UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.
(Área de concentração: Microbiologia Aplicada)

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE IWATSU et al., (1981) PARA ISOLAMENTO DE LEVEDURAS NEGRAS DO SOLO, DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS.

MARCELA MIURA SATOW

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 de concentração: Microbiologia Aplicada).

Julho - 2008

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE IWATSU et al., (1981) PARA ISOLAMENTO DE LEVEDURAS NEGRAS DO SOLO, DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS.

MARCELA MIURA SATOW

Orientador: Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Co-orientador: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Julho de 2008

A Nossa Senhora
Desatadora dos Nós,
pela graça concedida.
Dedico,

Aos meus pais, Rui e Yayo,
pelo apoio e compreensão
hoje e sempre.

Ofereço,

AGRADECIMENTOS:

- A Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis pela sua amizade, orientação, dedicação e pela oportunidade em conhecer o CBS e a UFPR bem como os profissionais que ali trabalham;

- A Professora Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pela orientação, amizade, ensinamentos, apoio e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

- A Professora Dra. Vânia Aparecida Vicente e família pela amizade, ensinamentos científicos e pessoais e por me acolherem em Curitiba durante minha estada.

- A Isadora B. Kwiatkowski pela acolhida durante minha estada na UFPR e pelos ensinamentos em técnicas moleculares.

- Ao Professor Dr. Roberto Domingos Naves por disponibilizar a infra-estrutura do Centro de Estudos Ambientais (CEA) em Rio Claro, SP para a realização de parte do projeto.

- As técnicas do CEA, Francisca e Eleni, pelo auxílio técnico.

- Ao mestre Alex Fernando de Almeida pela amizade e auxílio na utilização do equipamento Bioscreen C bem como na análise dos dados obtidos.

- Ao Prof. Dr. Sybren de Hoog pela enorme contribuição a este trabalho e pela oportunidade oferecida em estagiar no CBS.

- Ao Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht- Holanda por permitir a realização da parte molecular do projeto em suas dependências.

- Aos colegas do CBS pela colaboração na pesquisa, especialmente Gritt Walther e Bert van den Ende.

- Aos meus pais, Rui Satow e Yayo Miura Satow, e irmã Patricia Miura Satow pela compreensão, apoio, confiança, palavras de incentivo todos esses anos.

- Às minhas tias, sempre presentes, Nana Miura Ikari, Toki Miura, Elisa Emico Miura Bo e Regina Maria Azevedo, pelo carinho, apoio e preocupação.

- Aos meus familiares pelo carinho, preocupação e dedicação.

- Ao meu companheiro Daniel Shin Iti Kimura por estar sempre ao meu lado seja nos bons ou maus momentos.

- À família Kimura por sempre me acolherem bem em seu lar.

- Aos técnicos do departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro: Maria Luiza, Inês, Beto, Fátima e Carmen pela amizade e auxílio laboratorial.

- Aos colegas, funcionários e amigos do Depto. de Bioquímica e Microbiologia pelo agradável convívio.

- Aos estagiários da Profa. Dra. Dejanira, colegas de bancada, pia e câmara fria, pela colaboração, companhia, bom convívio e por manter o espírito de cooperação que reina nestes laboratórios.

- Aos amigos de departamento, pessoas especiais, que lembrarei sempre com muito carinho, pela amizade, companhia, ajuda técnica e pessoal e momentos vividos juntos: Zito, Danilla, Ariane, Fabi, Angela, Guerra, Miriam, Letícia, Barbie e Dani.

- Aos meninos da República do Genaro: César, Alex, Aguinaldo, Tito, Príncipi e Fred pela amizade, companhia e por me acolherem nos momentos de: fome, alegria, comemoração, bem como nos dias em que nem tudo eram flores.

- Aos demais amigos de longe, mas muito especiais: Ceres, Dú, Luzinha, Gustchavo, Xine, Nádia, Quel, Chris, Mahdi, Bene e Ana Cabral.

- A Dra. Márcia Ferreira Murakami pelos ensinamentos de vida que levarei comigo sempre.

- A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

- A FUNDUNESP pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho.

- A REPLAN pelas amostras de solo concedidas.

RESUMO

Fungos do grupo das leveduras negras têm revelado grande potencial em degradar compostos aromáticos como únicas fontes de carbono, capacidade de sobreviver sob atmosferas contendo hidrocarbonetos e habitar nichos com baixa concentração de nutrientes. Apesar do potencial de aplicação destes nas áreas ambiental e industrial, sua ecologia é pouco conhecida e seu isolamento na natureza ainda é difícil. A técnica de flotação em óleo (IWATSU et al., 1981) é aplicada com sucesso para recuperação de leveduras negras provenientes da natureza. No entanto, os mecanismos envolvidos neste método são desconhecidos. Assim, neste trabalho, testaram-se três hipóteses de seleção da técnica: hidrofobicidade celular, assimilação de hidrocarbonetos e oligotrofismo. A metodologia foi aplicada em amostras de solo de "landfarming" da Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN). Cepas isoladas e padrão foram submetidas aos testes para verificação das hipóteses formuladas. A hidrofobicidade celular das cepas foi verificada mediante quantificação da concentração celular da suspensão na fase oleosa após agitação com hidrocarboneto. Os testes de assimilação de hidrocarbonetos e oligotrofismo foram realizados mediante análises de curvas de crescimento obtidas por leituras de absorbância. Os resultados obtidos mostraram que o solo de "landfarming" é um local propício para o estudo de leveduras negras, uma vez que 107 cepas foram recuperadas e a análise molecular revelou uma espécie nova: *Cladophialophora immunda.* O teste de hidrofobicidade indicou que, a hidrofobicidade celular pode não ser o principal fator seletivo, pois espécies hidrofóbicas e hidrofílicas foram recuperadas pela técnica em estudo. A maioria das cepas de leveduras negras testadas apresentou crescimento em meio contendo hidrocarbonetos como fontes únicas de carbono, indicando que a assimilação ou tolerância a estas substâncias são possíveis fatores seletivo do método. Cepas de *Exophiala xenobiotica* apresentaram crescimento em meio pobre em nutrientes e este foi estimulado por adição de hidrocarbonetos, indicando que tais condições podem facilitar o isolamento desta espécie. Os dados obtidos são úteis para a formulação de protocolos específicos para recuperação de determinadas espécies do grupo mediante adaptação da metodologia estudada.

ABSTRACT

Black yeast fungi have shown great potential to degrade aromatic hydrocarbons as single carbon source, ability to survive under atmospheres with hydrocarbons and to live in niches poor in nutrient. Despite the application potential of these fungi in the environmental and industrial areas, the knowledge about their ecology is incomplete and their isolation from nature is still difficult. The oil flotation technique (IWATSU et al., 1981) has been succeed on the black yeast strains recovery from nature, however, mechanisms involved in this method are still unknown. The present study tests three hypothesis on its selective mechanisms: cell surface hydrophobicity, hydrocarbon assimilation and oligotrophism. The methodology was applied in landfarming soil samples from Planalto Paulísta Refinery (REPLAN). Six isolates and control strains were submitted to experiments to verify the hypothesis done. Hydrophobicity was studied through quantification of oil-phase cell concentration after shaking the cell suspension with hydrocarbon. Hydrocarbon assimilation and oligotrophism were verified by analyzing the growth curves obtained with absorbance data. The results showed that landfarming soil has great potential for black yeast isolation, as 107 strains were recovered and a new species – *Cladophialophora immunda*- was revealed by molecular analyzes. Hydrophobicity test showed that cell hydrophobicity could not be the main selective factor, since hydrophobic and hydrophillic strains were recovered. Growth in media with hydrocarbons as sole carbon source was observed in the majority of the tested black yeast strains, indicating that hydrocarbon assimilation or tolerance to these substances could be the selective factors of the method. *Exophiala xenobiotica* was able to grow in the poor media tested, what suggests that this substrate with the addition of hydrocarbons could be used for the isolation of this species. Data obtained could be used to make isolation protocols of specific species.

ÍNDICE

Página

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 PETRÓLEO: CONTEXTO ATUAL. 4

2.2 BIORREMEDIAÇÃO. 5

2.3 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS. 6

2.4 FUNGOS FILAMENTOSOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS 7

2.5 LEVEDURAS NEGRAS. 9

2.5.1 Métodos moleculares. 11
2.5.2 Leveduras negras de fontes naturais. 12
2.5.3 Leveduras negras e hidrocarbonetos. 13

2.6 FLOTAÇÃO EM ÓLEO PARA O ISOLAMENTO DE LEVEDURAS NEGRAS 14

2.6.1 Óleo mineral como fator seletivo. 16
2.6.1.1 Hidrofobicidade. 16
2.6.1.2 Assimilação de hidrocarbonetos. 17
2.6.1.3 Oligotrofismo. 17

3 OBJETIVOS 19

4 MATERIAL E MÉTODOS 20

4.1 MEIOS DE CULTURA 20

4.1.1 Ágar Sabouraud Dextrosado 20
4.1.2 Ágar Sabouraud com Meso-eritritol e Cloranfenicol (“Mycosel”) 20
4.1.3 Meio Batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia Manufactures®) 21
4.1.4 Meio Malte (MEA) 21
4.1.5 Meio de Aveia 21
4.1.6 Meio de Aveia com folha de bananeira 22

4.2 SOLUÇÕES E REAGENTES 22

4.2.1 Solução salina 0,85% 22
4.2.2 Solução de meso-eritritol 22
4.2.3 Solução de cloranfenicol 22
4.2.4 Solução de estreptomicina 23
4.2.5 Solução de Penicilina 23

4.2.6 Meio mineral para assimilação de carbono (YNB) (estoque 10x).....23
4.2.7 Meio mineral para assimilação de carbono (YNB).....23
4.2.8 Óleo Mineral (Vaselina branca).....24
4.2.9 n-Hexadecano.....24
4.2.10 Mistura de Sílica: celite (2:1).....24
4.2.11 Tampão Brometo de Cetil-trimetil-amônia (CTAB).....24
4.2.12 Clorofórmio Merck 2445.....25
4.2.13 Etanol 96%.....25
4.2.14 Etanol 70%.....25
4.2.15 Tampão TE.....25
4.2.16 Solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5M pH 8,0.....25
4.2.17 Solução Tris 1M.....26
4.2.18 Solução Tris 0,05 M pH 8,3.....26
4.2.19 Ácido clorídrico HCl, 1N (Ferak 11448).....26
4.2.20 Solução RNAse.....26
4.2.21 Acetato de sódio 0,01M pH 4,6.....27
4.2.22 Acetato de sódio 3M, pH 4,6.....27
4.2.23 Gel de agarose 1%.....27
4.2.24 Tampão Tris-acetato (TAE) 1x.....27
4.2.25 Tampão de corrida para gel de agarose estoque (TBE 5x).....27
4.2.26 Tampão de corrida para gel de agarose (TBE 0,5x).....28
4.2.27 Brometo de etídio.....28
4.2.28 Tampão para PCR 10x.....28
4.2.29 Ditiotritol (DTT) 1M.....29
4.2.30 Mix dNTP 5mM estoque.....29
4.2.31 Tampão de diluição para DNA polimerase.....29
4.2.32 Solução de DNA polimerase 1U/µL.....29
4.2.33 Tampão de amostra “Loading buffer”.....30
4.2.34 Marcador de peso molecular.....30
4.2.35 Kit de sequenciamento de DNA (Applied Biosystems 4303152).....30
4.2.36 “Primers”.....30

4.3 MÉTODOS.....31

4.3.1 Esterilização.....31
4.3.2 Local de coleta.....31
4.3.3 Coleta de amostras de solo.....32
4.3.4 Análise do solo amostrado.....32
4.3.5 Isolamento de fungos do ambiente.....32
4.3.6 Identificação preliminar e seleção das cepas isoladas.....33
4.3.7 Cepas-padrão utilizadas.....33
4.3.8 Termotolerância.....34
4.3.9 Suspensão de esporos.....34
4.3.10 Teste de hidrofobicidade.....35
4.3.11 Teste de assimilação de óleo mineral e n-hexadecano.....36
4.3.12 Teste de oligotrofismo.....38
4.3.13 Extração de DNA.....39
4.3.14 Amplificação do DNA e reação de seqüenciamento.....40

4.3.15 Seqüenciamento e Identificação das cepas. 41

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....42

5.1 ANÁLISE DO SOLO AMOSTRADO. 42
5.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS. 42
5.3 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS. 45
5.4 TESTE COM MEIOS DE CULTURA PARA MANUTENÇÃO DAS CEPAS. 50
5.5 TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA 53
5.6 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA TESTE DE HIDROFOBICIDADE. 54
5.7 TESTE DE HIDROFOBICIDADE 55
5.8 TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E OLIGOTROFISMO. 57
5.8.1 Teste de assimilação....68
5.8.2 Teste de oligotrofismo....69
5.8.3 Discussão geral dos resultados obtidos nos testes de assimilação de hidrocarbonetos, oligotrofismo e hidrofobicidade celular. 70

6 CONCLUSÕES 73

7 REFERÊNCIAS....75

APÊNDICE 1....80

1 INTRODUÇÃO

Na sociedade moderna, o petróleo é uma das fontes de energia e matéria-prima mais empregadas em infinitas aplicações, impulsionando indústrias e, de certa maneira, o progresso das nações. Apesar de sua grande importância econômica, algumas questões relacionadas têm preocupado a sociedade: acidentes ambientais; os resíduos gerados durante os processos de refino e da combustão de seus derivados; bem como conseqüências relacionadas à saúde da população.

Sabe-se que o petróleo apresenta em sua composição uma fração de hidrocarbonetos aromáticos, que torna sua degradação muito lenta. Diante desse problema, surgiu a biorremediação: técnica que visa a recuperação de áreas contaminadas mediante a degradação do poluente por microrganismos a níveis aceitáveis, a compostos menos tóxicos ou a CO_2 e H_2O (mineralização).

Assim, estudos são realizados visando encontrar espécies microbianas capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos e outros poluentes. Dentre os microrganismos destacam-se os fungos filamentosos, os quais têm demonstrado grande potencial em degradar tais compostos em ambientes terrestres.

Pesquisas em isolamento de cepas fúngicas com potencial de aplicação em tratamento de resíduos de hidrocarbonetos têm relatado com grande freqüência a presença de espécies do grupo das leveduras negras.

Prenafeta-Boldú et al. (2005) em uma revisão bibliográfica sobre sistemática, ecologia e metabolismo de cepas fúngicas assimiladoras de hidrocarbonetos observaram que a maioria dos isolados pertencia às leveduras negras. *Exophiala lecanii-corni*, espécie de levedura negra, foi empregada com sucesso em biofiltros de reatores para eliminação de tolueno. Entretanto, o isolamento de representantes desse grupo provenientes de amostras da natureza ainda é recente, pouco freqüente e difícil.

As dificuldades de recuperação desses microrganismos devem-se ao crescimento lento das cepas, baixa produção de esporos, baixa competitividade com outras espécies de fungos e pouco conhecimento sobre métodos seletivos em ausência de um protocolo específico para esse grupo de fungos.

Uma das metodologias utilizadas no isolamento de leveduras negras da natureza é o método aplicado por Iwatsu et al. (1981). Os autores isolaram cepas de *Phialophora verrucosa* e *Fonsecaea pedrosoi* da natureza no Japão. Outras pesquisas utilizaram esse método com sucesso para isolar leveduras negras de matéria orgânica vegetal, solo natural e solo contaminado com hidrocarbonetos (BADALI et al., no prelo; DE HOOG et al., 2006; DIXON et al., 1980; MARQUES et al., 2006; RICHARD-YEGRES e YEGRES, 1987; VICENTE, 2000; VICENTE et al., 2001).

O método utiliza óleo mineral para realizar uma flotação, concentrando as células de leveduras negras na interfase água-óleo que é posteriormente plaqueada em meio seletivo. Baseando-se neste procedimento pode-se supor que, o mecanismo de hidrofobicidade celular esteja envolvido, concentrando as células desse grupo de fungos na fase oleosa. Outra suposição baseia-se no fato de que diversas espécies de leveduras negras são assimiladoras de hidrocarbonetos aromáticos, fator que pode elevar a concentração de suas células na fase oleosa onde são encontrados tais compostos.

Adaptações da metodologia, incluindo incubação da amostra em meio pobre em nutrientes, demonstraram uma maior facilidade na recuperação de leveduras negras. Estas observações, aliadas à capacidade de sobrevivência de espécies deste grupo em meio oligotrófico, indicam que o oligotrofismo pode ser um fator seletivo da técnica em estudo.

Para elucidar esta questão, este trabalho objetivou testar três hipóteses para a seletividade do método: hidrofobicidade, assimilação e oligotrofismo.

Esta informação será de fundamental importância para a incrementação do método, o qual pode vir a ser recomendado como padrão para a recuperação de cepas com potencial de aplicação industrial e ambiental, além de facilitar a obtenção de novas espécies pertencentes ao grupo, permitindo uma maior elucidação sobre a ecologia, filogenia e evolução destes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Petróleo: contexto atual.

O petróleo é um recurso de origem fóssil, não renovável, empregado para a produção de produtos como: combustíveis, óleos, lubrificantes, plásticos, solventes, parafinas, fertilizantes e compostos químicos, dentre outros (CUNHA, 2004; GARRITZ e CHAMIZO, 2003). Devido à sua ampla gama de utilidades, prevê-se em 2030 uma demanda mundial de 117,6 milhões de barris diários (mb/d); um aumento equivalente a 34 mb/d desde 2005 cuja demanda foi de 83,3 mb/d (OPEC, 2007).

Apesar da grande importância econômica do petróleo, em função dos imensos volumes mobilizados, acidentes têm ocorrido durante os processos de extração, transporte e refino, resultando em inúmeros prejuízos e riscos à saúde. Além disso, restrições ao desenvolvimento urbano, explosões, redução do valor imobiliário da área, contaminação do solo, do lençol freático e de mananciais hídricos e alteração da diversidade biológica da área (microbiana, animal e vegetal) são fatores que devem ser considerados.

Existe também uma crescente preocupação com o armazenamento e descarte adequado de resíduos gerados e quanto à emissão de gases poluentes tóxicos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) para a atmosfera durante o refino do petróleo (CETESB®, 2005; PASCHOA, 2005; SILVA et al., 2002).

Sabe-se que o petróleo, compõe-se de uma mistura de até 98% de hidrocarbonetos como: n-alcanos, isoalcanos, cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos (SOLOMONS e FRYHLE, 2001) e constituintes menores como enxofre, nitrogênio, oxigênio, vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio.

Os compostos aromáticos apresentam maiores riscos à saúde, por possuírem propriedades carcinogênicas, mutagênicas e podem ser cumulativos nos tecidos adiposos de animais. Os anéis aromáticos que formam sua cadeia dificultam a sua degradação fazendo com que estes permaneçam no meio ambiente por longos períodos (CETESB®, 2005). Estas questões preocupantes tornaram-se uma grande motivação para a busca de soluções alternativas para a recuperação do meio ambiente.

2.2 Biorremediação.

Em busca de formas de recuperação das áreas contaminadas e de procedimento adequado aos resíduos gerados, surgiu a biorremediação, técnica caracterizada por baixos custos estruturais e de operação, sem utilização de água tratada e nem de produtos químicos nocivos ao meio ambiente. Entretanto, o processo é lento e, freqüentemente, faz-se necessário o isolamento da área contaminada.

A biorrremediação baseia-se na capacidade dos microrganismos em degradar compostos com estruturas moleculares complexas a outras mais simples (biodegradação). Assim, compostos poluentes e/ou tóxicos como hidrocarbonetos aromáticos, agrotóxicos e outras substâncias são degradadas a: a) substâncias com peso molecular menor, b) com maior polaridade, c) CO_2 e H_2O (mineralização), d) a substâncias menos nocivas ao ambiente ou e) suas concentrações são reduzidas a níveis aceitáveis pelos órgãos de saúde, propiciando a recuperação da área contaminada. Portanto, pode-se dizer que a biorremediação visa recuperar áreas contaminadas mediante a biodegradação de poluentes.

A biorremediação promove a biodegradação das substâncias contaminantes basicamente de duas formas: estimulando o crescimento da população microbiana nativa fornecendo nutrientes como: nitrogênio, fósforo e oxigênio ou inoculando

microrganismos alóctones capazes de degradar o contaminante. (FURTADO, 2004; PELCZAR et al., 1996; ROSATO, 1997; TORTORA et al., 2003).

Alguns aspectos devem ser considerados para o emprego da técnica em questão: identificação e caracterização do poluente (qual a disponibilidade deste no ambiente e acessibilidade à ação microbiana ou enzimática); estudo da microbiota local, verificando a presença de organismos capazes de degradar o poluente e quais as condições climáticas e nutritivas favoráveis ao crescimento destes; quantificação dos nutrientes disponíveis no ambiente; estudo prévio das prováveis rotas metabólicas e dos metabólitos secundários gerados pela biodegradação do poluente (que podem ter uma toxicidade maior que a substância inicial); tempo requerido para que ocorra todo o processo; e fatores econômicos (MARTINS et al., 2005; AMBIENTE BRASIL, 2005).

2.3 Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.

Devido ao papel essencial desempenhado pelos microrganismos no processo de biorremediação e a problemática relacionada aos acidentes com derivados do petróleo, uma série de estudos tem sido realizada visando o isolamento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001; NAVARRETE, 2006; PRENAFETA-BOLDÚ, 2002; SATOW, 2005).

Estes microrganismos são recuperados de ambientes ricos em hidrocarbonetos como: biofiltros para tratamento de tolueno (WOERTZ et al., 2001), reservatório de refinaria de petróleo, tanques combustíveis (CAMPBELL, 1977; LACAZ et al., 1970), solos destinados ao tratamento de hidrocarbonetos (DE HOOG et al., 2006; KATAOKA, 2001; SATOW, 2005), lagoas de estabilização (CONCEIÇÃO et al., 2005).

Segundo Rosato (1997), bactérias, cianobactérias, algas, leveduras, fungos filamentosos e protozoários apresentam espécies capazes de degradar hidrocarbonetos. A maioria desses microrganismos é mesófila e aeróbia, uma vez que a degradação de hidrocarbonetos envolve uma reação de oxidação e o metabolismo desses compostos ocorre numa faixa de temperatura entre 30 ºC e 40 ºC.

2.4 Fungos filamentosos degradadores de hidrocarbonetos

Dentre os microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos, os fungos se destacam por apresentarem um conjunto de características que favorecem o seu emprego em relação às bactérias: grande diversidade de cepas em ambientes terrestres; maior tolerância a estresse osmótico e variação de temperatura; capacidade de viver em meios com pH ácido (pH 5,5); 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, por não apresentarem restrição quanto ao tamanho da cadeia do hidrocarboneto a ser degradada (ROSATO, 1997; TORTORA et al., 2003).

Diversos estudos foram realizados visando o isolamento de cepas fúngicas com potencial para a biorremediação de áreas contaminadas ou para tratamento de resíduos contendo hidrocarbonetos aromáticos (CONCEIÇÃO, 2003; KATAOKA, 2001; PRENAFETA BOLDÚ, 2002; PRENAFETA BOLDÚ et al., 2005; SATOW, 2005).

Davies e Westlake (apud KATAOKA, 2001) isolaram fungos dos gêneros *Penicillium*, *Verticillium*, *Beauveria*, *Mortierella* e *Phoma* capazes de crescer em presença de tolueno, n-tetradecano, naftaleno e outros tipos de resíduo de petróleo. Hofrichter et al. (1933) (apud CONCEIÇÃO, 2003) isolaram algumas cepas de *Penicillium* sp. capazes de sobreviver a concentrações de fenol superiores à 1500mg/L. Satow (2005) isolou espécies fúngicas capazes de sobreviver a concentrações de 1,88 x 10^{-4} mol/L de fenol: *Aspergillus fumigatus* Fres.; *Fusarium* cf. *moniliforme* Sheld.; *Fusarium* cf. *oxysporum* (Schlecht) Sny. e Hans. *Penicillium purpurogenum* Stoll; *Trichoderma pseudokoningii* Rifai; *Trichoderma* Harz; e de 4,41 x 10^{-6} mol/L naftaleno: *Aspergillus niger* van Tieghem, *Fusarium* Link ex Fr., *Penicillium purpurogenum* Stoll; *Penicillium* Link ex Fr. *Trichoderma koningii* Oudem.; *Trichoderma* Harz.

Os fungos, de modo geral, promovem degradação de compostos aromáticos basicamente de três modos: a) por reações de transformações parciais; b) mineralização do hidrocarboneto em presença de um segundo substrato; c) utilização do hidrocarboneto como única fonte de carbono para crescimento.

Os processos de transformações parciais ocorrem mediante detoxificação de xenobióticos via sistema enzimático citocromo P-450 monoxigenase. Esta via metabólica encontra-se em ascomicetos da ordem *Xylariales* e basidiomicetos da ordem *Aphyllophorales*. No processo, ocorre oxidação do anel aromático por monoxigenases formando óxidos arenos (epóxidos). Estes compostos podem sofrer ação das enzimas epóxido hidrolases convertendo-se a trans-diidrodióis, ou um dos anéis pode ser rearranjado não enzimaticamente a fenol e ser conjugado, originando compostos como o-glicosídeos e o-glicoronídeos. O processo de oxidação e conjugação dos compostos fenólicos aumenta a solubilidade do poluente, facilitando a recuperação da área contaminada. Entretanto, dentre as substâncias geradas existem metabólitos oxidados como, por exemplo, o benzo-pireno, que podem reagir com o DNA dos organismos apresentando assim, potencial carcinogênico, característica não desejada nos processos de biorremediação.

A mineralização de hidrocarbonetos foi observada em fungos da podridão branca mediante co-metabolismo dessas substâncias. O processo envolve peroxidades extracelulares e enzimas secundárias como lacases e monoxigenases P-450, enzimas não específicas que atuam na degradação da lignina (polímero aromático complexo) e, conseqüentemente, também agem na decomposição de compostos aromáticos. Para que ocorra a degradação destes, é necessária a presença de outros substratos, como por exemplo, a celulose, que atua como fonte de carbono, já que tanto a lignina como os compostos aromáticos não são utilizados como fontes únicas de carbono. Esse processo apresenta desvantagens para sua aplicação na biorremediação: baixas taxas de degradação; necessidade de um co-substrato e acumulação de substâncias intermediárias tóxicas (ATLAS e CERNIGLIA, 1995; PRENAFETA-BOLDÚ, 2002; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2005; ROSATO, 1997).

A assimilação de hidrocarbonetos aromáticos como únicas fontes de carbono e energia, especialmente quando resulta em mineralização dos compostos, constitui a forma de biodegradação ideal para a biorremediação de áreas. Cepas fúngicas capazes de realizar este tipo de via metabólica foram isoladas de solos contaminados e de biofiltros para tratamento de gases tóxicos (PRENAFETA-BOLDÚ, 2001; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2005; WOERTZ et al., 2001). Fungos dos gêneros

Paecilomyces, *Verticillium*, *Beauveria* e *Penicillium* são capazes de assimilar alquilbenzenos com longas cadeias. *Exophiala jeanselmei*, *Clonostachys rosea* e *Penicillium* sp. apresentam crescimento estimulado por adição de hidrocarbonetos aromáticos. Assimilação de tolueno e etilbenzeno como únicas fontes de carbono e energia foi observada em *Cladophialophora* sp. cepa T1 (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002).

Observando o aumento do número de cepas fúngicas assimiladoras de hidrocarbonetos, Prenafeta-Boldú et al. (2005) fizeram uma revisão da biossistemática, ecologia e metabolismo destes a partir de pesquisas publicadas, constatando que a minoria dos isolados encontrava-se distribuída em quatro famílias de três ordens de ascomicetos: Pseuderotiaceae; Trichocomaceae (ordem Eurotiales, classe *Eurotiomycetes*); Bionectriaceae (ordem Hypocreales, classe *Sordariomycetes*) e Ophiostomataceae (ordem Ophistomatales, classe *Sordariomycetes*). Entretanto, a maioria das cepas com capacidade para a degradação de hidrocarbonetos enquadrou-se à ordem Chaetothyriales, classe *Chaetothyriomycetes*, gêneros *Cladophialophora* e *Exophiala*, ambas do grupo das leveduras negras.

Prenafeta-Boldú et al., (2002) observaram o crescimento da cepa *Cladophialophora* sp. T1 (= ATCC MYA-2335) proveniente do solo em uma fração de gasolina contendo benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno (BTEX), sendo capaz de degradar os componentess por assimilação e cometabolismo.

2.5 Leveduras negras.

As leveduras negras, conhecidas mundialmente como “Black yeast” formam um grupo artificial de fungos heterogêneos quanto à taxonomia e filogenia. Este grupo abrange membros de ascomicetes das ordens Chaetothyriales e Dothideales e representantes basidiomicetos. Os últimos estão restritos ao gênero *Moniliella* e são caracterizados pela capacidade de fermentar glicose e pela freqüente ocorrência de artroconídios retangulares.

A ordem Chaetothyriales apresenta patógenos e oportunistas humanos causadores da cromoblastomicose e outras doenças, bem como cepas sapróbias e de ambientes ricos em hidrocarbonetos (MARQUES et al., 2006; VICENTE, 2000; VICENTE et al., 2001). Os representantes desse grupo concentram-se na família *Herpotrichiellaceae*, nos gêneros: *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinocladiella*, *Cyphellophora*, *Heteroconium*, *Veronaea* (DE HOOG, comunicação pessoal).

Na ordem Dothideales, existem espécies de leveduras negras dos gêneros *Aureobasidium*, *Hormonema* e *Hortaea*. Estes fungos encontram-se associados a plantas e espécies sapróbias (DE HOOG et al., 2004; STERFLINGER et al., 2001).

Leveduras negras e espécies relacionadas são caracterizadas por apresentar colônias de coloração escura assim como o reverso desta, com crescimento lento em meios de cultura tradicionais. Algumas espécies são dimórficas, com crescimento leveduriforme e filamentoso dependendo do meio de cultivo e do tempo de incubação. Microscopicamente, apresentam células vegetativas e reprodutivas com paredes celulares melanizadas, como característica geral (STERFLINGER, 2006; VICENTE, 2000). Em algumas espécies pode ocorrer a formação de células filhas semelhante às leveduras, melanizadas e com brotamento multilateral ou polar em qualquer estágio de seu ciclo de vida (DE HOOG et al., 2000; STERFLINGER, 2006). As células filhas podem estar encapsuladas por uma matriz de substâncias poliméricas.

A plasticidade morfológica das espécies desse grupo e a pouca diferenciação das estruturas conidiais, com possíveis variações de tamanho e formato na maioria das espécies, dificultam a determinação da classificação taxonômica mediante análise morfológica. Assim, métodos de biologia molecular são empregados para tal (ATTILI et al., 1998; DE HOOG, 1999; STERFLINGER e PRILLINGER, 2001 VICENTE, 2000).

2.5.1 Métodos moleculares.

A biologia molecular tem sido amplamente utilizada para o estudo da biodiversidade de fungos, contribuindo com dados precisos para taxonomia, principalmente nos grupos de microrganismos com pouca diferenciação morfológica, como ocorre com o grupo das leveduras negras. Dados obtidos por métodos moleculares também permitem a construção de árvores filogenéticas mais precisas, auxiliando a elucidação da ecologia e evolução destes microrganismos (STERFLINGER, 2006; VICENTE, 2000).

Estudos taxonômicos das leveduras negras utilizam a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) que consiste na amplificação de fragmentos específicos de DNA. Para fungos, realiza-se a PCR de regiões do DNA ribossomal (DNAr), caracteristicamente repetitivo, situado em regiões específicas do genoma e presente em altas proporções em relação ao conteúdo total de DNA da espécie.

O DNAr contém repetições que consistem em pequenas subunidades (SSU; 18S); uma região interna que é transcrita (ITS1); 5.8S; outra região interna que é transcrita (ITS2) e uma grande subunidade (LSU, 26S). Estas repetições estão separadas por regiões não transcritas. As regiões 26S, 18S e 5.8S geralmente não apresentam variação de seqüência, no entanto, há variações nas regiões internas que são transcritas (ITS). Assim, dados gerados pelo seqüenciamento da região ITS têm sido amplamente utilizados para estudos de filogenia e evolução, bem como para identificação de espécies (PROTOCOL ONLINE). No caso das leveduras negras, o seqüenciamento da região ITS1 é aplicado para identificação das espécies, enquanto o da região SSU para classificação dos microrganismos em nível de classes (STERFLINGER, 2006).

Realiza-se a PCR de fragmentos do DNAr com um par de primers que delimitam o fragmento de DNA a ser amplificado mediante uma enzima DNA polimerase. A amplificação ocorre por um repetitivo ciclo de desnaturação, polimerização e renaturação mediante alteração de temperatura em um termociclador. O par de primers a ser utilizado depende de qual fragmento a ser amplificado, do microrganismo e da análise a ser realizada (TORTORA et al., 2006; VICENTE, 2000).

Para leveduras negras, as análises moleculares indicadas são as do seqüenciamento das regiões SSU, ITS, "elongation factor" 1-alpha (EF1α), β tubulina e actina (BADALI et al., 2007; ZENG et al., 2006). Entretanto, Zeng et al. (2006) ao analisarem as seqüências ITS, Elongation factor 1- alpha (EF1-α), β tubulina e actina de 156 cepas da clade de *E. spinifera* concluíram que os dados das seqüências ITS são confiáveis para a reconstrução filogenética e identificação das espécies desta clade, não sendo necessária a análise de tantas seqüências obtidas com diferentes primers para a identificação à nível de espécie.

A biologia molecular tem se mostrado essencial ainda para esclarecer a taxonomia, ecologia e filogenia das leveduras negras, como por exemplo, as variantes da espécie *Exophiala jeanselmei* que, após análise dos dados obtidos pelo seqüenciamento das regiões: SSU, ITS, citocromo mitocondrial B e análise do DNA mitocondrial por RFLP, foram divididas em diferentes espécies conhecidas como *E. heteromorpha, E. lecanii-corni, E. jeanselmei* (DE HOOG et al., 2006).

2.5.2 Leveduras negras de fontes naturais.

O conhecimento sobre a distribuição das leveduras negras na natureza ainda é incompleto e as pesquisas nessa área são raras (MARQUES et al., 2006). A maioria das pesquisas realizadas visando o isolamento de cepas de leveduras negras da natureza busca descobrir a fonte dos agentes causadores de doenças como a cromoblastomicose, doença causada por espécies da família Herpotrichiellaceae (ATTILI et al., 1998; IWATSU et al., 1981; MARQUES et al., 2006; VICENTE, 2000). No entanto, o uso de técnicas seletivas tem revelado a presença de espécies ambientais em maior quantidade do que previsto no início das pesquisas (BADALI et al., no prelo).

Atualmente, há registros da ocorrência de leveduras negras em regiões de clima tropical, subtropical (McGINNIS, 1992 apud VICENTE, 2000) e semi-árido (STERFLINGER, 2006). Estes microrganismos são capazes de habitar uma grande variedade de nichos como solo, plantas em decomposição, cascas de árvores, em espinhos e frutos, matéria orgânica em decomposição (IWATSU et al, 1981; VICENTE,

2000), tecidos, equipamentos metálicos, água marinha, rochas, telhas, arenito, desertos, mármore, vidro, sistemas de ar condicionado, ambientes de banho e sauna (STERFLINGER, 2006). Além disso, foram também encontradas em peixes, animais de sangue frio e como patógeno ou oportunistas de humanos (UIJTHOF, 1996).

Embora existam muitas diferenças entre os inúmeros habitats das leveduras negras, notou-se que todos apresentam alguma condição especial como: pouca disponibilidade de nutrientes; presença de compostos aromáticos, elevadas temperaturas, radiação ultravioleta (UV), estresse osmótico ou combinações desses fatores (STERFLINGER, 2006).

2.5.3 Leveduras negras e hidrocarbonetos.

Estudos recentes têm observado a presença de leveduras negras em ambientes ricos em hidrocarbonetos derivados do petróleo tais como: biofiltros para tratamento de tolueno (WOERTZ et al., 2001), solo contaminado com óleo; solo poluído com gasolina; madeira tratada com conservantes fenólicos e madeira de ferrovias contaminada com creosoto (DE HOOG et al., 2006; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2005). De Hoog et al. (2006) supõe que a presença de hidrocarbonetos aromáticos na amostra seja favorável ao crescimento de espécies de leveduras negras. Os mesmos autores observaram que cepas ambientais de *Exophiala xenobiotica* são freqüentemente isoladas de habitats ricos em hidrocarbonetos monoaromáticos e alcanos. Diversas pesquisas demonstraram que as leveduras negras apresentam potencial em degradar hidrocarbonetos monoaromáticos e xenobióticos (MIDDELHOVEN et al., 1989; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2005; WOERTZ et al., 2001). Há relatos da aplicação de cepas de leveduras negras em biorreatores para tratamento de gases contendo hidrocarbonetos aromáticos.

Woertz et al., (2001) utilizaram *Exophiala lecanii-corni* em biofiltro para remoção de tolueno em um biorreator de fase gasosa e obtiveram a capacidade de eliminação (máxima) de $270 gm^{-3}h^{-1}$, de 2 a 7 vezes maior que em sistemas bacterianos. Os autores observaram que o reator continuou operando sob uma variedade de

condições ambientais adversas incluindo flutuação de pH, ressecamento e realimentação brusca.

A espécie *Exophiala jeanselmei* foi capaz de utilizar uma variedade de compostos aromáticos como fontes de carbono e energia incluindo uretanos, estireno, fenol, e outros compostos benzênicos (MIDDELHOVEN, 1991; WOERTZ et al., 2001).

Diversas cepas de leveduras negras isoladas de rochas conseguiram degradar hidrocarbonetos como os do óleo diesel, gasolina, querosene e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (STERFLINGER resultado ainda não publicado apud STERFLINGER, 2006).

Sterflinger e Prillinger (2001) atribuíram, o aparecimento de leveduras negras em rochas na cidade de Viena ao aumento dos níveis de poluição orgânica do ar em ambientes urbanos como: hidrocarbonetos aromáticos, poliaromáticos e ácidos graxos liberados por indústrias de alimentos, os quais se fixam nas rochas constituindo uma fonte de carbono para esses microrganismos.

Prenafeta- Boldú et al. (2004) observaram que a cepa de *Cladophialophora* sp. T1 foi capaz de degradar etilbenzeno e tolueno, bem como metabolizar xileno apresentando assim, potencial de aplicação na biorremediação de solos, principalmente aqueles com pH baixo, fator que inibe o crescimento da microbiota local, especialmente as bactérias.

2.6 Flotação em óleo para o isolamento de leveduras negras.

Embora as leveduras negras estejam presentes em uma grande diversidade de ambientes, seu isolamento apresenta muitas dificuldades. Sabe-se que estes fungos apresentam crescimento lento em meios pré-definidos, assim, o rápido crescimento micelial de outras espécies pode mascarar o crescimento das colônias das leveduras. Além disso, a baixa produção de esporos diminui as possibilidades de isolamento quando a amostra é diluída antes de ser plaqueada. A existência de poucos estudos sobre o isolamento de espécies deste grupo provenientes da natureza e a dificuldade no

reconhecimento e identificação dessas também devem ser considerados (DE HOOG, 1999; DIXON et al., 1980; STERFLINGER, 2006).

As leveduras negras provenientes da natureza são isoladas com sucesso mediante a aplicação do método seletivo de flotação em óleo, adaptado por Iwatsu et al. (1981). A metodologia de flotação em óleo foi desenvolvida por Smith e Furcolow em 1964 para o isolamento de *Histoplasma capsulatum* de amostras de solo. Iwatsu et al. (1981) adaptaram a técnica para o isolamento de leveduras negras adicionando cicloheximida e cloranfenicol na realização da suspensão com solo e ao meio de cultura da metodologia, simplificaram a metodologia e eliminaram a etapa de inoculação da suspensão em camundongos.

O método adaptado por Iwatsu et al. (1981) constitui-se de uma incubação da amostra em 100 mL de solução salina contendo: 200 U/mL de penicilina; 200µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de cicloheximida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, 20 mL de óleo mineral é adicionado ao frasco e vigorosamente agitado durante 5 minutos. O frasco é deixado em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Alíquotas da interfase água-óleo são plaqueadas em meio Sabouraud dextrosado com os mesmos antibióticos utilizados na solução e estas são incubadas à 27 ou 37 °C até o aparecimento de colônias de coloração escura.

Na pesquisa realizada por Iwatsu et al. (1981) foram isoladas cepas de *Phialophora verrucosa* e *Fonsecaea pedrosi* de solo, madeira em decomposição e outros compostos vegetais no Japão. Vicente et al. (2001) isolaram do Centro Nacional de Pesquisas de Florestas/EMBRAPA, Colombo, PR, Brasil 17 espécies desta família em amostras de solo e de material vegetal utilizando este método. De Hoog et al. (2006) isolaram e descreveram uma nova espécie, *Exophiala xenobiotica* proveniente de solos contaminados com compostos aromáticos voláteis aplicando a mesma técnica. O método mostrou-se eficiente também para isolamento de leveduras negras de amostras de coco, folhas e material vegetal de babaçu em decomposição (MARQUES et al., 2006). Assim, observa-se que a aplicação bem sucedida dessa metodologia tem crescido nos últimos anos.

Adaptações desta metodologia são realizadas em estudos de espécies patogênicas de leveduras negras de origem ambiental, como por exemplo, a inoculação de alíquotas de suspensão da amostra em ratos e posterior isolamento (DIXON et al., 1980).

2.6.1 Óleo mineral como fator seletivo.

A metodologia de Iwatsu et al (18981) realiza uma flotação em óleo mineral, diferente de outras técnicas aplicadas para recuperação de leveduras negras do ambiente. Esta substância parece ser fundamental para o sucesso da técnica, uma vez que permite a formação de fases distintas na suspensão concentrando células de leveduras negras na interfase água-óleo (SMITH e FURCOLOW, 1964).

Assim, duas hipóteses sobre os mecanismos seletivos do óleo mineral foram formuladas e testadas neste trabalho: hidrofobicidade celular, assimilação de hidrocarbonetos.

2.6.1.1 Hidrofobicidade.

Göttlich et al. (1995) verificaram que *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura e Miyaji apresentou hidrofobicidade da superfície celular com n-hexadecano e que tal condição se manteve durante todos os estágios de seu desenvolvimento numa taxa variável de 94 a 98%. A hidrofobicidade celular foi também verificada em *Exophiala dermatitidis* e *E. jeanselmei* que apresentaram, respectivamente, 63% e 37% de taxa de hidrofobicidade. Estes resultados mostram diferenças de taxas de hidrofobicidade celular entre as espécies de leveduras negras.

No método em estudo, retira-se a alíquota da suspensão a ser plaqueada da interfase água e óleo, talvez facilitando a recuperação de leveduras negras. Assim, pode-se supor que o sucesso da metodologia deva-se à concentração das células na fase oleosa. A hidrofobicidade celular poderia ser o mecanismo seletivo da técnica,

agregando células desse grupo de fungos na fase oleosa por apresentar maior afinidade com o óleo mineral. As células hidrofóbicas seriam, desta forma, repelidas da fase aquosa, mantendo-se na fase oleosa.

2.6.1.2 Assimilação de hidrocarbonetos.

Como exemplificado no item 2.5.3 "Leveduras negras e hidrocarbonetos", sabe-se que muitos fungos do grupo das leveduras negras degradam hidrocarbonetos aromáticos, e vêm sendo isoladas com freqüência de ambientes que apresentam abundância deste composto. Acredita-se que, o hidrocarboneto possa agir de duas formas na seleção desses microrganismos: a) como fator de enriquecimento, sendo assimilado como fonte de carbono; b) inibindo o crescimento de outras espécies fúngicas pela sua toxicidade (DE HOOG et al., 2006; PRENAFETA-BOLDÚ, 2002; WOERTZ et al., 2001). No caso do óleo mineral, constituído por uma mistura de hidrocarbonetos com propriedades atóxicas, este pode favorecer o isolamento de leveduras negras como um fator de enriquecimento para estas espécies (DIXON e SHADOMY, 1980).

Observações empíricas indicam que um período prolongado de incubação da amostra em óleo mineral e solução salina com antibióticos, favorece a recuperação de um maior número de isolados do grupo de interesse (VICENTE, V.A. comunicação pessoal). Provavelmente, durante a incubação, haja uma seleção dos microrganismos capazes de assimilar o óleo mineral como fonte de carbono e sobreviver com quantidades escassas de nitrogênio e outros nutrientes (restritas ao existente na amostra e derivadas da morte celular de microrganismos por antibióticos).

2.6.1.3 Oligotrofismo.

Em conseqüência à hipótese anterior, outro suposto fator de seletividade envolvido na metodologia seria que as leveduras negras conseguem crescer com baixas concentrações de nitrogênio e nutrientes como a solução da técnica em estudo composta

de amostra ambiental, solução salina, antibióticos e óleo mineral. O oligotrofismo foi observado em algumas espécies de leveduras negras como, por exemplo: *Exophiala dermatitidis* isoladas de saunas à vapor (STERFLINGER, 2006). As outras espécies (não oligotróficas) teriam seu crescimento debilitado devido à insuficiente concentração de nutrientes. Assim, após um período de incubação, as leveduras negras seriam predominantes no meio e a probabilidade de isolamento destas seria alta.

3 OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivos gerais:

- Avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o óleo mineral empregado no método de Iwatsu et al., (1981) favorece a seleção de leveduras negras;
- Verificar a possibilidade de se propor a técnica de Iwatsu et al., 1981 como metodologia padrão para o isolamento de leveduras negras.

Assim, para alcançá-lo os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Isolar fungos do grupo das leveduras negras de solo contaminado com hidrocarbonetos derivados do petróleo, utilizando-se o método em estudo;
- Identificar a nível molecular as cepas isoladas;
- Verificar a termotolerância dos isolados;
- Verificar a hidrofobicidade celular de cepas padrão e de cepas do grupo em estudo;
- Verificar a produção de biomassa de leveduras negras em óleo mineral e n-hexadecano como únicas fontes de carbono utilizando método turbidimétrico automatizado – Labsystem Bioscreen C;
- Verificar o oligotrofismo como fator seletivo do método em estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultura

4.1.1 Ágar Sabouraud Dextrosado

Dextrose	40,0 g
Neopeptona	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH final igual a 7,0 com NaOH 1N ou HCl 1N* e esterilizado a 1 atm, 121 ºC por 15 minutos.

*Procedimento realizado para ajuste de pH de todos os meios de cultura.

4.1.2 Ágar Sabouraud com Meso-eritritol e Cloranfenicol (“Mycosel”)

Dextrose	20,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	20,0 g
Meso-eritritol	500,0 mg
Cloranfenicol	200,0 mg
Estreptomicina	200,0 mg
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado a 1 atm, 121 ºC por 15 minutos e resfriado até 60 °C, acrescentando os antibióticos previamente dissolvidos e esterilizados em membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro.

4.1.3 Meio Batata dextrose ágar (BDA) (Acumedia Manufactures®)

Infusão de batata desidratada	4,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,6 e esterilizado a 1atm, 121 ºC por 15 minutos.

4.1.4 Meio Malte (MEA)

Extrato de Malte	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glicose	20,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,5 e esterilizado a 1atm, 121 ºC por 15 minutos.

4.1.5 Meio de Aveia

Aveia em flocos	30,0 g
Ágar	13,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A aveia em flocos foi fervida com água destilada por 1 hora, filtrada em gaze e o volume completado para 1000 mL. Em seguida, o meio foi autoclavado por 15 minutos à 121 ºC e 1 atm.

4.1.6 Meio de Aveia com folha de bananeira

Folha de bananeira

Água destilada

Meio de Aveia

A folha de bananeira, cortada em quadrados de 0,5 x 0,5 cm, foi embebida em água destilada e autoclavada 2 vezes por 15 minutos à 121 ºC e 1 atm para eliminação dos microrganismos endofíticos. Três ou quatro quadrados de folha foram distribuídos sobre o meio de aveia sólido previamente vertido em tubos de cultura (16 x 160 mm) e cerca de 10 unidades para cada placa de Petri.

4.2 Soluções e reagentes

4.2.1 Solução salina 0,85%

NaCl	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121 ºC e 1 atm.

4.2.2 Solução de meso-eritritol

Meso-eritritol	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20 ºC.

4.2.3 Solução de cloranfenicol

Cloranfenicol	1,0 g
Álcool 95 °GL q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20 ºC.

4.2.4 Solução de estreptomicina

Estreptomicina	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20 ºC.

4.2.5 Solução de Penicilina

Penicilina	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20 ºC.

4.2.6 Meio mineral para assimilação de carbono (YNB) (estoque 10x)

"Yeast Nitrogen Base" (YNB) (DIFCO)	6,5 g
Água destilada estéril q.s.p.	100 mL

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a 4 ºC.

4.2.7 Meio mineral para assimilação de carbono (YNB)

Solução estoque YNB 10X	1 mL
Água destilada estéril q.s.p.	9 mL

4.2.8 Óleo Mineral (Vaselina branca)

Óleo mineral (União Química Farmacêutica Nacional S/A)

O óleo mineral foi esterilizado em membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro.

4.2.9 n-Hexadecano

n- Hexadecano (Sigma H-0255)

O n-hexadecano foi esterilizado em membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 µm de diâmetro.

4.2.10 Mistura de Sílica: celite (2:1)

Sílica gel (Merck 7736)

Celite (545 Macherey, Nagel e Co.)

4.2.11 Tampão Brometo de Cetil-trimetil-amônia (CTAB)

Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	2,42 g
Cloreto de sódio	8,2 g
Na-EDTA (Titriplex III Bio Rad 161-0729)	0,74 g
CTAB	2,0 g
Água ultra pura q.s.p.	100 mL

Os sais foram diluídos em 80 mL de água ultra pura e o pH ajustado para 7,5 com HCl 1N. A solução foi aquecida para dissolver o Na-EDTA e o CTAB. O volume foi completado para 100 mL com água ultra pura. O tampão foi autoclavado por 15 minutos, 1 atm, 121 ºC e guardado em temperatura ambiente.

4.2.12 Clorofórmio Merck 2445

4.2.13 Etanol 96%

Refrigerado a -20 ºC.

4.2.14 Etanol 70%

Etanol 96%	350 mL
Água ultra pura	150 mL

Refrigerado a -20 ºC

4.2.15 Tampão TE

Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	0,12 g
Na-EDTA (Titriplex III Bio Rad 161- 0729)	0,04 g
Água ultra pura q.s.p.	100 mL

Os sais foram diluídos em 80 mL de água ultra pura e o pH ajustado para 8,0 com HCl 1N. O volume foi completado para 100 mL com água ultra pura. O tampão foi autoclavado por 15 minutos, 1 atm, 121 ºC e guardado em temperatura ambiente.

4.2.16 Solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M pH 8,0

Na-EDTA (Titriplex III Bio Rad 161- 0729)	186,1 g
Água ultrapura q.s.p.	800 mL

Adicionou-se Na-EDTA a água ultra pura e misturou-se com auxílio de agitador magnético. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH (± 20g NaOH em “pellet”) e a solução foi autoclavada.

4.2.17 Solução Tris 1 M

Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	121,1 g
Água ultra pura q.s.p.	1000 mL

Dissolveu-se Tris(hidroximetil)-aminometano em 800 mL de água ultra pura. Ajustou-se o pH para 7,4 ou 8,0 com HCl 1N. Completou-se o volume para 1000 mL com água ultra pura.

4.2.18 Solução Tris 0,05 M pH 8,3

Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	6,05 g
Água ultra pura q.s.p.	1000 mL

Tris(hidroximetil)-aminometano foi dissolvido em 500 mL de água ultra pura. Ajustou-se o pH para 8,3 com HCl 1N. Completou-se o volume para 1000 mL com água ultra pura.

4.2.19 Ácido clorídrico HCl, 1N (Ferak 11448)

4.2.20 Solução RNAse

RNAse pancreática 20 U/mg (Merck 24570)	10 g
Acetato de sódio 0,01M pH 5,2	1 mL
Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	100 µl

RNAse foi dissolvida em acetato de sódio. A solução foi aquecida a 100 °C por 15 minutos e deixada esfriar a temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 7,4 adicionando o Tris(hidroximetil)- aminometano. A solução foi armazenada a -20 °C.

4.2.21 Acetato de sódio 0,01 M pH 4,6

Em um tubo de plástico adicionou-se 45 mL de água ultra pura. Descartou-se 150 µl desta e acrescentou-se o mesmo volume de acetato de sódio 3M.

4.2.22 Acetato de sódio 3 M, pH 4,6

Acetato de sódio ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) (Merck 6267)	20,4 g
Água ultra pura q.s.p.	50 mL

Dissolveu-se o acetato de sódio em 50 mL de água ultra pura, ajustou-se o pH para 4,6 e armazenou-se a -20 ºC.

4.2.23 Gel de agarose 1%

Agarose	1,0 g
Tampão Tris-acetato 1x	100,0 mL
Brometo de etídio	1,0 µL

A agarose foi pesada em um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se o Tampão Tris-acetato 1x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até a ebulição quando tornou-se límpida. Deixou-se a solução esfriar até que o vapor cessasse e adicionou-se brometo de etídio.

4.2.24 Tampão Tris-acetato (TAE) 1x

TAE 50x (BioRad 161-0743)	200 mL
Água ultra pura q.s.p	9800 mL

4.2.25 Tampão de corrida para gel de agarose estoque (TBE 5x)

Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	54 g
Ácido bórico (H_3BO_3, Merck 0165)	27,5 g

Água ultra pura q.s.p.	1000 mL
EDTA 0,5 M	20 mL

Adicionou-se o tris e o ácido bórico em 800 mL de água ultra pura. Em seguida acrescentou-se o EDTA e ajuste o volume para 1000 mL com água ultra pura.

4.2.26 Tampão de corrida para gel de agarose (TBE 0,5x)

TBE 5x	100 mL
Água ultra pura q.s.p.	900 mL

4.2.27 Brometo de etídio

Brometo de etídio	10 mg
Água destilada	10 mL

A solução foi agitada durante 1 hora em agitador magnético e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

4.2.28 Tampão para PCR 10x

KCl	9,32 g
Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck 8382)	3,03 g
$MgCl_2$. $6H_2O$	1,53 g
Gelatina (Merck 4078)	0,25 g
Triton X-100 (Merck 8603)	2,5 mL
Água ultra pura q.s.p.	250 mL

Adicionou-se o KCl, tris, $MgCl_2$. $6H_2O$ a 220 mL de água ultra pura. Ajustou-se o pH para 8,3 adicionando HCl 1N (± 10 mL). Acrescentou-se a gelatina, Triton X-100 e aqueceu-se a solução por 30 minutos a 56 ºC. O volume foi completado para 250 mL com água ultra pura. Distribuiu-se em alíquotas de 50 mL.

4.2.29 Ditiotritol (DTT) 1 M

Ditiotritol (DTT) (Sigma D-0632)	1,54 g
Água ultra pura q.s.p.	10 mL

Dissolveu-se o DTT em água ultra pura e este foi distribuído em alíquotas de 1 mL e armazenado a -20 ºC.

4.2.30 Mix dNTP 5 mM estoque

"Ultrapure dNTP set" 100 mM (Pharmacia 27-2035-01)	
Água ultra pura q.s.p.	800 µL

Pipetou-se 50 µL dATP, 50 µL dTTP, 50 µL dCTP, 50 µL dGTP e água ultra pura estéril em um tubo de 1,5 mL. Antes de usar, esta solução foi diluída para 1 mM (50 µL mix e 200 µL água ultra pura estéril).

4.2.31 Tampão de diluição para DNA polimerase

Tris 1 M pH 8,0	0,2 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	0,2 mL
DTT 1 M	0,1 mL
Água ultra pura q.s.p.	49,5 mL
Glicerol 87%	50 mL

As soluções foram misturadas vigorosamente e a solução final foi mantida a 4 ºC.

4.2.32 Solução de DNA polimerase 1 U/µL

Taq DNA polimerase 5 U/µL (Sigma)	20 µL
Tampão de diluição para DNA polimerase	80 µL

A solução foi mantida a -20 º C.

4.2.33 Tampão de amostra "Loading buffer"

Azul de bromofenol	25 mg
Sacarose	4,0 g
Água ultra pura estéril	10 mL

A solução foi misturada e armazenada a 4 ºC.

4.2.34 Marcador de peso molecular

Smart Ladder (Eurogentec)

4.2.35 Kit de sequenciamento de DNA (Applied Biosystems 4303152)

4.2.36 "Primers"

Amplificação do DNA:

V9G (5'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') (DE HOOG et al., 1998)

LS266 (5'-gCATTCCCAAACAACTCgACTC-3') (MAXCLAUS et al., 1995)

Reação de Seqüenciamento:

ITS1 (5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg-3') (WHITE et al., 1990)

ITS4 (5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3') (WHITE et al., 1990)

Os "primers" foram diluídos em tampão TE até a concentração de 10 pmol e mantidos a -20 ºC.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Esterilização.

Meios de cultura, vidraria, soluções, reagentes, tubos plásticos e outros materiais foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 15 minutos. Placas de Petri em estufa para esterilização a 180 °C por 2 horas. Todo material contaminado por microrganismos e antibióticos foi autoclavado antes do descarte.

4.3.2 Local de coleta.

Para realizar o isolamento de leveduras negras de amostras ambientais mediante aplicação da técnica de flotação em óleo, foram coletadas amostras de solo de "landfarming" provenientes da Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN). Esta localiza-se na cidade de Paulínia, estado de São Paulo, Brasil e ocupa uma área de 9,1 km^2, constituindo a maior unidade de refino do país. Dentre os produtos gerados na refinaria a partir do petróleo encontram-se: diesel, gasolina, gás liquefeito de petróleo (GLP), nafta, querosene, coque, asfalto e aguarrás (PETROBRÁS®, 2005).

O "landfarming" constitui-se de uma área para biorremediação dos resíduos gerados pela refinaria. Assim, estes são aplicados de forma controlada na superfície do solo e submetidos à atividade aeróbia dos microrganismos para degradação dos compostos aromáticos. O solo é revolvido periodicamente para oxigenação e exposição dos resíduos à microbiota local.

Diversos estudos visando o isolamento de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos foram realizados nesta área, bem como nas lagoas de estabilização e no rio Atibaia que recebe alguns efluentes da refinaria (CONCEIÇÃO et al., 2005; KATAOKA, 2001; NAVARETE, 2006; SATOW, 2005).

4.3.3 Coleta de amostras de solo.

As amostras de solo contaminado por hidrocarbonetos foram coletadas da área de "landfarming" da REPLAN. Sub-amostras de três células de "landfarming" foram coletadas de 0 a 10 cm de profundidade com espátula esterilizada, homogeneizadas e armazenadas em saco de polietileno a 4 ºC.

4.3.4 Análise do solo amostrado.

Uma amostra do solo coletado foi analisada pela Analytical Technology- Serviços Analíticos e Ambientais Ltda. segundo a norma técnica L6.245 (CETESB, 1984).

4.3.5 Isolamento de fungos do ambiente.

Empregou-se a metodologia de Iwatsu et al. (1981). Nesta técnica, preparou-se erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de salina e antibióticos nas seguintes concentrações finais: 200 U/mL de penicilina; 200 µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de meso-eritritol. Em seguida, 20 g de amostra de solo foi adicionado ao Erlenmeyer. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, 20 mL de óleo mineral foi adicionado ao Erlenmeyer e este foi agitado vigorosamente com auxílio de um agitador de tubos por 5 minutos. O frasco de Erlenmeyer permaneceu em repouso por 20 minutos para que o solo decantasse. A seguir, alíquotas de 150 µL da interfase óleo-água foram coletadas e plaqueadas em meio "Mycosel". Preparou-se 5 placas de cada amostra, sendo cada alíquota proveniente de pontos distintos da interfase: quatro pontos das extremidades e do centro da interfase água-óleo. O inóculo foi distribuído na superfície do meio sólido com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30 °C até o surgimento de colônias de coloração escura, que foram posteriormente, observadas microscopicamente e, aquelas que se assemelhavam morfologicamente às leveduras negras foram transferidas para outras placas de "Mycosel" para purificação da cultura mediante o método de estria (esgotamento). Após purificação da cultura, esta foi transferida para tubos com meio inclinado de BDA ou MEA. Os tubos foram incubados

a 30 °C até o crescimento da cultura, aproximadamente 20 dias, e, posteriormente, preservados a 4 °C.

4.3.6 Identificação preliminar e seleção das cepas isoladas.

A identificação preliminar dos isolados foi realizada mediante técnicas clássicas baseadas na morfologia macro e microscópica das colônias. Para tal, lâminas coradas com lactofenol azul de algodão foram preparadas a partir de culturas crescidas em MEA ou BDA a 28°C. Após análise macroscópica das colônias, prepararam-se lâminas mediante técnica de microcultivo para melhor visualização microscópica das estruturas reprodutivas dos isolados, permitindo a identificação preliminar destes.

Os isolados foram agrupados segundo a morfologia e, aqueles considerados distintos, foram submetidos a análises moleculares para identificação em nível de espécie. Estas análises foram realizadas no Centro de Diversidade Fúngica, em Utrecht, na Holanda (CBS- Centraalbureau voor Schimmelcultures - Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science). As técnicas moleculares empregadas estão descritas posteriormente.

Seis isolados identificados a nível específico foram selecionados para realização dos testes de hidrofobicidade, assimilação de hidrocarbonetos e oligotrofismo (item 5.3). O tempo de crescimento e de esporulação dos isolados também foi um critério levado em consideração.

4.3.7 Cepas-padrão utilizadas.

Nos três testes realizados, foram empregadas 9 cepas: 6 isolados de amostras de "landfarming" pertencentes ao grupo das leveduras negras e 3 cepas padrão.

As cepas padrão foram gentilmente cedidas pelo CBS e foram utilizadas como referência para taxas de hidrofobicidade (*Penicillium chrysogenum* e *Rhodotorula*

graminis) ou como linhagem-tipo de levedura negra (*Exophiala xenobiotica*). A tabela 1 apresenta a origem e as características dessas cepas.

Penicillium chrysogenum mostrou-se hidrofóbico em testes de adesão em microesferas de poliestireno (HAZEN et al., 1988), enquanto que *Rhodotorula graminis*, foi submetida ao teste de adesão à n-hexadecano realizado por Göttlich et al. em 1995, mostrando baixa hidrofobicidade celular.

Tabela 1- Cepas-padrão: características quanto à hidrofobicidade.

Identificação	CBS Nº	Local de coleta	Hidrofobicidade celular
Exophiala xenobiotica	118157	Solo contaminado com óleo, Venezuela	Desconhecida
Penicillium chrysogenum	776.95	Caverna de Lechuguilla, Estados Unidos	Alta
Rhodotorula graminis	2826	Grama em North Island, Nova Zelândia	Baixa

4.3.8 Termotolerância.

A termotolerância dos isolados selecionados foi testada. Para tal, as cepas foram inoculadas em placas com MEA e incubadas por 20 dias nas seguintes temperaturas, em duplicata: 25 ºC; 30 ºC; 33 ºC; 37 ºC; 40 ºC. O crescimento da colônia foi avaliado segundo o diâmetro desta após o período de incubação (BADALI et al., no prelo).

4.3.9 Suspensão de esporos.

Este procedimento foi realizado previamente aos testes, a fim de facilitar o estabelecimento de uma concentração de células inicial padrão nos testes.

As cepas selecionadas foram reativadas em tubos de cultura com meio MEA e incubadas por 10 a 20 dias à 30 ºC ou até sua esporulação. Após esse período, 10 mL de solução salina (NaCl 0,85%) foi adicionado ao tubo com a cultura e este foi agitado com auxílio de vórtex por 30 segundos para a liberação dos esporos na suspensão. Outra metodologia adotada foi a adição de solução salina seguida de raspagem superficial delicada da cultura com auxílio de uma alça de inoculação estéril.

Após a liberação dos esporos, a suspensão foi filtrada com funil de vidro e gaze previamente esterilizados. A suspensão foi depositada em frascos de vidro pequenos com tampa de borracha. Esta foi homogeneizada e a concentração de células estimada com auxílio da câmara de Neubauer. Ajustou-se a concentração celular para 1,00 x 10^6 cels/mL ou 1,00 x 10^7 cels/mL dependendo do teste a ser realizado. O ajuste da concentração foi obtido adicionando-se inóculo ou solução salina de acordo com a concentração de células desejada.

A solução de esporos foi utilizada com no máximo 2 dias após o seu preparo, sendo conservada a 4 ºC. Anteriormente à realização dos testes, a qualidade e a concentração desta foram verificadas; suspensões com excesso de micélio e/ou com muitos esporos germinando foram descartadas.

4.3.10 Teste de hidrofobicidade.

Para cada cepa, foram preparados dois frascos de vidro estéreis com volume de 20 a 25 mL e tampa de borracha contendo, cada um, 5 mL de suspensão de esporos com concentração de 1,00 x 10^7 cels/mL. Em um dos frascos adicionou-se 1 mL de óleo mineral e no outro 1 mL de n-hexadecano. A solução foi submetida à agitação vigorosa com vórtex por 30 segundos e deixada em repouso por 5 minutos. Uma pequena alíquota de suspensão de esporos da fase aquosa foi retirada com auxílio de seringa (de 1 mL) com agulha para contagem de células em câmara de Neubauer. A contagem foi registrada e o procedimento (desde a agitação) foi repetido 5 vezes. Para verificar a hidrofobicidade, a concentração inicial de células (100%) foi comparada com a diferença entre esta e a média das concentrações obtidas na fase aquosa após o

tratamento (X%). Quanto menor X, maior seria a hidrofobicidade das células da cepa (GÖTTLICH et al., 1995). Por exemplo:

Concentração inicial = 1,00 x 10^7 células/mL (100%)

Média da concentração na fase aquosa = (*C1+C2+C3+C4+C5)/5 = 0,33 x 10^7 cels/mL (33%)

Concentração de células na fase oleosa = (100%) - (33%) = **67%** (células hidrofóbicas; concentraram-se na fase oleosa)

*C= contagem da concentração de células na fase aquosa após o tratamento.

4.3.11 Teste de assimilação de óleo mineral e n-hexadecano.

Este teste foi executado com auxílio do espectrofotômetro "Bioscreen C" (Labsystems, Helsinki, Finlândia) (FIGURA 1). Este aparelho fornece dados de crescimento do microrganismo pelo aumento da turbidez do meio proporcionada à medida que esses se multiplicam. Apresenta capacidade de analisar até 200 microcultivos por vez (cada estojo apresenta 100 células de microcultivo com capacidade de volume total igual a 400 µL). Parâmetros cinéticos como: comprimento de onda para leitura de densidades ópticas, tempo de cultivo, tipo e freqüência de agitação das células, freqüência das leituras de absorbâncias das células podem ser pré-determinados.



Figura 1- Bioscreen C, equipamento utilizado para medição de biomassa.

Para realização do teste, suspensões de esporos das cepas selecionadas (até 7 cepas por experimento) com concentração equivalente a 1,00 x 10^6 cels/mL foram preparadas. Cinco tratamentos foram estabelecidos para verificar a assimilação de óleo mineral e n-hexadecano como únicas fontes de carbono pelas cepas. Tratamento A controle, sem adição de hidrocarboneto; tratamento B contendo 20% de óleo mineral; tratamento C com 20% de n-hexadecano; tratamento D com 90% de óleo mineral e tratamento E com 90% de n-hexadecano. Os protocolos experimentais 1 e 2 apresentam a composição dos meios em cada tratamento. Os tratamentos foram realizados em quintuplicata.

Protocolo experimental 1: Volumes em µL e concentrações de soluções para o teste de assimilação com cepas.

Solução	Tratamentos				
	A	B	C	D	E
Suspensão de esporos (1,0x 10^6cels/mL)	40	40	40	40	40
Yeast Nitrogen Base (0,65%)	360	280	280	---	---
Óleo mineral	---	80	---	360	---
n-hexadecano	---	---	80	---	360
Total	400	400	400	400	400

Protocolo experimental 2: Volumes em µL e concentrações de soluções para o teste controle (branco) de assimilação.

Solução	Tratamentos				
	A	B	C	D	E
Suspensão de esporos (1,0x 10^6 cels/mL)	---	---	---	---	---
Yeast Nitrogen Base (0,65%)	400	320	320	40	40
Óleo mineral	---	80	---	360	---
n-hexadecano	---	---	80	---	360
Total	400	400	400	400	400

O "Bioscreen" foi programado para operar durante 7 dias, 28ºC, com agitação média contínua, leitura de absorbância a 540 nm, intervalo de leitura de 2 horas. As leituras de densidade óptica (OD) automáticas foram enviadas a um computador acoplado, no qual os resultados obtidos determinaram as curvas de crescimento das diferentes cepas em cada tratamento. A assimilação dos hidrocarbonetos foi verificada mediante comparação das curvas de crescimento com o controle e entre os diferentes tratamentos.

4.3.12 Teste de oligotrofismo.

Os tratamentos foram repetidos substituindo-se o meio mineral (YNB) por solução salina (NaCl 0,85%). As quantidades de soluções para cada tratamento estão resumidas nos protocolos experimentais 3 e 4. As condições de incubação e leituras foram as mesmas estabelecidas para o teste de assimilação.

Protocolo experimental 3: Volumes em µL e concentrações de soluções para o teste de oligotrofismo com cepas.

Solução	Tratamentos				
	A	B	C	D	E
Suspensão de esporos (1,0x 10^6cels/mL)	40	40	40	40	40
Solução salina (0,85%)	360	280	280	---	---
Óleo mineral	---	80	---	360	---
n-hexadecano	---	---	80	---	360
Total	400	400	400	400	400

Protocolo experimental 4: Volumes em µL e concentrações de soluções para o teste controle (branco) de oligofotrofismo.

Solução	Tratamentos				
	A	B	C	D	E
Suspensão de esporos (1,0x 10^6cels/mL)	---	---	---	---	---
Solução salina (0,85%)	400	320	320	40	40
Óleo mineral	---	80	---	360	---
n-hexadecano	---	---	80	---	360
Total	400	400	400	400	400

4.3.13 Extração de DNA.

Este procedimento foi baseado no protocolo estabelecido por Gerrits van den Ende e De Hoog em 1999. As cepas selecionadas foram reativadas em tubos de cultura ou em placas de Petri com meio MEA e incubadas por até 15 dias a 28 ºC. Em seguida, aproximadamente 1 cm^2 de micélio de cada cultura foi transferido para um tubo plástico de 2,0 mL com uma mistura de sílica em pó e celite (2:1) e incubados a -20 ºC por 5 minutos. Após esse período, 300 µL de tampão CTAB foi acrescentado e o material foi triturado com auxílio de um bastão de vidro esterilizado por 5 minutos até a obtenção de uma massa homogênea. Acrescentou-se 200 µL de tampão CTAB e a solução foi agitada em vórtex por 5 minutos. Em seguida, os tubos plásticos foram incubados por 10 minutos a 65 ºC em banho-maria. 500 µL de clorofórmio foi adicionado e misturado cuidadosamente. Realizou-se a centrifugação a 20400 g durante 5 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 400 µL) foi transferido para outro tubo plástico de 2,0 mL e adicionou-se 800 µL de etanol 96% gelado (volume equivalente a aproximadamente o dobro do volume sobrenadante). Os tubos foram mantidos a -20 ºC por 2 horas, no mínimo, para a precipitação do DNA. Após esse processo, realizou-se a centrifugação a 20400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" foi ressuspenso e lavado em 500 µL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se novamente a solução por 5 minutos a 20400 g. O sobrenadante (etanol) foi descartado e o DNA em "pellet" foi deixado a temperatura ambiente por 15 minutos para garantir a evaporação

do etanol. Posteriormente, o DNA foi ressuspenso em 97,5 µL de tampão TE e 2,5 µL de RNAse 20 U/mg. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 ºC durante 5 minutos. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (260-280 nm) com auxílio do equipamento NanoDrop ND-1000 (NANODROP TECHNOLOGIES, INC.) e sua integridade verificada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio. O DNA foi mantido a -20 ºC.

4.3.14 Amplificação do DNA e reação de seqüenciamento.

Para cada amostra de DNA preparou-se uma solução contendo, 2,5 µL de tampão de PCR; 16,5 µL de água ultra pura estéril; 1,0 µL de "primer" V9G (10 pmol); 1,0 µL de "primer" LS266 (10 pmol); 2,5 µL dNTP mix (1 mM); 0,5 µL Taq polimerase (1 U/µL). Dessa solução, 24 µL foi distribuído em tubos plásticos de 0,5 mL e, em seguida, adicionou-se 1 µL de amostra de DNA devidamente diluído (12 - 20 ng). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada no termociclador "iCycler Thermal Cycler" (BIO-RAD LABORATORIES) programado para realizar 35 ciclos (2 minutos a 94 ºC para a desnaturação inicial; desnaturação a 94 ºC por 35 s; anelamento a 52 ºC durante 30 s; síntese a 72 ºC por 60 s e 7 minutos de extensão final).

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,0%, utilizando 3,0 µL de "Loading buffer" e 2,5 µL de cada amostra e submetidos a uma voltagem de 100 volts. O marcador de peso molecular "Ladder" de 200 pb foi utilizado. Os fragmentos de amplificação foram visualizados no analisador de Imagens "Gel Doc XR" (BIO-RAD LABORATORIES) com o "software" "Quantity one". "Amplicons" de aproximadamente 1000 a 1500 pares de bases foram obtidos.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de bandas de DNA ("GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit", GE Healthcare) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados os "primers": ITS1 e ITS4. Assim, para cada amostra foram preparadas duas soluções compostas de: 1,0 µL de "BigDye" (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems), 1,0 µL

de produto de PCR purificado, 1,0 µL de um dos "primers" (4 pmol), 3,0 µL de tampão de diluição e 4,0 µL de água ultra pura estéril. O programa de amplificação constituiu 30 ciclos de 95 ºC por 1 minuto; 10 segundos a 95 ºC; 5s a 50 ºC; 4 minutos a 60 ºC. Após os 30 ciclos permaneceu sob refrigeração a 4 ºC.

4.3.15 Seqüenciamento e Identificação das cepas.

O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, E.U.A.). As seqüências foram editadas usando o "software" SEQMAN (DNAStar Inc., Madison, E.U.A.), obtendo-se seqüencias com aproximadamente 550 pares de bases. Estas foram alinhadas com auxílio do "software" BIONUMERICS versão 4.61 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Posteriormente, as cepas mais próximas aos isolados foram encontradas realizando-se um "blast" no banco de dados do CBS e suas seqüências comparadas a fim de identificá-las. O CBS sedia um grupo de estudos sobre leveduras negras, assim, apresenta um banco de dados para este grupo de fungos conciso, confiável e em constante atualização, sendo sua aplicação preferível em relação ao GenBank para identificação desse grupo de microrganismos, especificamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do solo amostrado.

A análise dos hidrocarbonetos totais do petróleo do solo amostrado (solo 1, APÊNDICE 1) revelou contaminação deste por óleo crú intemperizado. A análise mostrou a presença de hidrocarbonetos resolvidos do petróleo (483.734,76 µg/Kg), mistura complexa não resolvida (11.847.026,95 µg/Kg) e hidrocarbonetos totais do petróleo (12.330.761,70 µg/Kg). Não foram detectadas concentrações de alcanos na amostra.

5.2 Isolamento de fungos.

Foram isoladas 107 cepas de leveduras negras provenientes de três amostras de solo da área estudada, resultado considerado positivo e superior ao observado por outros autores (TABELA 2). Iwatsu et al. (1981), isolaram 83 cepas de fungos dematiáceos em 177 amostras provenientes da natureza (madeira em decomposição, tronco de pinheiros e outras árvores, solo, serragem, ninhos de aves e vespas). Vicente (2000) obteve 81 isolados em 540 amostras investigadas. Marques et al. (2006) recuperaram 9 cepas de leveduras negras dos gêneros *Exophiala* (6), *Fonsecaea* (2) e *Cladophialophora* (1) de 68 diferentes substratos de Vilarejo de Fortaleza, Maranhão, Brasil.

Além da diferença entre a proporção número de isolados por amostra, os autores dos artigos acima não obtiveram sucesso no isolamento de cepas de leveduras negras

provenientes do solo, relatando poucas ou nenhuma cepa. Assim, a área de "landfarming" estudada foi considerada satisfatória para o isolamento destes fungos. Os hidrocarbonetos presentes nas amostras provavelmente influenciaram positivamente o crescimento destes microrganismos. O resultado confirmou também a eficácia do método de Iwatsu et al. (1981) para recuperação dos microrganismos em estudo provenientes do solo.

Outras pesquisas realizadas na área apresentaram resultados bem sucedidos quanto ao isolamento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (CONCEIÇÃO, 2005; KATAOKA, 2001; NAVARRETE, 2006; SATOW, 2005). Conceição et al., (2005) isolaram cepas produtoras de oxigenases, com pigmentação escura, identificadas como pertencentes ao gênero *Cladosporium* e outras apenas como "fungo não esporulante escuro". Como os autores desse estudo não realizaram a identificação a nível molecular das cepas isoladas, existe possibilidade de que alguns isolados pertencessem ao grupo das leveduras negras.

Prenafeta-Boldú et al. (2005) observaram que cepas degradadoras de hidrocarbonetos identificadas somente mediante análises morfológicas estavam classificadas de forma incorreta ou incompleta. Assim, os autores realizaram a re-identificação destas mediante análise das seqüências da região ITS do DNA ribossomal e constataram que a maioria das cepas pertencia à ordem Chaetothyriales, classe *Chaetothyriomycetes*, dos gêneros *Cladophialophora* e *Exophiala*, ambas do grupo das leveduras negras. Evidenciando-se a importância desse grupo de fungos para tratamento de resíduos e contaminação por derivados do petróleo.

Portanto, o local pode ser considerado uma área de pesquisa promissora para estudos relacionados ao isolamento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos complexos e pesquisas que visam implementar metodologias para aumentar ou potencializar a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

Observou-se que, além do óleo mineral, o meio seletivo "Mycosel" e a agitação vigorosa foram fatores essenciais para o sucesso do isolamento. Recomenda-se o meio "Mycosel" para o isolamento de fungos patógenos e dematiáceos de substratos contendo grande quantidade de fungos e bactérias. Apresenta em sua composição uma substância

citostática, geralmente cicloheximida, que inibe o crescimento de fungos caracterizados por crescimento rápido e alta produção de esporos, facilitando assim, o crescimento das colônias de leveduras negras e o seu isolamento.

Tabela 2- Comparação do número de isolados de cepas de leveduras negras por amostra, obtidos em diferentes estudos mediante mesma técnica e meio de cultivo.

Autor/ ano	*Amostra*	*Local de coleta*	*Nº isolados*	*Nº amostras*	*Isolados /amostra*
Iwatsu et al., 1981	Fontes ambientais diversas	Chiba, Japão	83	177	0,47
Vicente, 2000	Fontes ambientais diversas	Colombo, Paraná	81	540	0,15
Marques et al., 2006	Fontes ambientais diversas	Vilarejo de Fortaleza, Maranhão	9	68	0,13
Satow, 2008	Solo de "landfarming"	REPLAN, São Paulo	107	3	35,67

Neste estudo, devido à proibição da venda de cicloheximida, esta foi substituída por meso-eritritol. Esta substância consitutui-se em um potente citostático com ação sobre fungos dematiáceos de crescimento rápido. Hoog e Haase (1993 apud VICENTE, 2000) verificaram a eficiência dessa substância para o isolamento de leveduras negras de tecido hospedeiro e fontes ambientais. Ainda, segundo Vicente (2000) a maioria dos isolados do grupo em estudo apresentou capacidade de crescimento em meios contendo meso-eritritol e cicloheximida nas concentrações de: 0,01%; 0,05% e 0,1% portanto, seu crescimento não é inibido em meios seletivos contendo esses compostos. Entretanto, pesquisas anteriores relatam um maior número de isolados pertencentes às leveduras negras em meio com cicloheximida ("Mycosel") do que em Sabhi agar, que contém meso-eritritol(DIXON et al., 1980; DIXON e SHADOMY, 1980; VICENTE, 2000).

Neste trabalho, apesar da substituição de cicloheximida por meso-eritritol na solução com antibióticos e no meio seletivo, o isolamento foi bem sucedido já que, um número significativo de cepas de leveduras negras com diversidade morfológica foi registrado.

A agitação vigorosa com auxílio de vórtex promoveu uma maior superfície de contato entre o óleo e a suspensão com a amostra de solo, aumentando a concentração

de células de leveduras negras na fase oleosa, e assim, a probabilidade de isolamento dessas ao plaquear a interfase água e óleo.

O artigo de Iwatsu et al. (1981) cita apenas a realização de uma agitação vigorosa, sem mencionar como esta deveria ser realizada. Assim, em testes para adequação da metodologia, observou-se que a agitação com "shaker" não permitiu o contato do óleo com toda a suspensão, diminuindo o número de isolados. Satow (2005) isolou fungos filamentosos degradadores de hidrocarbonetos complexos mediante o método de Iwatsu, porém a agitação foi efetuada em "shaker" e plaqueamento da alíquota em BDA. O autor obteve poucas cepas, caracterizadas pela alta produção de esporos e crescimento rápido, entretanto, cepas de leveduras negras não foram isoladas. De Hoog et al. (2006) obtiveram leveduras negras de amostras de solo contaminado com compostos voláteis aromáticos mediante a técnica de Iwatsu et al. (1981) e seleção mediante incubação em atmosferas de fenol e naftaleno. Os autores verificaram a presença de poucos isolados de gêneros como: *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* e *Exophiala* (representante das leveduras negras). Provavelmente, na pesquisa realizada por Satow (2005) fatores como: crescimento mais rápido das cepas isoladas, presença de espécies esporulantes na amostra, a agitação moderada promovida pelo "shaker", a fase de enriquecimento previamente ao processo de seleção, e não uso de meio seletivo sólido resultaram no baixo número obtido de isolados de leveduras negras.

Outro fator importante para o sucesso do isolamento foi o plaqueamento da alíquota proveniente da interfase água – óleo, local onde as células fúngicas do grupo em estudo parecem concentrar-se após a agitação da amostra com a solução salina acrescida de antibióticos e óleo mineral (DIXON e SHADOMY, 1980).

5.3 Identificação e seleção das cepas isoladas.

107 cepas de coloração olivácea a preta com reverso escuro foram recuperadas das placas preparadas com alíquotas da interfase água-óleo. Após purificação, foi realizada a observação macro e microscópica dos isolados e separação destes de acordo com a morfologia de estruturas reprodutivas. A morfologia das cepas isoladas utilizadas nos testes pode ser observada na figura 2.

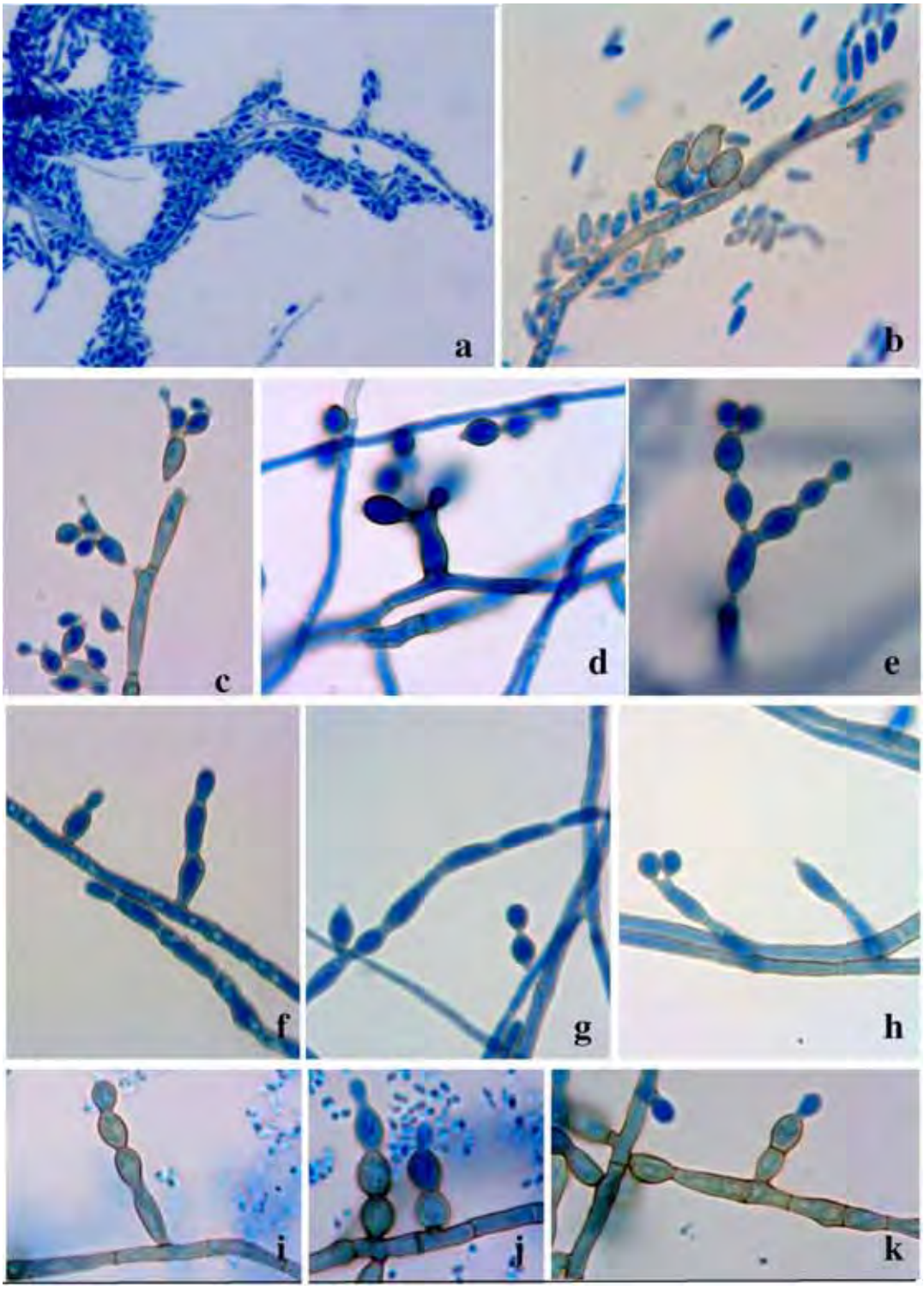


Figura 2- Leveduras negras isoladas de solo de "landfarming". Microcultivo em MEA, 28 °C 10 dias. Lâminas coradas com lactofenol. a) Células de *Exophiala xenobiotica* CBS122258 (20x); b) Crescimento filamentoso e leveduriforme de *Exophiala xenobiotica* CBS122258 (40x); c) Estrutura conidial de *Cladophialophora* sp. CBS 122257; d, e) Conidióforo de *Cladophialophora minourae* CBS 122275; f) Conidióforos de *Cladophialophora* sp. CBS 122253; g, h) *Cladophialophora* sp. CBS 122255; i-k) *Cladophialophora* sp. dH 18473.

A identificação a nível molecular foi realizada para 20 isolados (resumidos na tabela 3) e somente 6 cepas (com fundo destacado) foram selecionadas para a realização dos testes de hidrofobicidade, assimilação de hidrocarbonetos e oligotrofismo.

Tabela 3- Cepas identificadas pelo seqüenciamento da região ITS. Cepas com fundo destacado foram selecionadas para realização de testes.

nº referência	*nº CBS*	*Identificação*
dH 18458	CBS 122258	*Exophiala xenobiotica*
dH 18459	-----	*Exophiala xenobiotica*
dH 18460	-----	*Cladophialophora minourae*
dH 18461	-----	*Exophiala xenobiotica*
dH 18462	-----	*Cladosporium* sp.
dH 18463	CBS 122254	*Cladophialophora* sp.
dH 18464	-----	*Exophiala xenobiotica*
dH 18465	CBS 122257	*Cladophialophora* sp.
dH 18466	CBS 122275	*Cladophialophora minourae*
dH 18467	-----	*Exophiala xenobiotica*
dH 18468	CBS 122253	*Cladophialophora* sp.
dH 18469	CBS 122259	*Cladophialophora* sp.
dH 18470	-----	*Exophiala xenobiotica*
dH 18471	CBS 122255	*Cladophialophora* sp.
dH 18472	-----	*Exophiala xenobiotica*
dH 18473	-----	*Cladophialophora* sp.
dH 18474	-----	*Cladophialophora* sp.
dH 18476	-----	*Cladophialophora* sp.
dH 18477	-----	*Cladophialophora* sp.
dH 18478	-----	*Cladophialophora* sp.

A identificação baseada na morfologia de estruturas reprodutivas dos isolados utilizados para os testes foi posteriormente comparada com a identificação a nível molecular (TABELA 4). Diferenças taxonômicas foram observadas confirmando-se a importância da biologia molecular para a identificação precisa das leveduras negras.

Tabela 4- Identificação morfológica x molecular (região ITS) de cepas isoladas.

nº referência	*nº CBS*	*Identificação*	
		Morfológica	*Molecular*
dH 18458	CBS 122258	*Exophiala* c.f. *spinifera*	*Exophiala xenobiotica*
dH 18465	CBS 122257	*Cladophialophora* c.f. *devriesii*	*Cladophialophora* sp.
dH 18466	CBS 122275	*Cladophialophora* sp.	*Cladophialophora minourae*
dH 18468	CBS 122253	*Cladophialophora* sp.	*Cladophialophora* sp.
dH 18471	CBS 122255	*Cladophialophora* c.f. *emmonsii*	*Cladophialophora* sp.
dH 18473	-----	*Cladosporium* sp.	*Cladophialophora* sp.

dH: número de referência da coleção de fungos particular do Dr. Sybren de Hoog.

CBS: Referência da cepa mantida em coleção de cultura do Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.

As análises moleculares dos isolados mostrou a predominância de dois gêneros nas amostras de "landfarming", C*ladophialophora* e *Exophiala*.

As cepas de *Exophiala xenobiotica* apresentam colônias de coloração preta a olivácea em MEA; exibem crescimento inicial leveduriforme com coloração oliva escuro e posteriormente desenvolvem uma aparência aveludada oliva acinzentado, com reverso preto. Microscopicamente, as cepas apresentam células leveduriformes abundantes e hifas melanizadas. Não apresentam produção de pigmentos solúveis em meio MEA (DE HOOG et al., 2006).

Estudos recentes têm recuperado cepas de *Exophiala* de diferentes substratos da natureza (MARQUES et al., 2006), de ambientes ricos em hidrocarbonetos e casos clínicos (DE HOOG et al., 2006).

Zeng et al., (2007), observaram que cepas de *Exophiala* provenientes de diferentes substratos ou continentes apresentavam o mesmo genótipo ou muito semelhantes, constatando que cepas ambientais poderiam apresentar potencial de oportunismo semelhante às cepas de casos clínicos, por exemplo: *Exophiala xenobiotica* e *E. oligosperma* são freqüentemente relatados como agentes oportunistas de infecções cutâneas e sistêmicas em humanos, e, também estão presentes em ambientes ricos em hidrocarbonetos aromáticos. O mesmo ocorre com *E. dermatitidis*, agente de infecções sistêmicas isolada também em madeira tratada com creosoto (VICENTE et al., no prelo).

A existência de diversas cepas de *Exophiala xenobiotica* provenientes do solo de "landfarming", neste trabalho, confirma a prevalência dessa espécie em ambientes ricos em hidrocarbonetos (DE HOOG et al., 2006).

Assim, estudos futuros sobre o potencial patogênico de cepas ambientais devem ser realizados, uma vez que, possa existir um fator de virulência ainda desconhecido associado à habilidade destas em degradar hidrocarbonetos.

As cepas de *Cladophialophora* sp. em meio "Mycosel" apresentaram culturas escuras com reverso escuro, micélio aéreo curto e grande aderência ao meio de cultivo

sólido. Microscopicamente apresentam hifas septadas melanizadas e esporulação do tipo *Cladosporium* caracterizada por cadeias pouco ou abundantemente ramificadas com conídios moderadamente melanizados com formato variando entre semelhante à um limão à fusiforme. Apresentam cicatriz conidial com pigmentação clara, não tão evidente quanto no gênero *Cladosporium* e conidióforos pouco diferenciados. O nicho natural de cepas pertencentes a este grupo ainda é pouco conhecido. Estes fungos têm sido recuperados de madeira em decomposição (MARQUES et al., 2006), raramente de solos, biofiltros, associados a plantas e sapróbios (BADALI et al., no prelo).

Os isolados do gênero *Cladophialophora* identificados apenas em nível de gênero pertencem a uma espécie ainda não descrita: *Cladophialophora immunda* (BADALI – comunicação pessoal). Este resultado, aliado à alta proporção de cepas em amostras de solo de "landfarming", indicam que esta espécie pode estar associada a habitats ricos em hidrocarbonetos derivados do petróleo. Assim como esta, outras espécies novas podem estar presentes, enfatizando-se a importância dessa área para estudos ecológicos e filogenéticos deste grupo de microrganismos.

Estudos anteriores recuperaram outras espécies de leveduras negras utilizando a mesma técnica seletiva, indicando que o método não favorece a recuperação de apenas uma parcela de espécies do grupo. Assim, este método pode ser empregado para verificar a diversidade de fungos negros da amostra.

Comparando-se os dados obtidos para amostras de solo (TABELA 5) foi possível observar uma proporção de isolados por amostra distinta: alta (SATOW, 2008) e baixa ou nula para os outros estudos. Houve diferença na diversidade fúngica entre as amostras ambientais. Dentre as pesquisas realizadas, Vicente (2000) obteve maior número de isolados do solo pertencentes a cinco gêneros diferentes. O número de isolados foi inferior ao registrado neste trabalho (107 cepas), porém a diversidade foi superior. Neste trabalho observou-se baixa diversidade e a grande freqüência dessas espécies de leveduras negras. Isto pode ser justificado por: a) presença de hidrocarbonetos nas amostras (APÊNDICE 1), pode ter selecionado e/ou enriquecido o crescimento das espécies capazes de assimilar tais compostos ou sobreviver a tais condições adversas; b) cobertura vegetal ausente nas amostras de solo, eliminando

espécies associadas a plantas e, c) identificação a nível molecular de apenas 20 cepas, amostragem pequena em relação ao número total de isolados (107).

5.4 Teste com meios de cultura para manutenção das cepas.

Antes de determinar o meio de cultura para manutenção das cepas isoladas foram realizados testes para verificar qual seria o mais eficaz para induzir a esporulação das cepas selecionadas. Os meios testados foram: "Mycosel", Sabouraud, BDA, MEA, Aveia ágar e Aveia ágar com folha de bananeira. A incubação das placas foi realizada a 30 °C e o diâmetro da colônia medido após 7, 14 e 21 dias de incubação (TABELAS 6 e 7).

De modo geral, o crescimento dos isolados selecionadas para realização dos testes foi maior em MEA e BDA. Nos outros meios de cultivo o crescimento foi mais lento.

O crescimento das cepas em meio de Aveia e Aveia com folha de bananeira (*Musa* sp.) foram semelhantes, taxas de crescimento lenta e baixa produção de esporos.

Em meio "Mycosel" e Sabouraud o crescimento das cepas foi lento sendo necessária a incubação por cerca de 3 semanas para obtenção da concentração de esporos padrão para os testes. Além disso, o meio "Mycosel" apresenta custo elevado devido aos antibióticos presentes na sua composição. Algumas cepas apresentaram baixa produção de esporos em meio Sabouraud. Iwatsu et al.(1981) relatam a obtenção de suspensão de esporos com concentração igual a 2,00 x 10^7 células/mL cultivando a cepa em meio Sabouraud Dextrosado a 27 ºC em 4 semanas.

Em meio BDA, as cepas apresentaram crescimento e produção de esporos em taxas medianas com duas semanas de incubação.

Tabela 5 - Comparação da diversidade de leveduras negras em amostras da natureza obtidas pelo método em estudo:

Referência bibliográfica	Habitat	n° amostras	Fungos isolados por gênero						Total de isolados
			Cladophialophora	*Exophiala*	*Fonsecaea*	*Phialophora*	*Ramichloridium/ Rhinocladiella*	*Veronea*	
Vicente, 2000	Cobertura vegetal em decomposição	ND	10	5	-	1	14	1	31
	Troncos de árvores	ND	1	-	1	-	7	-	9
	Raízes de árvores	ND	1	-	-	1	-	-	2
	Formigueiro e cupinzeiro	ND	-	2	-	-	1	-	3
	Solo	ND	5	6	1	1	4	-	17
	Madeira em decomposição	ND	9	5	5	2	12	5	38
Iwatsu et al., 1981	Madeira em decomposição	78	ND	ND	1	13	ND	ND	14
	Tábua, troncos	7	ND	ND	-	1	ND	ND	1
	Casca de pinus	18	ND	ND	-	2	ND	ND	2
	Casca de outras árvores	13	ND	ND	-	-	ND	ND	-
	Serragem	4	ND	ND	-	-	ND	ND	-
	Solo	54	ND	ND	-	1	ND	ND	1
	Ninhos de vespas	2	ND	ND	-	-	ND	ND	-
	Ninho de aves	1	ND	ND	-	-	ND	ND	-
Marques et al., 2006	Casca de babaçu em decomposição	18	-	1	1	-	-	-	2
	Folhas de babaçu	6	-	1	-	-	-	-	1
	Madeira em decomposição	7	1	1	-	-	-	-	2
	Casca de árvore em	5	-	1	-	-	-	-	1
	Matéria vegetal em	8	-	1	1	-	-	-	2
	Caule de babaçu	9	-	1	-	-	-	-	1
	Fezes de animais	2	-	-	-	-	-	-	-
	Solo	11	-	-	-	-	-	-	-
	Espinhos de palmeira	2	-	-	-	-	-	-	-
Satow, 2008	Solo de landfarming	3	≥12	≥7	EE	EE	EE	EE	107

ND: Resultados não descritos no artigo; EE: encontram-se em estudo.

Tabela 6- Avaliação do crescimento dos isolados nos meios de cultura Aveia Agar (OA); Meio de Malte (MEA), Sabouraud (Sab), "Mycosel" (Myc); Meio de Batata (BDA) a 30 °C nos períodos 7 e 14 dias, através do diâmetro médio das colônias medido em mm.

Isolados		Incubação a 30 °C									
		7 dias					14 dias				
n° Referência	Identificação	OA	MEA	Sab	Myc	BDA	OA	MEA	Sab	Myc	BDA
CBS 122258	*Exophiala xenobiotica*	12,5	18,5	16	15	15	20	26	24,5	21	20,5
CBS 122257	*Cladophialophora* sp.	19	21,5	15,5	19	21	27	33	26	29,5	33
CBS 122275	*Cladophialophora minourae*	19	11,5	12	18	21	30	27,5	28	29,5	29
CBS 122253	*Cladophialophora* sp.	14	21,5	18,5	18,5	22	26	34	30	29	34
CBS 122255	*Cladophialophora* sp.	12	17	10	7	9,5	23	29	21	18	21,5
dH 18473	*Cladophialophora* sp.	16,5	17	11	13	20,5	30,5	32	20,5	20	32

Valores sublinhados: maior crescimento da cepa no período de incubação.

Tabela 7- Avaliação do crescimento dos isolados nos meios de cultura Aveia Agar (OA); Meio de Malte (MEA), Sabouraud (Sab), "Mycosel" (Myc); Meio de Batata (BDA) a 30 °C em 21 dias, através do diâmetro médio das colônias medido em mm.

Isolados		Incubação a 30 °C				
		21 dias				
n° Referência	Identificação	OA	MEA	Sab	Myc	BDA
CBS 122258	*Exophiala xenobiotica*	26	30,5	30	27	26
CBS 122257	*Cladophialophora* sp.	35	46,5	38,5	42	46
CBS 122275	*Cladophialophora minourae*	44	39,5	38,5	47	40
CBS 122253	*Cladophialophora* sp.	34	48	42,5	40	48
CBS 122255	*Cladophialophora* sp.	34	41,5	32	28	36
dH 18473	*Cladophialophora* sp.	35	40	30	30,5	47

Valores sublinhados: maior crescimento da cepa no período de incubação.

O meio MEA apresentou maior eficácia quanto à esporulação e crescimento para a maioria das culturas utilizadas nos testes. Acredita-se que presença da peptona e da glicose neste meio tenham favorecido a produção de esporos e estimularam o crescimento. Assim, o meio de cultivo MEA foi escolhido para manutenção dos isolados e preparo da suspensão de esporos.

5.5 Teste de termotolerância

As cepas selecionadas desenvolveram-se em meio sólido MEA a temperaturas entre 25 ºC a 37 ºC em 20 dias. O melhor crescimento foi entre 30-33 ºC, indicando que os isolados são mesófilos. Nenhum isolado apresentou crescimento a 40 ºC. Os resultados estão resumidos na tabela 8. O mesmo foi observado para linhagens recuperadas do ambiente por Marques et al., 2006. As espécies causadoras de infecções sistêmicas, em geral, são capazes de crescer a 40 ºC, agentes da cromoblastomicose têm crescimento limitado a 37 ºC e espécies que causam infecções cutâneas moderadas restringem-se a temperaturas abaixo de 37 ºC. Cepas com crescimento até 37 ºC, sem crescimento a 40 ºC, como observadas aqui, são em sua maioria, sapróbias apresentando algum potencial como oportunistas em humanos (BADALI et al., no prelo; STERFLINGER, 2006).

Tabela 8 - Avaliação do crescimento das cepas selecionadas em MEA em diferentes temperaturas, após 20 dias de incubação, mediante diâmetro médio das colônias em mm.

nº referência	Identificação	Temperatura (ºC)				
		25	30	33	37	40
CBS 122258	*Exophiala xenobiotica*	25	29	20	14	-
CBS 122257	*Cladophialophora* sp.	31	40	37	4	-
CBS 122275	*Cladophialophora minourae*	32	33	40	33	-
CBS 122253	*Cladophialophora* sp.	31	32	35	10	-
CBS 122255	*Cladophialophora* sp.	30	38	40	11	-
dH 18473	*Cladophialophora* sp.	25	28	28	-	-

5.6 Padronização da metodologia para teste de hidrofobicidade.

Visando testar a hidrofobicidade celular das cepas e simular a flotação em óleo realizada na técnica de Iwatsu, este trabalho desenvolveu uma nova metodologia. Para tal, diversos testes foram realizados para a padronização do volume de suspensão de esporos, volume de óleo mineral e n-hexadecano; e escolha do recipiente adequado para a metodologia em questão. Os recipientes, volumes e reagentes estão resumidos abaixo (TABELA 9).

Tabela 9 - Recipientes e volumes da suspensão de esporos e óleo mineral ou n-hexadecano para padronização da metodologia.

Teste nº	Recipientes	Suspensão de esporos (mL)	Óleo mineral ou n-hexadecano (mL)
1	Erlenmeyer 250 mL	100	20
2	Erlenmeyer 100 mL	50	10
3	Tubo de cultivo	10	2
4	Frasco de vidro de 20 a 25 mL	10	2
5	Frasco de vidro de 20 a 25 mL	5	1

Nos testes nº 1 e 2, os volumes de suspensão de esporos mostraram-se inviáveis devido a baixa produção de esporos pelas leveduras negras. O tubo de cultivo, teste nº 3, foi considerado inadequado devido ao formato do recipiente, que dificultava a retirada das alíquotas para contagem de esporos. O frasco de vidro de 20 a 25 mL mostrou-se adequado para a realização da metodologia por permitir a retirada com facilidade da alíquota.

No teste n° 4, não foi possível obter 20 mL de suspensão de esporos, necessários para realizar os testes de hidrofobicidade com n-hexadecano e óleo mineral. A obtenção de tal volume de suspensão de esporos com concentração de 1,0 x 10^7 cels/mL era

dificultada pela baixa produção de esporos das leveduras negras; assim um grande número de tubos com repique das cepas foi necessário e os procedimentos para obtenção de suspensão de esporos e de ajuste de concentração foram repetidos inúmeras vezes até a obtenção do volume desejado de suspensão. Devido a todas essas dificuldades realizou-se o teste número 5, diminuindo o volume de solução de esporos. Este método foi o mais adequado à metodologia: o frasco permite a retirada com facilidade da alíquota e o volume de suspensão de esporos necessário para os 2 tratamentos é obtido com menor quantia de esporos e num período de tempo menor.

5.7 Teste de hidrofobicidade

Os resultados obtidos no teste de hidrofobicidade estão resumidos na tabela 10. A cepa padrão *Rhodotorula graminis* (CBS2826) apresentou baixa concentração de células na fase oleosa em ambos os tratamentos, característica almejada para uma cepa-padrão hidrofílica. Göttlich et al.(1995) obtiveram resultado semelhante ao submeter a cepa de *Rhodotorula graminis* (IFM 5757) a diferentes concentrações de n-hexadecano.

A cepa *Penicillium chrysogenum* (CBS 776.95) apresentou uma das maiores porcentagens de concentração de células na fase oleosa (a maior em óleo mineral e a segunda maior em n-hexadecano), indicando alta hidrofobicidade, como esperado; assim, considerou-se adequada sua aplicação como cepa padrão.

Não se observou uniformidade quanto à hidrofobicidade celular entre os gêneros de leveduras negras isoladas neste estudo. Entretanto, algumas relações poderiam ser estabelecidas entre as espécies e as taxas de hidrofobicidade.

As cepas de *Exophiala xenobiotica* CBS 122258 e CBS 118157 apresentaram porcentagens de hidrofobicidade inferiores a 50 %, e valores maiores em óleo mineral que em n-hexadecano. No entanto, os isolados pertencentes ao gênero *Cladophialophora* apresentaram altas taxas de hidrofobicidade em ambos os substratos, sendo ligeiramente maiores em n-hexadecano. Entretanto, a cepa CBS 122255 foi exceção: apresentou hidrofobicidade inferior aos de outros isolados do mesmo gênero e valor superior em tratamento com óleo mineral.

Embora as taxas de hidrofobicidade das cepas de *Cladophialophora* sp. sejam distintas, todas as cepas apresentaram valores superiores a 50% na fase oleosa, sendo, assim, consideradas hidrofóbicas. O mesmo pode-se dizer sobre as cepas de *Exophiala xenobiotica*, cujas concentrações na fase oleosa foram inferiores a 50%, podendo assim, ser consideradas como hidrofílicas.

Göttlich et al. (1995) ao testar diferentes espécies, a saber: *Exophiala jeanselmei* (CBS 507.90), *Exophiala dermatitidis* (CBS 207.35) e *Hortaea werneckii* com n-hexadecano obtiveram as seguintes porcentagens máximas de células na fase oleosa: 37%; 63% e 98% respectivamente. A não homogeneidade do caráter hidrofóbico em cepas de mesmo gênero pode ser devido à ecologia distinta das mesmas. Os autores ainda observaram que cepas patogênicas ou com potencial para tal apresentam maior hidrofobicidade celular. O artigo também relatou que a hidrofobicidade das células esteve presente em todas as fases do ciclo de vida, tendo um pequeno aumento, em *Hortaea werneckii*, durante a fase estacionária e em meio levemente ácido.

A grande diferença entre as taxas de hidrofobicidade de cepas dos gêneros *Exophiala* e *Cladophialophora*, indicam que a hidrofobicidade superficial celular não é o principal fator seletivo da técnica em estudo, uma vez que o método foi eficaz para a recuperação de cepas que apresentaram tanto hidrofobicidade como hidrofílidade celular. Considerando-se que a metodologia objetiva o isolamento de leveduras negras, o resultado demonstra mais um fator para a eficiência do método, ou seja, atende aos dois padrões celulares estudados.

A hidrofobicidade talvez possa atuar na quantidade de isolados obtidos de uma determinada cepa, assim, espécies hidrofóbicas estariam presentes na interfase óleo-água numa freqüência maior que as hidrofílicas. A seguinte situação hipotética exemplificará a teoria acima: Uma amostra é preparada contendo Cepa A com taxa de hidrofobicidade igual a 95% e concentração igual a 100 cels/mL; e a Cepa B com taxa de hidrofobicidade igual a 40% na mesma concentração. Após adição de óleo mineral e agitação vigorosa, devido à hidrofobicidade celular, a concentração de células da cepa A na interfase seria 95 cels/mL e da B 40 cels/mL. Ao realizar o plaqueamento com alíquota proveniente da interfase; o número de isolados A seria mais que o dobro de B

(95 : 40). Assim, não é recomendável a realização de um estudo quantitativo baseado neste método, pois quanto menor a taxa hidrofóbica da cepa menor suas probabilidades de isolamento.

Tabela 10 - Resultados do teste de hidrofobicidade.

Identificação	Referência	Concentração de células		
		Tratamento	Fase aquosa	Fase oleosa
*Penicillium chrysogenum**	CBS 776.95	Óleo mineral	2,40%	97,60%
		n-hexadecano	2,81%	94,75%
Cladophialophora minourae	CBS 122275	Óleo mineral	5,25%	94,75%
		n-hexadecano	3,30%	96,70%
Cladophialophora sp.	CBS 122253	Óleo mineral	31,91%	68,08%
		n-hexadecano	17,17%	82,82%
Cladophialophora sp.	CBS 122257	Óleo mineral	16,93%	83,07%
		n-hexadecano	10,22%	89,78%
Cladophialophora sp.	CBS 122255	Óleo mineral	25,8%	74,2%
		n-hexadecano	36,92%	63,08%
Cladophialophora sp.	dH 18473	Óleo mineral	47,27%	52,73%
		n-hexadecano	32,4%	67,6%
Exophiala xenobiotica	CBS 122258	Óleo mineral	67,70%	32,30%
		n-hexadecano	83,75%	16,25%
*Exophiala xenobiotica**	CBS 118157	Óleo mineral	55,20%	44,80%
		n-hexadecano	56,70%	43,30%
*Rhodotorula graminis**	CBS2826	Óleo mineral	79,91%	20,81%
		n-hexadecano	85,98%	14,01%

*Cepas-padrão.

5.8 Teste de assimilação de hidrocarbonetos e oligotrofismo.

Os valores das leituras de absorbância dos tratamentos controle (sem adição de suspensão de célula) foram subtraídos dos obtidos para comparação das curvas de crescimento de cepas em diferentes tratamentos e entre cepas. Assim, nos gráficos

apresentados (FIGURAS 3 a 21), os valores de absorbância referem-se apenas ao crescimento da cepa nos diferentes tratamentos.

As curvas de crescimento obtidas foram organizadas por tratamentos nos testes de assimilação (FIGURAS 3 a 7), oligotrofismo (FIGURAS 8 a 12) e por cepa estudada (FIGURAS 13 a 21).

Os tratamentos realizados com volumes maiores de hidrocarbonetos (D e E) não foram considerados nas análises comparativas de assimilação de hidrocarbonetos devido à baixa qualidade das curvas de crescimento obtidas. A agitação promovida pelo aparelho pode não ter sido suficiente para homogeneizar as amostras em meios com 90% de hidrocarbonetos, tratamentos D e E, resultando em curvas de crescimento com muitos picos (FIGURAS 6, 7, 11 e 12). Procedimentos de emulsificação do meio poderiam solucionar este problema, no entanto, outros fatores influenciariam a degradação dos compostos em estudo, não sendo interessante para a avaliação do método de isolamento.

Para os demais tratamentos o aparelho foi considerado adequado, proporcionando curvas de crescimento satisfatórias para o estudo proposto.

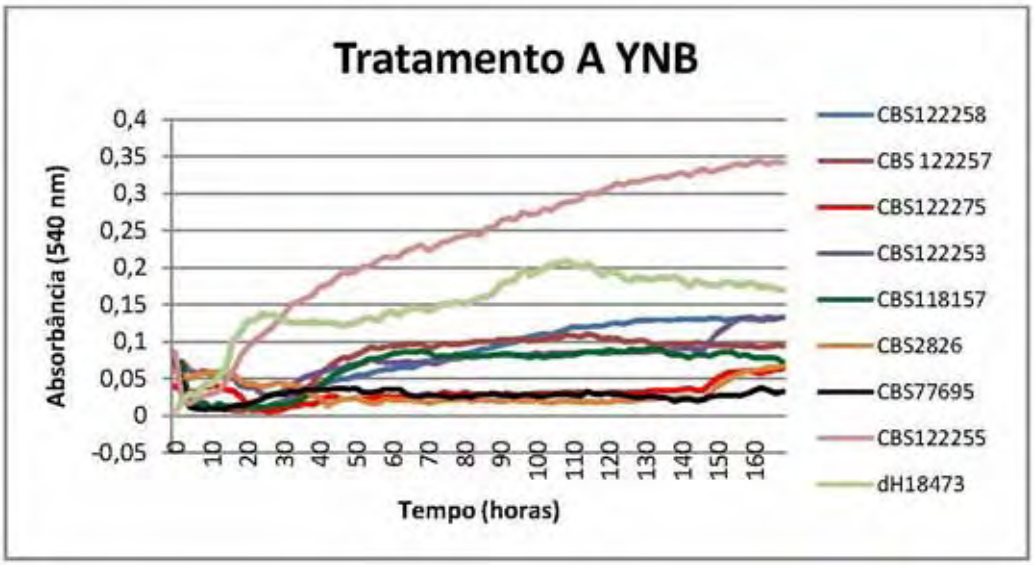


Figura 3 – Curvas de crescimento das cepas em meio mineral, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

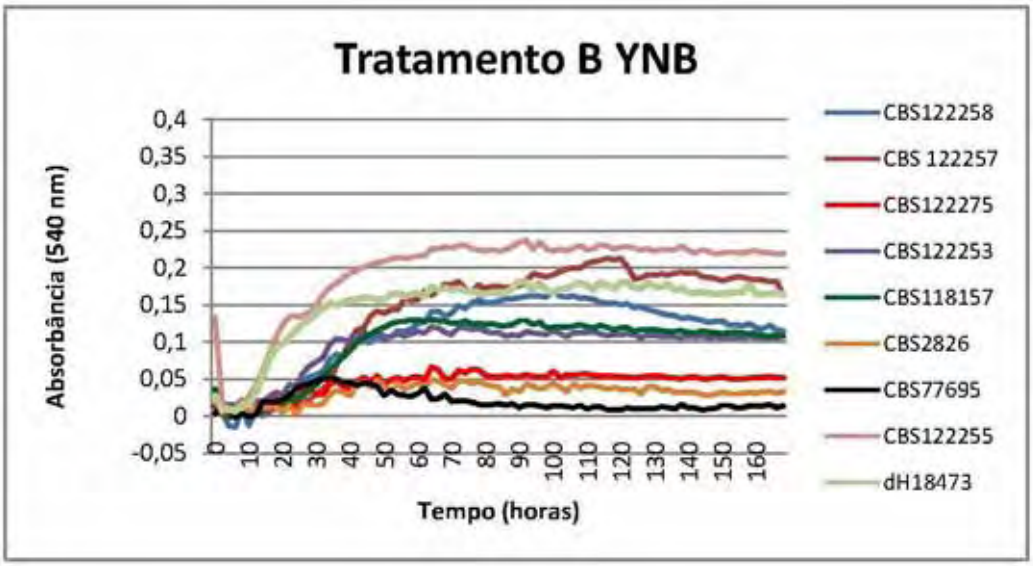


Figura 4 – Curvas de crescimento das cepas em meio mineral + 20% óleo mineral, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

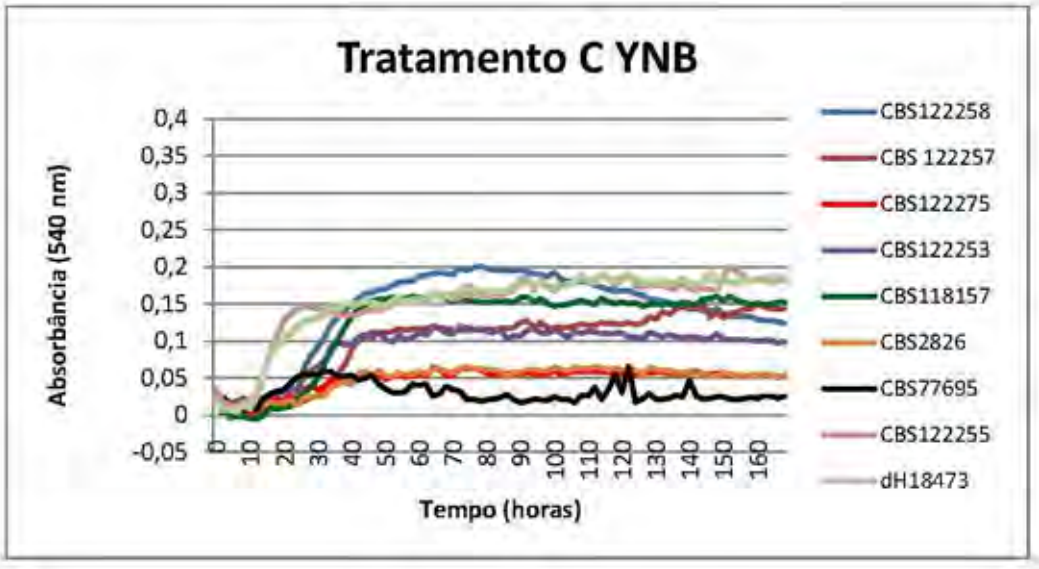


Figura 5 – Curvas de crescimento das cepas em meio mineral + 20% n-hexadecano, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

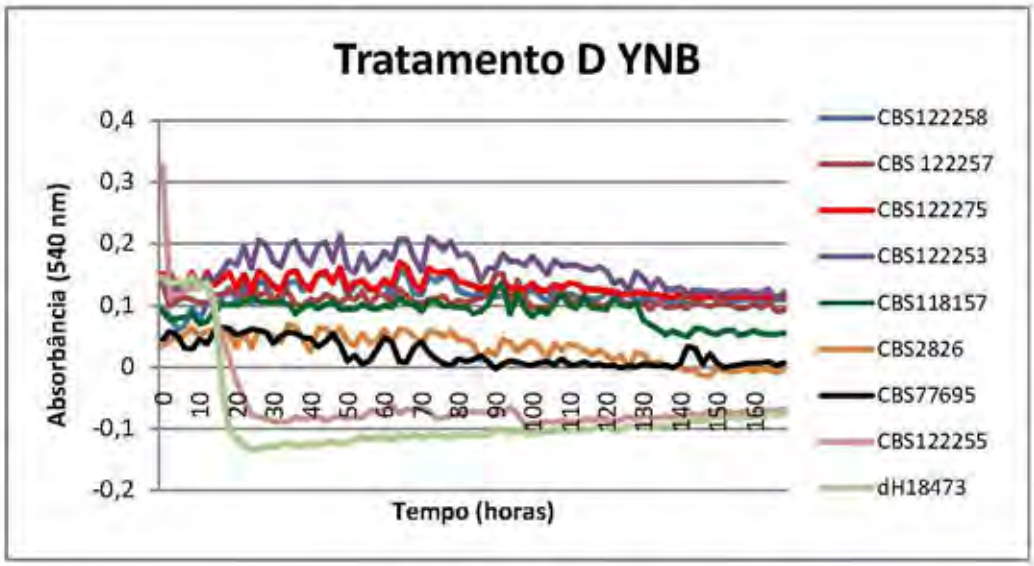


Figura 6 – Curvas de crescimento das cepas em meio mineral + 90% óleo mineral, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

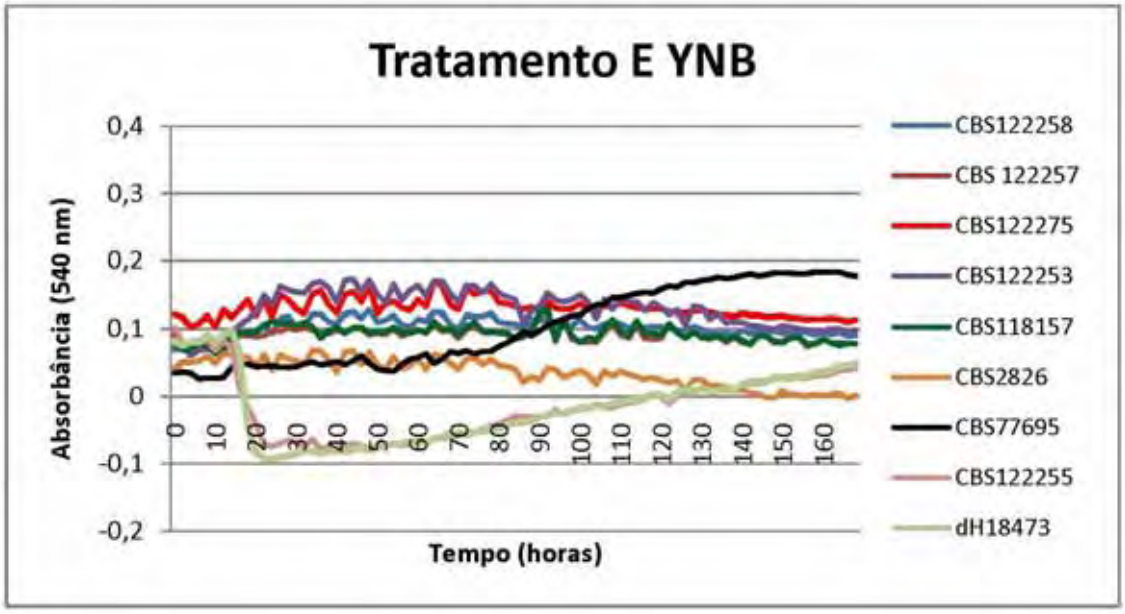


Figura 7 – Curvas de crescimento das cepas em meio mineral + 90% n-hexadecano, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

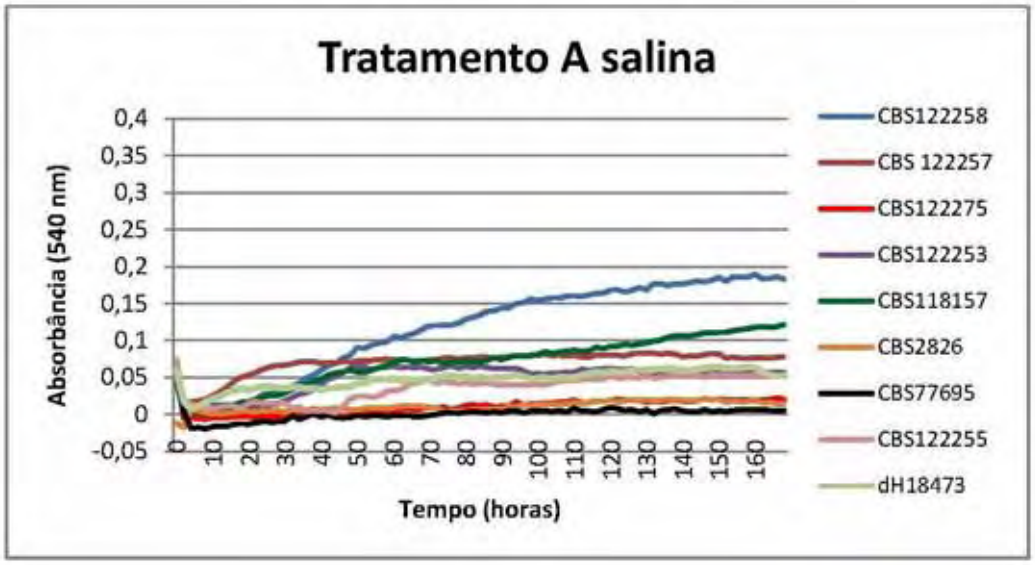


Figura 8 – Curvas de crescimento das cepas em solução salina, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

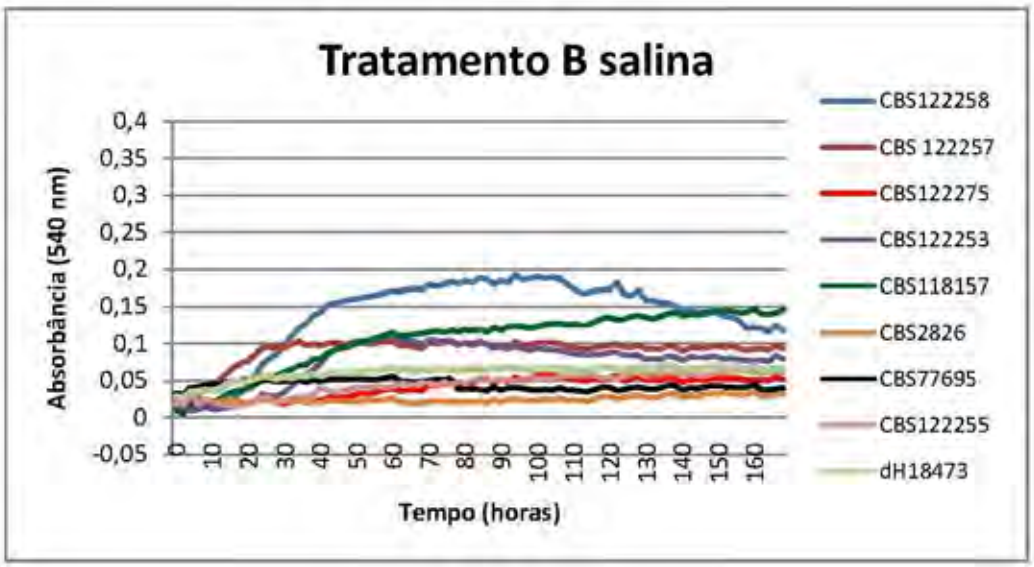


Figura 9 – Curvas de crescimento das cepas em solução salina + 20% óleo mineral, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

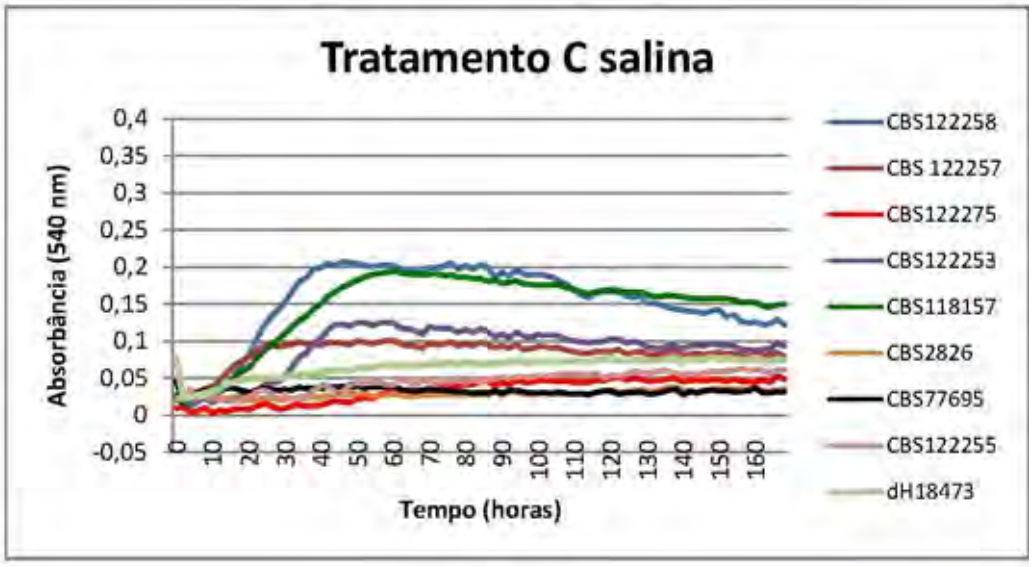


Figura 10 – Curvas de crescimento das cepas em solução salina + 20% n-hexadecano, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

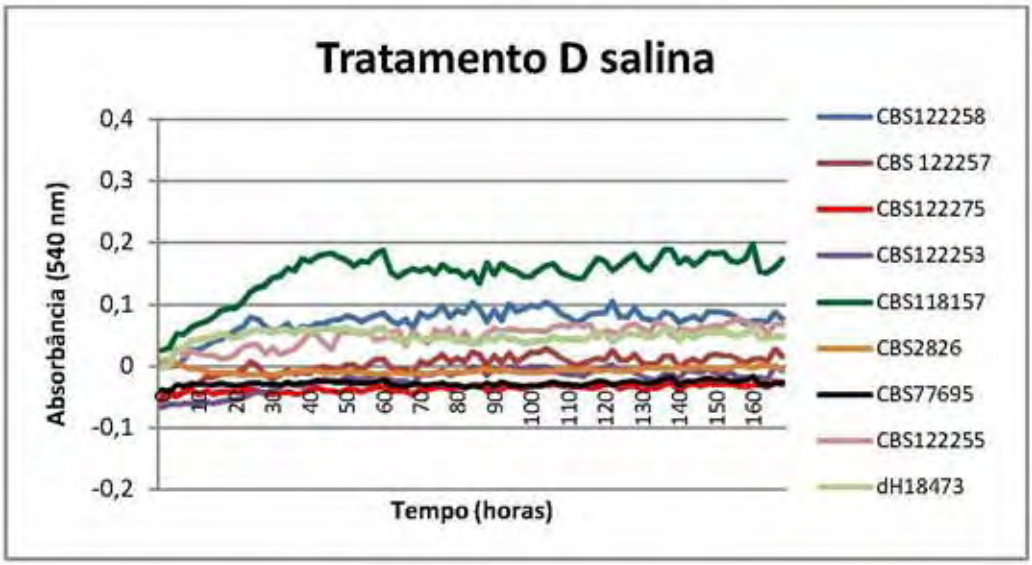


Figura 11 – Curvas de crescimento das cepas em solução salina + 90% óleo mineral, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

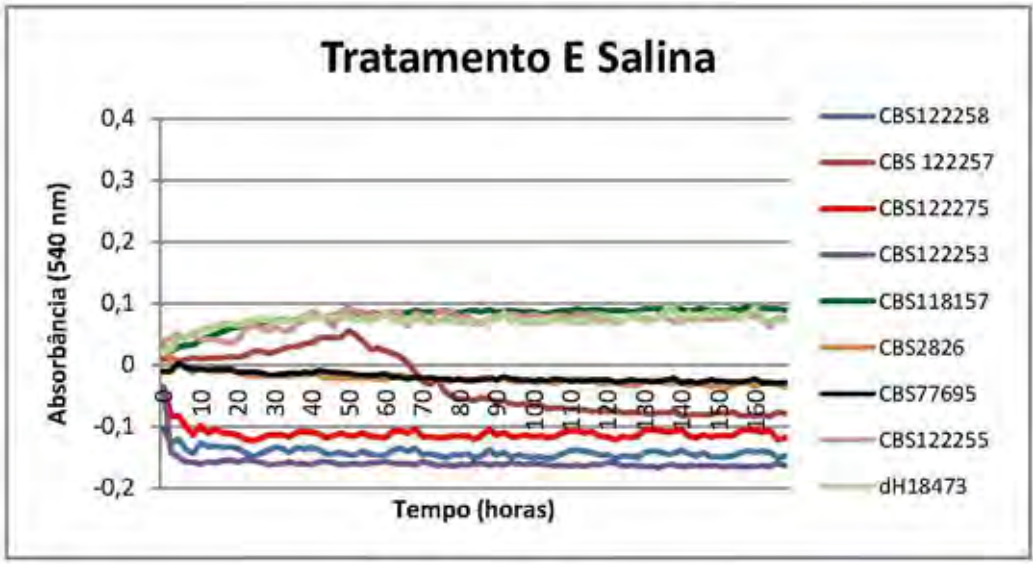


Figura 12 – Curvas de crescimento das cepas em solução salina + 90% n-hexadecano, incubação por 7 dias, a 28 °C e agitação contínua. CBS 122258 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 122257 (*Cladophialophora* sp.), CBS 122275 (*Cladophialophora minourae*), CBS 122253 (*Cladophialophora* sp.), CBS 118157 (*Exophiala xenobiotica*), CBS 2826 (*Rhodotorula graminis*), CBS 776.95 (*Penicillium chrysogenum*), CBS 122255 (*Cladophialophora* sp.), dH 18473 (*Cladophialophora* sp.).

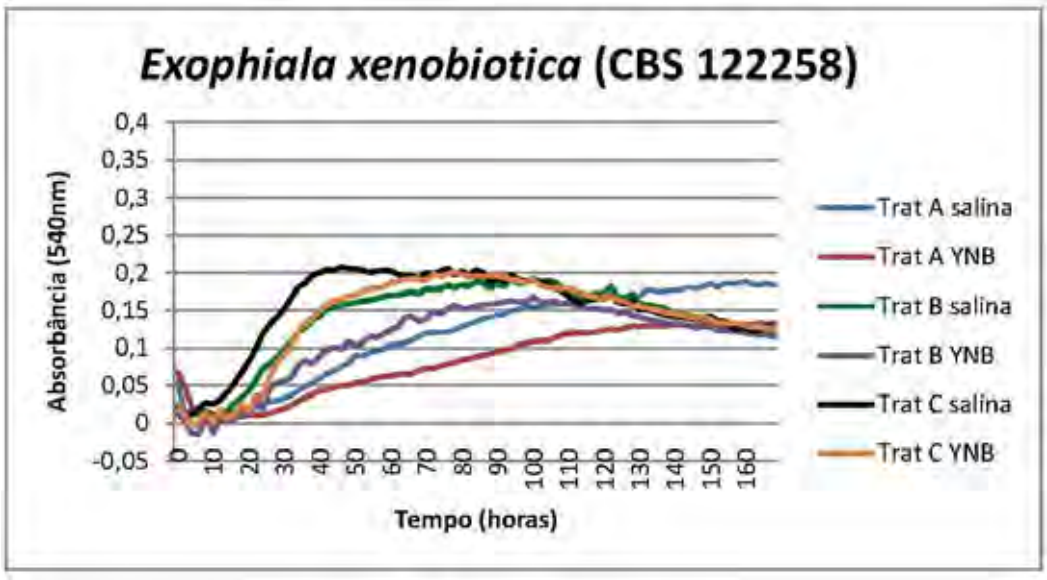


Figura 13- Curvas de crescimento da cepa de *Exophiala xenobiotica* (CBS 122258) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

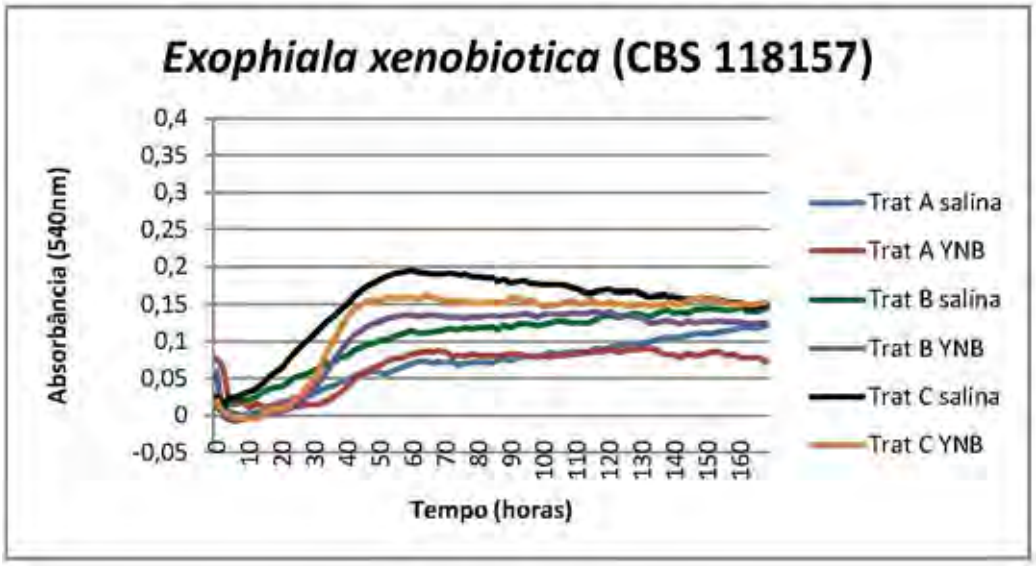


Figura 14- Curvas de crescimento da cepa de *Exophiala xenobiotica* (CBS 118157) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

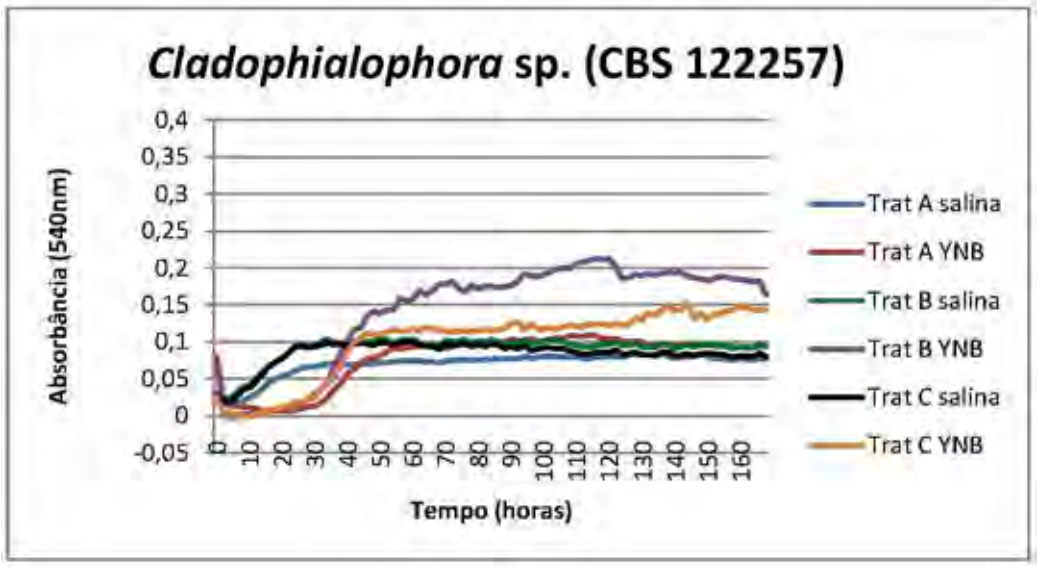


Figura 15- Curvas de crescimento da cepa de *Cladophialophora* sp. (CBS 122257) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos:Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

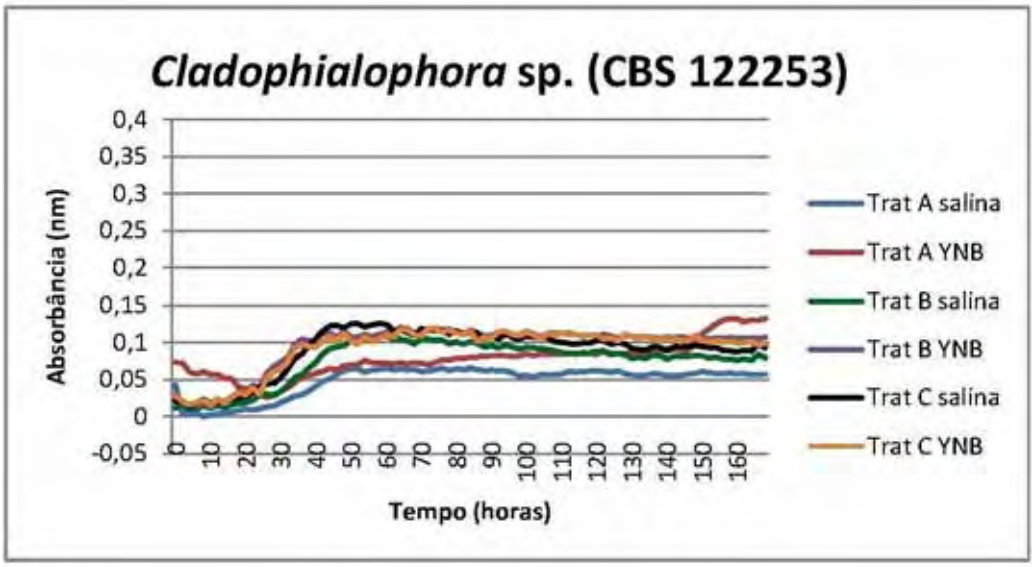


Figura 16- Curvas de crescimento da cepa de *Cladophialophora* sp. (CBS 122253) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

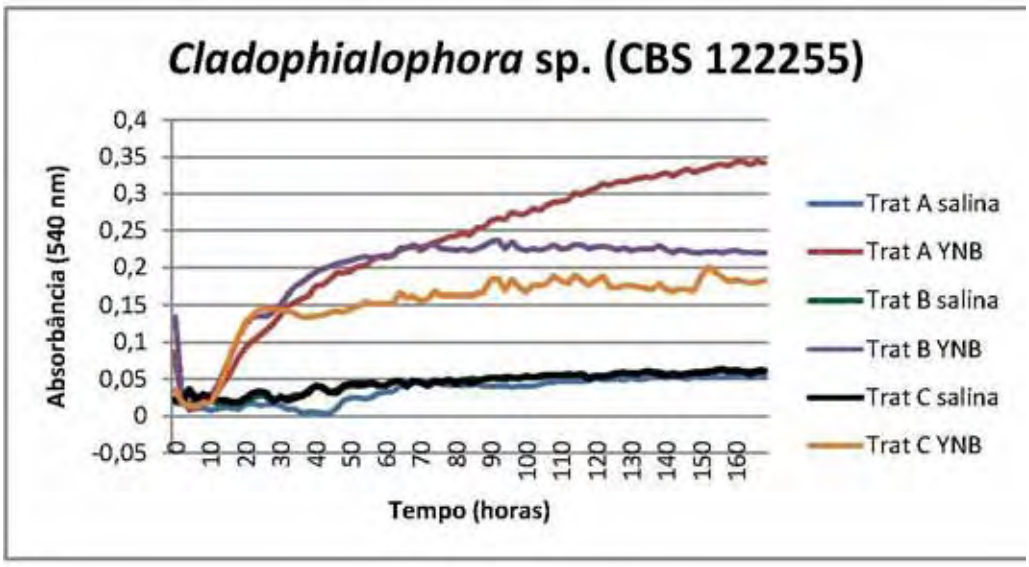


Figura 17- Curvas de crescimento da cepa de *Cladophialophora* sp. (CBS 122255) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

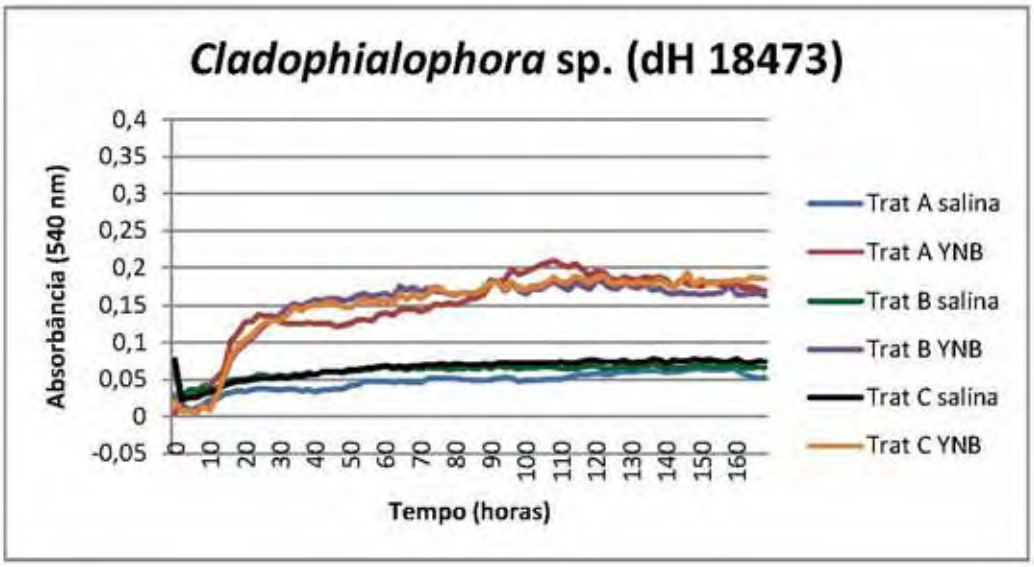


Figura 18- Curvas de crescimento da cepa de *Cladophialophora* sp. (dH 18473) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

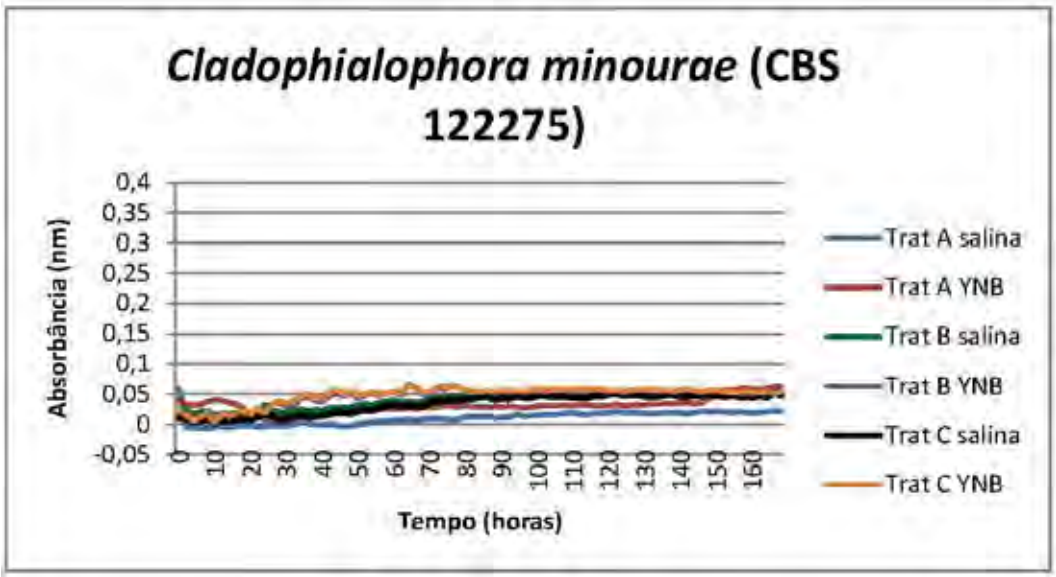


Figura 19- Curvas de crescimento da cepa de *Cladophialophora minourae* (CBS 122275) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

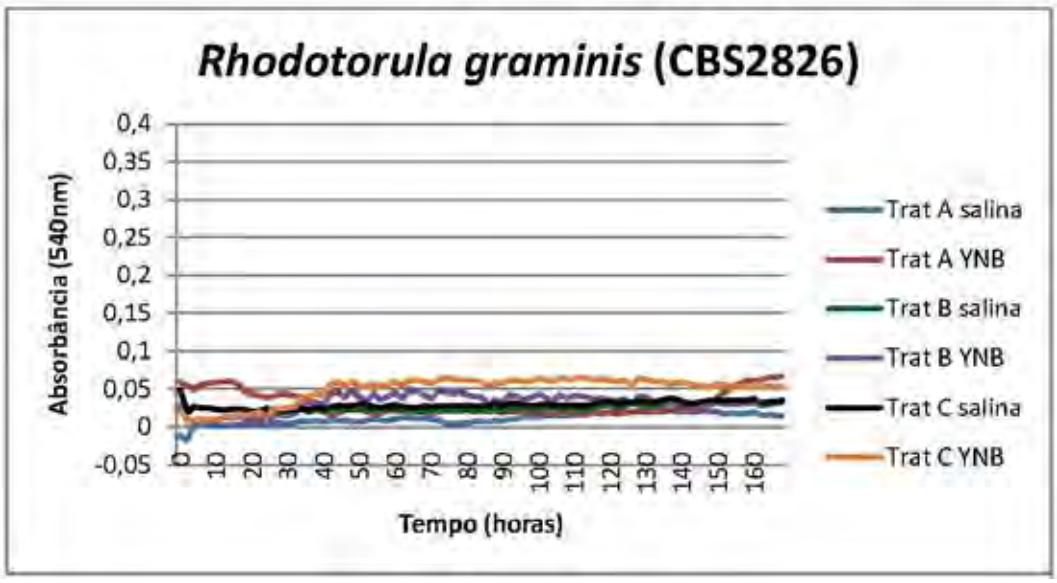


Figura 20- Curvas de crescimento da cepa de *Rhodotorula graminis* (CBS 2826) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

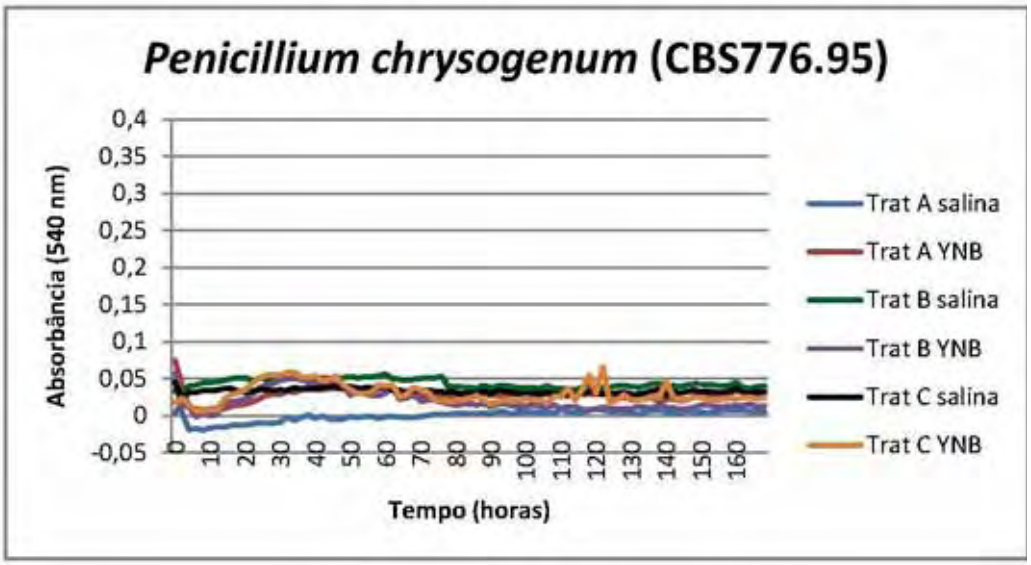


Figura 21- Curvas de crescimento da cepa de *Penicillium chrysogenum* (CBS 776.95) em incubação por 7 dias, a 28 °C, agitação contínua sob diferentes tratamentos: Tratamento A – suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB; Tratamento B- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% óleo mineral; Tratamento C- suspensão de esporos + solução salina ou meio YNB + 20% n-hexadecano.

5.8.1 Teste de assimilação

O tratamento A contendo suspensão de esporos mais meio mineral (YNB) foi utilizado como controle: as cepas cujas curvas de crescimento nos tratamentos B e C apresentaram valores superiores ao controle foram consideradas assimiladoras de hidrocarbonetos.

Nos tratamentos B e C, a adição de hidrocarbonetos numa fração correspondente a 20% do volume total, estimulou o crescimento das cepas de *Exophiala xenobiotica* (FIGURAS 13 e 14) e das cepas do gênero *Cladophialophora* CBS 122253 e CBS122257 (FIGURAS 15 e 16).

A cepa CBS 122255 embora tenha crescido inicialmente em presença de hidrocarboneto, após cerca de 70 horas, este se manteve constante (FIGURA 17). No tratamento controle, o crescimento exponencial continuou durante o período de incubação atingindo valores superiores aos dos tratamentos contendo hidrocarbonetos. Esse resultado pode indicar que, apesar do crescimento inicial observado nos tratamentos com adição de hidrocarbonetos, esta cepa não os assimila como fontes únicas de carbono. Ainda é possível supor que esta cepa possua tolerância a presença de hidrocarbonetos no meio.

A cepa de *Cladophialophora* sp. (dH 18473) apresentou crescimento semelhante nos três tratamentos (FIGURA 18), indicando que a presença de óleo mineral ou n-hexadecano na proporção de 20% não interfere no crescimento desta cepa. Assim, esta cepa pode ser considerada como tolerante a ambientes com hidrocarbonetos porém incapaz de assimilá-los como fontes únicas de carbono. O crescimento não foi significativo para as cepas de *Penicillium chrysogenum* (CBS 776.95), *Rhodotorula graminis* (CBS2826) e *Cladophialophora minourae* (CBS 122275) em nenhum tratamento (FIGURAS 19, 20 E 21). Portanto, as últimas foram consideradas não assimiladoras de óleo mineral ou n-hexadecano e não tolerantes à presença desses compostos no meio.

Os resultados indicam a possibilidade de seleção de cepas de leveduras negras por incubação em meio contendo hidrocarbonetos como únicas fontes de carbono, estimulando o crescimento destas e, inibindo o crescimento de espécies fúngicas não

assimiladoras destes compostos que apresentam altas taxas de crescimento e esporulação como *Rhodotorula graminis* e *Penicillium chrysogenum*.

Considerando-se apenas as cepas assimiladoras de hidrocarbonetos pode-se estabelecer três grupos quanto ao crescimento: a) taxa de crescimento semelhante nos hidrocarbonetos testados (CBS 122253); b) crescimento maior em óleo mineral (CBS122257;); c) maior crescimento em n-hexadecano (CBS122258, CBS118157- ambas *Exophiala xenobiotica*). Essa diferença pode ser devido à composição das substâncias testadas: o óleo mineral é uma mistura de hidrocarbonetos complexos (degradação mais difícil); enquanto o n-hexadecano é um composto puro, com composição química definida ($C_{16}H_{34}$), apresenta cadeia curta e simples (GARRITZ e CHAMIZO, 2003).

Mais uma vez, evidencia-se a eficiência e a importância da técnica em estudo para o isolamento de espécies degradadoras de hidrocarbonetos, visto que resgata fungos com potenciais para aplicação em diferentes tipos de resíduos.

5.8.2 Teste de oligotrofismo

Nos testes de oligotrofismo, o crescimento da maioria das cepas, como previsto, foi limitado, devido à escassez de nutrientes (FIGURAS 8, 9 e 10).

Entretanto, a análise das curvas de crescimento em diferentes tratamentos das cepas de *Exophiala xenobiotica* (FIGURAS 13 e 14) mostra que o metabolismo destas não foi inibido e o crescimento foi semelhante ao do observado nos testes de assimilação.

As cepas CBS 122257 e CBS 122253 também apresentaram crescimento nos tratamentos em solução salina (FIGURAS 15 e 16).

Estes microrganismos mostraram potencial em crescer em meios com nutrientes em baixas concentrações provavelmente disponibilizados pela lise celular de

microrganismos mortos presentes no meio ou da própria amostra coletada; meio inóspito para muitas espécies inclusive algumas do grupo das leveduras negras. Assim, uma incubação da amostra por cerca de 2 dias em solução salina e óleo mineral ou n-hexadecano poderia facilitar o isolamento dessas cepas, principalmente de *Exophiala xenobiotica*, enriquecendo seu crescimento e inibindo o de outras espécies (FIGURAS 9 e 10). Essa poderia ser uma alternativa, caso houvesse a predominância de espécies com alta hidrofobicidade celular na amostra; uma vez que a espécie *Exophiala xenobiotica* como verificado no teste de hidrofobicidade é hidrofílica.

5.8.3 Discussão geral dos resultados obtidos nos testes de assimilação de hidrocarbonetos, oligotrofismo e hidrofobicidade celular.

A análise das curvas de crescimento obtidas nos testes revelou semelhança entre cepas quanto às taxas de crescimento em tratamentos, resumidas na tabela 9:

Tabela 11 - Grupos de cepas segundo taxa de crescimento em diferentes tratamentos:

Crescimento	*A*	*B*	*C*	*D*
Cepas	CBS 122258 CBS 118157	CBS 122255	CBS 122257 CBS 122253	dH 18473
Ordem dos tratamentos por crescimento: maior ↓ Menor	1º Trat. C salina 2º Trat. C YNB 3ºou 4º Trat. B salina ou YNB 5º Trat. A salina 6º Trat. A YNB	1º Trat. A YNB 2º Trat. B YNB 3º Trat. C YNB 4º Trat. A salina, Trat. B salina e Trat. C salina.	1º Tratamentos com hidrocarboneto 2º Trat. A. YNB 3º Trat. A. salina	1° Tratamentos com YNB 2° Tratamentos com salina

A partir da tabela acima e dos gráficos gerados pode-se supor alguns métodos seletivos para diferentes cepas.

Cepas semelhantes a CBS 122257, CBS 122253 poderiam ser recuperadas por aplicação direta do método de Iwatsu sem incubação, devido às suas taxas de

hidrofobicidade intermediárias, ou pela incubação da amostra em solução mineral ou salina acrescida de hidrocarbonetos.

As cepas CBS 122255 e dH 18473 apresentam taxas de hidrofobicidade celular medianas (74,2% e 52,73% em óleo mineral; 63,08% e 67,6% em n-hexadecano). Assim, a recuperação destas por flotação em óleo pode apresentar algumas dificuldades quando a amostra apresentar predomínio de microrganismos com maior taxa de hidrofobicidade. Entretanto, o isolamento destas poderia ser facilitado mediante incubação da amostra em solução mineral, já que estas apresentam crescimento em meio contendo fontes de nitrogênio. Devido à tolerância destas cepas à presença de hidrocarbonetos no meio, a incubação da amostra em meio mineral com 20% de óleo mineral ou n-hexadecano poderia facilitar a recuperação das mesmas. Os hidrocarbonetos inibiriam o crescimento de microrganismos incapazes de sobreviver em sua presença, aumentando as chances de recuperar estas cepas de levedura negra após um período de incubação. A cepa CBS122275 que não apresentou crescimento em nenhum tratamento (FIGURA 19) poderia ser recuperada do meio ambiente devido a sua alta taxa de hidrofobicidade (94,75% em óleo mineral e 96,7% em n-hexadecano).

Neste estudo não foi possível identificar um único fator de seleção da metodologia. Os resultados indicaram que tanto a capacidade de assimilação de hidrocarbonetos, como o oligotrofismo e a hidrofobicidade celular encontram uma relação positiva com a presença do óleo mineral. O fator principal parece depender da forma em que a técnica for realizada: a) execução da metodologia descrita sem períodos de incubação podem favorecer o isolamento de cepas hidrofóbicas; b) inclusão de um período de incubação em solução salina e óleo mineral favorece a recuperação de cepas de *E. xenobiotica*; c) incubação da amostra em óleo mineral e meio mineral pode favorecer o isolamento de uma maior diversidade de leveduras negras (FIGURA 4).

Estudos posteriores devem ser realizados para verificar esses fatores em diferentes amostras provenientes da natureza e em outras espécies de leveduras negras. Assim, o conhecimento sobre a fisiologia e ecologia deste grupo de fungos aumentaria e protocolos específicos poderiam ser estabelecidos para o levantamento de cada grupo de leveduras negras com fisiologia semelhante.

Dixon e Shadomy (1980) observaram variação de espécies de organismos isolados da mesma amostra dependendo da técnica seletiva utilizada.

O isolamento de cepas de leveduras negras, heterogêneas em suas características fisiológicas, ecológicas e filogenéticas justifica a indicação do método de Iwatsu como técnica padrão nos estudos deste grupo de fungos do ambiente. Uma metodologia que apresentasse apenas um mecanismo de seleção não seria adequada para a recuperação de espécies tão distintas, provavelmente algumas cepas seriam favorecidas e outras técnicas teriam que ser aplicadas.

Cabe ressaltar, que além da metodologia, a origem e natureza da amostra influenciam na diversidade dos fungos isolados. (DE HOOG et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

- O local de coleta mostrou-se promissor para o isolamento de leveduras negras bem como para estudos na área de biorremediação;
- O método confirmou ser eficiente para o solo de "landfarming";
- Confirmou-se a importância de uma agitação vigorosa e o uso do meio "Mycosel" para o isolamento de cepas de leveduras negras;
- A análise molecular dos isolados foi essencial para a correta identificação taxonômica dos isolados;
- O meio MEA apresentou maior eficácia na indução de esporulação e estimulou o crescimento das cepas em estudo;
- A análise da temperatura de crescimento permite inferir que as cepas isoladas constituem um grupo de fungos potencialmente oportunistas.
- As cepas utilizadas como referência nos testes de hidrofobicidade foram adequadas ao estudo e permitiram concluir que as cepas isoladas não apresentam homogeneidade quanto ao caráter hidrofóbico;
- A metodologia permitiu o isolamento de espécies de caráter hidrofóbico e hidrofílico, o que demonstra que a hidrofobicidade celular não é único fator seletivo do método;

- A maioria das cepas testadas de leveduras negras foi capaz de assimilar óleo mineral e n-hexadecano como fontes únicas de carbono, indicando que este pode ser um dos mecanismos seletivos da técnica;

- Cepas de *Cladophialophora* sp., não assimiladoras de hidrocarbonetos, foram tolerantes à presença de hidrocarboneto no meio, indicando atuação dos compostos como agente inibidor de microrganismos incapazes de sobreviver em tais condições.

- O oligotrofismo de cepas de *Exophiala xenobiotica* e duas de *Cladophialophora* sp. foi verificado podendo ser empregado como mecanismo seletivo do método.

- As três hipóteses de mecanismos de seleção testadas estão presentes no método em diferentes intensidades dependendo da forma que este é executado e das características fisiológicas dos microrganismos presentes na amostra.

- A metodologia foi considerada eficaz para isolamento de leveduras negras do ambiente, recuperando cepas com características distintas quanto à hidrofobicidade celular, assimilação de óleo mineral e n-hexadecano e oligotrofismo, podendo ser utilizada como metodologia padrão.

- A metodologia pode ser adaptada para o isolamento de cepas específicas.

7 REFERÊNCIAS

AMBIENTE BRASIL: Biorremediação. Disponível em: <http://www.ambiente brasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/biorremediacao.html>. Acesso em: 15 out. 2005.

ATLAS, R. M.; CERNIGLIA, C. E. Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. **Bioscience**, [S.I.], v. 45, n. 5, p. 332-338, may. 1995.

ATTILI-ANGELIS, D.; HOOG, G. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. RDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. **Journal of medical and veterinary mycology**, Oxford, v. 36, p. 219 – 225, 1998.

BADALI, H.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; KWIATKOWSKI, I. B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. A new, opportunistic species of *Cladophialophora*. **Medical Mycology.** Enviado para publicação.

BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 66, p. 1007-1019, 2000.

CAMPBELL, R. **Microbial Ecology:** Basic Microbiology. Blackwell Scientific Publications, [S.I.], v.5, p. 27-29, 1977.

CONCEIÇÃO, D. M. **Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia e do efluente de refinaria de Petróleo, biodegradadores de compostos fenólicos.** 2003. 73f. Dissertação (Mestre em Ciências biológicas. Área de concentração: Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP, e refinarias de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivo do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2005.

CUNHA, R. **As mil e uma utilidades de um líquido negro que vale ouro**. Disponível em <http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet13.shtml>. Acesso em: 29 nov. 2004.

DE HOOG, G. S. Ecology and evolution of Black yeast and their relatives: Preface. In: **Studies in Mycology**. Baarn, n. 43, p. 3-4. May 1999.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Reus: Universitat Rovira i Virgili, 2000. p. 374 – 379.

DE HOOG, G. S.; ZENG, J. S.; HARRAK, M. J. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.I.], v. 90, p. 257-268, 2006.

DIXON, D. M.; SHADOMY, H. J.; SHADOMY, S. Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 70, n. 3, p. 153-161, 1980.

DIXON, D. M.; SHADOMY, H. J. Comparison of methods for isolation of dematiaceous fungi from nature. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 70, n. 3, p. 145-152, 1980.

FURTADO, M. I. **Ataque microbiano remedia áreas contaminadas.** Disponível em <http://www.quimica.com.br/revista/qd389/biotecnologia1.htm>. Acesso em: 09 dez. 2004.

GARRITZ, A.; CHAMIZO, J. A. **Química.** São Paulo: Pearson Education do Brasil, p.170-180, 2003.

GÖTTLICH, E. et al. Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. **Mycoses**, [S.I.], v. 38, p. 489-494, 1995.

HAZEN, B. W.; LIEBERT, R. E.; HAZEN, K. C. Relationship of cell surface hydrophobicity to morphology of monomorphic and dimorphic fungi. **Mycologia**, Bronx, NY, v. 80, n. 3, p. 348-355, 1988.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, Den Hague, v. 75, p. 149-158, 1981.

KATAOKA, A. P. A. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming".** 2001. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KOTTERMAN, M. J. J.; VIZ, E. H.; FIELD, J. A. Successive mineralization detoxification of benzo(a) pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and indigenous microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 64, p. 2853-2858, 1998.

LACAZ, C. S. Introdução ao estudo dos fungos. Significado dos cogumelos na economia humana. In: LACAZ, C. S. et al.. **O grande mundo dos fungos.** São Paulo: Editora Universidade e Editora Polígono, 1970. p.3-31.

MARTINS, A. et al. **Biorremediação**. Disponível em: <http://ceset.unicamp.br/lte/Artigos/3fec2401.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2005.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Japanese Jornal of Medical Mycology**, [S.I.], v. 47, p. 305-311, 2006.

MIDDELHOVEN, W. J.; DE HOOG, G. S.; NOTERMANS, S. Carbon assimilation and extracellular antigens of some yeast-like fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.I.], v. 55, p. 165-175, 1989.

MIDDELHOVEN, W. J.; JONG, I. M.; WINTER, M. Arxula adeninivorans, a yeast assimilating many nitrogenous and aromatic compounds. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.I.], v. 59, p. 129-137, 1991.

NAVARRETE, A. A. **Algas na detoxicação do solo de "landfarming" de refinaria de petróleo.** 2006. 95f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PASCHOA, G. **O petróleo e a agressão ao meio ambiente**. Disponível em <http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet09.shtml>. Acesso em: 10 jan. 2005.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia:** Conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron books, 1996. 2v.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. **Growth of fungi on volatile aromatic hydrocarbons:** Environmental perspectives. Thesis Wageningen University, Wagenningen , 2002.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 68, n. 6, p. 2660-2665, jun. 2002.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Biorremediation of BTEX hydrocarbons: Effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. **Biodegradation**, [S.I.], v. 15, p. 59-65, 2004.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; SUMMERBELL, R.; HOOG, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. **FEMS Microbiol Ver,** [S.I.], v. xx, p. 1-22, 2005.

Protocol on line. Net. Executing a PCR with ribosomal DNA. Disponível em: <http://www.protocol-online.net/Protocol.htm> acesso em: 20 set. 2007.

RICHARD-YEGRES N.; YEGRES F. *Cladosporium carrionii* en vegetación xerófila: aislamento en una zona endemica para la cromomicosis en Venezuela. **Dermatologia Venezolana**, [S.I.], v. 25, p. 15-18, 1987.

RIO DE JANEIRO (Rio de Janeiro). Petróleo Brasileiro S.A.- PETROBRAS. **Refinaria de Paulínia.** Disponível em: < http://www2.petrobras.com.br/minisite/refinarias/portugues/refinarias/i_replan.asp >. Acesso em: 25 jul. 2007.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO, I. S. (Org.) **Microbiologia Ambiental.** Jaguariuna: Embrapa, 1997. p.307-326.

SÃO PAULO (São Paulo). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB. **Aspectos toxicológicos dos óleos.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_toxicologicos.asp>. Acesso em: 11 mar. 2005.

SÃO PAULO (São Paulo). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB. **Solos, coleta e preparação de amostras- Procedimentos. Norma técnica L6.245**. 1984.

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.

SILVA, R. L. B. et al. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1599-1607, nov/dez. 2002.

SMITH, C. D.; FURCOLOW, M. L. Efficiency of three techniques for isolating *Histoplasma capsulatum* from soil including a new flotation technique. **Journal of Laboratorial Clinical Medecine**, [S.I.], v. 64, p. 342-348, 1964.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 1.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. p.110-114 e 528-544.

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

STERFLINGER, K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: ROSA, C. e PÉTER, G. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** Heidelberg: Spring-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p. 501-514.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003.

UIJTHOF, J. M. J. **Taxonomy and phylogeny of the Human Pthogenic Black yeast genus *Exophiala* Carmichael.** 1996. 120 p. PhD Thesis. University of Utrecht, Utrecht, 1996. p.9-17.

VICENTE, V. A.; ANGELIS, D. A.; QUEIROZ-TELLES FILHO, F. Isolamento de fungos herpotriquieláceos do ambiente. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 47-51, jan./mar. 2001.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.** 2000. 181f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

VIENA. Organization of the Petroleum Exporting Countries - OPEC. **World Oil Outlook 2007**. Disponível em:< http://www.opec.org/library/World%20Oil%20Outlook/pdf/Section%20One.pdf> Acesso em: 21 jul. 2007.

WOERTZ, J. R. et al. Removal of toluene in a vapour-phase bioreactor containing a strain of *Exophiala lecanii-corni*. **Biotechnology and bioengineering, [S.I.],** v.75, n.5, p.550-558. dec. 2001.

ZENG, J. S. et al. Phylogeny of the *Exophiala spinifera* clade using multilocus sequence data and exploring phylogenetic species concept. In: ZENG, J.S. Developing Species Recognition and Diagnostics of Rare Opportunistic Fungi. 2007. PhD Thesis, University of Amsterdam, Amsterdam and Centraalbureau voor Schimmelculture, Utrecht, 2007. p. 85-106.

APÊNDICE 1

Analytical Technology

ANÁLISES DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO (TPH)

INTERESSADO: UNESP DE RIO CLARO
Avenida 24 - A, 1515.
13506-9000 - São Paulo/SP
Tel (19) 3532-5119

LABORATÓRIO CONTRATADO: Analytical Technology Serviços Analíticos e Ambientais Ltda.

PROJETO: NÃO INFORMADO

IDENTIFICAÇÃO AT: LOG nº 4046A

Analytical Technology
Rua Francisco Cruz, 178 - V. Mariana • São Paulo SP • CEP 04117-090 • Tel.: (11) 5083 8886 Fax: (11) 5574 5065
www.analyticaltechnology.com.br

Dados referentes ao Projeto

1. Identificação das amostras

ID AT	IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO
4046A20656	AMOSTRA: SOLO 1 / DATA: 29/09/06 / HORA: NÃO INFORMADO/ MATRIZ: SOLO / PROJETO: NÃO INFORMADO
4046A20657	AMOSTRA: SOLO 2 / DATA: 29/09/06 / HORA: NÃO INFORMADO/ MATRIZ: SOLO / PROJETO: NÃO INFORMADO

2. Custódia das amostras

Data de recebimento de amostra: 30/09/06

Data de emissão do relatório eletrônico: 16/10/06

Período de retenção das amostras: até 16/10/06 (até essa data as amostras estarão disponíveis para devolução e/ou checagem)

Analytical Technology
Rua Francisco Cruz, 178 - V. Mariana • São Paulo SP • CEP 04117-090 • Tel.: (11) 5083 5888 Fax: (11) 5574 5066
www.analyticaltechnology.com.br

3. Resultados de análises

TPH – LOGIN Nº 4046A20656

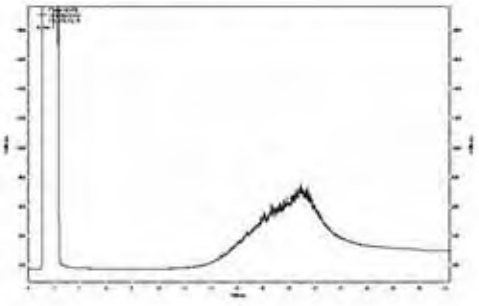
PROJETO: NÃO INFORMADO			
PONTO: SOLO 1	**DATA**: 29/09/06	**HORA**: NÃO INFORMADO	**MATRIZ**: SOLO

Referência Externa
USEPA 8015B

Identificação do Arquivo: C:\ChromQuest\Projects\Default\Data\0305-06A\FID11\037.DAT
Método de Aquisição: C:\ChromQuest\Projects\Default\Methods\1006-06_ALCANOS.met
Identificação da Amostra 4046A20656
Massa inicial da Amostra (g): 14,6
Fator de Diluição: 100
Data de Extração: 03/10/06
Data de Injeção: 7/10/2006 01:21:12

Composto	Concentração (µg/Kg)	LD (µg/Kg) (1)	LQ (µg/Kg) (1)
C10	ND	39593,4	109780,2
C11	ND	39593,4	109780,2
C12	ND	39593,4	109780,2
C13	ND	39593,4	109780,2
C14	ND	39593,4	109780,2
C15	ND	39593,4	109780,2
C16	ND	39593,4	109780,2
C17	ND	39593,4	109780,2
Pristano	ND	39593,4	109780,2
C18	ND	39593,4	109780,2
Fitano	ND	39593,4	109780,2
C19	ND	39593,4	109780,2
C20	ND	39593,4	109780,2
C21	ND	39593,4	109780,2
C22	ND	39593,4	109780,2
C23	ND	39593,4	109780,2
C24	ND	39593,4	109780,2
C25	ND	39593,4	109780,2
C26	ND	39593,4	109780,2
C27	ND	39593,4	109780,2
C28	ND	39593,4	109780,2
C29	ND	39593,4	109780,2
C30	ND	39593,4	109780,2
C31	ND	39593,4	109780,2
C32	ND	39593,4	109780,2
C33	ND	39593,4	109780,2
C34	ND	39593,4	109780,2
C35	ND	39593,4	109780,2
C36	ND	39593,4	109780,2
Total n-alcanos	ND	n/a	n/a
HRP	483734,76	n/a	n/a
MCNR	11847035,96	n/a	n/a
HTP	12330761,70	1062197,8	3186593,4

Cromatograma FID



QA/QC - Recuperação dos padrões de controle e critérios de aceitação.

Padrão de Controle	Recuperação (%)	Critérios de Aceitação (%)
C20-d42	140	40-135

Interpretações
O perfil cromatográfico da amostra apresenta contaminação por óleo cru intemperizado.

Observações:
Resultados expressos na base seca
ND = Não detectado
LD = Limite de Detecção
LQ = Limite de Quantificação
(1) = Limites elevados devido à necessidade de diluição da amostra
(2) = Surrogate não recuperado devido à diluição da amostra

Definições
MCNR - Mistura Complexa Não Resolvida
HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
HRP - Hidrocarbonetos Resolvidos de Petróleo

Aprovado por:
Glauco F. S. Silva
Gerente Técnico

Analytical Technology
Rua Francisco Cruz, 178 - V. Mariana • São Paulo SP • CEP 04117-090 • Tel.: (11) 5083 8888 Fax: (11) 5574 5065
www.analyticaltechnology.com.br

TPH – LOGIN Nº 4046A20657

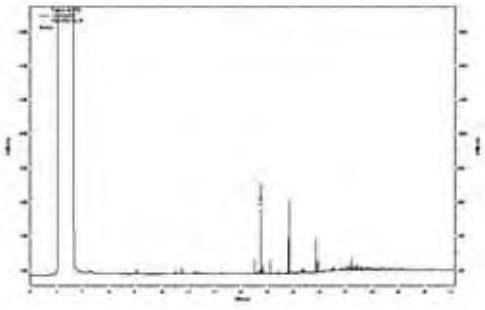
PROJETO: NÃO INFORMADO			
PONTO: SOLO 2	**DATA**: 29/09/06	**HORA**: NÃO INFORMADO	**MATRIZ**: SOLO

Referência Externa
USEPA 8015B

Identificação do Arquivo: C:\ChromQuest\Projects\Default\Data\1067-06AFID117067.DAT
Método de Aquisição: C:\ChromQuest\Projects\Default\Method\1003-06_ALCANOS.met
Identificação da Amostra 4046A20657
Massa inicial de Amostra (g): 15,2
Fator de Diluição: 1
Data de Extração: 03/10/06
Data de Injeção: 9/10/2006 14:26:00

Composto	Concentração (µg/Kg)	LD (µg/Kg)	LQ (µg/Kg)
C10	ND	354,3	1062,8
C11	ND	354,3	1062,8
C12	ND	354,3	1062,8
C13	ND	354,3	1062,8
C14	ND	354,3	1062,8
C15	ND	354,3	1062,8
C16	ND	354,3	1062,8
C17	ND	354,3	1062,8
Pristano	ND	354,3	1062,8
C18	ND	354,3	1062,8
Fitano	ND	354,3	1062,8
C19	ND	354,3	1062,8
C20	ND	354,3	1062,8
C21	ND	354,3	1062,8
C22	ND	354,3	1062,8
C23	ND	354,3	1062,8
C24	ND	354,3	1062,8
C25	ND	354,3	1062,8
C26	ND	354,3	1062,8
C27	ND	354,3	1062,8
C28	ND	354,3	1062,8
C29	ND	354,3	1062,8
C30	ND	354,3	1062,8
C31	ND	354,3	1062,8
C32	ND	354,3	1062,8
C33	ND	354,3	1062,8
C34	ND	354,3	1062,8
C35	ND	354,3	1062,8
C36	ND	354,3	1062,8
Total n-alcanes	ND	n/a	n/a
HRP	ND	n/a	n/a
MCNR	ND	n/a	n/a
HTP	ND	10283,0	30848,9

Cromatograma FID



QA/QC - Recuperação dos padrões de controle e critérios de aceitação.

Padrão de Controle	Recuperação (%)	Critérios de Aceitação (%)
C20-d42	42,36	40-135

Interpretações
O perfil cromatográfico da amostra não apresenta contaminação proveniente de compostos orgânicos derivados de petróleo.

Observações:
Resultados expressos na base seca
ND = Não detectado
LD = Limite de Detecção
LQ = Limite de Quantificação

Definições
MCNR - Mistura Complexa Não Resolvida
HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
HRP - Hidrocarbonetos Resolvidos de Petróleo

Aprovado por:
Glauco F. S. Silva
Gerente Técnico

Analytical Technology
Rua Francisco Cruz, 178 - V. Mariana • São Paulo SP • CEP 04117-090 • Tel.: (11) 5083 5888 Fax: (11) 5574 5065
www.analyticaltechnology.com.br

Dados de Branco de Análise – TPH

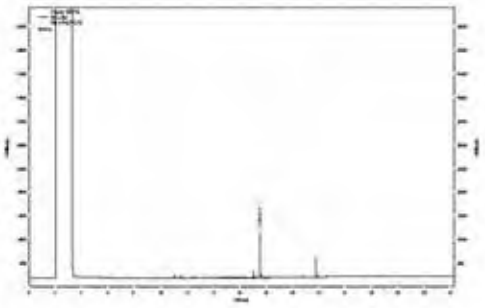
PROJETO: NÃO INFORMADO	
PONTO: BRANCO DE ANÁLISE	**MATRIZ:** SOLO

Referência Externa
USEPA 8015B

Identificação do Arquivo: C:\ChromQuest\Projects\Default\Data\1007-06AF1D117067.DAT
Método de Aquisição: C:\ChromQuest\Projects\Default\Method\1009-06_ALCANOS.met
Identificação da Amostra 1003-B2
Massa Inicial de Amostra (g): 15,0
Fator de Diluição: -
Data de Extração: 03/10/06
Data de Injeção: 8/10/2006 10:39:35

Composto	Concentração (µg/Kg)	LD (µg/Kg)	LQ (µg/Kg)
C10	ND	333,00	999,00
C11	ND	333,00	999,00
C12	ND	333,00	999,00
C13	ND	333,00	999,00
C14	ND	333,00	999,00
C15	ND	333,00	999,00
C16	ND	333,00	999,00
C17	ND	333,00	999,00
Pristano	ND	333,00	999,00
C18	ND	333,00	999,00
Fitano	ND	333,00	999,00
C19	ND	333,00	999,00
C20	ND	333,00	999,00
C21	ND	333,00	999,00
C22	ND	333,00	999,00
C23	ND	333,00	999,00
C24	ND	333,00	999,00
C25	ND	333,00	999,00
C26	ND	333,00	999,00
C27	ND	333,00	999,00
C28	ND	333,00	999,00
C29	ND	333,00	999,00
C30	ND	333,00	999,00
C31	ND	333,00	999,00
C32	ND	333,00	999,00
C33	ND	333,00	999,00
C34	ND	333,00	999,00
C35	ND	333,00	999,00
C36	ND	333,00	999,00
Total n-alcanos	ND	n/a	n/a
HRP	ND	n/a	n/a
MCNR	ND	n/a	n/a
HTP	ND	9666,00	29998,00

Cromatograma FID



QA/QC - Recuperação dos padrões de controle e critérios de aceitação.

Padrão de Controle	Recuperação (%)	Critérios de Aceitação (%)
C20-d42	84,45	40-135

Interpretações
Não Aplicável

Observações:
Resultados expressos na base seca
ND = Não detectado
LD = Limite de Detecção
LQ = Limite de Quantificação

Definições
MCNR - Mistura Complexa Não Resolvida
HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
HRP - Hidrocarbonetos Resolvidos de Petróleo

Aprovado por:
Glauco F. S. Silva
Gerente Técnico

Analytical Technology
Rua Francisco Cruz, 178 - V. Mariana • São Paulo SP • CEP 04117-090 • Tel.: (11) 5083 5888 Fax: (11) 5574 5065
www.analyticaltechnology.com.br

Dados de QA/QC – Padrão SPIKE – TPH

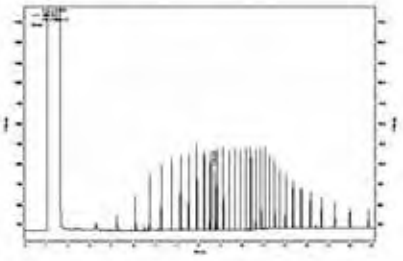
PROJETO: NÃO INFORMADO	
PONTO: SPIKE	**MATRIZ:** SOLO

Referência Externa
USEPA 8015B

Identificação do Arquivo: C:\ChromQuest\Projects\Default\Data\1007-66A\FID1\1706B.DAT
Método de Aquisição: C:\ChromQuest\Projects\Default\Method\1005-06_ALCANOS.met
Identificação da Amostra: 1003-PD2
Massa inicial de Amostra (g): 15,0
Fator de Diluição: -
Data de Extração: 3/10/06
Data de Injeção: 6/10/2006 11:18:26

Composto	Concentração (µg/Kg)	Spike Add.	% Recuperação	Critérios de Aceitação (%)
C10	714,67	1333,3	53,6	40-135
C11	777,60	1333,3	58,3	40-135
C12	940,73	1333,3	70,6	40-135
C13	862,47	1333,3	64,7	40-135
C14	885,80	1333,3	66,4	40-135
C15	909,33	1333,3	68,2	40-135
C16	939,40	1333,3	70,5	40-135
C17	960,07	1333,3	72,0	40-135
Pristano	986,20	1333,3	74,0	40-135
C18	941,73	1333,3	70,6	40-135
Fitano	960,20	1333,3	72,0	40-135
C19	958,93	1333,3	71,9	40-135
C20	966,73	1333,3	72,5	40-135
C21	1089,47	1333,3	81,7	40-135
C22	994,80	1333,3	74,6	40-135
C23	995,33	1333,3	74,7	40-135
C24	994,07	1333,3	74,6	40-135
C25	1009,33	1333,3	75,3	40-135
C26	1006,20	1333,3	80,1	40-135
C27	981,13	1333,3	73,6	40-135
C28	1523,33	1333,3	114,3	40-135
C29	959,00	1333,3	71,9	40-135
C30	945,73	1333,3	70,9	40-135
C31	939,20	1333,3	70,4	40-135
C32	930,40	1333,3	69,8	40-135
C33	939,40	1333,3	70,4	40-135
C34	942,53	1333,3	70,7	40-135
C35	964,80	1333,3	72,3	40-135
C36	1016,13	1333,3	76,1	40-135
Total n-alcanos	26086,33	n/a	n/a	n/a
HRP	n/a	n/a	n/a	n/a
MCNR	n/a	n/a	n/a	n/a
HTP	n/a	n/a	n/a	n/a

Cromatograma FID



QA/QC - Recuperação dos padrões de controle e critérios de aceitação.

Padrão de Controle	Recuperação (%)	Critérios de Aceitação (%)
C20-d42	83,82	40-135

Interpretações
Não Aplicável

Observações:
Resultados expressos na base seca.
ND = Não detectado
LD = Limite de Detecção
LQ = Limite de Quantificação

Definições
MCNR - Mistura Complexa Não Resolvida
HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
HRP - Hidrocarbonetos Resolvidos de Petróleo

Analytical Technology
Rua Francisco Cruz, 178 - V. Mariana • São Paulo SP • CEP 04117-090 • Tel.: (11) 5083 5888 Fax: (11) 5574 5065
www.analyticaltechnology.com.br

4. Responsabilidade técnica

Ana Paula Ahualli	**CRQ 4ª Região nº 04121814**

5. Informações Adicionais

Os resultados aqui apresentados referem-se exclusivamente às amostras enviadas pelo interessado. O relatório de ensaio só deve ser reproduzido por completo. A reprodução parcial requer aprovação por escrita deste laboratório.

6. Anexos

✓ Cadeia de Custódia.

7. Aprovação do relatório

Relatório aprovado segundo especificações comerciais (proposta 106.06) e técnicas com base nos procedimentos do Sistema da Qualidade Analytical Technology e referências externas.

Glauco F. de Sousa da Silva
CRQ 4ª Região nº 04439405
Gerente Técnico