresentado crescimento equivalente aos 10 isolados testados. Segundo dados estatísticos (Figura 3A) a produção de biomassa por *C. psammophila* tendo tolueno como única fonte de carbono orgânico foi significativamente superior apenas em relação a alguns isolados que produziram menor biomassa (A130, D30 e N21). Além disso, a linhagem também produziu biomassa no controle negativo, sendo a mesma superior em relação à biomassa produzida no tratamento T (Tabela 4). Assim, *C. psammophila* não foi capaz de atender às necessidades experimentais que levaram à sua inclusão como linhagem de referência.

Em conclusão, a metodologia de criação de atmosfera saturada de tolueno em dessecadores se mostrou um método efetivo de análise para a obtenção de biomassa quando tolueno é oferecido como única fonte de carbono, porém, há uma importante questão a ser esclarecida: a produção de biomassa no controle negativo, principalmente quando aumentada a confiabilidade do teste realizando-o com quintuplicatas. O caráter oligotrófico e extremófilo dos fungos negros, já discutido na literatura, pode explicar este resultado, mas lança uma dúvida sobre a fonte de carbono utilizada pelo fungo. Assim, é sugerido que testes futuros incluam ferramentas adequadas a esclarecer até que ponto os isolados utilizam o carbono do tolueno. Uma sugestão, é a realização do teste fornecendo tolueno com carbono marcado radioativamente e depois, avaliar a incorporação do carbono na biomassa mediante técnicas apropriadas.

Análise cromatográfica do decréscimo de tolueno em *headspace*

O projeto inicial contava com a realização de um experimento de análise quantitativa do consumo de tolueno por fungos previamente selecionados mediante análise de amostras de *headspace* estático por cromatografia gasosa. Para tal, o crescimento dos fungos, tendo somente tolueno como fonte de carbono e energia, se daria em frascos de Boston de 250 mL selados com válvulas Mininert® (Figura 1), um aparato que se descobriu ser extremamente caro para importação. Os suprimentos de material para cromatografia gasosa são de elevado custo, e, além

disso, os frascos para análise de *headspace* são pequenos, com volume máximo de 40 mL. O trabalho com a biomassa fúngica *in vivo* faz necessária a utilização de frascos de volume maior, que carecem no mercado. Dessa forma, tomou-se como objetivo o desenvolvimento um frasco que pudesse ser utilizado para tal função substituindo os frascos e as válvulas que teriam de ser importadas por um preço inviável, e que tivesse um volume adequado ao requerido pelo experimento.

Quatro propostas diferentes de frascos para análise do *headspace* foram montadas (Tabela 1). Os resultados obtidos mostraram que apenas um deles tem potencial para substituir o frasco de Boston, após alguns ajustes que estão em andamento.

No teste de vedação, os frascos com lacre de alumínio apresentaram uma redução drástica de 10 vezes na concentração interna de tolueno em 24 horas em todos os frascos, indicando a ocorrência de vazamento. A adaptação com frascos reagente envolvendo o acoplamento do septo com silicone neutro não se mostrou adequada, pois após a cura do silicone o mesmo se desprende da tampa, inviabilizando a utilização do frasco.

A adaptação com a arruela, parafusos e o tarugo de PVC usinado, não foi eficiente, pois o vapor de tolueno podia ser detectado no ambiente (olfato). Para o teste de vedação, dentro do frasco foram colocados 50 mL de água deionizada estéril e 500 μ L de tolueno, totalizando 2000 ppm (mL/m^3) de tolueno. Na análise cromatográfica em tempo zero, apenas cerca de 600 ppm foram detectados, indicando o vazamento pela adaptação. Na adaptação com o engate rápido e o “niple” foram adicionados 10 μ L de tolueno em 25 mL de meio mineral dentro do frasco reagente adaptado de 250 mL, totalizando 40 ppm (mL/m^3) de tolueno. Mediante análise cromatográfica valores constantes foram obtidos, todos próximos de 30 ppm, para um tempo de cerca de três horas. A perda de 10 ppm foi interpretada não como um vazamento, mas sim uma perda que poderia ter sido recorrente do momento de montagem dos frascos dada à alta taxa de volatilização do tolueno. Assim, partiu-se para a realização do experimento com esse modelo de frasco adaptado.

O experimento envolveu a medida no tempo zero e medidas diárias a partir do terceiro dia até o 12º dia, em triplicata para cada frasco, totalizando 9 medidas diárias para cada linhagem testada. Prenafeta-boldú et al. (2001) em seu experimento de análise de *headspace* estático com o isolado *Cladophialophora* sp. T1, mais tarde identificada como *C. psammophila*, a qual foi utilizada como padrão de referência nesse estudo, trabalharam com um período de 14 dias de

análise, sendo que detectaram o fim da fase log e início da fase lag de crescimento por volta do 12º dia.

Para o teste foram selecionadas as quatro leveduras negras do gênero *Exophiala* do grupo dos 10 isolados selecionados pela metodologia nos dessecadores, levando em consideração o relato em literatura do maior potencial para a degradação de tolueno desses micro-organismos em detrimento aos demais selecionados na triagem (ZHAO et al., 2010; SATOW et al., 2008; DE HOOG et al., 2006; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001). Além disso, seria necessário um número grande de frascos para o teste dos 10 isolados de uma só vez, e estavam disponíveis apenas 20 frascos. Sendo assim, foram montados 12 frascos, 3 para cada uma das linhagens de *Exophiala*, 3 para a linhagem padrão *C. psammophila* e 3 frascos controle contendo apenas o meio mineral e o tolueno, totalizando 18 frascos.

A queda na concentração de tolueno aconteceu para as quatro linhagens testadas, bem como para a linhagem comprovadamente positiva para a degradação de tolueno, *C. psammophila*. Entretanto, o mesmo decréscimo ocorreu nos frascos controle, como não era esperado. Todos os conjuntos de frascos chegaram ao zero de tolueno, incluindo os controles, basicamente ao mesmo tempo (12 dias). Ainda com o comprovado vazamento e perda de tolueno do interior dos frascos houve crescimento de biomassa para as linhagens como pode ser observado na Figura 6, porém, novamente não é possível afirmar se o mesmo é decorrente da utilização de tolueno, pois, apesar de o tolueno ser liberado de dentro dos frascos para o ambiente, o mesmo permaneceu em baixas concentrações no interior dos frascos, ou seja, estava disponível para ser utilizado como fonte de carbono. Assim, dos resultados obtidos sugere-se que a última proposta é a que mais se aproxima de um frasco que possa substituir o de Boston com a válvula, no entanto revisões devem ser adotadas.

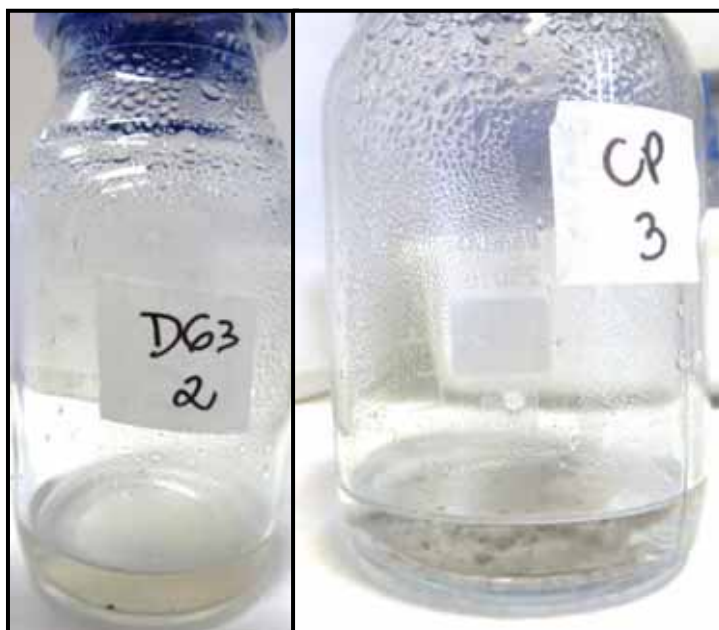


Figura 6. Observação da produção de biomassa no teste com frasco adaptado. D63= *E. dermatitidis*. CP= *C. psammophila*. 2 e 3 representam o número de replicata dos frascos (foram feitos 3 para cada linhagem).

Crescimento oligotrófico de fungos

Micro-organismos oligotróficos são aqueles capazes de crescer quando a disponibilidade de nutrientes assimiláveis é muito baixa, ou mesmo quando os mesmos aparentam estar ausentes (POINDEXTER, 1981).

Desde a década de 1980 estudos no âmbito da caracterização do caráter oligotrófico apresentado por diversas linhagens de fungos isoladas vêm sendo feitos, e indicam a capacidade desses micro-organismos em retirar o carbono necessário para sua sobrevivência de fontes inorgânicas como o CO₂ atmosférico. Segundo Wainwright (1993) os fungos podem crescer oligotroficamente sem o aparente envolvimento de lise e utilização de hifas previamente formadas. Parkinson et al. (1989) constataram hifas de *Fusarium oxysporum* crescendo oligotroficamente sem sofrer lise, permanecendo intactas e cheias de citoplasma do ponto de inoculação até as pontas de hifas que cresciam ativamente. Atualmente, estudos como o de Lukas et al. (2011) sustentam essa hipótese construída há tantos anos, e que pode ser um aspecto chave associado a este trabalho.

Zhdanova et al. (2000) isolaram fungos melanizados em reatores nucleares e na água de resfriamento dos mesmos. Onofri et al. (2008) discorrem sobre a capacidade de sobrevivência desses micro-organismos em condições análogas ao ambiente extraterrestre. Dadachova et al. (2007) trabalhando com fungos isolados de reatores de Chernobyl, relataram que os mesmos parecem utilizar a melanina para converter radiação gama em energia química para o seu crescimento. Linhagens fúngicas estudadas obtiveram maior aporte de biomassa e acumularam acetato em menor tempo quando expostas a um nível de radiação gama 500 vezes maior do que o normal.

O teste realizado em dessecadores trouxe o resultado inesperado da produção de biomassa quando nenhuma fonte de carbono foi oferecida, excetuando-se o carbono inorgânico (CO₂) da atmosfera isolada dentro do dessecador. Tal produção se deu em quantidade estatisticamente compatível à biomassa produzida pelos fungos quando tolueno foi oferecido como fonte de carbono e energia. Assim, os resultados obtidos vão de encontro aos relatos em literatura sobre a capacidade de fungos em utilizar carbono inorgânico (CO₂) para sua sobrevivência e crescimento. Lukas et al. (2011) testaram a variação da taxa de isótopos de ¹³C e ¹²C na biomassa de fungos melanizados (*Aureobasidium pullulans*, *Cryomyces antarcticus*, *Coniosporium perforanse* *Cladophialophora* sp.) em condições onde apenas CO₂ atmosférico foi oferecido como fonte de carbono. Os autores encontraram que após 42 dias, a proporção de ¹³C aumenta significativamente na biomassa indicando o consumo de carbono. Além disso, destacaram que o consumo de carbono (maior proporção de ¹³C) foi maior quando o experimento foi associado à exposição à radiação ultravioleta próxima (409 – 412 nm).

Mesmo para o teste nos frascos desenvolvidos para o experimento de cromatografia gasosa, a produção de biomassa pode ser explicada pelas duas vertentes, a oligotrófica e a degradativa, mas neste experimento, nenhuma delas pode ser provada, enquanto o teste nos dessecadores nos sugere que a produção de biomassa tenha sido oligotrófica. Mirocha; Devay (1972) sugerem que os fungos crescem autotroficamente na aparente ausência de carbono orgânico. Eles fixariam o CO₂ atmosférico utilizando energia advinda da oxidação de hidrogênio atmosférico. Parkinson et al. (1990) confirmaram mediante a técnica de “*stripping autoradiography*” a hipótese de Mirocha; Devay (1972), pois encontraram nas hifas carbono marcado radioativamente que havia sido oferecido na forma de CO₂, no entanto, no micélio morto não havia a presença de carbono marcado, indicando a realização de um processo ativo.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A degradação fúngica de xenobióticos como o tolueno envolve a presença de vias metabólicas específicas que atuam na clivagem do anel aromático e em sua conversão a compostos assimiláveis como fonte de carbono e energia. O estudo de fungos melanizados como potenciais biodegradadores de aromáticos ganhou força na última década. Os resultados aqui obtidos não evidenciaram a degradação de tolueno nem pelos isolados testados, e nem pela linhagem padrão tida como referência para a degradação de tolueno, mas mostraram a capacidade de assimilação de carbono inorgânico, disponível na atmosfera dentro dos dessecadores na forma de CO₂.

Os dados obtidos a partir da proposta inédita da metodologia em dessecadores agregam muito ao conhecimento da ecologia oligotrófica dos fungos melanizados, permitindo visualizar que das condições extremas oferecidas no experimento para o seu desenvolvimento, apenas a limitação de oxigênio interrompeu seu crescimento. Além disso, os fungos testados demonstraram tolerância à toxicidade do tolueno característica extremamente desejada em um micro-organismo que se pretenda utilizar para fins de degradação. Apesar de já descrita na literatura, sabe-se que não se trata de uma característica comum.

Apesar de a metodologia em dessecadores, na forma como foi proposta nesse trabalho, não ter sido suficiente para elucidar o potencial de degradação de tolueno pelos fungos melanizados testados, mostrou ser eficaz. Adaptações da proposta, como o fornecimento de tolueno com carbono marcado radioativamente, podem ser suficientes para comprovar a degradação do mesmo por estes micro-organismos.

As dificuldades enfrentadas nas propostas de uma adaptação eficiente para substituir os frascos de Boston acoplados às válvulas são reflexos da complexidade em se trabalhar com compostos voláteis. Análises confiáveis sobre a degradação de aromáticos voláteis por fungos negros ainda apresentam muitas lacunas, e o presente estudo deixa para o grupo de pesquisa uma importante experiência, além de aguçar nosso senso crítico para trabalhos envolvendo esse tipo de experimento.

Pode-se afirmar que os frascos adaptados elaborados representam uma ótima alternativa aos frascos de Boston e às válvulas de PTFE, pois apesar da detecção de vazamento, uma pequena quantidade de tolueno foi adicionada no início dos experimentos e a molécula pôde ser

detectada no interior do frasco mesmo depois de decorridos 12 dias, indicando que as adaptações apenas necessitam de melhorias, mas são adequadas. Os aperfeiçoamentos necessários já estão sendo realizados e testados, e novos experimentos envolvendo outros projetos de pesquisa do grupo estão agendados para serem realizados com os novos frascos, o que demonstra que os resultados deste trabalho serviram como um importante degrau para a continuidade dos estudos sobre fungos melanizados e degradação de BTEX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, 1999, 302 p.
- ATAGANA, H. I.; HAYNES, R.J.; WALLIS, F.M. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 172, p. 201–219, 2006.
- AYRES, M.; AYRES, M.Jr.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém, PA: Ong Mamiraua, 2007.
- BADALI, H.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; GUARRO, J.; KLAASSEN, C.H.; MEIS, J.F.; DE HOOG, G.S. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potencial use in bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. *Fungal Biology*, v. 115, p. 1019-1029, 2011.
- CARISSE, O.; EL BASSAM, S.; BENHAMOU, N. Effect of *Microsphaeropsis* sp. strain P130A on germination and production of sclerotia of *Rhizoctonia solani* and interaction between the antagonist and the pathogen. *Phytopathology*, v. 91, p. 782–791, 2001.
- CIMA - CONSELHO INTERMINISTERIAL DO AÇÚCAR E DO ÁLCOOL, 2013. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cima/2013/rcima%201%20-%202013.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=9930](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cima/2013/rcima%201%20-%202013.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=9930)>. Acesso em 08/03/2013.
- CROUS, P.W.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K.; GROENEWALD, J. Z. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. In: Preface, *Studies in Mycology*, n. 58, 253 p., 2007.
- DADACHOVA, E.; BRYAN, R.A.; HUANG, X. MOADEL, T.; SCHWEITZER, A.D.; AISEN, P. NOSANCHUK, J.D. CASADEVALL, A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *Plos One*, v. 2, n.5, e457, 2007.
- DE DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of Clical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.
- DE DE HOOG, G.S. et al. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 90, p. 257-268, 2006.
- EL BASSAM, S.; BENHAMOU, N.; CARISSE, O. The role of melanin in the antagonistic interaction between the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* and *Microsphaeropsis ochracea*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 349–358, 2002.

ESTÉVEZ, E.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 32, p. 33–37, 2005.

FOSTER, L.M.K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. *Rev. Saúde Pública*, v. 28, n. 2, p 167-172, 1994.

FUKAMI, A.; NAKAMURA, T.; KIM, Y.P.; SHIOMI, K.; HAYASHI, M.; NAGAI, T.; YAMADA, H.; KOMIYAMA, K.; OMURA, S. A new anti-influenza virus antibiotic, 10-norparvulenone from *Microsphaeropsis* sp FO-5050. *Journal of Antibiotics*, v. 53, p. 1215–1218, 2000.

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

HOBARA, T.; OKUDA, M.; GOTOH, M.; OKI, K.; SEGAWA, H.; KUNITSUGU, I. Estimation of the lethal toluene concentration from the accidental deaths of painting workers. *Industrial Health*, v. 38, p. 228 – 231, 2000.

ISOLA, D.; SELBMANN, L.; DE DE HOOG, G. S.; FENICE, M.; ONOFRI, S.; PRENAFETA-BOLDU, F.X.; ZUCCONI, L. Isolation and Screening of Black Fungi as Degradars of Volatile Aromatic Hydrocarbons. *Mycopathologia*, DOI 10.1007/s11046-013-9635-2, 2013.

LUKAS, M.; KRAKER, S.; LEIS, A.; STERFLINGER, K.; GRUBE, M. Signature-shifts of ¹³C in Black Fungi during starvation suggest facultative uptake of atmospheric carbon. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011.

MANAMGODA, D.S.; CAI, L.; BAHKALI, A.H. CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, v. 51, p. 3–42, 2011.

MARTINEZ, E.; LACORTE, S.; LLOBET, I.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gás chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 959, n. 1/2, p.181- 190, 2002.

MATOS, T.; HAASE, G.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE DE HOOG, G.S. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. *Antonie Leeuwenhoek*, Netherlands, v.83, p.293-303, 2003.

MELQUIADES, R.A.; LOBO, I.; GUEDES, C.L.B.; PINTO, J.P. Análise de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em solos por headspace e cromatografia gasosa/ detector de ionização de chama. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 27, n. 2, p. 113-120, 2006.

MIROCHA, C.J.; DEVAY, J.E. Growth of fungi on an inorganic medium. *Canadian Journal of Microbiology*, v.17, p. 1373, 1972.

MITRA, S.; ROY, P. BTEX: A serious ground-water contaminant. *Research Journal of Environmental Sciences*, v. 5, n.5, p 394-398, 2011.

ONOFRI, S. ; SELBMANN L. ; ZUCCONI, L. ; PAGANO, S. Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planetary and Space Science*, v. 52, p. 229 – 237, 2004.

PARKINSON, S.M.; WAINWRIGHT, M.; KILLHAM, K. Observations on oligotrophic growth of fungi on silica gel. *Mycological Research*, v., 93, p. 529, 1989.

PARKINSON, S.M., KILLHAM, K.; WAINWRIGHT, M. Assimilation of $^{14}\text{CO}_2$ by *Fusarium oxysporum* grown under oligotrophic conditions. *Mycological Research*, v. 94, p. 959, 1990.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X., SUMMERBELL R., DE DE HOOG G.S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. *FEMS Microbiological Reviews* v. 30, p. 109–130, 2006.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J.T.C.; van GROENESTIJN, W. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

PRENAFETA-BOLDU, F.X.; KUHN, A.; LUYKX, D.M.A.M.; ANKE, H.; GROENESTIJN, J.W.; BONT, J.A.M. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Research*, v. 105, n. 4, p 477-484, 2001.

POINDEXTER, J.S. Oligotrophy fast and famine existence. *Advances in Microbial Ecology*, v. 5, p. 63, 1981.

POTIN, O.; VEIGNIE, E.; RAFIN, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 51, p. 71-78, 2004.

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contaminated soil by filamentou fungi isolated from the soil. *International Biodegradation and Biodeterioration*, v. 54, p. 41-52, 2004

RAE, E.J.; DATTELBAUM, M. The properties of poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) in compression. *Polymer*, v.45, p. 7615 – 7625, 2004.

SATOW, M.M., ATTILI-ANGELIS, D., DE DE HOOG, G. S., ANGELIS, D.F., VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Mycology*, v. 61, p.157–163, 2008.

SILVA, R.L.B.; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.N.; BRILHANTE, O.M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos da Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1599-1607, 2002.

SILVA, M.; CERNIGLIA, C.E.; POTHULURI, J.V.; CANHOS, V.P.; ESPOSITO, E. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 399 – 405, 2003.

SINGH, H. *Mycorremediation: fungal bioremediation*. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey, 592p, 2006.

SOUZA, D.J; SANTOS, J.F.L.; DELLA-LUCIA, T.M.C. Organização Social das formigas-cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T.M.C. *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1ª edição. Viçosa – MG. Editora UFV, 2011. p.126 – 140.

TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU K.; SONE, T.; TANAK, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Modiolides A and B, two new 10-membered macrolides from a marine derived fungus. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 412– 415, 2003.

UIJTHOF, J.M.J.; de DE HOOG, G.S.; COCK, A.W.A.M. de; TAKEO, K.; NISHIMURA, K. Pathology of strains of the black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*: an evaluation based on PCR. *Mycoses*, v.37, p.235-242, 1994.

VIANA-BAILEZ, A.M.; BAILEZ, O.; MALAQUIAS, K.S. Comunicação em formigas-cortadeiras. In: Della-Lucia, T.M.C. *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa-MG, Brasil, p. 141-164, 2011.

WAINWRIGHT, M.; ALI, T. A.; BARAKAH, F. A review of the role of oligotrophic microorganisms in biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 31, n. 1, p. 1-13, 1993.

WILBUR, S.M.A; BOSH, S.B.S. U.S. Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 154p, 2004.

ZHDANOVA, N.N.; ZAKHARCHENKO, V.A.; VEMBER, V.V.; NAKONECHNAYA, L.T. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research*, v. 104, p. 1421 – 1426, 2000.

ZHAO, J. et al. Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. *Microbial Ecology*, v. 60, p. 149–156, 2010.

APÊNDICE

Tabela 1A. Valores de produção de biomassa em miligramas (mg) em cada tratamento, identificação e substrato de origem dos 200 isolados submetidos ao teste de assimilação de tolueno. C+ = Controle positivo; C- = Controle negativo; T+D = Tolueno + Dibutilftalato; T = Tolueno

Cód D	Identificação	Substrato de Origem	Tratamentos			
			C+	C-	T+D	T
4	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	86,4	1,4	6,6	17,0
5	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	81,7	1,6	18,1	4,4
15	Espécie de Chaetothyriales	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	90,7	1,8	2,4	18,9
16	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	35,4	18,6	17,3	6,1
23	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	52,2	10,3	5,1	16,7
25	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	12,8	2,0	2,6	17,8
29	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	35,8	5,0	8,0	18,2
30	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	8,2	15,2	4,3	19,3
31	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	76,8	1,8	4,3	17,5
41	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	84,5	10	3,2	5,3
48	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	87,1	16,8	3,9	4,1
51	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	1082,3	3,1	5,4	16,3
53	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	76,7	2,8	11,9	8,6
59	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	58,5	3,6	4,4	5,0
63	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	48	3,4	15	17,8
65	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	84,7	6,1	6,2	6,4
73	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	80,8	2,9	1,6	9,9
74	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	86	19,7	2,8	6,1

84	Espécie de Chaetothyriales	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	91,7	3,9	4,3	6,3
90	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	88,2	18,2	2,8	10,6
91	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	41,0	3,4	4,6	6,8
103	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	86,8	18,6	6,2	11,4
111	<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	81,3	4,1	7,5	16,5
112	Espécie de Chaetothyriales	Casca de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	78,2	8,3	3,1	16,7
115	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	33,7	6,6	6,6	17,2
116	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	83,0	10,6	3,6	16,8
119	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	37,4	2,9	8,1	16,8
121	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	18,0	4,0	2,5	6,9
122	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	85,8	9,8	4,5	6,3
123	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	39,8	3,3	4,6	3,5
127	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	78,3	2,7	4,0	4,9
128	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	30,6	3,8	5,8	2,5
129	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	86,8	3,1	4,5	5,9
131	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	83,6	2,9	5,1	4,5
132	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	21,1	3,9	2,1	3,3
133	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	84,1	4,4	5,0	16,5
135	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	85,0	3,0	17,9	4,8
137	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	11,9	17,8	3,2	9,7
138	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	83,9	3,0	3,5	7,5
139	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	70,3	5,2	7,3	15,5
141	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	20,6	12,5	6,1	5,1

146	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	32,2	2,5	5,8	18,1
149	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	22,2	4,5	3,1	9,9
151	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	94,1	17,9	3,9	17,8
153	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	87,2	2,7	18,1	16,9
154	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	34,7	2,7	3,2	6,0
157	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	19,0	3,7	18,1	15,0
158	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	80,0	2,3	10,7	7,7
160	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	93,3	16,5	17,8	16,6
162	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	74,7	7,6	4,4	17,0
164	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	17,0	2,4	8,4	17,5
165	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	11,6	3,8	6,2	17,3
168	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	85,6	1,9	4,9	4,9
169	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	9,3	4,7	5,4	16,3
170	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	93,2	3,2	6,3	21,5
171	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	86,9	4,5	15,3	12,7
173	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	11,7	1,7	3,3	14,1
180	Espécie de Chaetothyriales	Solo de oficina mecânica	27,3	2,0	34,5	3,0
183	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	30,5	2,8	7,0	7,2
192	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	19,9	17,6	8,3	8,0
199	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	85,9	7,2	11,5	17,3
200	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	9,2	3,5	17,4	5,6
201	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	129,4	1,4	3,3	9,2
203	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	39,3	2,5	17,2	11,2

207	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Solo de oficina mecânica	76,2	12,7	18,2	12,9
A			C+	C-	T+D	T
6	<i>Cladosporium gossypiicola</i>	Amostras de águas	41,6	16,7	5,8	18,1
18	<i>Curvularia trifolii</i>	Amostras de águas	50,3	16,6	16,7	18,8
28	<i>Cladosporium</i> sp.	Amostras de águas	41,7	15,3	5,7	9,3
30b	<i>Phoma</i> – like	Amostras de águas	28,2	15,5	16,4	7,6
48	<i>Westerdykella capitulum</i>	Amostras de águas	89,6	3,4	5,6	2,3
54	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	62,2	2,8	3,1	8,6
55	<i>Westerdykella dispersa</i>	Amostras de águas	81,9	1,4	17,9	14,5
58	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	51,0	4,4	17,9	2,9
64	<i>Phoma</i> – like	Amostras de águas	85,6	15,7	10,1	7,7
65	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	26,1	16,7	3,1	16,8
67	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Amostras de águas	26,4	2,7	5,9	6,4
70	<i>Phoma</i> –like	Amostras de águas	29,8	16,6	17,7	19,3
77	<i>Westerdykella capitulum</i>	Amostras de águas	87,6	15,7	6,5	5,3
78	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Amostras de águas	52,2	4,0	2,9	5,6
80	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	66,4	16,5	6,9	4,1
94	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Amostras de águas	63,5	3,3	16,9	5,2
95	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	22,9	3,2	7,4	7,3
107	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	29,2	4,5	17,3	4,8
125	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Amostras de águas	35,3	3,4	3,8	6,6
126	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	5,9	1,2	6,6	6,1
130	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	Amostras de águas	18,6	3,9	4,6	17,6
135	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	98,4	15,3	10,5	5,3
144	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	Amostras de águas	39,2	16,7	18,3	4,4
149	<i>Cladosporium</i> sp.	Amostras de águas	31,6	15,8	18,5	6,8
151	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Amostras de águas	64,2	3,6	5,8	19,0
165	<i>Westerdykella dispersa</i>	Amostras de águas	92,5	2,7	11,1	4,5
172	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	Amostras de águas	67,6	1,1	5,5	2,9
177	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	87,6	10,5	6,7	9,1

179	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	29,7	6,3	3,7	9,3
184	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	85,2	18,2	12,1	14,6
189	<i>Cladosporium</i> sp.	Amostras de águas	41,0	6,4	8,9	17,1
234	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	Amostras de águas	38,8	0,3	4,1	4,4
240	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	27,1	16,3	4,1	5,2
237	<i>Westerdykella capitulum</i>	Amostras de águas	43,9	16,3	8,4	6,3
246	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Amostras de águas	58,1	15,9	11,1	17,6
259	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Amostras de águas	48,2	16,9	18,1	17,3
272	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Amostras de águas	47,3	7,0	16,5	16,3
275	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	28,5	16,5	19,0	3,9
304	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	67,8	1,6	15,9	4,7
305	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	38,6	16,3	5,8	17,4
307	<i>Exophiala spinifera</i>	Amostras de águas	78,9	16,3	17,1	17,4
316	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	27,3	17,6	5,9	13,7
327	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	80,7	6,8	6,3	3,8
335	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	42,8	14,3	15,5	10,9
340	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Amostras de águas	19,3	16,4	9,5	17,4
348	<i>Exophiala spinifera</i>	Amostras de águas	44,2	3,8	13,0	7,5
356	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	30,7	17,2	11,1	22,6
373	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	31,3	1,8	12,0	4,0
374	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	74,5	2,6	8,1	4,9
390	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	31,0	3,4	1,5	8,6
393	<i>Paraconiothyrium maculiculis</i>	Amostras de águas	22,5	1,8	6,8	17,7
398	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	114,5	18,0	5,0	19,3
418	Fungo filamentoso negro	Amostras de águas	40,5	2,1	2,5	5,8
420	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	40,4	2,4	8,1	3,6
424	<i>Westerdykella capitulum</i>	Amostras de águas	112,1	15,6	5,6	18,0
457	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	23,7	9,3	4,8	14,2
N			C+	C-	T+D	T
18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Içá de <i>Atta capiguara</i>	40,2	20,4	15,8	9,0

19	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta capiguara</i>	35,7	17,3	2,9	19,2
21	<i>Cladosporium perangustum</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	25,7	3,0	18,3	19,0
24	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	34,1	3,2	3,1	5,6
26	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta capiguara</i>	36,2	4,7	3,6	5,8
27	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	35,6	4,3	5,2	18,6
32	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	50,4	3,4	4,0	0,4
34	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	36,9	0,4	4,2	8,1
36	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	32,0	14,9	12,8	16,1
44	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	38,0	3,5	4,8	13,1
45	<i>Cochliobolus geniculatus</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	52,3	3,8	5,7	14,7
47	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	45,2	15,6	4,0	5,6
49	Espécie de Pleosporales	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	81,0	1,8	4,9	8,7
53	<i>Cladophialophora mycetomatis</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	37,3	7,5	3,9	8,8
58	<i>Verruconis verruculosum</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	84,4	5,8	3,5	4,5
61	<i>Cochliobolus geniculatus</i>	Içá de <i>Atta laevigata</i>	26,9	16,6	3,8	7,6
64	<i>Exophiala bergeri</i>	Içá de <i>Atta laevigata</i>	70,0	6,3	3,5	1,7
66	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	51,1	5,6	15,3	6,1
67	<i>Penidiella</i> sp.	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	64,9	4,3	17,7	15,0
72	Espécie de Pleosporales	Içá de <i>Atta capiguara</i>	26,4	3,1	4,5	0,4
73	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta capiguara</i>	34,1	7,9	4,0	7,7
74	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta laevigata</i>	39,8	8,9	4,4	17,8
75	<i>Cladosporium uredinicola</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	35,1	17,0	3,7	18,4
76	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	36,9	2,2	5,6	2,8
77	<i>Cladosporium perangustum</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	36,9	11,9	17,1	0,8
79	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	36,9	5,2	17,4	17,2
80	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	40,3	18,4	17,4	17,4
82	<i>Cladosporium perangustum</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	31,2	17,6	45,8	16,9
83	<i>Cladosporium perangustum</i>	Içá de <i>Atta capiguara</i>	42,3	2,6	4,3	6,4
84	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	51,8	3,5	4,2	4,5
85	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	21,4	2,4	17,3	16,5

86	<i>Cladosporium</i> sp.	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	70,0	3,4	5,9	4,8
87	<i>Penidiella</i> sp.	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	75,1	17,9	4,4	16,0
89	<i>Penidiella</i> sp.	Içá de <i>Atta laevigata</i>	32,6	11,0	3,6	16,7
92	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta capiguara</i>	34,6	2,7	17,5	16,6
101	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	49,7	2,2	17,1	17,9
110	<i>Cladosporium gossypicola</i>	Bitú de <i>Atta laevigata</i>	57,8	16,9	16,8	8,4
F			C+	C-	T+D	T
3	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	44,6	14,9	16,6	15,5
4F1	Espécie de Capnodiales	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	90,3	2,4	18,9	2,5
4F2	Espécie de Capnodiales	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	85,9	2,3	4,8	6,9
7	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta capiguara</i>	38,8	24,2	17,6	17,7
10	<i>Cladophialophora chaetospira</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	81,3	14,9	8,4	16,1
11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	36,0	2,6	7,9	16,3
12	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	38,1	18,3	17,9	15,8
14	<i>Cladosporium</i> sp.	Içá de <i>Atta capiguara</i>	534,9	2,2	18,0	4,4
18	<i>Cladosporium perangustum</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	31,2	3,1	17,3	17,5
21	Fungo filamentoso negro	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	82,6	1,5	10,3	14,8
22	Fungo filamentoso negro	Içá de <i>Atta capiguara</i>	79,1	18,4	15,5	5,1
25	<i>Pithomyces-like</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	77,6	5,8	3,5	5,9
26	<i>Exophiala spinifera</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	102,2	4,1	5,6	17,0
27	Fungo filamentoso negro	Içá de <i>Atta capiguara</i>	87,3	16,8	2,0	7,6
29	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Içá de <i>Atta capiguara</i>	34,1	17,3	17,7	3,4
30	Espécie de Chaetothyriales	Içá de <i>Atta capiguara</i>	31,8	12,1	19,3	16,5
33	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bitú de <i>Atta capiguara</i>	31,2	7,9	17,8	16,0
34	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Içá de <i>Atta capiguara</i>	34,0	4,1	3,3	16,3
35	<i>Cladosporium bruhnei</i>	Içá de <i>Atta capiguara</i>	59,8	18,3	5,5	16,0
NR			C+	C-	T+D	T
1	<i>Exophiala spinifera</i>	Amostras de águas	74,6	4,7	2,1	4,6
2	<i>Exophiala attenuate</i>	Amostras de águas	91,1	4,8	6,0	7,9
3	<i>Exophiala heteromorpha</i>	Amostras de águas	65,8	2,4	5,2	5,1

4	<i>Exophiala alcalophila</i>	Amostras de águas	92,9	5,0	3,1	17,7
7	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	81,3	1,5	4,8	16,6
8	<i>Exophiala cf. attenuata</i>	Amostras de águas	25,2	13,2	3,6	16,3
10	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	22,2	15,4	10,7	16,8
11	<i>Peyronellaea glomerata</i>	Amostras de águas	67,1	4,2	4,8	16,1
12	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	34,7	6,6	17,3	6,5
16	Espécie de Pleosporales	Amostras de águas	29,0	0,0	6,0	11,1
35	<i>Exophiala spinifera</i>	Amostras de águas	32,6	1,4	12,2	4,9
36	<i>Curvularia lunata</i>	Amostras de águas	25,6	16,8	17,2	17,2
M			C+	C-	T+D	T
4	<i>Cladophialophora minourae</i>	Solo de landfarming	91,4	16,8	2,2	3,1
9	Espécie de Chaetothyriales	Solo de landfarming	49,2	10,2	10,8	11,3
14	<i>Cladophialophora immunda</i>	Solo de landfarming	43,4	10,4	2,5	10,4
46-1	<i>Cladophialophora immunda</i>	Solo de landfarming	48,1	20,2	7,0	9,7
68	Espécie de Chaetothyriales	Solo de landfarming	31,6	10,6	4,3	6,2
69	<i>Exophiala xenobiotica</i>	Solo de landfarming	47,6	9,8	4,2	10,2
75	<i>Cladosporium</i> sp.	Solo de landfarming	32,4	10,3	11,3	2,1
87	<i>Cladophialophora</i> sp.	Solo de landfarming	46,3	9,8	8,3	7,1
114	<i>Cladophialophora immunda</i>	Solo de landfarming	44,7	9,8	11,3	10,8
109	<i>Cladophialophora immunda</i>	Solo de landfarming	55,3	11,3	3,3	9,3
116	<i>Cladosporium</i> sp.	Solo de landfarming	29,9	10,6	11,3	9,9

Tabela 2A. Teste de Normalidade para os dados dos 34 isolados selecionados dentre os 200 testados. C+ = Controle Positivo; C- = Controle Negativo; T+D = Tolueno + Dibutilftalato; T = Tolueno.

Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk				
	Tratamento			
Resultados	C+	C-	T+D	T
Tamanho da amostra	34	34	34	34
Média	48.1294	5.7412	11.6412	15.3059
Desvio padrão	88.2451	4.7566	8.4967	4.3376
Valor W	0.3384	0.7601	0.7848	0.696
p-valor	0.0037	0.0084	0.0086	0.0077
p < 0,05 = Normalidade rejeitada				

Tabela 3A. Teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos dos 34 isolados selecionados dentre os 200 iniciais. A tabela mostra os valores de diferenças entre os postos e a comparação das mesmas, bem como o p-valor de cada comparação. C+ = Controle Positivo; C- = Controle Negativo; T+D = Tolueno + Dibutilftalato; T = Tolueno.

TESTE KRUSKAL-WALLIS		
H = 77.9132 Graus de liberdade = 3 (p) Kruskal-Wallis = 0	C+ (posto médio) = 111.8529 C- (posto médio) = 29.0294 T+D (posto médio) = 59.0588 T (posto médio) = 74.0588	
Comparações Student-Newman-Keuls	Diferença de Postos	p-valor
Grupos (C+ e C-)	82.8235	< 0.0001
Grupos (C+ e T+D)	52.7941	< 0.0001
Grupos (C+ e T)	37.7941	< 0.0001
Grupos (C- e T+D)	30.0294	0.0017
Grupos (C- e T)	45.0294	< 0.0001
Grupos (T+D e T)	15.0000	0.1165

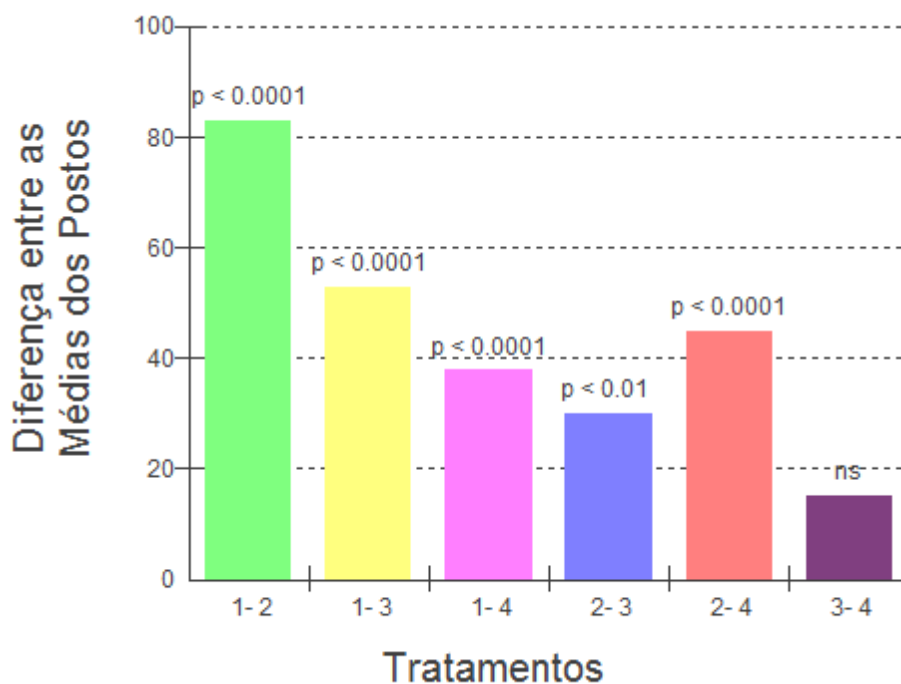


Figura 1A. Gráfico dos resultados do teste de Kruskal-Wallis. No eixo y estão representadas as diferenças entre as médias dos postos dos tratamentos indicados no eixo x. Valores de "p" inferiores a 0,05 indicam a existência de diferença significativa na produção de biomassa dos tratamentos. Valores superiores a 0,05 indicam que não há diferença significativa na produção de biomassa. 1 = C+ (Controle positivo); 2 = C- (Controle negativo); 3 = T+D (Tolueno + Dibutilftalato); 4 = T (Tolueno). ns = não significante.

Tabela 4A. Teste de Normalidade para os dados dos 10 isolados selecionados e para a linhagem padrão *Cladophialophora psammophila*. Os cálculos foram realizados com a biomassa média obtida da quintuplicata de cada isolado e da linhagem padrão e posteriormente a biomassa média dos mesmos em cada tratamento.

C+ = Controle Positivo; C- = Controle Negativo; T+D = Tolueno + Dibutilftalato; T = Tolueno.

Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk			
	Tratamento		
Resultados	C+	C-	T
Tamanho da amostra	11	11	11
Média	88.7727	18.7055	17.4691
Desvio padrão	15.6695	2.5582	0.9832
Valor W	0.8196	0.7357	0.9623
p-valor	0.0224	0.0093	0.7699
p < 0,05 em C+ e C- = Dados não-paramétricos			

Tabela 5A. Teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos dos 10 isolados selecionados e a linhagem padrão *C. psammophila*. A tabela mostra os valores de diferenças entre as médias dos postos e a comparação das mesmas, bem como o p-valor de cada comparação. C+ = Controle Positivo; C- = Controle Negativo; T+D = Tolueno + Dibutilftalato; T = Tolueno.

TESTE KRUSKAL-WALLIS		
H = 22.5202	C+ (posto médio) = 28.0000	
Graus de liberdade = 2	C- (posto médio) = 13.7273	
(p) Kruskal-Wallis = 0	T (posto médio) = 9.2727	
Comparações Student-Newman-Keuls	Diferença de Postos	p-valor
Grupos (C+ e C-)	14.2727	0.0005
Grupos (C+ e T)	18.7273	< 0.0001
Grupos (C- e T)	4.4545	0.28

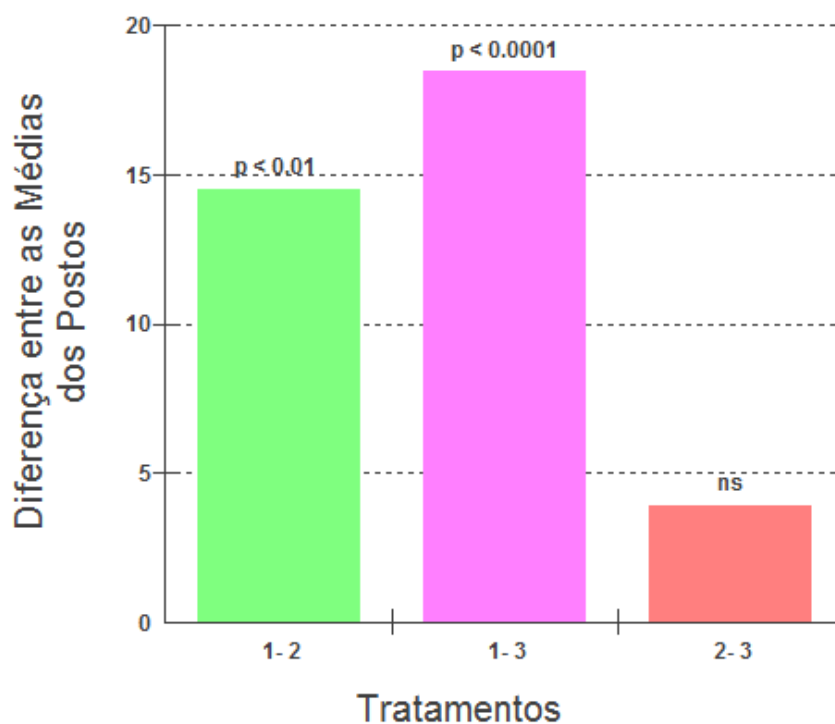


Figura 2A. Gráfico dos resultados do teste de Kruskal-Wallis para os 10 isolados selecionados e a linhagem padrão *C. psammophila*. No eixo y estão representadas as diferenças entre as médias dos postos dos tratamentos indicados no eixo x. Valores de "p" inferiores a 0,05 indicam a existência de diferença significativa na produção de biomassa dos tratamentos. Valores superiores a 0,05 indicam que não há diferença significativa na produção de biomassa. 1 = C+ (Controle positivo); 2 = C- (Controle negativo); 3 = T (Tolueno). ns = não significativo.

Tabela 6A. Teste de Normalidade para os dados dos 10 isolados selecionados no tratamento T (Tolueno) e a linhagem padrão *Cladophialophora psammophila* (Cp). Os cálculos foram realizados com a biomassa média obtida da quintuplicata de cada isolado e da linhagem.

TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK												
Resultados	A130	A393	NR4	D29	D30	D63	N21	N27	N82	18F	Cp	
Tamanho da amostra	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Média	15.76	17.7	17.94	17.66	16.5	18.18	16.22	17.44	18.26	17.36	19.14	
Desvio padrão	1.2361	0.9354	0.3912	0.498	0.8456	1.1649	0.9808	0.8414	0.5595	0.6229	3.0624	
Valor W	0.8804	0.907	0.9319	0.8058	0.7847	0.9252	0.9832	0.9394	0.9653	0.9405	0.7326	
p-valor	0.3461	0.434	0.5376	0.0997	0.0758	0.4942	0.9303	0.5951	0.7947	0.6036	0.0313	
p < 0,05 em Cp = Dados não-paramétricos												

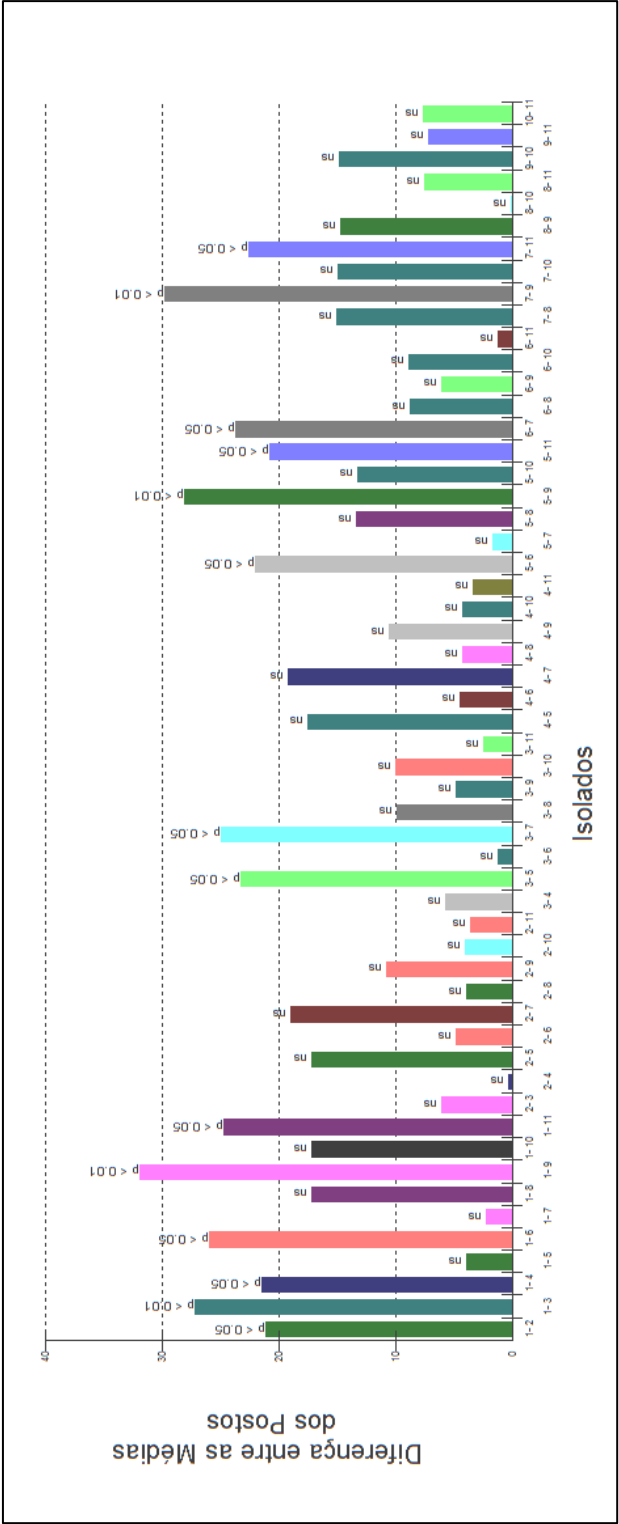


Figura 3A. Representação gráfica do Teste de Kruskal-Wallis para comparação da biomassa produzida por cada estirpe no tratamento T (Tolueno). Grupos de 1 a 10 representam a biomassa dos isolados A130, A 393, NR4, 29, D30, D63, N21, N27, N82 e 18F respectivamente e o grupo 11 representa a biomassa da linhagem padrão *C. psammophila*.

Tabela 7A. Teste de Kruskal-Wallis para comparação da biomassa produzida por cada estirpe no tratamento T (Tolueno). Grupos de 1 a 10 representam a biomassa dos isolados A130, A 393, NR4, 29, D30, D63, N21, N27, N82 e 18F respectivamente e o grupo 11 representa a biomassa da linhagem padrão *C. psammophila*. SNK = Student-Newman-Keuls.

H 22.941		Graus de liberdade = 10		(p) Kruskal-Wallis = 0.011	
Comparações SNK	Dif. Postos	p-valor	Comparações SNK	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2)	21.1	0.0373	Grupos (4 e 6)	4.5	0.657
Grupos (1 e 3)	27.1	0.0075	Grupos (4 e 7)	19.2	0.0581
Grupos (1 e 4)	21.4	0.0347	Grupos (4 e 8)	4.2	0.6785
Grupos (1 e 5)	3.9	0.7003	Grupos (4 e 9)	10.5	0.3001
Grupos (1 e 6)	25.9	0.0106	Grupos (4 e 10)	4.3	0.6713
Grupos (1 e 7)	2.2	0.8281	Grupos (4 e 11)	3.3	0.7447
Grupos (1 e 8)	17.2	0.0896	Grupos (5 e 6)	22	0.0299
Grupos (1 e 9)	31.9	0.0016	Grupos (5 e 7)	1.7	0.8668
Grupos (1 e 10)	17.1	0.0915	Grupos (5 e 8)	13.3	0.1893
Grupos (1 e 11)	24.7	0.0148	Grupos (5 e 9)	28	0.0057
Grupos (2 e 3)	6	0.5537	Grupos (5 e 10)	13.2	0.1927
Grupos (2 e 4)	0.3	0.9764	Grupos (5 e 11)	20.8	0.0401
Grupos (2 e 5)	17.2	0.0896	Grupos (6 e 7)	23.7	0.0193
Grupos (2 e 6)	4.8	0.6357	Grupos (6 e 8)	8.7	0.3905
Grupos (2 e 7)	18.9	0.0621	Grupos (6 e 9)	6	0.5537
Grupos (2 e 8)	3.9	0.7003	Grupos (6 e 10)	8.8	0.3851
Grupos (2 e 9)	10.8	0.2865	Grupos (6 e 11)	1.2	0.9057
Grupos (2 e 10)	4	0.693	Grupos (7 e 8)	15	0.1388
Grupos (2 e 11)	3.6	0.7224	Grupos (7 e 9)	29.7	0.0034
Grupos (3 e 4)	5.7	0.5737	Grupos (7 e 10)	14.9	0.1414
Grupos (3 e 5)	23.2	0.022	Grupos (7 e 11)	22.5	0.0264
Grupos (3 e 6)	1.2	0.9057	Grupos (8 e 9)	14.7	0.1468
Grupos (3 e 7)	24.9	0.014	Grupos (8 e 10)	0.1	0.9921
Grupos (3 e 8)	9.9	0.3285	Grupos (8 e 11)	7.5	0.4592
Grupos (3 e 9)	4.8	0.6357	Grupos (9 e 10)	14.8	0.1441
Grupos (3 e 10)	10	0.3237	Grupos (9 e 11)	7.2	0.4773
Grupos (3 e 11)	2.4	0.8128	Grupos (10 e 11)	7.6	0.4532
Grupos (4 e 5)	17.5	0.0841			

CAPÍTULO 2

OCORRÊNCIA DE FUNGOS MELANIZADOS ASSOCIADOS A HIDROCARBONETOS E POSSÍVEIS NOVAS ESPÉCIES

RESUMO

As recentes mudanças taxonômicas do reino Fungi tem sido tema de grande discussão na micologia atual. Muitos esforços têm se focado na busca de uma classificação microbiana consistente e que reflita as complexas relações entre os diversos grupos encontrados no Reino Fungi. Para tal, a correta classificação de seus táxons é primordial. Nesse contexto, os fungos melanizados constituem um rico material de estudos, pois as informações disponíveis atualmente ainda são insuficientes para esclarecer seus aspectos ecológicos e estimar a real diversidade de suas espécies. Suas características fisiológicas têm chamado a atenção dos pesquisadores, revelando conferir a estes fungos a capacidade de se adaptar a ambientes inóspitos e contaminados com xenobióticos, especialmente petróleo e seus derivados. Assim, o interesse biotecnológico alia-se à importância da taxonomia, além de todos os aspectos relacionados à ecologia destes micro-organismos que podem ser desvendados e melhor caracterizados quando uma identificação específica consistente é realizada. Este trabalho objetivou identificar mediante análises morfológicas, moleculares e filogenéticas 200 isolados de fungos melanizados selecionados previamente para estudos da avaliação de seu potencial de biodegradação de tolueno. Representantes de seis ordens foram reconhecidos: Chaetothyriales, Capnodiales, Pleosporales, Venturiales, Xylariales e Microascales. Diversas espécies identificadas são relatadas pela primeira vez associadas às fontes de isolamento utilizadas. Possíveis novas espécies nas ordens Pleosporales e Capnodiales foram encontradas e suas descrições são propostas.

Palavras-chave: Taxonomia, Fungos melanizados, novas espécies, *Penidiella*, *Roussoella*, *Pseudosporormiella*

INTRODUÇÃO

A maioria dos fungos, bem como outros micro-organismos é benéfica ao homem e aos demais seres vivos. São sapróbios, decompondo resíduos complexos de plantas e animais transformando-os em substâncias reaproveitáveis pelas gerações subsequentes. Desse modo, a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo e a ciclagem de nutrientes (WAINWRIGHT, 1990; HAWKSWORTH et al., 1995; MACHADO, 2006). Além disso, há milênios esses micro-organismos são utilizados para fermentação de produtos alimentícios, e com o tempo ganharam espaço em processos biotecnológicos, sendo utilizados, por exemplo, na produção de antibióticos, como agentes de controle biológico e para a biorremediação.

Com sua grande capacidade adaptativa a ambientes incomuns, os fungos denominados “negros”, “melanizados” ou “dematiáceos” têm atraído a atenção de micologistas. Tais designações são decorrentes da coloração escura do micélio, conferida pela presença de melanina na parede celular. É um grupo polifilético que possui ancestrais derivados a partir de diferentes ramos da árvore da vida dos fungos (DE HOOG; GRUBE, 2008). Devido à falta de marcadores fenotípicos para seus representantes, a identificação específica é consistente apenas aliando as análises morfológicas às moleculares.

Segundo Hawksworth (2001), das espécies de fungos descritas, apenas 11.500 (16%) estão conservadas em coleções de culturas, o que equivale a menos de 1% do número total de espécies estimado. Além disso, o autor aponta o fato de um número surpreendente elevado de fungos estar representado por menos de cinco linhagens conservadas em coleção, o que indica a pouca frequência do seu isolamento da natureza e pode representar uma preocupação, na medida em que não se sabe ao certo quantas linhagens deveriam ser conservadas para representar de forma adequada a variabilidade genética intra-específica de um fungo. Na realidade, o mundo dos fungos ainda desconhecido, ou incompletamente caracterizado, representa um recurso biológico potencial incalculável, à espera de realização. Nesse contexto, grupos que carecem de estudos, como o dos fungos melanizados, podem guardar um potencial de grande interesse à sociedade. Desta forma, esse estudo identificou, mediante análises morfológicas e moleculares, 200 isolados de fungos melanizados selecionados por encontrarem-se associadas a hidrocarbonetos.

MATERIAL E MÉTODOS

Fontes de isolamento dos fungos associados a hidrocarbonetos

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de cinco substratos:

- Corpo de içás e bitús (respectivamente, fêmeas e machos alados de formigas-cortadeiras) das espécies *Atta capiguara* e *A. laevigata* obtidas durante o período de acasalamento, também conhecido como revoada;

- Solo contaminado com óleo de motor de veículos automotores existente em uma oficina mecânica em Rio Claro, Estado de São Paulo;

- Solo de *landfarming* de uma refinaria de petróleo em Paulínia, Estado de São Paulo;

- Águas de influência de uma refinaria de petróleo em Paulínia, Estado de São Paulo. A refinaria encontra-se posicionada entre dois rios: no primeiro rio é feita a captação da água utilizada nos processos da refinaria, sendo este um dos pontos de coleta (Ponto 1). Dentro da refinaria existem mais três pontos de coleta, sendo eles a entrada do efluente bruto na estação de tratamento biológico (Ponto 2), a entrada do efluente tratado na lagoa de estabilização (Ponto 3), e a saída da lagoa de estabilização (Ponto 4). Depois, o efluente é lançado em um segundo rio, no qual há mais três pontos de coleta, sendo eles 200 m à montante da descarga do efluente tratado (Ponto 5) e 200 m (Ponto 6) e 800 m (Ponto 7), respectivamente, à jusante da descarga do efluente pela refinaria;

- Fragmentos de cascas de *Eucalyptus tereticornis*, talhão 35A, plantado em 1916, existente na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade, Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil.

Técnicas de isolamento aplicadas

Utilizou-se a técnica de flotação em óleo mineral (SATOW et al., 2008) para todos os substratos investigados, com exceção das amostras de água. Neste caso o isolamento de fungos melanizados seguiu o método recomendado pelo Standard Methods (CLESCERI et al., 1998), o qual emprega a técnica de diluição seguido de inoculação pela técnica de *pour plate* em meio BDA (ágar batata), destinado ao crescimento de fungos filamentosos, e meio Sabouraud para o crescimento de leveduras.

A flotação em óleo mineral (SATOW et al., 2008) consiste em um método seletivo para o isolamento de fungos melanizados. As amostras dos diferentes substratos foram colocadas em solução salina contendo antibióticos (200 U/mL de penicilina; 200 µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de cicloheximida (actidiona)). Após agitação e incubação por 30 min adicionou-se óleo mineral esterilizado, seguido de uma agitação vigorosa em vórtex por 5 minutos. Após 20 minutos em repouso foram retiradas da interface alíquotas de 100µL, e semeadas em Agar Mycosel (Agar Sabouraud com cicloheximida (500,0 mg), cloranfenicol (200,0 mg) e estreptomicina (200,0 mg)). As placas foram incubadas a 35°C por aproximadamente 15 dias, até o aparecimento de colônias. O isolamento das mesmas foi feito em placas contendo MA 2% e antibióticos (16.570 U/ml de penicilina; 100.000 µg/ml de estreptomicina; 10.000 µg/ml de clorotetraciclina).

Os isolados selecionados foram preservados em água pelo método de Castellani e também pela técnica de criopreservação a -80°C.

Análise Morfológica

As culturas filamentosas foram crescidas em ágar malte 2% (MA 2%) ou ágar batata (PDA), e as leveduriformes em ágar Sabouraud e a incubação foi feita a 25°C por 5 a 10 dias. Observações macro e microscópicas foram realizadas mediante o uso de estereomicroscópio e pelo preparo de lâminas para microscopia óptica com azul de algodão (lactofenol) e ácido láctico.

Para as possíveis novas espécies, as mesmas foram cultivadas em ágar extrato de malte (MEA), ágar batata (PDA) e ágar aveia (OA) por 14 dias a 25°C. Para avaliação microscópica foi utilizada a técnica de microcultivo (CROUS et al., 2009) nos três meios mencionados com

incubação por um período de 3 a 5 dias a 25°C. As lamínulas removidas dos microcultivos foram montadas em ácido láctico e em azul de algodão (lactofenol) e observadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica® DM 1000.

Identificação molecular

O DNA genômico foi extraído seguindo o protocolo de extração com CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) modificado de Moller et al. (1992). Posteriormente, a região ITS do DNA ribossomal foi amplificada utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) ou V9G e LS266 (GERRITS; DE HOOG, 1999), específicos para leveduras negras, quando a amplificação com o par de *primers* ITS não foi bem sucedida. Os *amplicons* foram gerados segundo o programa de amplificação: 94 °C/3min seguido de 30 ciclos a 94 °C/30s, 55 °C/30s, 72 °C/1min, 10 °C/∞. Para possíveis espécies novas, a região D1/D2 do DNA ribossomal 28S também foi amplificada utilizando-se os *primers* NL1 e NL4 (VILELA et al., 2005). Os *amplicons* foram purificados com o kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare, UK). A reação de sequenciamento foi realizada com os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e NL1 e NL4 (VILELA et al., 2005). O programa empregado foi: 95 °C/1min seguido de 28 ciclos a 95 °C/15s, 50 °C/45s, 60 °C/4min, 4°C/∞. Após a reação, todas as amostras seguiram para nova purificação, adaptada do manual de instruções do kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit”, GE Healthcare® e aplicadas em sequenciador automático ABI 3130. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas utilizando-se o software BioEdit, versão 7.0.5.3 (HALL; 1999) e foram comparadas às sequências depositadas Genbank, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e na base de dados do CBS – Fungal Biodiversity Centre (The Netherlands).

Análises filogenéticas

As sequências analisadas foram alinhadas utilizando-se Clustal W (LARKIN et al., 2007). Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA versão 5.2 (TAMURA et al., 2011). O parâmetro Kimura 2 foi utilizado para estimar as distâncias evolutivas e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo do método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 repetições.

Documentação dos fungos

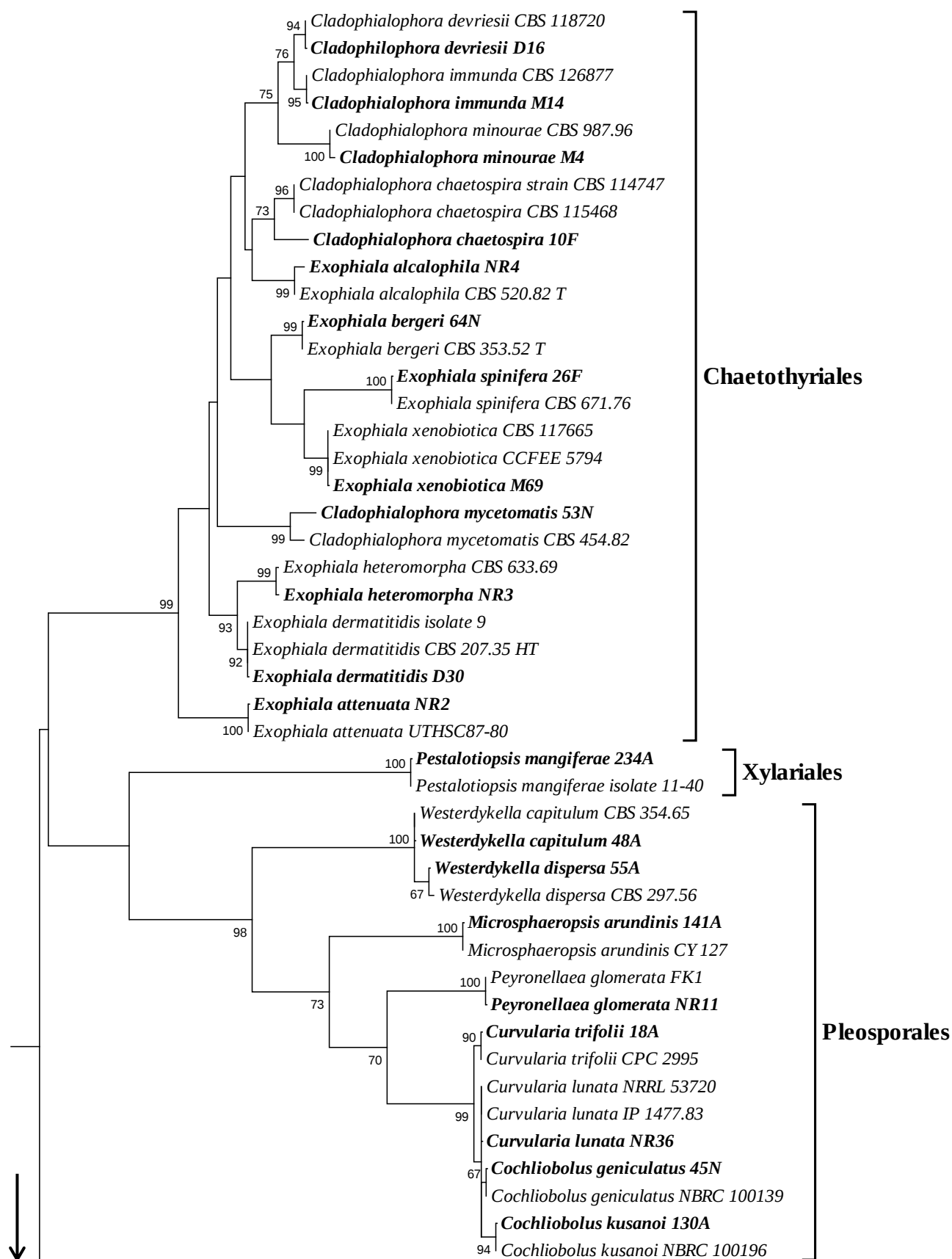
Os dados dos isolados utilizados neste trabalho, juntamente com as suas respectivas descrições e observações, foram reunidos em uma ficha catalográfica para cada táxon identificado. Na ficha constam as seguintes informações: descrição da amostra, código do isolado, substrato de isolamento, identificação, imagem de macroscopia de colônia, imagem de microscopia, medições, informações taxonômicas, caracterização molecular e filogenética e referências bibliográficas utilizadas para auxiliar na identificação. Neste trabalho são apresentadas 10 fichas catalográficas, selecionadas por apresentarem material fotográfico mais didático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos isolados

A identificação molecular foi feita para 138 dos 200 isolados selecionados para este estudo mediante o sequenciamento da região ITS, e em alguns casos da região D1/D2 da subunidade maior (28S) do DNA ribossomal. Para as demais 62 linhagens, sua identificação se deu apenas por caracteres morfológicos devido a dificuldades encontradas para a amplificação do DNA ribossomal. Mesmo utilizando *primers* considerados estridentes para o grupo dos fungos melanizados, como o V9G e o LS266 (GERRITS; DE HOOG, 1999), não foi possível a obtenção de DNA de qualidade para o sequenciamento. Tentativas subsequentes utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 também foram feitas, mas nenhum resultado foi obtido. O DNA bruto utilizado como molde foi de boa qualidade como comprovado mediante a constatação de bandas consistentes em gel de agarose (1%) após eletroforese.

Um total de 16 gêneros e 31 espécies foi reconhecido mediante análises de morfologia e sequenciamento, enquadrando-se nas seguintes ordens: Chaetothyriales (86 linhagens); Capnodiales (52 linhagens); Pleosporales (49 linhagens); Microascales (1 linhagem); Xylariales (1 linhagem) e Venturiales (1 linhagem). A árvore filogenética da Figura 1 ilustra as espécies e ordens identificadas. Na Tabela 1A, encontrada na seção “Apêndice” desse trabalho, pode-se visualizar a relação das espécies identificadas bem como seu substrato de origem. Na Figura 2 é apresentado um gráfico demonstrando a proporção de isolados advindos de cada substrato de isolamento.



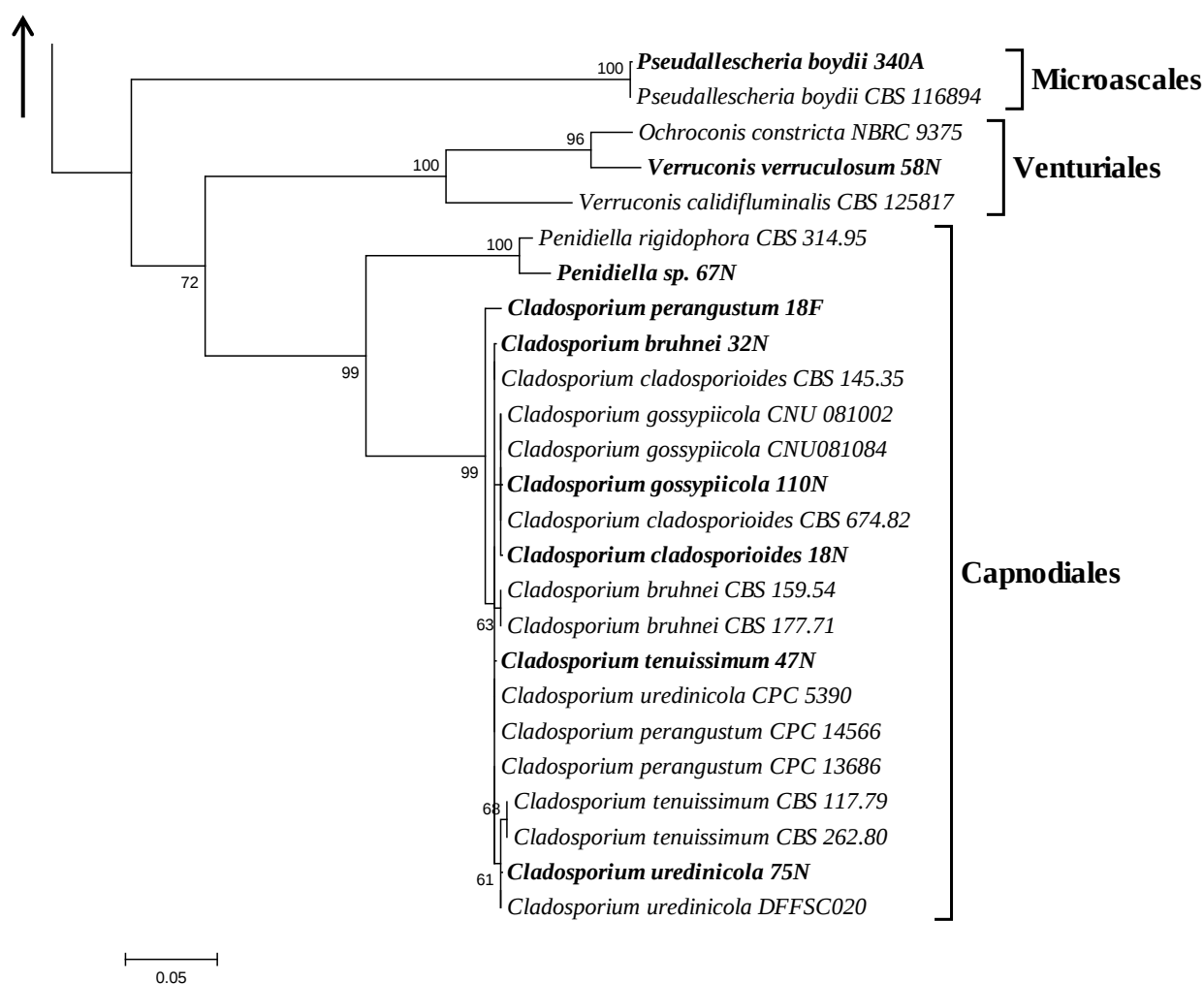


Figura 1. Análise filogenética da região ITS do DNA ribossomal de 29 das 31 linhagens representantes das espécies encontradas dentre os 200 isolados selecionados para este estudo. As linhagens identificadas neste estudo encontram-se marcadas em negrito. A árvore elucida o agrupamento das espécies em suas respectivas ordens, demonstrando a consistência das sequências obtidas em relação às sequências bem estabelecidas obtidas das bases de dados. As distâncias evolutivas baseiam-se no modelo de Kimura 2p e a reconstrução da árvore no método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%). T = Espécie Tipo; HT = Espécie Holotipo.

Na Figura 3 encontra-se o gráfico de identificação dos isolados em relação ao substrato de isolamento. No geral, nota-se a grande quantidade de espécies descritas dentre o grupo dos 200 isolados e como as espécies encontram-se melhor distribuídas nas amostras de águas de

influência da refinaria de petróleo e também nas formigas-cortadeiras. Para o solo de oficina mecânica fica clara sua relação com espécies da ordem Chaetothyriales, especialmente a espécie *Exophiala dermatitidis*. Os isolados do solo de *landfarming* e da casca de *E. tereticornis* também ficam quase exclusivamente com representantes da ordem Chaetothyriales.

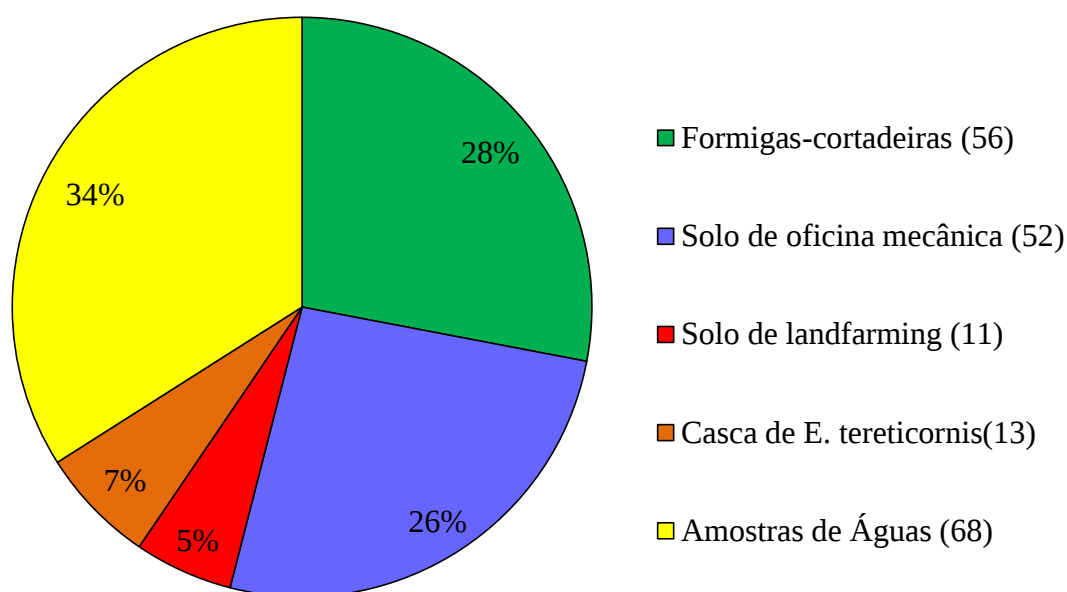


Figura 2. Gráfico da proporção de fungos melanizados obtidos de cada substrato de isolamento dentre os 200 isolados selecionados. Na pizza podem-se visualizar os valores do número de isolados expressos em porcentagem. Nota-se que a maioria dos isolados advém das águas sob influência de uma refinaria, das formigas-cortadeiras e do solo de oficina mecânica, respectivamente.

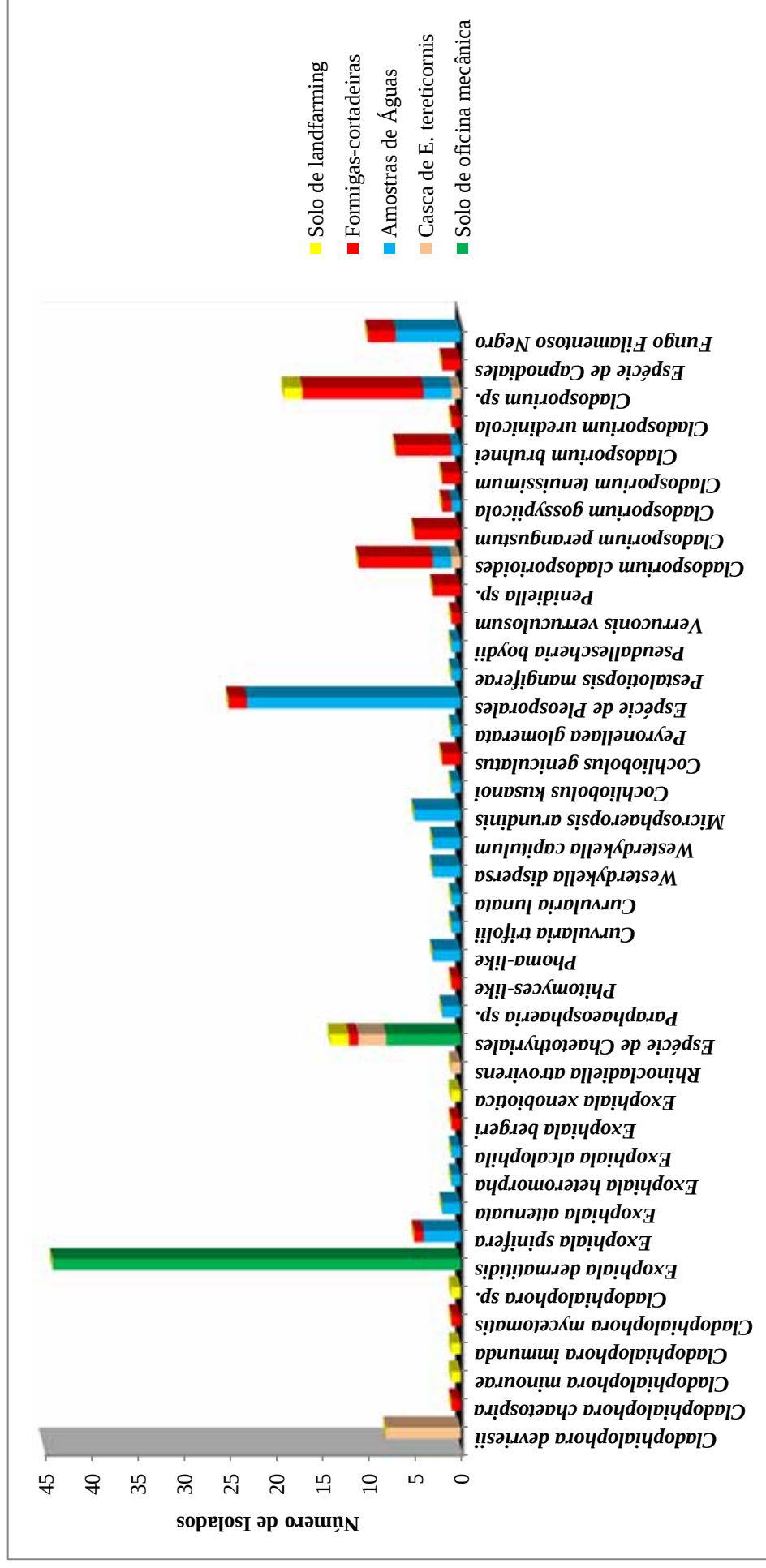


Figura 3. Gráfico da distribuição da identificação dos isolados pelos substratos de isolamento.

Chaetothyriales

A ordem Chaetothyriales, com maior número de representantes identificados, inclui as famílias Chaetothyriaceae e Herpotrichiellaceae (GEISER et al., 2006). A primeira é caracterizada por espécies com micélio que cresce livre sobre o substrato, colonizando preferencialmente folhas e a casca de árvores (BATISTA; CIFERRI, 1962), enquanto os representantes de Herpotrichiellaceae possuem micélio penetrante em seus teleomorfos (UNTEREINER, 2000). Além disso, possuem caráter dimórfico, exibindo tanto a morfologia filamentosa quanto a leveduriforme dependendo das condições abióticas do meio em que se encontram. A ecologia desses organismos é pouco conhecida e tem sido intensamente discutida na micologia atual. O isolamento de linhagens em seu habitat original é o aspecto chave para a compreensão da evolução do grupo (DE HOOG et al., 2000).

Cladophialophora, *Rhinocladiella* e *Exophiala*, gêneros identificados nesse trabalho, pertencem à família Herpotrichiellaceae. O primeiro se trata de um gênero monofilético que compreende duas clades principais: *bantiana* e *carrionii* (BADALI et al., 2008). Seus representantes encontram-se frequentemente associados a infecções em humanos, no entanto, espécies já foram descritas associadas a plantas como *C. yegresii* (DE HOOG et al., 2007), *C. hostae*, *C. proteae*, e *C. scillae* (CROUS et al., 2007) e a musgos, como *C. minutissima* (DAVEY; CURRAH, 2007). Cinco espécies diferentes foram identificadas: *C. devriesii*, *C. mycetomatis*, *C. chaetospora*, *C. minourae* e *C. immunda*.

Apesar dos relatos de isolamento em infecções humanas de *C. devriesii*, as oito linhagens identificadas neste trabalho foram anteriormente obtidas a partir de isolamento seletivo com técnica de flotação em óleo (SATOW et al., 2008) de cascas de *E. tereticornis*, substrato natural e fonte rica em hidrocarbonetos presentes em sua resina e óleos essenciais (NUNES; PIO, 2001; WINTERS et al., 2009; SILVA; CARVALHO; AZEVEDO, 2002). Este é o primeiro relato de *C. devriesii* em *Eucalyptus*, no entanto, outras linhagens já foram isoladas do ambiente, como CBS 118720 e CBS 118721 isoladas de solo sob detritos de plantas por V. A. Vicente (BADALI et al., 2008).

Até o momento apenas duas linhagens de *C. mycetomatis* foram isoladas no mundo. Uma delas (CBS 122637) isolada a partir de micetoma humano no México, relacionando a etimologia do nome da espécie. A segunda linhagem (CBS 454.82) foi isolada por W. Gams como

contaminante em uma cultura de *Scytalidium lignicola* (CBS 204.71) na Holanda, ou seja, trata-se de um isolado ambiental e não clínico. Apenas um isolado da ordem Chaetothyriales corresponde a esta espécie, e seu substrato de isolamento é o corpo de um bitú de *A. laevigata*.

Este é o primeiro relato de *C. mycetomatis* em insetos, especificamente em formigas-cortadeiras da tribo Attini. Como pode ser observado na Figura 4, sua identificação é consistente com base na análise filogenética da região ITS. Acredita-se que a relação entre fungos da ordem Chaetothyriales e hidrocarbonetos seja o elo entre este grupo de fungos e seu substrato de isolamento, como anteriormente observado por outros autores (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001; DE HOOG et al., 2006; ZHAO et al., 2010).

A utilização de hidrocarbonetos cuticulares de insetos como única fonte de carbono e energia para o crescimento de fungos foi relatada pela primeira vez por Napolitano; Juaréz (1997) para fungos entomopatogênicos de *Triatoma infestans*. Assim, a composição rica de hidrocarbonetos presente no exoesqueleto das formigas é provavelmente a fonte de carbono para *C. mycetomatis*: as formigas os utilizam para se comunicar, como feromônios, enquanto os fungos como fonte de carbono e energia. Attili-Angelis et al. (2014) descreveram duas novas espécies de leveduras negras do gênero *Phialophora* associadas a formigas-cortadeiras do gênero *Atta*, e discutem sobre a função dos hidrocarbonetos cuticulares na manutenção destes fungos no exoesqueleto, reafirmando a hipótese de que estas moléculas possivelmente são a chave da sobrevivência dos fungos nesse ambiente.

A função ecológica de *C. mycetomatis* nas formigas é um aspecto intrigante, pois não se sabe como o fungo chegou até esse substrato, nem quais benefícios ou malefícios estão relacionados à sua presença no mesmo. Apesar de incomum, este não é o primeiro registro de uma espécie de interesse clínico associada às formigas-cortadeiras. Em 2008, Li et al., descreveram uma nova espécie de *Coniosporium* isolada do membro inferior de um hospedeiro do gênero feminino procedente da China. Dentre as linhagens estudadas uma delas havia sido isolada do lixo de um formigueiro de *Atta sexdens*. O lixo de um formigueiro é composto de formigas mortas, micélio exaurido do fungo simbiote (utilizado como alimento pelas formigas) e material vegetal em decomposição (FORTI et al., 2011).

C. chaetospira e *C. minourae* correspondem a fungos originalmente isolados como sapróbios, ocorrendo em detritos de plantas (BADALI et al., 2008). Uma linhagem de cada uma das espécies foi identificada no presente trabalho. *C. chaetospira* teve como substrato de

isolamento o exoesqueleto de bitú de *A. capiguara*, enquanto *C. minourae* foi isolada de solo de *landfarming*. Ambos se tratam de ambientes relacionados à presença de hidrocarbonetos, o que novamente vem de encontro aos relatos de preferência por essas moléculas para serem utilizadas como fonte de carbono e energia. Assim como para *C. mycetomatis*, este é o primeiro relato de *C. chaetospira* em formigas-cortadeiras. Do solo de *landfarming* um isolado de *Cladophialophora* foi identificado, mas sem que fosse possível definir a espécie, além de quatro linhagens de *C. immunda*. Neste caso, a etimologia do nome faz alusão à preferência desse micro-organismo por ambientes contaminados com hidrocarbonetos, como é em seu substrato de isolamento.

As linhagens agrupadas no gênero *Exophiala* totalizaram 55 representantes assim distribuídos: *E. dermatitidis* (44), *E. spinifera* (5), *E. attenuata* (2), *E. bergeri* (1), *E. heteromorfa* (1), *E. alcalophila* (1) e *E. xenobiotica* (1). Todas as linhagens de *E. dermatitidis* foram isoladas de solo de oficina mecânica, indicando baixa diversidade de espécies do gênero para este ambiente. Segundo a própria etimologia, a espécie associa-se a casos de infecções em humanos. No entanto, Sudhadham et al. (2008) revelam em seu estudo a origem ambiental da espécie, isolando-a de ambientes tropicais incluindo principalmente fezes de pássaros e morcegos frugívoros e frutas, hipotetizando que devido às suas características extremófilas, células vivas passaram pelo trato intestinal de frugívoros em um ciclo natural, e que a conquista do ambiente humano foi dada pela ingestão de frutas silvestres que carregavam os propágulos da espécie.

E. alcalophila, *E. heteromorpha*, *E. attenuata*, e quatro das linhagens de *E. spinifera* foram obtidas das águas de influência da refinaria de petróleo, caracterizando uma maior diversidade de espécies neste habitat, e uma linhagem de *E. spinifera* foi isolada do corpo de bitú de *A. capiguara*, mediante a técnica de flotação em óleo mineral, seletiva para fungos melanizados. A espécie *E. bergeri* é relatada pela primeira vez em associação a esse substrato neste estudo, e foi isolada do corpo de içá de *A. laevigata* pela técnica de caminhada em placa, método não seletivo. A linhagem de *E. xenobiotica* foi recuperada de solo de *lanfarming*.

O gênero *Exophiala* divide-se em diversas clades principais (LI et al., 2009): *E. heteromorfa* agrupa-se dentro da clade *E. dermatitidis*, enquanto *E. xenobiotica* e *E. bergeri* enquadram-se na clade *E. spinifera*. Essas duas clades contêm as principais linhagens reconhecidas como patógenas, excetuando-se *E. xenobiotica*, originalmente isolada de ambiente contaminado com hidrocarbonetos aromáticos (DE HOOG et al., 2006). *E. attenuata* fica na

clade *E. mesophila* e *E. alcalophila* agrupa-se em sua própria clade (*E. alcalophila*). Para nenhuma delas há relatos de ligação com ambientes contaminados.

Uma linhagem foi identificada como *Rhinochrysiella atrovirens*. Esta espécie está intimamente relacionada à *R. similis*, e o gênero é sinanamorfo de *Exophiala*, ou seja, as duas espécies anamórficas podem ocorrer em um mesmo teleomorfo. Há relatos de patogenicidade para *R. atrovirens* (PALACIO-HERNANZ et al., 1989), no entanto em pesquisa ao catálogo de linhagens online do CBS Fungal Biodiversity Centre (Holanda) podem ser encontrados exemplares isolados do ambiente como madeira de serralheria e *Pinus* spp.

Quatorze isolados tiveram sua identificação restrita ao nível de ordem, devido à falta de caracteres morfológicos e das sequências de DNA para definição ao nível de gênero. Destas, oito tiveram como substrato o solo de oficina mecânica, três foram isoladas de casca de *E. tereticornis*, duas de solo de *landfarming* e uma de iça de *A. capiguara*.

Estudos como o de Ruibal; Plata; Bills (2005) isolando representantes melanizados, incluindo a ordem Chaetothyriales, de superfícies rochosas revelam a grande extremotolerância desses micro-organismos, já que segundo os autores, esse ambiente está associado a elevadas taxas de exposição à radiação solar e temperatura, baixa disponibilidade de nutrientes, alta concentração de eletrólitos (estresse osmótico) e umidade relativa extremamente baixa, disponível apenas esporadicamente.

Além das inhóspitas superfícies rochosas, outros ambientes associados ao isolamento desse grupo de fungos são aqueles onde predomina a presença de hidrocarbonetos como locais contaminados com petróleo e derivados e madeira tratada com creosoto (VICENTE et al., 2008; SATOW et al., 2008), ou mesmo solo livre de contaminação e matéria vegetal em decomposição (VICENTE et al., 2001) onde habita grande diversidade de fungos e outros micro-organismos. Assim, o fato de serem comumente tratados como patógenos oportunistas de humanos e outros animais não é unânime, consolidando-se a cada dia que a ecologia desses organismos possui vertentes diversas que podem apresentar grande interesse para a ciência.

De fato, muitas lacunas ainda existem para que se possa compreender a ecologia dos Chaetothyriales, mas o isolamento cada vez mais frequente de linhagens ambientais destes fungos corrobora com a hipótese de dualidades ecológicas. Esta discute que linhagens isoladas do ambiente, mas identificadas como patógenas e/ou oportunistas, devido a uma elevada similaridade genética, apresentam uma função ecológica não relacionada à virulência, ou seja, o

nicho ecológico não é o mesmo, sendo que linhagens relacionadas ao ambiente não atuam em infecções (BADALI et al., 2011).

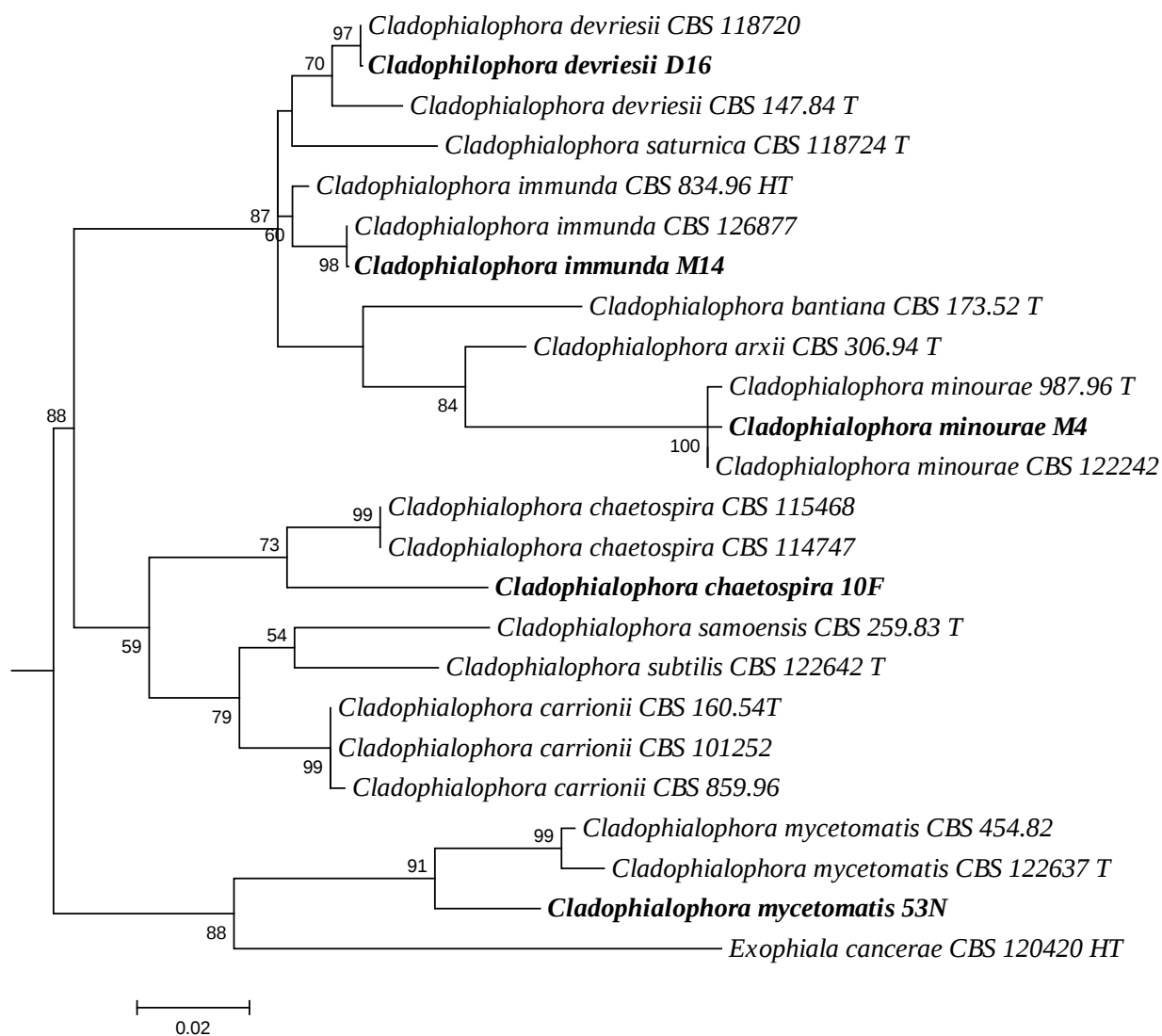


Figura 4. Análise filogenética da região ITS das linhagens pertencentes ao gênero *Cladophilophora*. Espécies identificadas nesse trabalho estão destacadas em negrito. As distâncias evolutivas baseiam-se no modelo de Kimura 2p e a reconstrução da árvore no método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%). T = Espécie Tipo; HT = Espécie Holotipo.

Capnodiales

A ordem Capnodiales da subfamília Dothideomycetidae compreende em sua maioria espécies epífitas de plantas, endofíticos e sapróbios, das quais alguns representantes podem formar associação em líquens ou ocorrer como parasitas de fungos ou animais (CROUS et al., 2009). Neste trabalho, 52 dos 200 isolados selecionados foram classificadas dentro da ordem Capnodiales. Destes, 45 foram identificados como *Cladosporium*, incluindo as espécies *C. cladosporioides* (11), *C. bruhnei* (7), *C. perangustum* (5), *C. tenuissimum* (3), *C. gossypiiicola* (2) e *C. uredinicola* (1). Dezesete isolados foram identificados genericamente como *Cladosporium* sp.. Dos cinco isolados restantes, três foram identificadas como *Penidiella* sp. e duas foram identificadas como pertencentes à ordem Capnodiales.

O gênero *Cladosporium* compreende hifomicetos que apresentam morfologia típica e facilmente reconhecível mediante análise macro e microscópica. No entanto, no que diz respeito à diferenciação interespecífica os caracteres morfológicos se mostram insuficientes dada a grande similaridade morfológica entre espécies distintas, e por isso, o uso de ferramentas moleculares para auxiliar sua identificação é de extrema importância.

É interessante destacar que mesmo utilizando o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal a identificação específica não foi considerada altamente consistente, pois quando as sequências obtidas foram analisadas e comparadas com sequências dos bancos de dados do Genbank e do CBS, porcentagens de similaridade elevadas (de 99% a 100%) foram obtidas com mais de uma espécie do gênero. Além disso, a análise filogenética utilizando apenas sequências da região ITS (Figura 1) confirma a dificuldade mencionada. Sabe-se que o gênero tem passado por importante revisão taxonômica, resultando na publicação de diversas novas espécies (BENSCH et al., 2012).

Dentre os 45 isolados identificados como *Cladosporium*, 35 apresentaram-se em associação com o exoesqueleto de formigas-cortadeiras. Estudos recentes relatam a presença do gênero associada às formigas Attini (RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). Pagnocca et al. (2008) relataram que o isolamento de *Cladosporium* foi predominante em iças de formigas do gênero *Atta*, e apontou que esses insetos podem atuar como veículos de dispersão para estes fungos, já que não existem relatos de qualquer interação com o fungo simbiote cultivado pelas formigas. Dos 10 isolados restantes, 7 linhagens foram

obtidas a partir das águas de influência de uma refinaria de petróleo (3 *Cladosporium* sp.; 2 *C. cladosporioides*; 1 *C. bruhnei* e 1 *C. gossypicola*), dois isolados de *Cladosporium* sp. de solo de *landfarming* e uma linhagem de *C. cladosporioides* da casca de *E. tereticornis*. Espécies de *Cladosporium* são cosmopolitas e encontram-se em substratos diversos como todos os tipos de plantas, detritos, solo, alimentos, tintas, produtos têxteis a qualquer outro tipo de matéria orgânica (BENSCH et al., 2012). Os conídios de *Cladosporium* representam o componente fúngico mais comumente isolado do ar (MULLINS, 2001).

O segundo gênero identificado como representante de Capnodiales foi *Penidiella*. As três linhagens identificadas foram isoladas da cutícula de formigas, sendo duas obtidas de bitú e uma de içá de *A. laevigata*. O gênero foi descrito por Crous et al. (2007), sendo representado pela linhagem *P. columbiana*. Espécies de *Penidiella* estão relacionadas a substratos vegetais como bananeiras, eucaliptos e pinheiros atuando geralmente como fitopatógenos (CROUS et al., 2009).

A associação de fungos e formigas pode ser resultado do hábito de forragear matéria vegetal fresca para o interior do ninho. As linhagens isoladas foram tratadas como *Penidiella* sp., pois provavelmente constituem novas espécies do gênero, as quais serão discutidas adiante. Comparando-se, as sequências de DNA obtidas com as bases de dados, similaridade abaixo de 97% foi obtida para a linhagem mais próxima, *P. rigidophora* (CBS 314.95).

Pleosporales

Anamorfos de Pleosporales são em sua maioria celomicetos, mas podem também ser hifomicetos. *Phoma* e seus relativos são os anamorfos mais comuns (ZHANG et al., 2012). A complexidade envolvida na identificação de celomicetos resultou em um entendimento restrito dos limites genéricos e específicos do grupo (DE GRUYTER et al., 2009).

Boerema (1997) propôs uma classificação para o gênero *Phoma* baseada em caracteres morfológicos dividindo-o em 9 seções: *Phoma*, *Heterospora*, *Macrospora*, *Paraphoma*, *Peyronellaea*, *Phyllostictoides*, *Pilosa*, *Plenodomus* e *Sclerophomella*. A descrição completa das seções foi reunida no “*Phoma Identification Manual*” (BOEREMA et al., 2004), o qual contém 223 descrições de táxons específicos e infra-específicos do gênero, além de mais de 1000 sinônimos em outros gêneros de celomicetos (DE GRUYTER et al., 2013). Atualmente, a análise filogenética de *Phoma* e seus relativos revela a existência de várias famílias, indicando a polifilia

de vários gêneros e tornando cada vez mais consistente a identificação de representantes do grupo (ZHANG et al., 2012).

Os representantes de Pleosporales identificados neste trabalho relacionam-se quase unicamente a um substrato, as águas de influência da refinaria de petróleo. Dos 49 isolados identificados, 41 advém desse substrato, sendo os demais oriundos de formigas-cortadeiras. Um maior número de gêneros também foi encontrado nesta ordem: *Westerdykella*, *Cochliobolus*, *Microsphaeropsis*, *Curvularia*, *Paraconiothirium*, *Peyronellaea*, *Pithomyces*-like e *Phoma*-like, mesmo com a identificação de 27 dos 49 isolados apenas como pertencentes à ordem Pleosporales devido à falta de caracteres morfológicos (colônias estéreis) e à dificuldade na obtenção de sequências de DNA com boa resolução.

Quatro linhagens foram identificadas no gênero *Westerdykella*, duas linhagens de *W. capitulum* e duas de *W. dispersa*. Este gênero faz parte da família Sporormiaceae, cujos membros são cosmopolitas e ocorrem especialmente em esterco, mas podem também ser encontrados como endofíticos ou sapróbios no solo. Espécies de *Westerdykella* geralmente encontram-se associadas a substratos como solo, lodo, esterco e material vegetal (EBEAD et al., 2012).

Três linhagens de *Cochliobolus* representaram duas espécies, *C. kusanoi* (1) e *C. geniculatus* (2). A primeira foi isolada das amostras de águas, enquanto as linhagens de *C. geniculatus* foram encontradas no corpo de bitú de *A. capiguara* e de içá de *A. laevigata*. Duas linhagens de *Curvularia* também foram identificadas para os isolados das amostras de águas, *C. trifolii* (1) e *C. lunata* (1). A presença de *Cochliobolus* e seus anamorfos *Curvularia* e *Bipolaris*, já foi previamente relatada em formigas do gênero *Atta* (GUEDES; ATTILI-ANGELIS; PAGNOCCA, 2012). *Cochliobolus*, *Curvularia* e *Bipolaris* são membros da família Pleosporaceae e formam um complexo que contém conhecidos patógenos de plantas, especialmente da família Poaceae (gramíneas). Sua taxonomia é confusa e vem sendo refinada. Não há limite morfológico claro entre as fases assexuadas *Bipolaris* e *Curvularia*, sendo que algumas espécies apresentam morfologia intermediária (MANAMGODA et al., 2012). Também na família Pleosporaceae encontra-se o gênero *Pithomyces*. Uma linhagem, isolada do corpo de bitú de *A. capiguara*, foi morfológicamente identificada como *Pithomyces*-like. Trata-se de um gênero cosmopolita e comumente encontrado no solo e em detritos vegetais (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980).

Cinco linhagens da família Montagnulaceae foram identificadas como *Microsphaeropsis arundinis*. A espécie é relatada como endofítica e cosmopolita (ALVES et al., 2010), integrante da diversidade fúngica de diversas plantas, como os manguezais do nordeste brasileiro (COSTA; MAIA; CAVALCANTI, 2012). Recentemente, Luo et al. (2013) observaram a produção de sesquiterpenos específicos, denominados “arundinóis” por *M. arundinis*. Outra linhagem da mesma família, *Paraconiothyrium maculiculis* foi isolada de um caso de infecção em um paciente imunodeprimido após transplante renal (GORDON et al., 2012), como a etimologia sugere. Neste estudo está sendo relatada pela primeira vez em isolamento ambiental.

Peyronellaea glomerata, representando a família Didymellaceae, isolada das amostras de águas também encontra-se associada a plantas como a maioria dos Pleosporales, tendo sido isolada desde há muito tempo de folhas senescentes de árvores decíduas (LUEDEMANN, 1959) até os tempos atuais (DENG et al., 2011). Três isolados de mesmo substrato de isolamento de *P. glomerata* foram morfológicamente classificados como *Phoma*-like devido à presença de pigmentação nos conídios, característica inexistente em representantes do gênero *Phoma*. A carência de dados moleculares devido a não obtenção de sequências de DNA com boa resolução impossibilitou a definição específica desses isolados.

A ordem Pleosporales compreende um quarto de todos os representantes da classe Dothideomycetes, sendo a maior de suas ordens (KIRK et al., 2008). Espécies de Pleosporales podem ocorrer em vários habitats como epífitas, endofíticas, parasitas de folhas e caules, hiperparasitas de fungos ou insetos, em associação com líquens, ou sapróbios (ZHANG et al., 2012). Relatos de linhagens oportunistas são raros, favorecendo exploração de seu potencial para diversos fins biotecnológicos, como por exemplo, para a degradação de xenobióticos, tema ainda pouco investigado nesse grupo. A maioria das linhagens aqui identificadas foi isolada das águas de influência de uma refinaria de petróleo, o que as associa com um ambiente onde hidrocarbonetos estão presentes. A diversidade metabólica dos fungos é muito ampla e a presença de compostos alternativos, como hidrocarbonetos, para serem utilizados como fonte de carbono e energia pode ser o “gatilho” para a ativação de vias de degradação ou de cometabolismo.

Microascales, Xylariales e Venturiales

Para cada uma destas ordens um representante foi identificado. *Pseudallescheria boydii* (Microascales) e *Pestalotiopsis mangiferae* (Xylariales) foram isolados de águas de influência de

uma refinaria de petróleo, enquanto *Verruconis verruculosum* (Venturiales) foi obtido do corpo de bitú de *A. laevigata*.

Microascales é uma pequena ordem de fungos cuja maioria dos representantes é sapróbia e habita o solo, vegetação ou esterco (BENNY; KIMBROUGH, 1980). *P. boydii* é um sapróbio frequentemente isolado de solo de agricultura e de água contaminada, no entanto, passou a ser isolada em casos clínicos de infecções invasivas especialmente em pacientes imunodeprimidos (BIBASHI et al., 2009).

A ordem Xylariales é monofilética, e contém mais de 92 gêneros e 72 espécies (SMITH; LIEW; HIDE, 2003). O gênero *Pestalotiopsis* distribui-se amplamente nos ecossistemas tropicais e temperados e é um importante patógeno de plantas com mais de 235 espécies descritas e nomeadas de acordo com os hospedeiros que se encontram associadas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2012). *P. mangiferae* foi descrita como sugere a etimologia por ser patógena de *Mangifera indica*, mangueiras (MORDUE, 1980).

A ordem Venturiales, bem como a família Sympoventuriaceae, foi recentemente introduzida por Zhang et al. (2011) a fim de acomodar membros da família Venturiaceae tradicionalmente agrupada em Pleosporales. *Verruconis* e *Ochroconis* são gêneros relacionados e pertencentes à família Sympoventuriaceae. *Verruconis* engloba espécies termofílicas, enquanto *Ochroconis* abriga apenas espécies mesofílicas, sendo que ambos os gêneros abrigam linhagens clínicas e ambientais (SAMERPITAK et al., 2013), corroborando com a dualidade ecológica já mencionada para os fungos melanizados.

Fichas catalográficas

As espécies identificadas foram organizadas em fichas catalográficas. A organização de qualquer acervo de micro-organismos é de suma importância para sua manutenção, o que justifica os esforços realizados para este trabalho. Algumas fichas catalográficas selecionadas podem ser visualizadas no “Apêndice” desse trabalho.

Possíveis novas espécies

Hawksworth (1991) estimou em 1.5 milhões o número de espécies de fungos presentes na Terra, sendo que existem cerca de 70.000 espécies de fungos catalogadas, ou seja, um grande esforço já foi realizado, mas ainda há muito por fazer. O número de novas espécies de fungos descritas na ciência é crescente, e o tema nunca foi tão debatido como atualmente. A evolução das técnicas moleculares e de análise filogenética levou à reconsideração de muitos nomes atribuídos erroneamente, bem como tornam consistentes as descrições de novas espécies encontradas na atualidade.

Dentre as linhagens identificadas nesse trabalho, pelo menos 4 possíveis novas espécies podem ser inferidas, sendo três delas pertencentes à ordem Pleosporales, e uma à ordem Capnodiales, gênero *Penidiella*. Tanto a região D1 / D2 quanto a ITS foram sequenciadas para todas as possíveis novas espécies, no entanto, as análises filogenéticas da região ITS foram pouco elucidativas, exceto para as linhagens de *Penidiella*, pois especialmente para membros da ordem Pleosporales, há uma grande carência de sequências nas bases de dados, e por isso, estas análises foram excluídas.

As três possíveis novas espécies da ordem Pleosporales foram isoladas previamente a partir de amostras de águas. São celomicetos não enquadrados dentro do gênero *Phoma* devido à pigmentação apresentada em seus conídios. A fase teleomórfica é desconhecida. Na Tabela 1 encontram-se os dados de porcentagem de similaridade das sequências das possíveis novas espécies com as cinco sequências obtidas como mais próximas nos bancos de dados do Genbank e do CBS. A análise filogenética realizada para as estirpes (Figura 5) mostra as famílias a que pertencem as possíveis novas espécies, codificadas como: 64A, 398A e NR7.

Observando-se a filogenia e a tabela pode-se notar que há divergências. Quando comparadas com as bases de dados, muitas sequências inespecíficas são dadas como parentes próximos, sequências depositadas com identificação ao nível de ordem ou somente gênero, muitas vezes mal identificadas e que acabam por poluir as bases de dados. Quando construídas filogenias apenas com as sequências das bases de dados, resultados muito pouco elucidativos foram obtidos. Assim, para elaborar uma filogenia consistente foi necessário um estudo muito aprofundado da ordem Pleosporales, suas famílias, subfamílias, sendo que publicações de autores renomados na taxonomia da ordem serviram de embasamento para a seleção de sequências

confiáveis que foram coletadas nas bases de dados. O objetivo foi coletar sequências das famílias a que pertenciam as sequências devolvidas como similares pelas bases de dados, bem como famílias relacionadas a estas nas quais pudessem se encaixar as sequências obtidas nesse trabalho.

A linhagem de código 64A demonstra ser basal à família Sporormiaceae. Apesar de as famílias relacionadas nesta filogenia serem evolutivamente próximas, a linhagem não se agrupou em nenhuma delas, com a possibilidade de tratar-se de um novo gênero. Pelos resultados das bases de dados, o Genbank contribuiu com uma melhor elucidação para a identificação da linhagem, pois apresentou dados de similaridade com espécies de *Preussia* e *Sporormiella*, membros de Sporormiaceae, apesar de trazer como membro mais próximo uma espécie de *Pleospora*, que pertence à família Pleosporaceae, a qual não apresenta relação próxima com a linhagem 64A como pode ser observado na filogenia. Os resultados obtidos da base de dados do CBS foram aleatórios e nada elucidativos, indicando como parentes mais próximos membros de táxons Incertae sedis e de outras ordens que não Pleosporales.

A linhagem 398A agrupa-se dentro de Arthopyreniaceae / Roussoellaceae. A nomenclatura da família está em estágio de transição, mas tende a ser definida como Roussoellaceae, e assim, pode-se tratar a linhagem 398A como pertencente ao gênero *Roussoella*, composto por espécies essencialmente terrestres e sapróbias (ZHANG ET AL., 2011). Nesse caso, para as análises dos bancos de dados, ambos apresentaram dados de similaridade com espécies da família Arthopyreniaceae / Roussoellaceae, no entanto, novamente os dados de maior similaridade foram com membros de outras famílias e ordens.

A linhagem NR7 agrupa-se dentro da família Didymellaceae, uma das principais famílias dentro de Pleosporales, cuja complexidade chega a ponto de dividi-la em 18 grupos distintos compreendendo cerca de 70% das espécies reconhecidas dentro das nove seções de Boerema et al. (2004) (AVESKAMP et al., 2010). A família Didymellaceae envolve um grande número de gêneros, e a análise filogenética demonstra elevada proximidade da linhagem com espécies de *Phoma*. Os resultados recuperados pela análise nos bancos de dados indicam para uma possível nova espécie do gênero *Phoma*, no entanto, a presença de conídios pigmentados indica que a mesma não pertence a este gênero. Análises filogenéticas e morfológicas mais aprofundadas podem garantir a identificação genérica da linhagem, mas aqui fica demonstrado que se trata de uma nova espécie para a ciência.

Tabela 1. Resultados da análise de comparação das sequências das possíveis novas espécies nas bases de dados do Genbank e do CBS. % Cob. = % Cobertura; % Sim. = % Similaridade.

64A						
		Identificação	Score	% Cob.	% Sim.	Erro
GENBANK (nº Acesso)	AY787931	<i>Pleospora igbalii</i>	830	100%	96%	0
	GQ203742	<i>Preussia longisporopsis</i>	808	100%	95%	0
	GQ203747	<i>Sporormiella pulchella</i>	804	99%	95%	0
	JQ044450	<i>Camarographium carpinii</i>	797	100%	95%	0
	GQ203736	<i>Preussia dubia</i>	785	100%	94%	0
CBS (nº CBS)	362.69	<i>Pleospora iqbalii</i>	730	98%	96%	0
	128781	<i>Camarographium carpinii</i>	715	98%	95%	0
	190.30	<i>Grubyella aurea</i>	708	98%	94%	0
	217.38	<i>Humicola brunnea</i>	705	98%	94%	0
	501.74	<i>Monodictys glauca</i>	699	98%	94%	0
398A						
		Identificação	Score	% Cob.	% Sim.	Erro
GENBANK (nº Acesso)	FJ890418	<i>Pleospora</i> sp.	970	99%	99%	0
	JN903564	<i>Pleospora</i> sp.	907	91%	99%	0
	AY849956	<i>Pleospora leptosphaerulinoidea</i>	904	99%	97%	0
	AY538339	<i>Arthopyrenia salicis</i>	904	99%	97%	0
	AB524624	<i>Roussoella</i> sp.	893	95%	98%	0
CBS (nº CBS)	277.74	<i>Microascus senegalensis</i>	794	96%	98%	0
	465.69	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	794	96%	98%	0
	175.79	<i>Aaosphaeria arxii</i>	794	96%	98%	0
	546.94	<i>Roussoella hysteroidea</i>	790	96%	98%	0
	368.94	<i>Arthopyrenia salicis</i>	787	96%	98%	0
NR7						
		Identificação	Score	% Cob.	% Sim.	Erro
GENBANK (nº Acesso)	KF251741	<i>Septoria steviae</i>	963	98%	100%	0
	GU048609	<i>Phoma medicaginis</i>	963	98%	100%	0
	GU238107	<i>Phoma minor</i>	963	98%	100%	0
	GU238106	<i>Phoma minor</i>	963	98%	100%	0
	GU238059	<i>Phoma costarricensis</i>	963	98%	100%	0
CBS (nº CBS)	537.66	<i>Phoma tropica</i>	827	98%	100%	0
	435.75	<i>Phoma tropica</i>	827	98%	100%	0
	273.60	<i>Sphaeronaema indicum</i>	827	98%	100%	0
	367.65	<i>Sphaeronaema coloratum</i>	827	98%	100%	0
	436.75	<i>Phoma tropica</i>	827	98%	100%	0

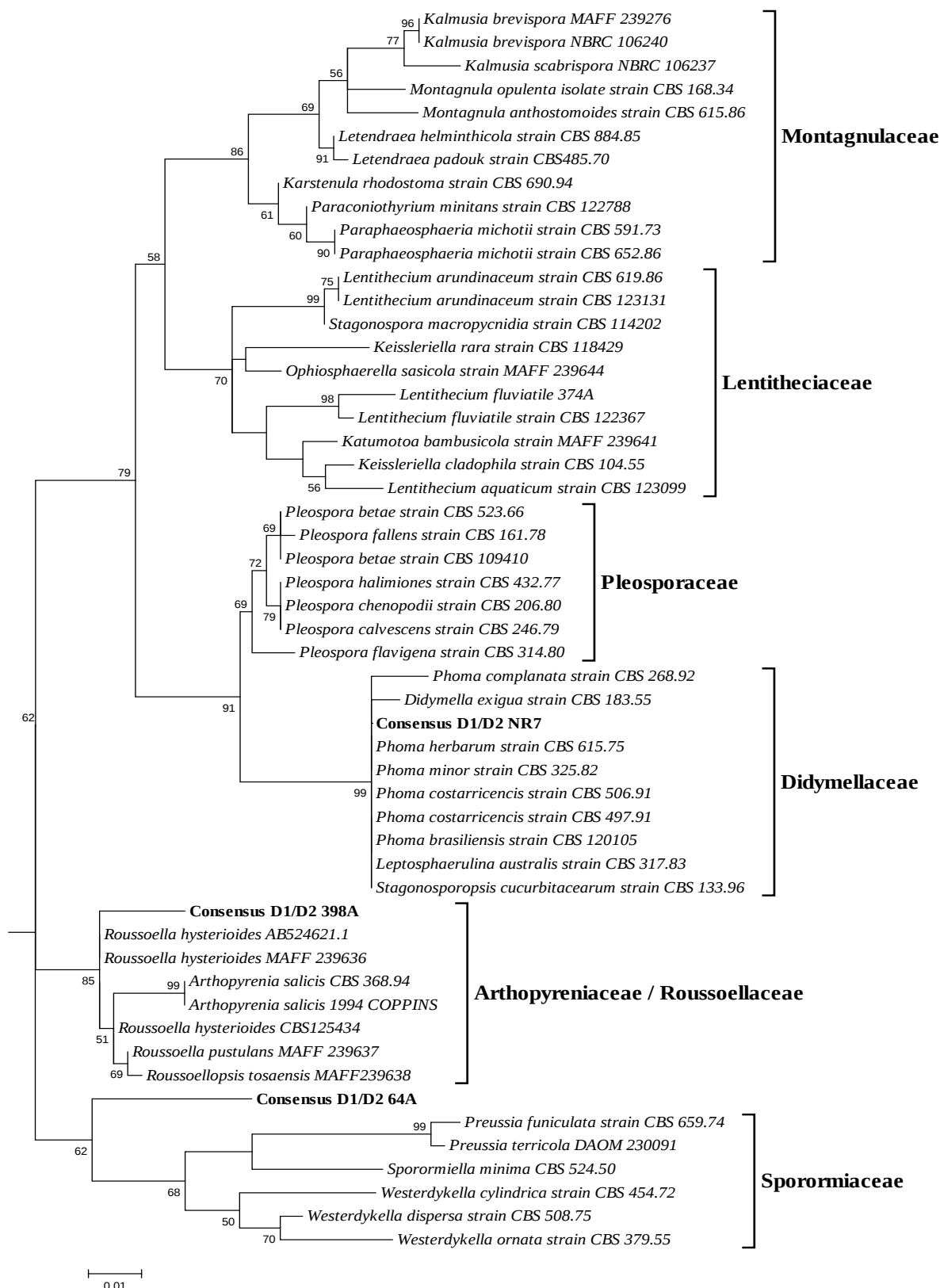


Figura 5. Análise filogenética da região D1/D2 do DNA ribossomal 28S das possíveis novas espécies de fungos da ordem Pleosporales (marcadas em negrito). A árvore elucida o agrupamento das novas espécies dentro de suas respectivas famílias. As distâncias evolutivas baseiam-se no modelo de Kimura 2p e a reconstrução da árvore no método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%). NR7 – espécie não descrita neste trabalho; 398A – *Roussoella cotoniis*; 64A – *Pseudosporormiella brasiliensis*.

64A – *Pseudosporormiella brasiliensis*

Etimologia: o nome “*Pseudosporormiella*” refere-se à relação basal do fungo com a família Sporormiaceae; “*brasiliensis*” refere-se à localização geográfica do isolamento do fungo, Brasil.

Descrição: Baseada em 64A (CBMAI XXXX; CBS XXXX) crescida a 25°C por 14 dias.

Morfologia em placa: Colônias crescidas em MEA a 25°C por 14 dias com 25 a 45 mm de diâmetro, superfície convexa pregueada, velutinosas; micélio de coloração rósea/salmão claro, quase branco; reverso alaranjado. Colônias crescidas em PDA a 25°C por 14 dias com 30 a 32 mm de diâmetro, superfície convexa pregueada, velutinosas; micélio de coloração rósea nas bordas e róseo a cinza no centro; porção central mais elevada com gotas de exsudato de coloração amarelada a negras; reverso alaranjado-marrom no centro e róseo nas bordas. Colônias crescidas em OA a 25°C por 14 dias com 40 a 42 mm de diâmetro; superfície lisa com aspecto áspero pela presença de picnídios em grande quantidade; micélio submerso no ágar e de coloração alaranjada nas bordas; picnídios negros.

Atividade de lacase: Negativo no teste em meio PDA com ABTS 0,03%.

Características microscópicas: Picnídios solitários ou confluentes, produzidos na superfície do ágar, globosos, não glabrosos, 90 – 180 µm de diâmetro. Ostíolos únicos, não papilados. Conídios cilíndricos, de parede celular fina, lisa, marrom claro, asseptados, 4 – 5,5 x 1,5 – 2,5 µm. Clamidoporos presentes, unicelulares, globosos a alongados, em longas cadeias, 5,5 – 7,5 x 6,5 – 9,5 µm.

Espécimen examinado: Espécie tipo CBS XXXX/ CBMAI XXXX isolada de água do Rio Jaguari, município de Paulínia – São Paulo, Brasil GPS: 22° 42’ W e 47° 08’ S em Novembro de 2011 por D. Attili-Angelis, F.C. Pagnocca e N.C. Baron.

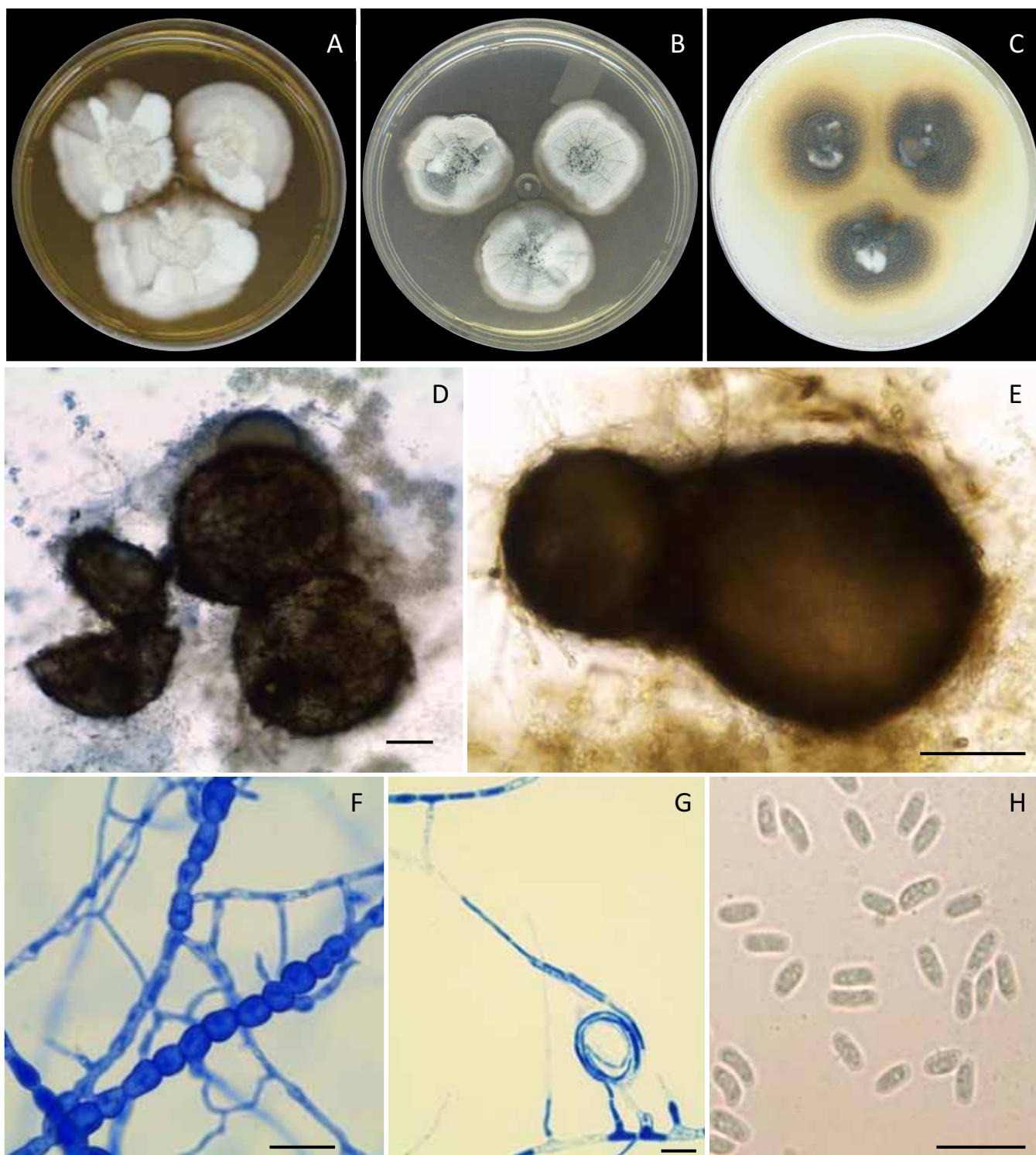


Fig 6. *Gen nov. sp. nov.* A-C. Colônias com 14 dias em MEA (A), PDA (B) e AO (C). D-E. Picnídios. F. Cadeia de clamidosporos. G. Hifas em espiral. H. Conídios. Barras de escala: D-E = 50μm; F-H = 10μm

398A – *Roussoella cotoniis*

Etimologia: o nome “cotoniis” refere-se à morfologia cotonosa do micélio.

Descrição: Baseada em 398A (CBMAI XXXX; CBS XXXX) crescida a 25°C por 14 dias.

Morfologia em placa: Colônias crescidas em MEA a 25°C por 14 dias com 60 mm de diâmetro, margem irregular, bastante cotonosa, com hifas aéreas que chegaram à tampa da placa; micélio de coloração branca; reverso branco, picnídios negros. Colônias crescidas em PDA a 25°C por 14 dias com 55 a 60 mm de diâmetro, superfície cotonosa com hifas aéreas que chegaram à tampa da placa; micélio de coloração branca apresentando início da formação de picnídios na região central. Forma-se uma espécie de halo de micélio cotonoso envolvendo a porção central da colônia separando-a em duas regiões com muitas estruturas reprodutivas; reverso branco e com pontuações negras correspondentes às estruturas reprodutivas. Colônias crescidas em OA a 25°C por 14 dias com 60 mm de diâmetro; superfície cotonosa, com hifas aéreas que alcançaram a tampa da placa; micélio branco com picnídios negros em grande quantidade na porção central das colônias; reverso branco com pontos negros das estruturas reprodutivas.

Atividade de lacase: Positiva em meio PDA com ABTS 0,03%. Halo de mesmo diâmetro da colônia, 6,5 – 7,0 mm, com pigmentação avermelhada escura no centro da colônia e verde clara nas bordas.

Características microscópicas: Hifas pigmentadas, de coloração marrom clara. Pincnídios solitários ou confluentes, produzidos na superfície do ágar ou imersos, globosos, não glabrosos, 135 – 400 µm. Ostíolos únicos. Conídios ovóides, unicelulares, de parede celular mais espessa, lisa, pigmentados (marrom claro – médio), asseptados, 7,5 – 8,5 x 5,0 – 6,0 µm. Clamidosporos ausentes.

Espécimen examinado: Espécie tipo CBS XXXX/ CBMAI XXXX isolada de água do Rio Jaguari, município de Paulínia – São Paulo, Brasil, GPS: 22° 42, 0’W e 47° 08’ 06,6” S em Novembro de 2011 por A.S. Cruz, D. Attili-Angelis, F.C. Pagnocca e N.C. Baron.

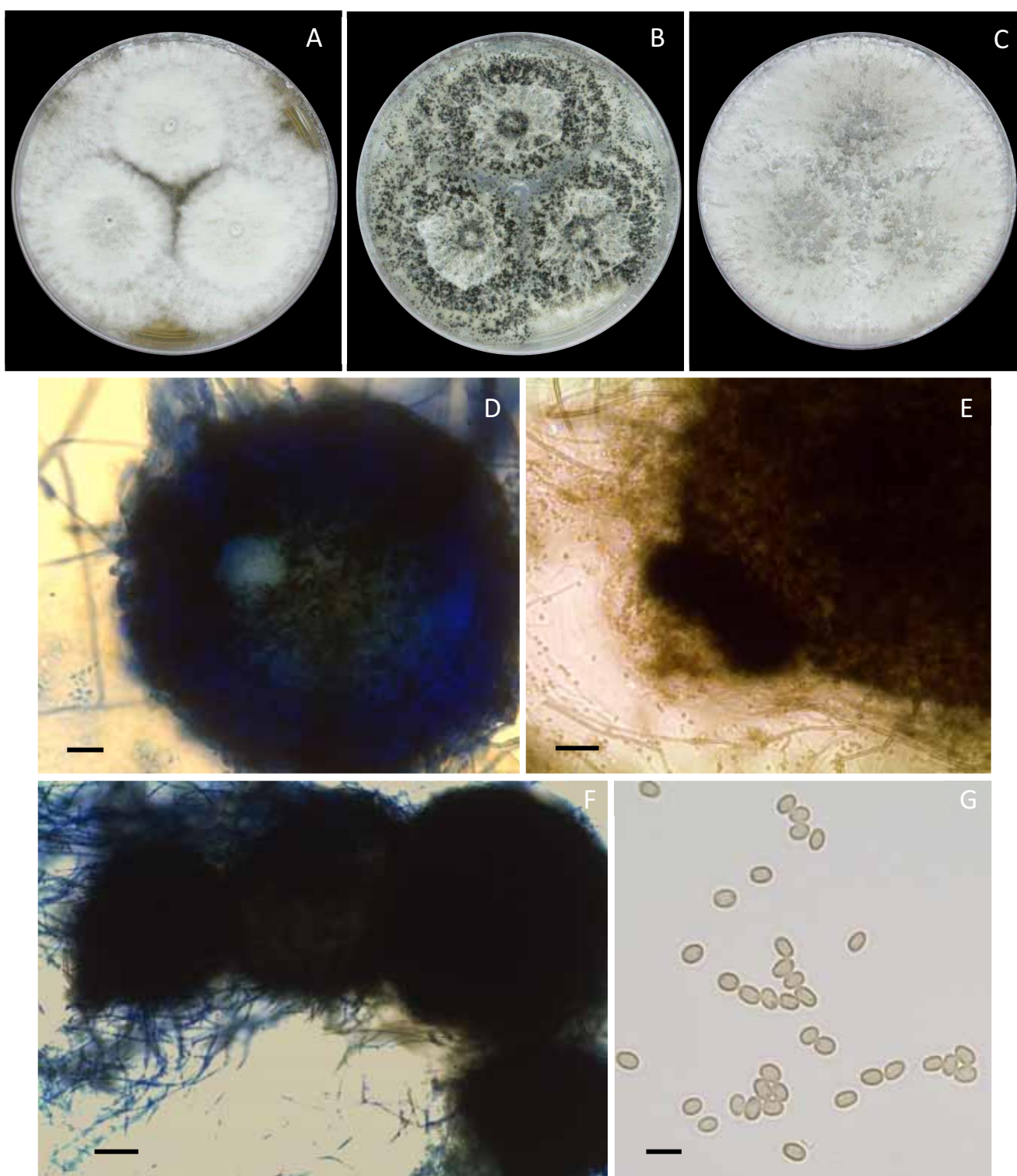


Fig 7. *Roussoella* sp. **A-C.** Colônias com 14 dias em MEA (A), PDA (B) e AO (C). **D.** Picnídio solitário. **E.** Detalhe do ostíolo. **F.** Picnídios confluentes. **G.** Conídios. Barras de escala: **D-E** = 20μm; **F** = 50μm e **H** = 10μm

As três linhagens identificadas como pertencentes ao gênero *Penidiella* foram previamente isoladas do copo de bitús (2) e içá (1) de *A. laevigata*. Na Tabela 2 encontram-se os dados da análise de similaridade com as cinco sequências definidas como mais próximas obtidas das bases de dados do Genbank e do CBS. Na tabela são apresentados além dos resultados da análise da região D1 / D2 da subunidade 28S do DNA ribossomal, também dados da região ITS. Ressalta-se que os mesmos resultados foram obtidos para as três sequências: 67N, 87N e 89N. As análises filogenéticas ilustradas na Figura 8 (D1 / D2) e na Figura 9 (ITS) mostram o posicionamento das linhagens em relação a membros da família Teratosphaeriaceae, indicando que possivelmente tratam-se de três linhagens da mesma espécie.

Assim como para as novas espécies de Pleosporales, muitas das sequências obtidas como mais próximas eram inespecíficas e não auxiliaram na caracterização das linhagens deste estudo, então, da mesma forma buscou-se por uma literatura apropriada que fornecesse dados de linhagens e sequências confiáveis que pudessem ser utilizadas na construção das filogenias.

Segundo os dados da Tabela 2, pela análise da sequência D1 / D2, seria possível afirmar que se tratam de três linhagens muito próximas à espécie *P. rigidophora*, porém, o mesmo não é válido analisando-se pela região ITS. Quando avaliadas as filogenias, tanto para D1 / D2 quanto para ITS o posicionamento das linhagens é o mesmo, agrupando-se juntas e próximas a *P. rigidophora*. Mediante análises moleculares seria até mesmo possível afirmar que se trata da mesma espécie, no entanto, evidências morfológicas excluem tal possibilidade.

Além disso, como pode ser observado na filogenia da Figura 8, muitas espécies diferentes se agrupam juntas na filogenia com valores de *bootstrap* elevado, acima de 90%. Tais fatos indicam a necessidade de se avaliar sequências de outros fragmentos de DNA (genes) que possam auxiliar na obtenção de uma separação mais precisa, porém, fica claro que se tratam de possíveis novas espécies para a ciência. Uma breve descrição para a possível nova espécie de *Penidiella*, baseada na linhagem referência de código 67N, encontra-se adiante.

Tabela 2. Resultados da análise de comparação das sequências das linhagens de *Penidiella* (67, 87 e 89N) nas bases de dados do Genbank e do CBS. % Cob. = % Cobertura; % Sim. = % Similaridade.

D1 / D2						
		Identificação	Score	% Cob.	% Sim.	Erro
GENBANK (nº Acesso)	EU019276	<i>Penidiella rigidophora</i>	861	98%	98%	0
	EU019254	<i>Teratosphaeria macowanii</i>	828	98%	97%	0
	FJ493199	<i>Teratosphaeria macowanii</i>	828	98%	96%	0
	EU707895	<i>Teratosphaeria macowanii</i>	828	98%	96%	0
	EU707894	<i>Teratosphaeria macowanii</i>	828	98%	96%	0
CBS (nº CBS)	314.95	<i>Penidiella rigidophora</i>	754	98%	98%	0
	101262	<i>Placidiopsis poronioides</i>	739	98%	97%	0
	111029	<i>Catenulostroma macowanii</i>	732	97%	96%	0
	110756	<i>Catenulostroma macowanii</i>	732	97%	96%	0
	112163	<i>Catenulostroma wingfieldii</i>	732	97%	96%	0
ITS						
		Identificação	Score	% Cob.	% Sim.	Erro
GENBANK (nº Acesso)	EU019276	<i>Penidiella rigidophora</i>	708	100%	94%	0
	HQ599594	<i>Phaeotheicoidea melaleuca</i>	532	100%	87%	7e-148
	JF499851	<i>Xenophacidiella pseudocatenata</i>	529	100%	87%	9e-147
	JF499850	<i>Xenophacidiella pseudocatenata</i>	529	100%	87%	9e-147
	JF499833	<i>Catenulostroma hermanusense</i>	529	92%	89%	9e-147
CBS (nº CBS)	314.95	<i>Penidiella rigidophora</i>	553	90%	96%	3e-156
	485.61	<i>Xenomeris raetica</i>	431	87%	87%	2e-119
	109889	<i>Pseudotaeniolina globosa</i>	404	87%	87%	2e-111
	119423	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	393	90%	86%	5e-108
	122893	<i>Teratosphaeria parva</i>	391	87%	85%	1e-107

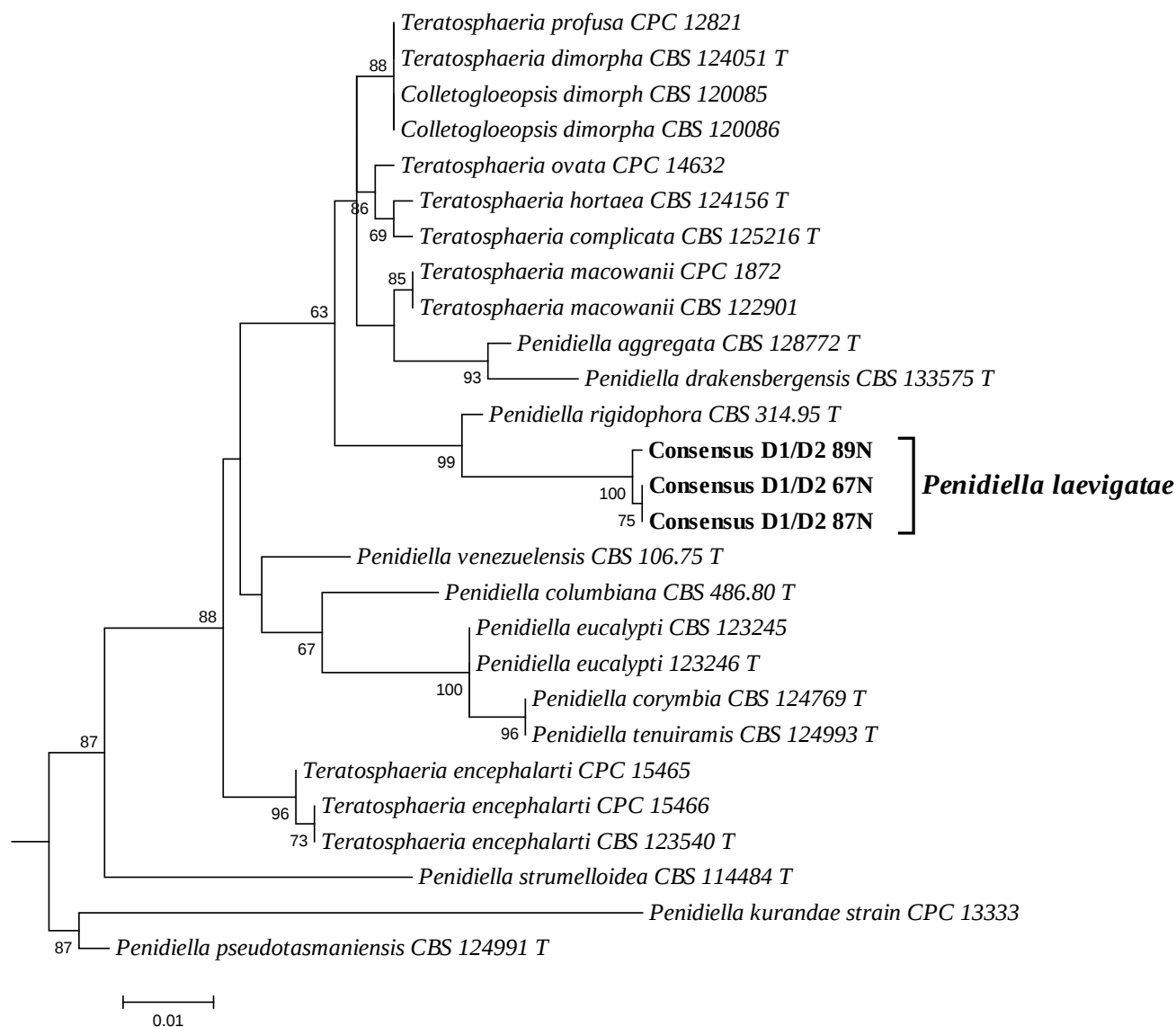


Figura 8. Análise filogenética da região D1/D2 do DNA ribossomal 28S da possível nova espécie de *Penidiella laevigatae*. A árvore elucidou o agrupamento da nova espécie (linhagens marcadas em negrito) dentro da família Teratosphaeriaceae. As distâncias evolutivas baseiam-se no modelo de Kimura 2p e a reconstrução da árvore no método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%). T = Linhagem Tipo.

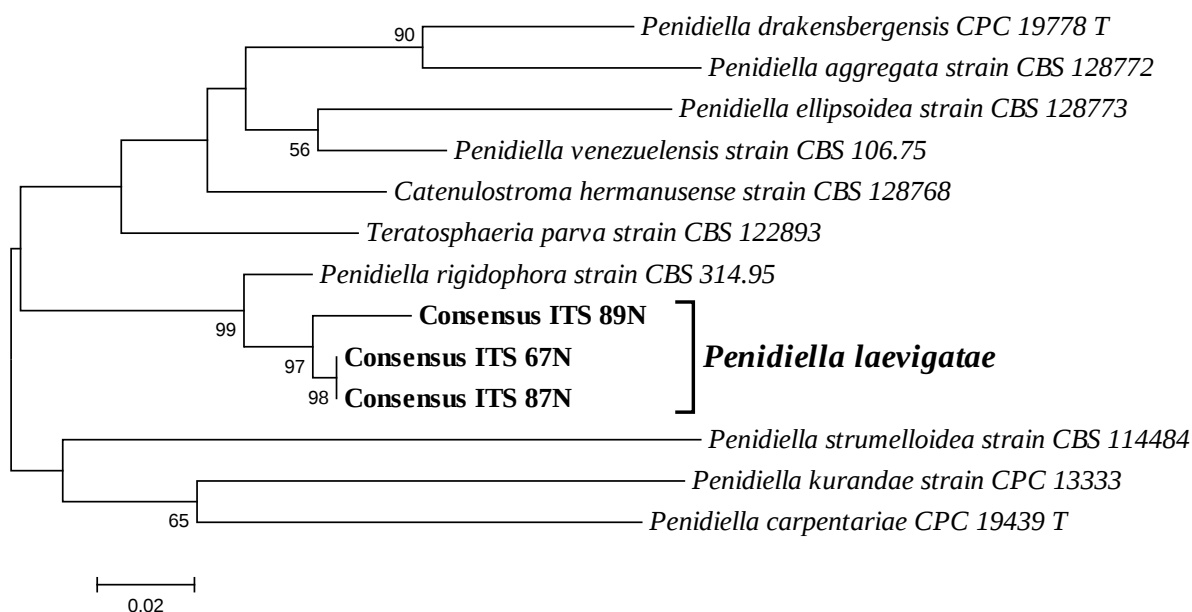


Figura 6. Análise filogenética da região ITS do DNA ribossomal da possível nova espécie de *Penidiella laevigatae*. A árvore elucida o agrupamento da nova espécie (ramo marcado com um círculo) dentro da família Teratosphaeriaceae. As distâncias evolutivas baseiam-se no modelo de Kimura 2p e a reconstrução da árvore no método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 repetições, sendo exibidos em forma de porcentagem (%). T = Linhagem Tipo.

67N – *Penidiella laevigatae*

Etimologia: o nome “laevigatae” refere-se ao substrato de isolamento, a formiga *Atta laevigata*.

Descrição: Baseada em 67N (CBS XXXX/ CBMAI XXXX) crescida a 25°C por 14 dias.

Morfologia em placa: Colônias crescidas em MEA a 25°C por 14 dias com desenvolvimento lento, 12 a 13 mm de diâmetro, superfície convexa, pouco pregueada nas bordas muito pregueada no centro, formando uma elevação de aspecto semelhante à vilosidades, velutinosas, micélio de coloração verde escura com margem negra; reverso negro. Colônias crescidas em PDA a 25°C por 14 dias com desenvolvimento lento, 10 a 11 mm de diâmetro, superfície convexa pouco pregueada nas bordas e com porção central formando uma estrutura circular, velutinosas, micélio de coloração verde escura e negro na margem; reverso negro. Colônias crescidas em OA a 25°C por 14 dias com desenvolvimento lento, 10 a 11 mm de diâmetro; superfície lisa, velutinosa; micélio de coloração negra; reverso negro.

Atividade de lacase: Positiva em meio PDA com ABTS 0,03%. Diâmetro da colônia de 0,8 cm e halo de 1,8 cm de coloração verde com margem irregular arroxeadada.

Características microscópicas: Hifas pigmentadas, marrons, de paredes lisas e espessas (ou espessura intermediária). Conidióforos eretos, marrons, de paredes lisas, simples ou ramificados, com conidiogênese simpodial. Conídios elipsoides com constrição na porção basal, bicelulares em sua maioria, 3,5 – 5,5 x 10,5 – 13,5 µm, paredes lisas e espessas, marrons (mesma cor do micélio e conidióforos). Sucessão conidial rexolítica.

Espécimen examinada: Espécie tipo CBS XXXX/ CBMAI XXXX, e estirpes adicionais CBS XXXX/ CBMAI XXXX, isoladas da cutícula de bitús e içá de *A. laevigata*, respectivamente, coletados na Fazenda Santana, Botucatu, São Paulo, Brasil, GPS: 22°50,6' S; 48°26,1' W (798 m de elevação), em Novembro de 2011 por N.C. Baron, F.C. Pagnocca, N. S. Nagamoto e D. Attili-Angelis.

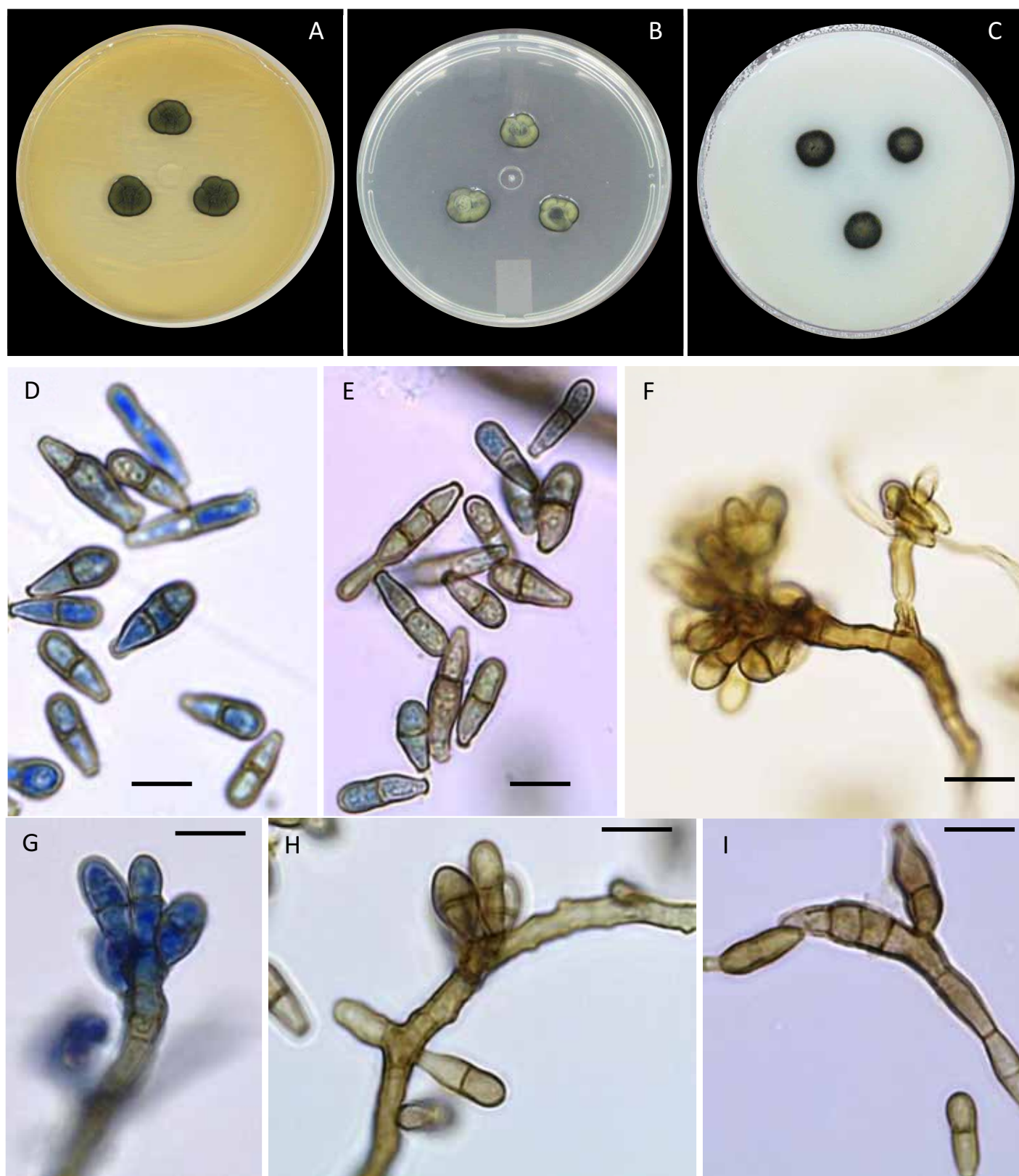


Fig 9. *Penidiella* sp. A-C. Colônias com 14 dias em MEA (A), PDA (B) e AO (C). D-E. Conídios. F-G. Conidióforos. H-I. Conidiogêse. Barras de escala: D-I = 10μm

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento e a descoberta de fungos em qualquer ambiente são de extrema importância, pois tal levantamento associado aos diferentes habitats de nosso planeta auxilia na compreensão das atividades ligadas ao seu ecossistema de origem, como é o caso dos basidiomicetos ligninolíticos na madeira. No entanto, atualmente entende-se que “isolar” um fungo não significa “conhecer” o mesmo. A diversidade de espécies presentes nas variadas ordens aumenta a cada dia levando os micologistas a uma revisão cada vez mais aprofundada de todo o sistema de classificação deste grupo tão importante de micro-organismos.

Novas ordens, famílias, gêneros surgem rapidamente, criando a necessidade de maiores estudos para reclassificá-los de forma coerente. A grande diversidade de características morfológicas, fisiológicas e evolutivas (análise filogenética), exige cada vez mais dos taxonomistas.

O trabalho é bastante extenso, milhões de espécies de fungos tem sua existência estimada e ainda não foram, ou nem chegarão a ser, descritas. O ganho associado à caracterização de comunidades fúngicas no ambiente é inigualável, e tal conceito firma-se a cada dia em associação às descobertas de um grande potencial biotecnológico associado a uma vasta gama de espécies fúngicas, como a produção de enzimas, antibióticos, biomassa, alimentos e a degradação de xenobióticos. Por motivos como estes é que os estudos de taxonomia e descrição precisa e consistente de novas espécies, e a revisão de espécies já descritas são tão importantes.

Nesse trabalho, buscou-se caracterizar com a maior precisão possível os 200 isolados de fungos melanizados selecionados a partir de um acervo muito maior já construído pelo grupo de pesquisa. Dentro dessa amostra foi possível identificar um número significativo de espécies indicando que realmente trata-se de um grupo diverso, e que se apresenta nos mais variados tipos de ambiente. Assim, esse estudo agrega dados importantíssimos sobre a amplitude ecológica desse grupo de micro-organismos, tão comumente associado a casos clínicos, mas que tem se mostrado cada vez mais presente no ambiente executando funções diversas, incluindo a degradação de xenobióticos.

Além da carência de estudos ecológicos, os fungos melanizados também apresentam uma defasagem na identificação de seus membros. Nesse aspecto, somente dentro da amostra de 200

isolados analisados quatro possíveis novas espécies para a ciência foram inferidas, atentando para a necessidade de estudos mais aprofundados para o grupo.

Em suma, esse trabalho aponta para o fato de que os fungos melanizados compõem um grupo diverso em seu número de espécies, sendo que há um grande número de descrições a serem realizadas, e também que sua ecologia é extremamente ampla, justificando a exploração de seu potencial. Os dados aqui apresentados podem servir de base para pesquisas futuras no âmbito da caracterização, específica e ecológica, bem como para a busca de meios para utilizar esses micro-organismos em bioprocessos e para a obtenção de bioprodutos. As características morfo-fisiológicas desse grupo favorecem a sua permanência em habitats que apresentam condições extremas, nas quais outros fungos nem sempre são capazes de sobreviver, indicando o enorme potencial biotecnológico que pode estar associado às rotas metabólicas específicas dos fungos melanizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.L.; BARRETO, R.W.; PEREIRA, O.L.; SOARES, D.J. Additions to the mycobiota of the invasive weed *Miconia calvenscens* (Melastomataceae), *Mycologia*, v.102, n. 1, p. 69 – 82, 2010.

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A.P.M.; PAGNOCCA, F.C.; NAGAMOTO, N.S.; de VRIES, M.; STIELOW, J.B.; DE DE HOOG, G.S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini), *Fungal Diversity*, aceito para publicação, 2014.

AVESKAMP, M.M.; GRUYTER, J.; WOUNDENBERG, J.H.C.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, v. 65, p. 1 – 60, 2010.

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE DE HOOG, G.S. Biodiversity of *Cladophialophora*. *Studies in Mycology*, v.61, p.175–191, 2008.

BADALI, H. et al. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potencial use in bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. *Fungal Biology*, v. 115, p. 1019-1029, 2011.

BATISTA, A.C.; CIFERRI, R. The Chaetothyriales. *Sydowia*, v. 3, p. 1 – 129, 1962.

BENNY, G.L.; KIMBROUGH, J.W. A synopsis of the orders and families of Plectomycetes with keys to genera. *Mycotaxon*, v. 12, n. 1, p. 1 – 91, 1980.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, v.72, p. 1-401, 2012.

BIBASHI, E.; DE DE HOOG, G.S.; KOSTOPOULOU, E.; TSIVITANIDOU, M.; SEVASTIDOU, J.; GELERIS, P. Invasive infection caused by *Pseudallescheria boydii* in an immunocompetent patient. *Hippokratia*, v.13, n. 3, p. 184 – 186, 2009.

BOEREMA, G.H.; GRUYTER, J.; NOORDELOOS, M.E. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – IV Section Heterospora: Taxa with large sized conidial dimorphs, in vivo sometimes as *Stagonosporopsis* sinanamorfos. *Persoonia*, v. 16, p. 335 – 371.

BOEREMA, G.H.; GRUYTER, J.; NOORDELOOS, M.E.; HAMERS, M.E.C. *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and intra-specific taxa in culture. 1ª ed. Editora CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido, 470 pp., 2004

CLESCERI, L.S.; REENBRRG, A.E.; EATON, A.D. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 20th Edition. APHA; AWWA and WEF. Washington, 1998.

COSTA, I.P.M.W.; MAIA, L.C.; CAVALCANTI, M.A.; Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, p. 1165 – 1173, 2012.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. Fungal biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 269 p. 2009

CROUS, P.W.; SUMMERELL, B.A.; CARNEGIE, M.J.; WINGFIELD, M.J.; GROENEWALD, J.Z. Novel species of Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae. Persoonia, v.23, p. 119 – 146, 2009.

CROUS, P.W.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K.; GROENEWALD, J. Z. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. In: Preface, Studies in Mycology, n. 58, 253 p., 2007.

DE DE HOOG, G.S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; ANGELIS, D.A.; VAN DEN ENDE, A.; MATOS, T.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; RAINER, J.; RICHARD-YEGRES, N.; VICENTE, V.; YEGRES, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. Medical Mycology, v.38, p.243-250, 2000.

DE DE HOOG, G.S. et al. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. Antonie van Leeuwenhoek, v. 90, p. 257-268, 2006.

DE DE HOOG, G.S.; NISHIKAKU, G.; FERNANDEZ – ZEPPENFELDT, C.; PADÍN-GONZÁLES, E.; BADALI, H.; RICHAR-YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, H.G. Molecular nalysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. Studies in Mycology, v. 58, p. 219 – 234, 2007.

DE DE HOOG, G.S.; GRUBE, M. Black fungal extreme: preface. In: DE HOOG, G.S.de; GRUBE, M. Studies in Mycology, CBS Fungal Biodiversity Centre, The Netherlands, 2008.

DENG, J.X.; PAUL, N.C.; LI, M.J.; SEO, E.Y.; SUNG, G.H. YU, S.H. Molecular Characterization and Morphology of Two Endophytic *Peyronellaea* Species from *Pinus koraiensis* in Korea. Microbiology, v. 39, n.4, p. 266 – 271, 2011.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, v. 1, 1993. 120p.

EBEAD, G.A.; OVERY, D.P.; BERRUÉ, F.; KERR, R.G. *Westerdykella reniformis*, sp. nov., producing the antibiotic metabolites melinacidin IV and chetracin B. IMA Fungus, v. 3, n. 2, p. 189 – 201, 2012.

FORTI, L.C.; MOREIRA, A.A.; ANDRADE, A.P.P.; CASTELLANI, M.A.; CALDATO, N. Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo. 1ª edição. Viçosa – MG. Editora UFV, 2011. p.102 - 125.

GEISER, D.M.; GUEIDAN, C.; MIADLIKOWSKA, J.; LUTZONI, F. KAUFF, F. HOFSTETTER, V.; FRAKER, E.; SCHOCH, C.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; APTROOT, A. Eurotiomycetes: Euromtiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. Mycologia, v. 98, p. 1054 – 1065, 2006.

GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE DE HOOG, G.S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. Studies in Mycology, v.43, p.151– 162, 1999.

GORDON, R.A.; SUTTON, D.A.; THOMPSON, E.H.; SHRIKANTH, V.; VERKLEY, G.J.M.; STIELOW J.B.; MAYS, R.; OLESKE, D.; MORRISON, L.K.; LAPOLLA, W.J.; GALFIONE, S.; TYRING, S.; SAMATHANAM, C.A.; FU, J; WICKES, B.L.; MULANOVICH, V.; WANGER, A.; ARIAS, C.A. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Paraconiothyrium cyclothyrioides*. Journal of Clinical Microbiology, v. 50, n. 11, p. 3795 – 3798, 2012.

GRUYTER, J.; AVESKAMP, M.M.; WOUNDENBERG, J.H.C.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Molecular phylogeny of phoma and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. Mycological research, v. 113, p. 508 – 519, 2009.

GRUYTER, J.; WOUNDENBERG, J.H.C.; AVESKAMP, M.M.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in Pleosporales. Studies in Mycology, v. 75, p. 1 – 36, 2013.

GUEDES, F. L. A. ; ATTILI-ANGELIS, D. ; PAGNOCCA, F. C. . Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). Folia Microbiologica (Prague), v. 56, p. 1-6, 2012.

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

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

HAWKSWORTH, D.L. et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8 ed. Wallingford: CAB International Mycological Institute, 1995. 616p.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STAPLERS, J.A. Dictionary of the fungi. 10ª Ed., Editora CABI Bioscience, Reino Unido, 2008.

- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, v. 23, n. 21, p. 2947 – 2948, 2007.
- LI, D.M.; DE DE HOOG, G.S.; LINDHARDT SAUNTE, D.M.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; CHEN, X.R. *Coniosporium epidermidis* sp. nov., a new species from human skin. *Studies in Mycology*, v. 61, p. 131-136, 2008.
- LI, D.M.; LI, R.Y.; DE DE HOOG, G.S.; WANG, Y.X.; WANG, D.L. *Exophiala asiatica*, a new species from a fatal case in China. *Medical Mycology*, v. 47, p. 101 – 109, 2009.
- LUEDEMANN, G.M. The dictyochlamydospore of *Peyronellaea glomerata* (Corda) Goidanich ex Togliani contrasted with the dictyospore of *Alternaria tenuis* Auct. *Mycologia*, v. 51, p. 772–780, 1961.
- LUO, J.; LIU, X.J.; LI, E.; GUO, L.; CHE, Y. Arundinols A–C and Arundinones A and B from the Plant Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis*. *Journal of Natural Products*, v. 76, p. 107 – 112, 2013.
- MACHADO, A.P.S. Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água. Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente Escola de Engenharia da Universidade do Minho. Departamento em Engenharia Biológica, 2006. 116f.
- MANAMGODA, D.S.; CAI, L.; BAHKALI, A.H. CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, v. 51, p. 3–42, 2011.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S.N.; GUO, L.D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; WU, W.P.; SUN, X.; CROUS, P.W.; CHAT, D.J.; MCKENZIE, E.H.C.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, v. 56, p. 95 – 129, 2012.
- MULLINS, J. Microorganisms in outdoor air. In: FLANNIGAN, B.; SAMSON, R.A.; MILLER, J.D.) *Microorganisms in home and indoor work environments: Diversity, health impacts, investigation and control*. 1ª Ed., Editora Taylor & Francis, Londres, p. 3 – 16, 2001.
- NAPOLITANO, R.; JUARÉZ, N.P. Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 344, p. 208 – 214, 1997.
- NUNES, T.V.; PIO, C.A. Emission of volatile organic compounds from Portuguese eucalyptus forests. *Chemosphere – Global change Science*, v. 3, n. 3, p. 239 – 248, 2001.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. JR Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

PALACIO-HERNANZ, A.D.; MOORE, M.K.; CAMPBELL, C.K.; DEL PALACIO-PEREZ-MEDEL, A.; DEL CASTILLO-CANTERO, R. Infection of the central nervous system by *Rhinocladiella atrovirens* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Medical Mycology*, v. 27, n. 2, p. 127 – 130, 1989.

PRENAFETA-BOLDU, F.X.; KUHN, A.; LUYKX, D.M.A.M.; ANKE, H.; GROENESTIJN, J.W.; BONT, J.A.M. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Research*, v. 105, n. 4, p 477-484, 2001.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI Jr, M.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PENNING, L.H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiologica*, v.50, n.5, p.421-425, 2005.

RODRIGUES, A.; CABLE, R.N.; MUELLER, U.G.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leafcutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.96, p.331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U.G.; ISHAK, H.D.; BACCI, M.Jr.; PAGNOCCA, F.C. Ecology of microfungi communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. *Microbiology Ecology*, p. 1-12, 2011.

RUIBAL, C.; PLATAS, G. BILLS, G.F. Isolation and characterization of melanized fungi from limestone formations in Mallorca. *Mycological Progress*, v. 4, n. 1, p. 23 – 38, 2005.

SAMERPITAK, K.; VAN DER LINDE, E.; CHOI, H.J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; MACHOUART, M.; GUEIDAN, C.; DE DE HOOG, G.S. Taxonomy of *Ochroconis* genus including opportunistic pathogens on humans and animals. *Fungal Diversity*, DOI 0.1007/s13225-013-0253-6, publicada somente online, 2013.

SATOW, M.M., ATTILI-ANGELIS, D., DE DE HOOG, G. S., ANGELIS, D.F., VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Mycology*, v. 61, p.157–163, 2008.

SMITH, G.J.D.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. The Xylariales: a monophyletic order containing 7 families. *Fungal Diversity*, v. 13, p. 185 – 218, 2003.

SUDHADHAM, M. et al. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. *Studies in mycology*, v. 61, p. 145-155, 2008.

TAMURA K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUAMR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

Distance, and maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, n. 28, p. 2731 – 2739, 2011.

VILELA, R.; MENDONZA, L.; ROSA, P.S.; BELONE, A.F.F.; MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D.V.A.; RESENDE, M.A. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 8, 2005.

VICENTE, V.A.; ANGELIS, D.A.; QUEIROZ-TELLES FILHO, F. Isolamento de 83 fungos herpotriqueláceos do ambiente. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2001.

VICENTE, V.A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in mycology*, v. 61, p. 137-144, 2008.

WAINWRIGHT, M. Novel uses for fungi in biotechnology. *Chem. Ind. London*, v. 2, p. 31- 44, 1990.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. New York: Academic Press, p. 315–322, 1990.

WINTERS, A.J.; ADAMS, M.A.; BLEBY, T.M.; RENNENBERG, H.; STEIGNER, D.; STEINBHECHER, R.; KREUZWIESER, J. Emissions of isoprene, monoterpene and short-chained carbonyl compounds from *Eucalyptus* spp. in southern Australia. *Atmospheric Environment*, v. 43, p. 3035 – 3043, 2009.

ZHANG, Y.; CROUWS, P.W.; SCHOCH, C.L.; BAHKALI, A.H.; GUO, L.D.; HYDE, K.D. A molecular, morphological and ecological re-appraisal of Venturiales – a new order of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, v. 51, n. 1, p. 249 – 277, 2012.

ZHAO, J. et al. Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. *Microbial Ecology*, v. 60, p. 149–156, 2010.

APÊNDICE

Tabela 4A. Relação de espécies de fungos melanizados identificadas dentre os 200 isolados estudados.

Cód	Número de linhagens	Substratos de origem	Identificação Molecular	Identificação final (Morfologia + Molecular)
D16	8	Casca de <i>E. tereticornis</i>	<i>Cladophialophora devriesii</i> CBS 118720 (FJ385275)	<i>Cladophialophora devriesii</i>
10F	1	Corpo de bitú de <i>A. capiguara</i>	<i>Cladophialophora chaetospira</i> CBS 115468 (EU137333)	<i>Cladophialophora chaetospira</i>
M4	1	Solo de <i>landfarming</i>	<i>Cladophialophora chaetospira</i> CBS 114747 (EU035403)	<i>Cladophialophora chaetospira</i>
M14	4	Solo de <i>landfarming</i>	<i>Cladophialophora minourae</i> CBS 987.96 (EU103988)	<i>Cladophialophora minourae</i>
53N	1	Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i>	<i>Cladophialophora immunda</i> CBS 126877 (KC886409)	<i>Cladophialophora immunda</i>
D30	44	Solo de oficina mecânica	<i>Cladophialophora mycetomatis</i> CBS 454.82 (EU137293)	<i>Cladophialophora mycetomatis</i>
26F	5	Águas refinaria (4); Corpo de bitú de <i>A. capiguara</i> (1)	<i>Cladophialophora mycetomatis</i> CBS 122637 (FJ385276)	<i>Exophiala dermatitidis</i>
NR2	2	Amostras de Águas	<i>Exophiala dermatitidis</i> CBS 207.35 (FJ974060)	<i>Exophiala spinifera</i>
NR3	1	Amostras de Águas	<i>Exophiala dermatitidis</i> Isolate 9 (JX669013)	<i>Exophiala attenuata</i>
NR4	1	Amostras de Águas	<i>Exophiala spinifera</i> CBS 671.76 (AY156975)	<i>Exophiala heteromorpha</i>
			<i>Exophiala attenuata</i> UTHSC87-80 (EF025392)	<i>Exophiala alcalophila</i>
			<i>Exophiala heteromorfa</i> CBS 633.69 (AY857522)	
			<i>Exophiala alcalophila</i> CBS 520.82	

64N	1	Corpo de içá de <i>A. laevigata</i>	<i>Exophiala bergeri</i> CBS 353.52 (EF551462)	<i>Exophiala bergeri</i>
M69	1	Solo de <i>landfarming</i>	<i>Exophiala xenobiotica</i> CCFEE 5794 (JX681048)	<i>Exophiala xenobiotica</i>
D111	1	Casca de <i>E. tereticornis</i>	<i>Exophiala xenobiotica</i> CBS 117665 (DQ182588)	
18N	11	Casca de <i>E. tereticornis</i> (1); Águas refinaria (2); Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i> (2), bitú (2) e içá (4) <i>A. capiguara</i> (2)	<i>Rhinocladiella atrovirens</i> CBS 264.49 (EU041812)	<i>Rhinocladiella atrovirens</i>
18F	5	Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i> (1), bitú (3) e içá (1) <i>A. capiguara</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> CBS 674.82 (HM 148014)	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
110N	2	Águas refinaria (1); Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i> (1)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> CBS 145.35 (HM108013)	
47N	3	Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i> (1) e <i>A. capiguara</i> (2)	<i>Cladosporium perangustum</i> CPC 13686 (HM148138)	<i>Cladosporium perangustum</i>
			<i>Cladosporium perangustum</i> CPC 14566 (HM 148147)	
			<i>Cladosporium gossypiiicola</i> CNU081084 (KC339775)	<i>Cladosporium gossypiiicola</i>
			<i>Cladosporium gossypiiicola</i> CNU 081002 (KC339774)	
			<i>Cladosporium tenuissimum</i> CBS 262.80 (HM148201)	
			<i>Cladosporium tenuissimum</i> CBS 117.79 (148200)	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
32N	7	Águas refinaria (1); Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i> (1) e bitú (4) e içá (1) de <i>A. capiguara</i>	<i>Cladosporium bruhnei</i> CBS 177.71 (EF679339)	<i>Cladosporium bruhnei</i>
			<i>Cladosporium bruhnei</i> CBS 159.54 (EF679337)	

75N	1	Corpo de bitú de <i>A. capiguara</i>	<i>Cladosporium uredinicola</i> DFFSC020 (JX156366) <i>Cladosporium uredinicola</i> CPC 5390 (AY251071)	<i>Cladosporium uredinicola</i>
67N	3	Corpo de içá (1) e bitú (2) de <i>A. laevigata</i>	<i>Penidiella rigidophora</i> CBS 314.95 (EU019276)	<i>Penidiella</i> sp.
58N	1	Corpo de bitú de <i>A. laevigata</i>	<i>Ochroconis constricta</i> NBRC 9375 (DQ307327)	<i>Verruconis verruculosum</i>
18A	1	Amostras de Águas	<i>Curvularia trifolii</i> CPC 2995 (JN712459)	<i>Curvularia trifolii</i>
NR36	1	Amostras de Águas	<i>Curvularia lunata</i> IP 1477.83 (Mycobank)	<i>Curvularia lunata</i>
55A	3	Amostras de Águas	<i>Westerdykella dispersa</i> CBS 297.56 (AY943055)	<i>Westerdykella dispersa</i>
48A	3	Amostras de Águas	<i>Westerdykella capitulum</i> CBS 354.65 ()	<i>Westerdykella capitulum</i>
141A	5	Amostras de Águas	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> CY 127 (HQ607976)	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>
130A	1	Amostras de Águas	<i>Cochliobolus kusanoi</i> NBRC 100196 (JN943395)	<i>Cochliobolus kusanoi</i>
234A	1	Amostras de Águas	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> isolate 11-40 (JX999998)	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>
45N	2	Corpo de bitú de <i>A. capiguara</i> (1) e içá de <i>A. laevigata</i> (1)	<i>Cochliobolus geniculatus</i> NBRC 100139 (JN943417)	<i>Cochliobolus geniculatus</i>
NR11	1	Amostras de Águas	<i>Peyronellaea glomerata</i> FK1 (KC802086)	<i>Peyronellaea glomerata</i>
340A	1	Amostras de Águas	<i>Pseudallescheria boydii</i> CBS 116894 (HQ231817)	<i>Pseudallescheria boydii</i>

FICHA CATALOGRÁFICA

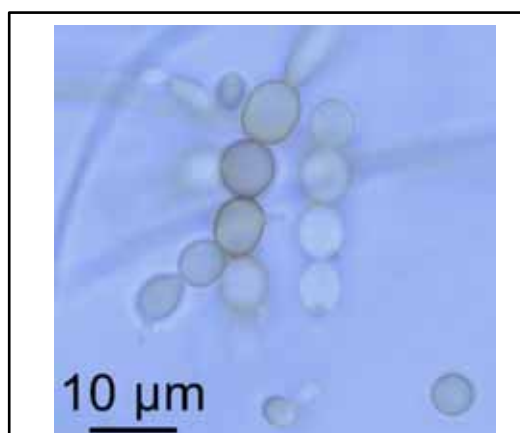
Descrição da amostra:	Levedura negra
Código / Origem:	26F / Bitú de <i>Atta capiguara</i> (Flotação em óleo mineral)
Identificação:	<i>Exophiala spinifera</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *E. spinifera* com 5 dias de crescimento em ágar Sabouraud.

Microscopia:



Conídios de *E. spinifera*.

Caracterização morfológica

Colônia negra: forte melanização

Elevada produção de exopolissacarídeos pelas células conferindo aspecto pegajoso à colônia

Células ovaladas, circulares ou mais alongadas: 3,5 – 5μm x 2,5 - 3μm

9) Referência Bibliográfica:

de DE HOOG, G.S.; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R.B; KANTARCIOGLU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 10, p 4767 – 4778, 2003.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra 26F apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Exophiala spinifera*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra 26F no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Exophiala spinifera*, suportado por um *bootstrap* de 100% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura 26F deve ser identificada como *Exophiala spinifera*.

Observações: T – Linhagem Tipo

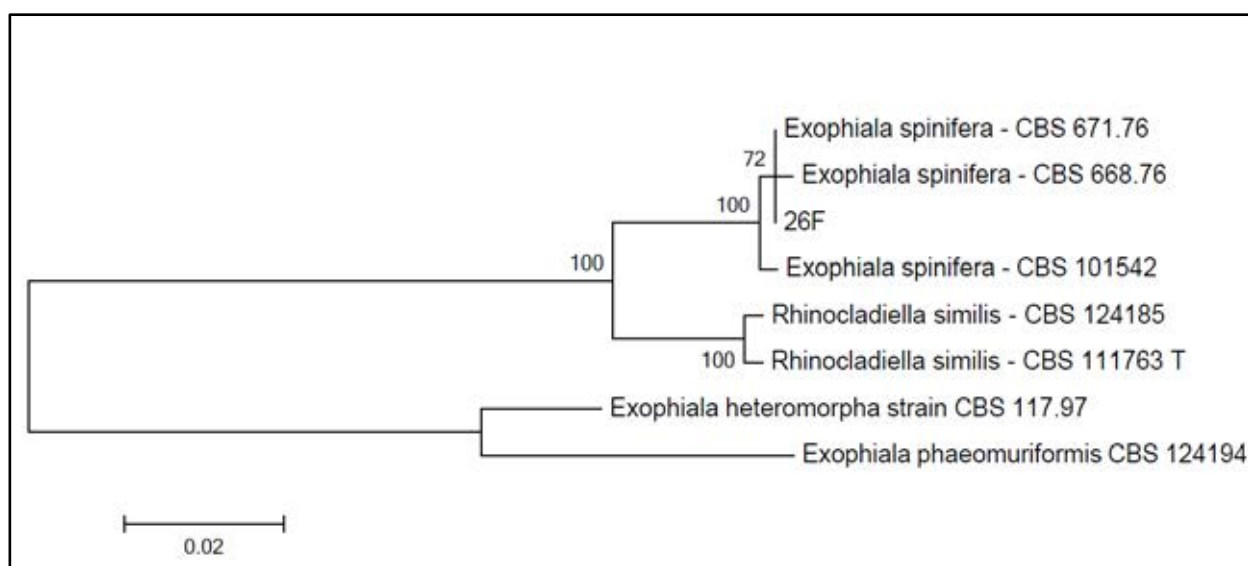


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra 26F e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

TCCCACCCATTGTTTATGATACTCAGTGTTGCTTCGGCAGGCCTGGTCTCGACCTGCCGGAGGGCCG
TAACACGCCCCCGGAGAGTGCCTGCCGACGGCCCCAACTTCCAAATTCTTTAACTAAACGTGTCT
TTGTCTGAGTAAAGTCTTTAATAAAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCTCGTGAGTCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTTCACCCCTCAAG
CCCCCGGCTTGGTGTTGGACGGTTTGGTCCCCGGGACGCCCTGGACCCCTCCCAAAGACAATGACG
GCGGGCTGTTGCACCCCCGGTACACTGAGCATCTTCACGGAGCACGTACCGGTCTCAAGGGTCGAC
GGCACCCGGTCTTACCTATATTTTTCAAGGTTGACC

FICHA CATALOGRÁFICA

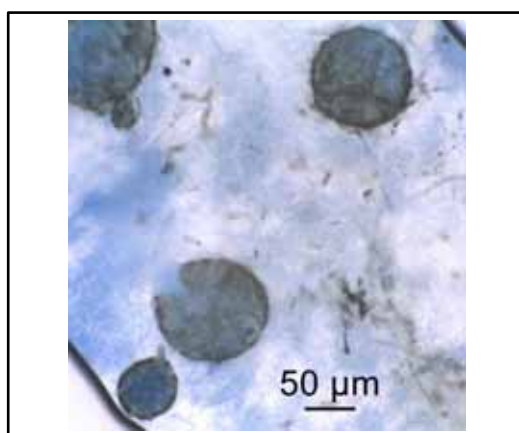
Descrição da amostra:	Fungo filamentoso claro com estruturas reprodutivas negras
Código / Origem:	77A / Água de influência de refinaria (Pour plate)
Identificação:	<i>Westerdykella capitulum</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *W. capitulum* com 7 dias de crescimento em ágar batata (PDA).

Microscopia:



Picnídios de *W. capitulum*

Caracterização morfológica

Diâmetro da colônia: 3,6 cm

Picnídios globosos: 60 a 120 µm de diâmetro

Conídios pigmentados subglobosos: 3 - 4 µm comprimento x 2,5 - 3 µm largura

9) Referência Bibliográfica:

de GRUYTER, J.; WOUNDENBERG, M.M.; VERKLEY, G.J.M.; GROENWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Redisposition of *Phoma* – like anamorphs in *Pleosporales*. *Studies in Mycology*, v. 75, p. 1 – 36, 2012.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra 77A apresentou 100 % de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Westerdykella capitulum*, depositadas no banco de dados do GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra 77A no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Westerdykella capitulum* suportado por um *bootstrap* de 88% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura 77A deve ser identificada como *Westerdykella capitulum*.

Observações: IT – Linhagem Isotipo; HT – Linhagem Holotipo

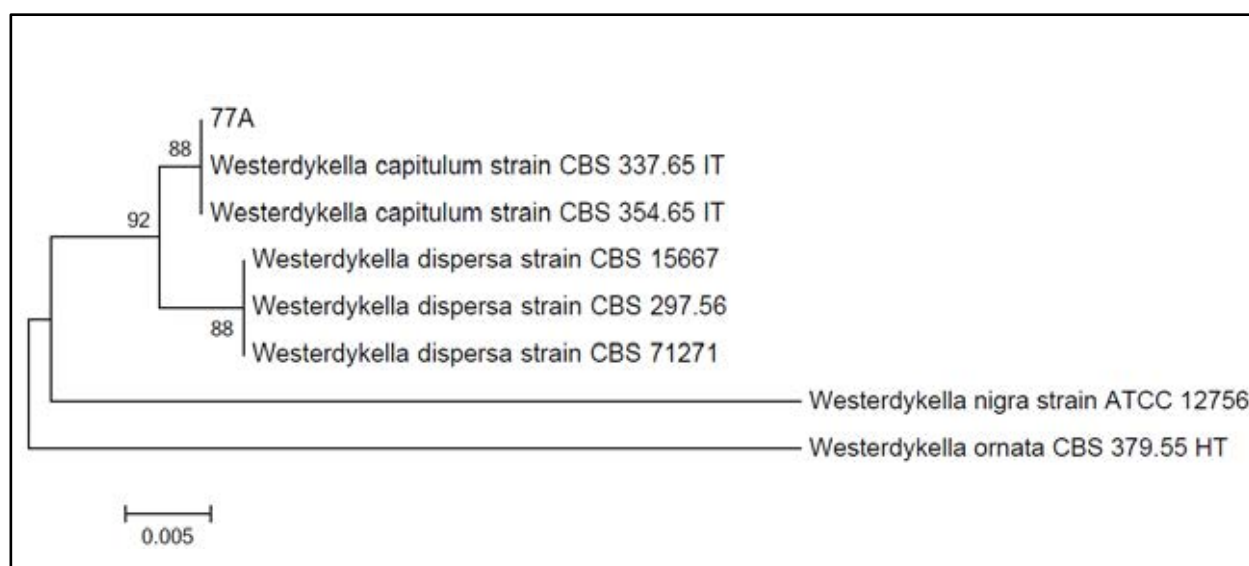


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra 77A e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

TGCCTTTTCGAGCACCTGTTTGTTCCTCGGCAGGCCCGCCTGCCAATGGGGACCCTTTAAACTCT
 TGCAATCAACCTGAACAATATTGTCTGAACAAAAAATCTAAATCAAACTTTCAACAACGGATCT
 CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGT
 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTATGGTATTCCGTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG
 TCATTTACACCTTCAAGCTCCGCTTGGTGTGGGTGACTGTGGCCCCCTCGGGGCCACTCGCCTCAA
 GTCATTGGCGGCCGTTTGTAGGCTTCGAGCGCAGCACATGTGCGTCTTCGTGCCTCGCGGATCGG
 CTCCCAGAAGCTAAATCTCACATTTTGGACCTCGAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA
 TATC

FICHA CATALOGRÁFICA

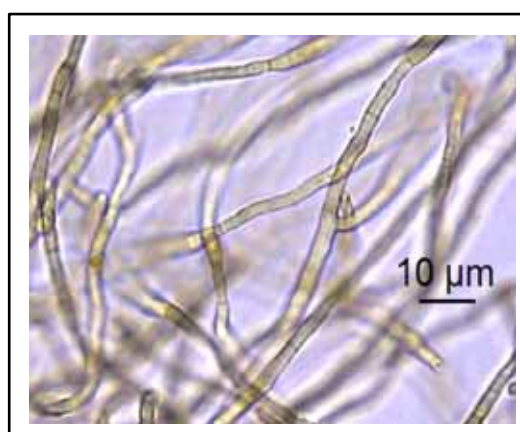
Descrição da amostra:	Fungo filamentoso negro
Código / Origem:	D16 / Solo de oficina mecânica (Flotação em óleo mineral)
Identificação:	<i>Cladophialophora devriesii</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *C. devriesii* com 7 dias de crescimento em ágar malte 2%.

Microscopia:



Micélio estéril de *C. devriesii*

Caracterização morfológica

Diâmetro da colônia: 1,6cm x 1,4 cm

Crescimento lento

Filamentação rápida

9) Referência Bibliográfica:

DE HOOG, G.S. de; GUARRO, J. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra D16 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Cladophialophora devriesii*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra D16 no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Cladophialophora devriesii*, suportado por um *bootstrap* de 100% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura D16 deve ser identificada como *Cladophialophora devriesii*.

Observações: HT – Linhagem Holotipo; T – Linhagem Tipo.

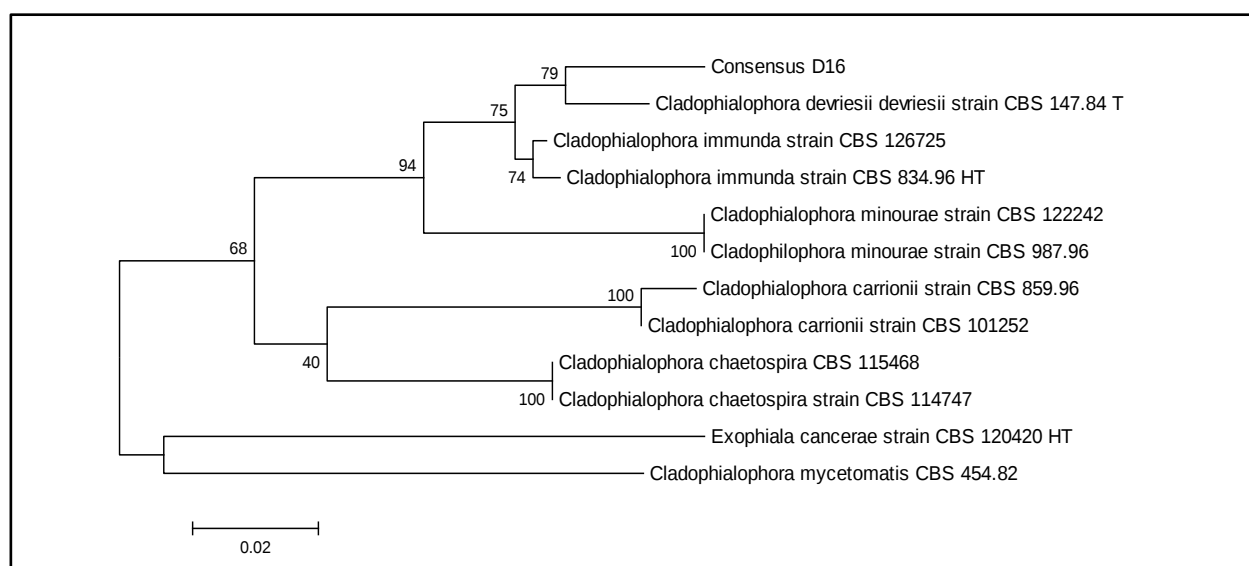


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra D16 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

```
CCTCTGTCTACTAGACCTCTGTTGCTTCGGCGGACCCGTCCCAAACGGACCGCCGGAGGACCGCCC
ATCGTGCCGCGTCCTCTGGCCAGCGTCCGCGGATAGCCCCTTCAAACCTCTGGAATAATCATGATTTT
ACCGTCTAAGTGATTTTATTCAATTAAAAGCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTGAGTCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCC
CTCAAGCCCCGTGCTTGGTGTTGGACGGCTTGGTAGAGAGTCTCTACCCCTCCTAAAGACAATGAC
GGCGGCCTCGTGGAACCCCCGGTACACTGAGCTTCTTAAGTACGATCGGATCAAGGGTGCC
CGGGGCACGGTCTTCTCCCCTTCCATGGGGAAATTTCTCAAGGTTGACC
```

FICHA CATALOGRÁFICA

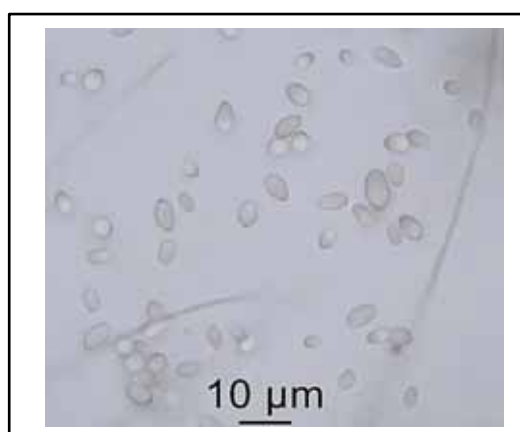
Descrição da amostra:	Levedura negra
Código / Origem:	D30 / Solo de oficina mecânica (flotação em óleo mineral)
Identificação:	<i>Exophiala dermatitidis</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *E. dermatitidis* com 3 dias de crescimento em ágar Sabouraud.

Microscopia:



Células de *E. dermatitidis*

Caracterização morfológica

Colônia melanizada olivácea

Células ovaladas ou arredondadas com 3,5 - 5,0 µm de comprimento por 2,5 - 3,0 µm de diâmetro

9) Referência Bibliográfica:

DE HOOG, G.S. de; GUARRO, J. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 720p., 1995.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra D30 apresentou 99% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Exophiala dermatitidis*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra D30 no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Exophiala dermatitidis*, suportado por um *bootstrap* de 93% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura D30 deve ser identificada como *Exophiala dermatitidis*.

Observações: HT – Linhagem Holotipo / T – Linhagem Tipo

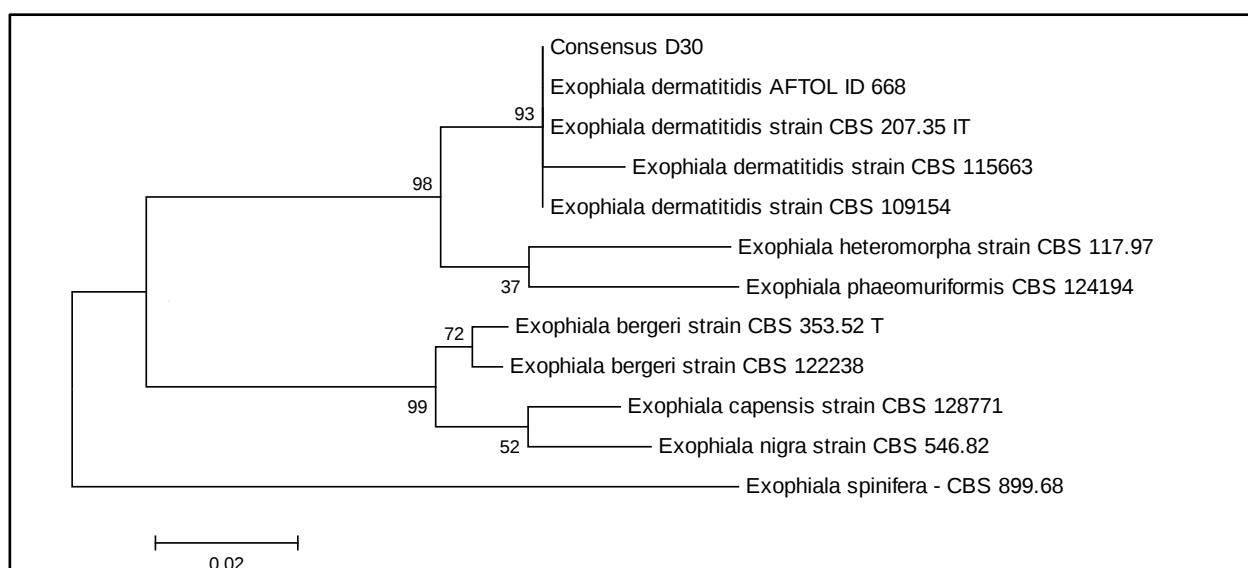


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra D30 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

```
CCCTTTGTTTACCCGACCCGTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGAGGACCGC
CTATTCAGGTCCTCTGGCCCCGCGCCCGCCGGTAGCCAATTCTACCAAACCTCTTGAATCAAATCGTGT
CCAATGTCTGAGTATATTACAAAATAAAAGCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCC
TCAAGCCCCCCCCGGCTTGGTGTGGACGGTCTGGTCGAGCGTTTCCGCGCGACCCCTCCCAAAGAC
AATGACGGCGGCCTGGTTGGACCCCCGGTACACGGAGCTTCTTCACTGAGCACGTATCGGTTTCAA
GGTGTCCCCGGGACCCGGTCGACCTCTCTTGCTCCCCTGCGGGAGTGGGAGAGACCCCTTTTAT
CAAGGTTGACC
```

FICHA CATALOGRÁFICA

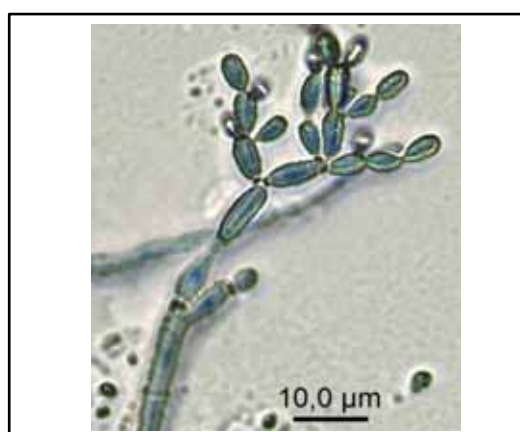
Descrição da amostra:	Fungo filamentoso negro
Código / Origem:	N27/ Corpo de bitú de <i>Atta capiguara</i> (Caminhada em placa)
Identificação:	<i>Cladosporium cladosporioides</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *Cladosporium cladosporioides* com 7 dias de crescimento em MA 2%.

Microscopia:



Conidióforo e conídios de *C. cladosporioides*.

Caracterização morfológica

Diâmetro da colônia: 4,0cm x 3,4cm

Conídios: 4,5 – 6,0µm x 3,0 – 4,0µm

9) Referência Bibliográfica:

BENSH K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology, n. 72, 402pp, 2012.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra N27 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Cladosporium cladosporioides*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra N27 no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Cladosporium cladosporioides*, suportado por um *bootstrap* de 100% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura N27 deve ser identificada como *Cladosporium cladosporioides*.

Observações: NT – Linhagem Neotipo; HT – L. Holotipo; LCT – L. Lectotipo; T – L. Tipo

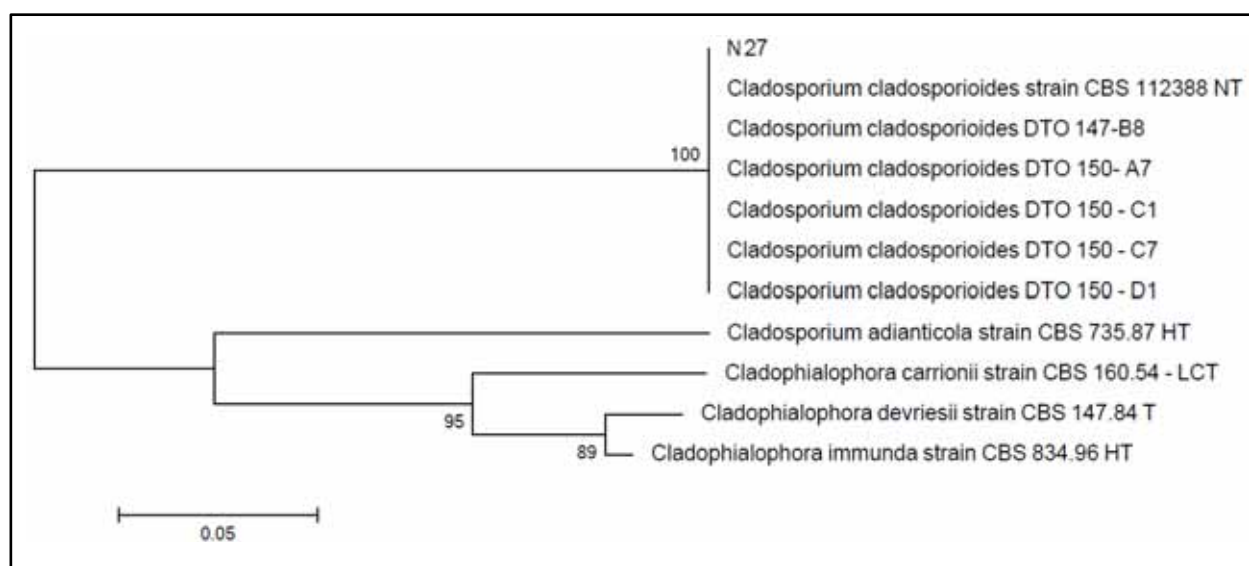


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra N27 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

```
CCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGAC
ACTTCAAACCTCTTGCGTAACCTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAATAAATTAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAA
TCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAGTATTTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGG
CTACGCCGTAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTT
AAGCATAT
```

FICHA CATALOGRÁFICA

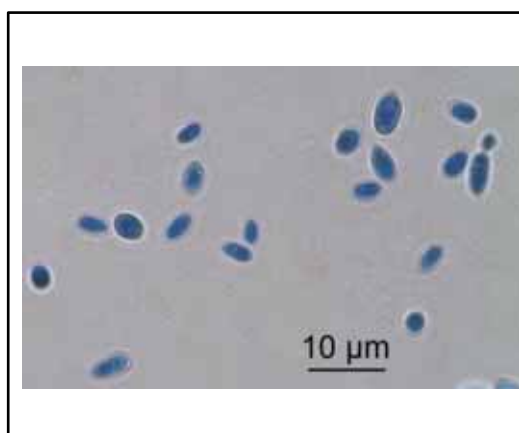
Descrição da amostra:	Levedura negra
Código / Origem:	N64 / Içá de <i>Atta laevigata</i> (Caminhada em ágar YMA)
Identificação:	<i>Exophiala bergeri</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *E. bergeri* com 5 dias de crescimento em ágar Sabouraud.

Microscopia:



Células de *E. bergeri*

Caracterização morfológica

Crescimento lento com filamentação rápida

Células ovaladas com 4,5 – 5,0µm comprimento x 2,5 – 3,0µm largura

9) Referência Bibliográfica:

De DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of Clinical Fungi, v. 1, Segunda edição, Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra N64 apresentou 99% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Exophiala bergeri*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra N64 no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Exophiala bergeri* suportado por um *bootstrap* de 85% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura N64 deve ser identificada como *Exophiala bergeri*.

Observações: T – Linhagem Tipo

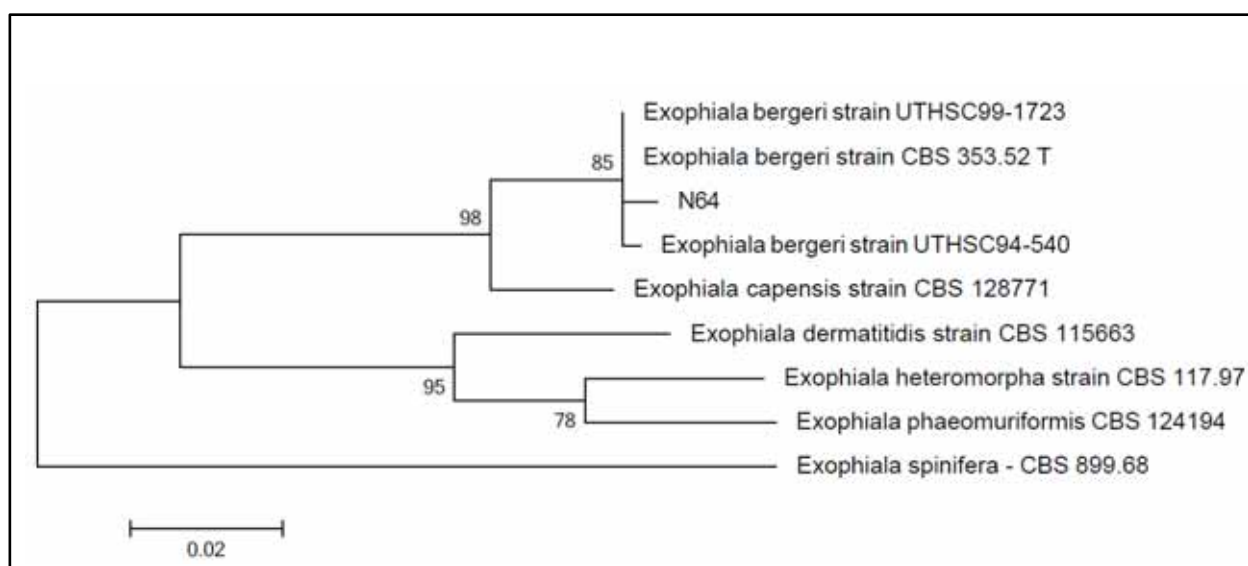


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra N64 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

```
CCCTATGTTTATTGTACCTTGTGTTGCTTCGGCGGGACCGTCTCACGACCGCCGGAGGGCCGTAAA
ACGTCCTCTGGCCCGCGCCCGCCGATGGCCCTCCACACAAAATTCTGAATAAATCATGCCTAATTG
TCTGAGTATAATACACAAAAATTAAAAGCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTGAGTCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTCACCCCTC
AAGCCCCCGGCTTGGTTTTGGACGGTCTGGTTTAGGCACCGCCTAGACCCCTCCTAAAGATAATGA
CGGCGGCCTCGTTGGACCCCGGTACACTGAGCTTCTTAAGTACGACGTATCGGATCAAGGGTGC
GCGAGACACGGTCTTCAACCCCTTTTTTTCTAAGGTTGACC
```

FICHA CATALOGRÁFICA

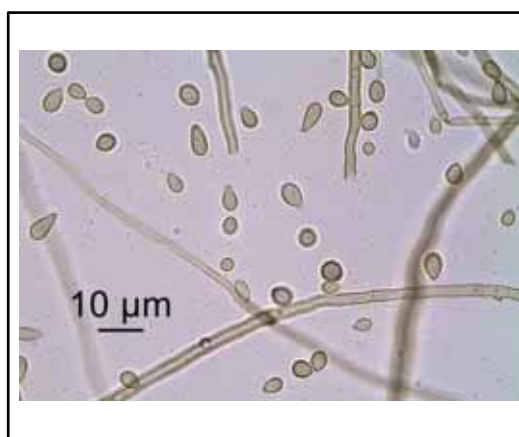
Descrição da amostra:	Levedura negra
Código / Origem:	NR2 / Água de influência de refinaria (<i>Pour plate</i>)
Identificação:	<i>Exophiala attenuata</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *E. attenuata* com 5 dias de crescimento em ágar malte 2%.

Microscopia:



Hifas, conídios e células de *E. attenuata*

Caracterização morfológica

Diâmetro da colônia: 2,3cm x 2,0cm

Células arredondadas: 4,5 – 6,0µm diâmetro

Conídios piriformes: 6,0 – 8,0µm comprimento x 4,0 – 4,5µm largura

9) Referência Bibliográfica:

De DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of Clinical Fungi, v. 1, Segunda edição, Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra NR2 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Exophiala attenuata*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra NR2 no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Exophiala attenuata*, suportado por um *bootstrap* de 100% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura NR2 deve ser identificada como *Exophiala attenuata*.

Observações:

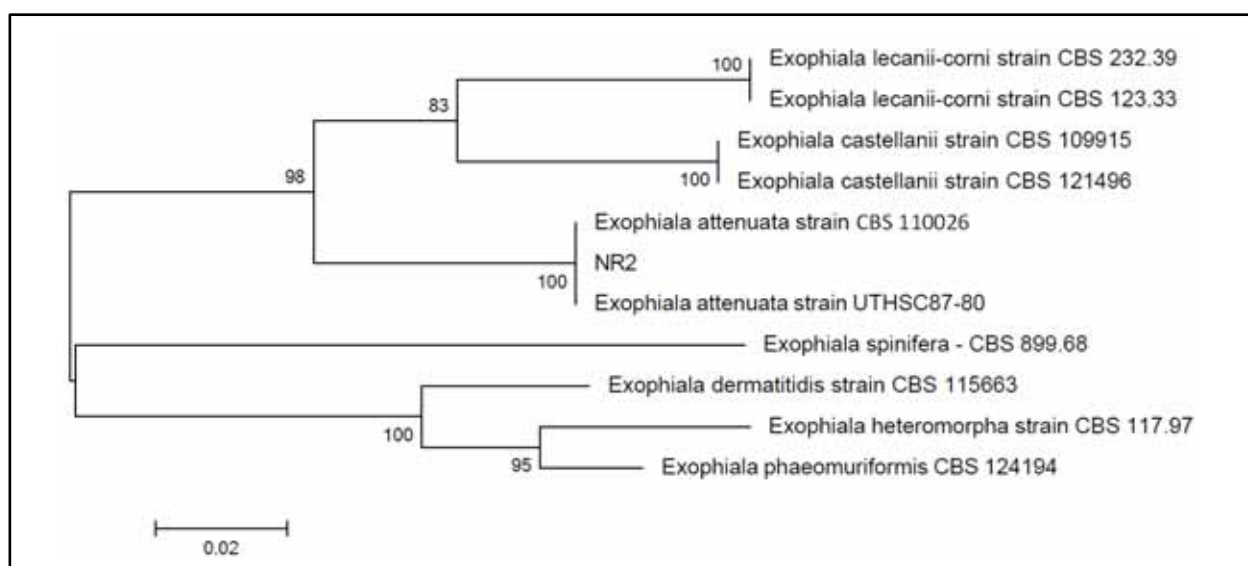


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra NR2 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

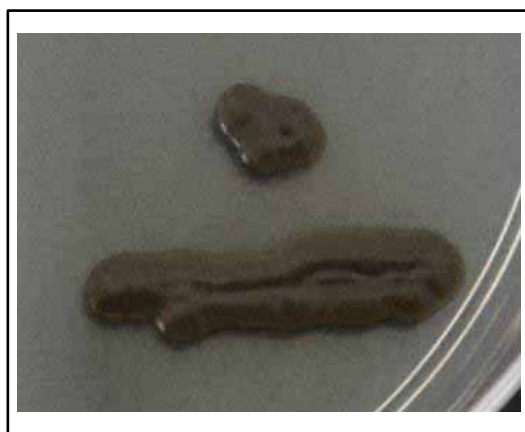
Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

```
GACCTTTTGTTGCTTCGGCGAGCCCGTCCTGTCCTGTTTACCGGGAAGGGACCGCCGGAGGACCGT
CACACGTCCTCTGGTCCGCGCTCGTCGGTGGCCATCTTTAAATTCTTACAAACCGTGTCTTCTCTGA
GTACATTATTAAATTAAAGCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCTTTGGCATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCTCTCAAGCCCCCT
GGGTTTGGCGTTGGACGTTTGGTGTCTGGCAACGGTCACCCCTCCCAAAGATAATGACGGCGGCC
TCGTGGGACCCCGGTACACTGAGTTCTTCACGGGACACGTACTGGATCAAGGGTTGACGGGGCCC
CGGTCTTGGTGACCTTTCCTCCTCGGA
```

FICHA CATALOGRÁFICA

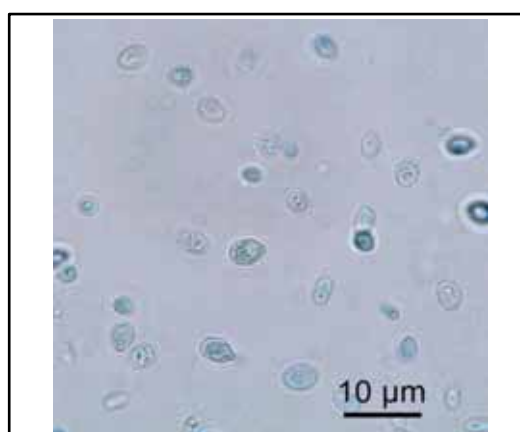
Descrição da amostra:	Levedura negra
Código / Origem:	NR4 / Efluente da Refinaria do Planalto Paulista (<i>Pour plate</i>)
Identificação:	<i>Exophiala alcalophila</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *Exophiala alcalophila* com 3 dias de crescimento em ágar Sabouraud.

Microscopia:



Células de *Exophiala alcalophila*

Caracterização morfológica

Colônia apresentando coloração fortemente negra

Apresenta secreção de exopolissacarídeos (aspecto pegajoso)

Células arredondadas a ovaladas: 3,5 – 4,0µm comprimento x 2,5 – 3,0µm largura

9) Referência Bibliográfica:

De DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of Clinical Fungi, v. 1, Segunda edição, Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra NR4 apresentou 99% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Exophiala alcalophila*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra NR4 no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Exophiala alcalophila*, suportado por um *bootstrap* de 100% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura NR4 deve ser identificada como *Exophiala alcalophila*.

Observações: T – Linhagem Tipo

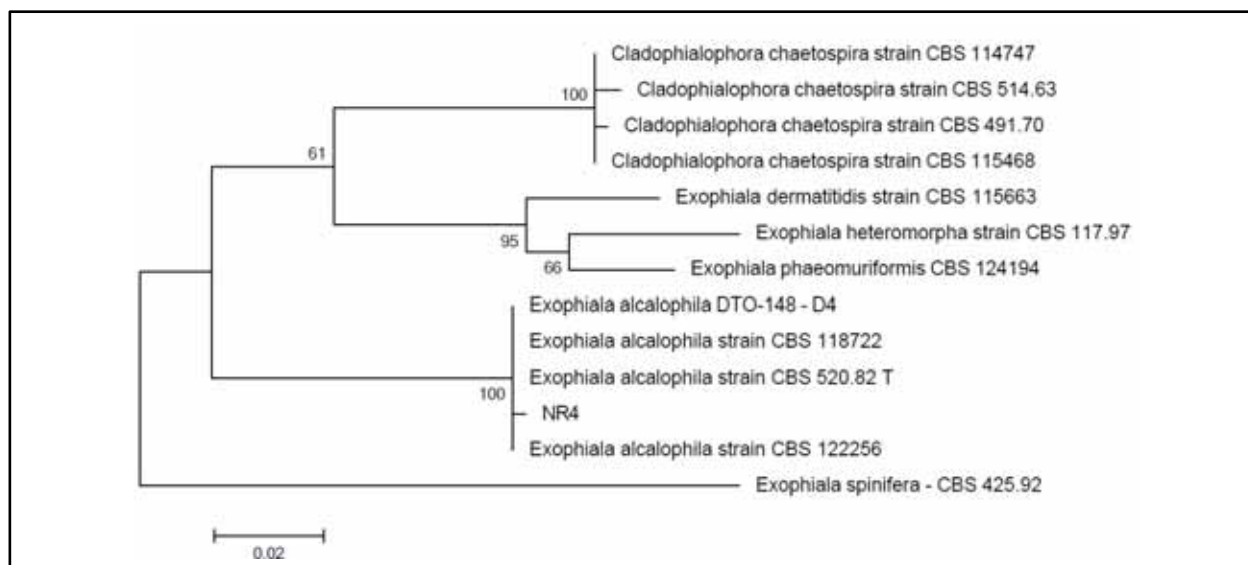


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra NR4 e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

```
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTA
GGGTCCTCTGGGCCCCGATCTCCCAACCCTTTGTTTATTATACCTTTTGTTGCTTCGGCGAGCGTTGTC
TCACGACGACCGCCGGAGGACCGCTTAACGGCGTCCTCTGGTCCGCGCCCGCCGATGGCCCCAAAA
TCTCAAAATTCTTGTATGAATCGTGTCTTTACCTAAGTCTTGATTTAATCAAAACAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCA
GAATTCCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGATCCGAAGGGCATGCCTG
TTCGAGCGTCATTATACCCCTCGAGCCCCCGGGCTTGGTGTGGACGGCTTGGTTACGCTCCCCGC
GTGACCCCTCCTAAAGACAATGACGGCGGCCTCGTGGAGCCCCGTACACTGAGCTTCTTAAGTGA
CACGTATCGGATCTAGGGCGCCCAGGCTCCGGTCTCTCCCTTTGTGGGGGAAAACCCTCTTTTAC
AAGG
```

FICHA CATALOGRÁFICA

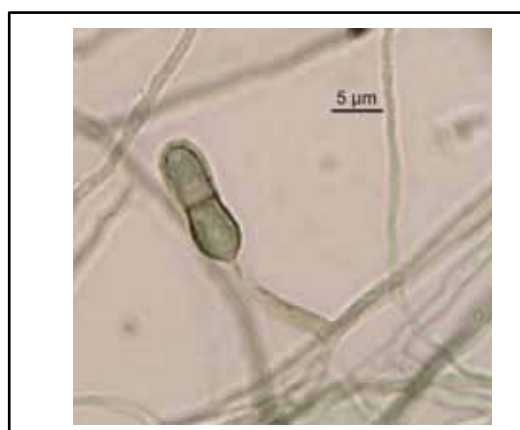
Descrição da amostra:	Fungo filamentoso negro
Código / Origem:	N58 / Bitú de <i>Atta laevigata</i> (Caminhada em ágar YMA)
Identificação:	<i>Verruconis verruculosum</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *Verruconis verruculosum* com 14 dias de crescimento em ágar MEA.

Microscopia:



Conidióforo e conídio de *V. verruculosum*

Caracterização morfológica

Diâmetro da colônia: 3,1 – 3,2 cm

Micélio marrom claro

Conidióforos: simples, sem ramificações, portadores de um único conídio, 8 – 18 µm

Conídios: marrom escuro, parede espessa e rugosa, compostos por duas células, leve constrição mediana (no septo de divisão das células), 3 – 4,5 x 9 - 14 µm

9) Referência Bibliográfica:

SAMERPITAK, K.; VAN DER LINDE, E.; CHOI, H.J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; MACHOUART, M.; GUEIDAN, C.; DE HOOG, G.S. Taxonomy of *Ochroconis*, genus including opportunistic pathogens on humans and animals. *Fungal Diversity*, 2013.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região LSU, região D1/D2 da amostra 58N apresentou 98% e 95% de similaridade com sequências da mesma região das espécies *Ochroconis constricta* e *Verruconis verruculosum*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra 58N no mesmo agrupamento de linhagens da espécie *Verruconis verruculosum*, suportado por um *bootstrap* de 99% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises morfológicas, moleculares e da literatura pertinente a cultura 58N deve ser identificada como *Verruconis verruculosum*.

Observações: T – Linhagem Tipo

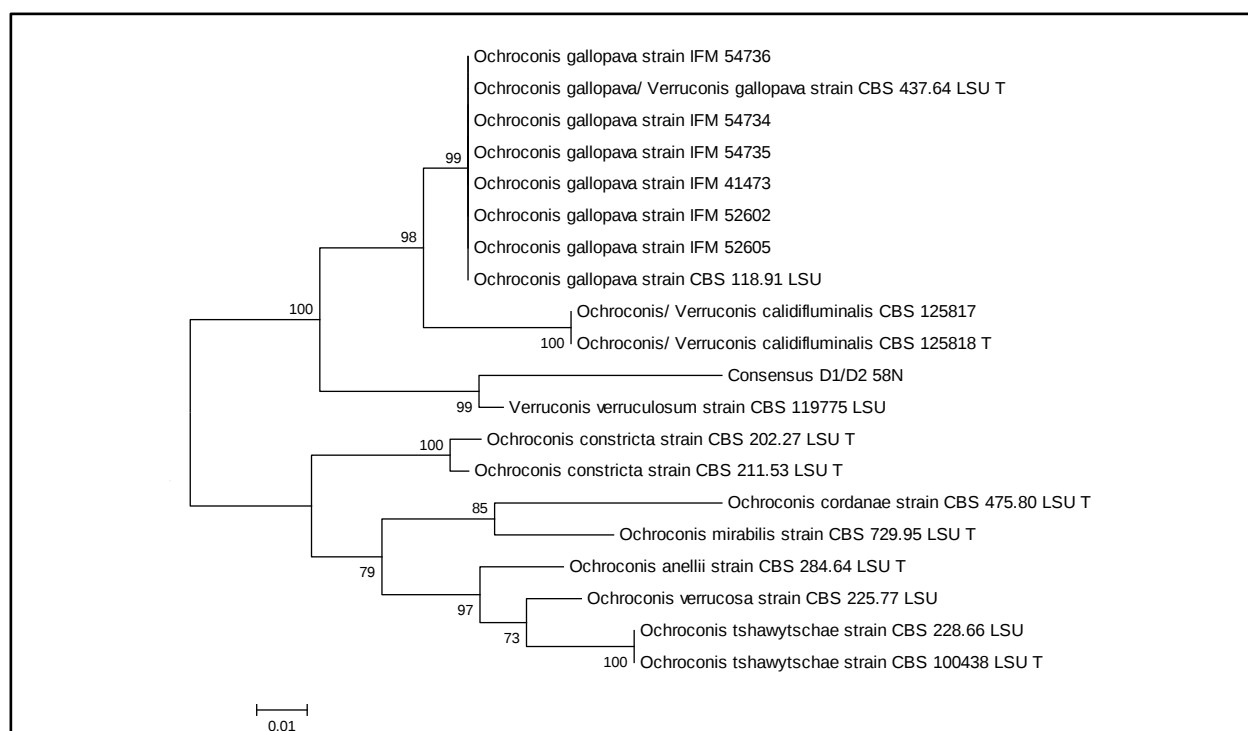


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região LSU (D1/D2) da amostra 58N e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região LSU, região D1/D2 da amostra analisada.

CGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGACGTCTTAGGCGTCCGAGTTGTAATTTG
CAGAGGGAGTCTCGGGTTTAGGACCGGCCCAAGTGCCTTGAACAGGATACCAAAGAGGGTGAGA
GTCCCGTATCCGGCCGGTACCAACGCCCGTGTGAGACCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGAAT
GCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACA
AGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTCAAACAGTACGTGAAATTGTTGA
AAGGGAAGCGTATGTGGGCAGACTTGACCACGGGATTGAGCTCGTCTTCTGGCGGGTGTACTTTCT
CGTGGGCAGGCCAGCATCGGTTTCGGGGGTAAGACAAAGGCGGCGGGAATGTGGCACCCCTTCGGG
GTGTGTTATAGCCCGTCGTGTAATGTTGCCACCTGGGACCCGAGGACCGCGTTTTTACGAGGA

FICHA CATALOGRÁFICA

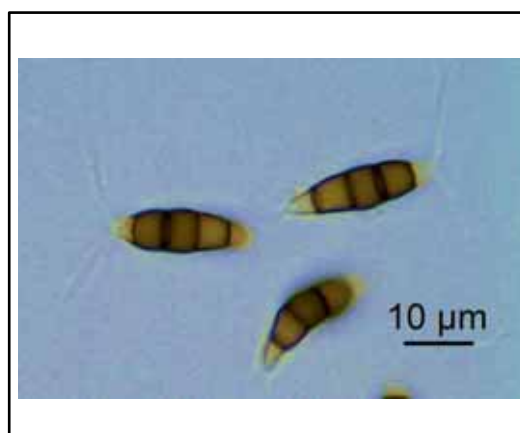
Descrição da amostra:	Fungo filamentoso branco
Código / Origem:	234A / Água de influência de refinaria (<i>Pour plate</i>)
Identificação:	<i>Pestalotopsis mangiferae</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *P. mangiferae* com 7 dias de crescimento em ágar batata (PDA).

Microscopia:



Conídios de *P. mangiferae*.

Caracterização morfológica

Diâmetro da colônia: 9,0cm x 9,0cm

Conídios: compostos por cinco células:

20 – 25µm comprimento x 6 – 6,5µm largura

Célula apical hialina com um apêndice de 4,5 - 5µm comprimento

Célula basal hialina com 2 apêndices de 20 - 25µm comprimento

Células centrais (3) marrom escuro

9) Referência Bibliográfica:

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; GUO, L.D.; CAI, L.; CHUKEATIROTE, E.; WU, W.P.; SUN, X.; CROUS, P.W.; BHAT, D.J.; MCKENZIE, E.H.C.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, n. 56, p. 95 – 129, 2012.

Caracterização molecular e filogenética

A sequência parcial da região ITS do DNA ribossomal da amostra 234A apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Pestalotiopsis mangiferae*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. A análise filogenética recuperou a sequência da amostra 234A no mesmo agrupamento de linhagens da espécie ..., suportado por um *bootstrap* de 100% (Figura 1). Assim, com base nos resultados das análises moleculares e da literatura pertinente a cultura 234A deve ser identificada como *Pestalotiopsis mangiferae*.

Observações:

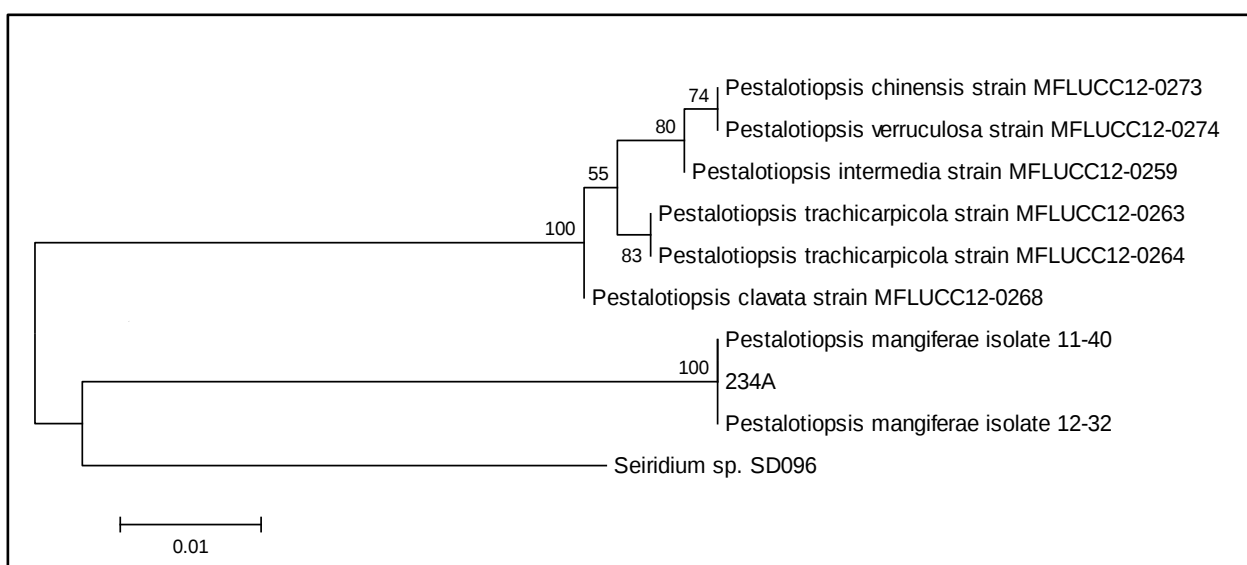


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais da região ITS da amostra 234A e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial da região ITS da amostra analisada.

CCTTTTGTTCCTCGGCAGAAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAACTCTT
GTTATTTTATGTAATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTC
AACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTTCTCTTAGGAGTTGTAGTTCCTGAAATACAAC
GGCGGATTTGTAGTATCCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCCA
GCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC
ATATCAAT