UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

MARIANA BLANCO BARATO

Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas

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 - Microbiologia Aplicada.

Rio Claro-SP
2014

MARIANA BLANCO BARATO

Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette
Co-orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro-SP
2014

589.2 Barato, Mariana Blanco
B226f Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas / Mariana Blanco Barato. - Rio Claro, 2014
73 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Lara Durães Sette
Coorientador: André Rodrigues

1. Fungos. 2. Enzimas de interesse biotecnológico - Fungos produtores. 3. Enzimas adaptadas ao frio. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas

AUTORA: MARIANA BLANCO BARATO
ORIENTADORA: Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquimica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA
Departamento de Bioquimica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQ / Universidade Estadual de Campinas

Data da realização: 24 de abril de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, José Humberto e Vânia, por todo suporte dado, confiança, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" pela oportunidade de participar do programa de pós-graduação em Microbiologia Aplicada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada e a todos os docentes e profissionais envolvidos no programa.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todos os funcionários, principalmente os que ajudaram de alguma forma ao desenvolvimento do projeto.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), pela ajuda quando necessária, pela companhia, pelas risadas e saídas durante esses dois anos.

Ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) pela grande ajuda prestada durante o desenvolvimento do projeto, em especial aos meus amigos Danilo, Tássio e Lucas pela paciência, amizade e ajuda prestada sempre que precisei.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), especialmente ao Laboratório de Microbiologia e também ao Miagui, por sequenciar muitas amostras de fungos para mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Lara Durães Sette, por primeiramente ter me dado a oportunidade de trabalhar no laboratório quando este ainda estava sendo construído, ter participado de cada etapa foi uma experiência muito válida. Agradeço pela orientação durante a realização do projeto e por poder fazer parte de uma equipe muito competente.

Ao meu co-orientador Prof.Dr.André Rodrigues, por todo ensinamento na parte de biologia molecular do meu trabalho, sua ajuda foi essencial e de grande valia.

Ao pessoal da DRM – CPQBA (UNICAMP), especialmente a Rafaella Bonugli e o Fernando Nobre.

As pessoas que conheci e aos amigos que fiz durante esses dois anos, pessoas que vou levar comigo para sempre de alguma forma. Thayse, Rafael, Viviane, Sadala, Ives, Danilo, Tássio, Gustavo, Bárbara Rani, Bárbara, Jaque, Alexandre, Grazy, Roberta, Túlio, Raphael, Paola, Marcela, Vinicius, Ana Maria, Quimi,Weilan Paixão, Cis, Silvio, Juliana, Gabriela, Pedro Mainardi, Fran, Victor, Mari Vida, Paulo Ávila, Cesar, Adriano, Giordanni.

Um agradecimento em especial, aos meus amigos Thayse, Rafael, Viviane, Paola, Jaque, Paixão e Sadala, por todos os momentos vividos, todas as risadas, cervejadas, festas, bares, cafés, tudo que vivemos juntos foi muito especial, sou muito grata por ter a amizade de vocês, cada dia que passei em Rio Claro não poderia ter sido melhor, muito obrigada!

Gostaria de agradecer ao meu pai, que mesmo não estando entre nós há algum tempo, sempre me incentivou, me passou os melhores valores, me deu exemplo, referência. Tenho certeza que ele estaria muito orgulhoso por mais uma conquista, mais uma etapa vencida na minha vida. Gostaria muito que ele estivesse presente, mas espero que de alguma forma ele esteja "vendo" esse momento. Agradeço muito a minha mãe, que está sempre ao meu lado, dando conselhos, me guiando, dando o melhor de si, me dando exemplo de força, de superação. Sua presença em minha vida é fundamental. Sempre vou ser muito grata a vocês, por todo amor, carinho, compreensão e ensinamentos durante a minha vida.

RESUMO

O interesse por micro-organismos, em especial os fungos derivados de ambientes poucos explorados como a Antártica, tem crescido nas últimas décadas. Os ecossistemas da Antártica por serem caracterizados por extremos de temperatura, salinidade ou valores de pH, inviabilizam o desenvolvimento de muitas formas de vida, sendo os micro-organismos os mais adaptados para se proliferar nos substratos deste continente. Os micro-organismos que se desenvolvem nos ecossistemas Antárticos são capazes de produzir enzimas adaptadas ao frio, as quais possuem potencial aplicação em diversos setores de importância econômica. O presente projeto é parte do Projeto Fapesp 2010/17033-0 intitulado "Exploração biotecnológica de fungos derivados da Antártica" coordenado pela Profa. Dra. Lara Sette e teve como objetivo conhecer a biodiversidade, selecionar fungos filamentosos com potencial ligninocelulolítico e avaliar a produção dessas enzimas a médias e baixas temperaturas. Para tanto, foram utilizados 160 isolados recuperados de amostras marinhas e terrestres do continente Antártico que se encontram mantidos na coleção de pesquisa da DRM (CPQBA/UNICAMP) e na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). Após a triagem inicial (em meio sólido e em meio líquido) dois fungos ligninolíticos foram selecionados para os experimentos subsequentes, um de origem marinha (P1) e outro de origem terrestre (M7), os quais foram identificados como *Cadophora luteo-olivacea* e *Cadophora malorum*, respectivamente. Os ensaios referentes à avaliação de diferentes fatores na produção de ligninases permitiu identificar os efeitos de cada uma das variáveis na atividade enzimática. Entretanto, a otimização da produção de lacase para o fungo C. *luteo-olivacea* P1 não foi eficiente, tendo em vista a baixa atividade desta enzima nas condições estudadas. Em substratos lignocelulósicos o fungo *C. malorum* M7 se destacou frente à atividade de xilanases quando cultivado em bagaço de cana e sabugo de milho. Dentre os 160 fungos estudados, 76 foram avaliados taxonomicamente, revelando a presença de 11 gêneros distintos pertencentes ao filo Ascomycota. Dentre os gêneros identificados nas amostras marinhas e terrestres da Antártica, sete foram comuns aos dois ambientes (*Cadophora, Cladosporium, Cosmosporas, Geomyces*, *Penicillium, Pseudeurotium* e *Thelebolus*), três foram encontrados apenas em amostras terrestres (*Acremonium*, *Hypocrea/Trichoderma*, *Oidiodendron*) e um apenas em amostra marinha (*Cercospora*). O presente trabalho amplia o conhecimento sobre a diversidade de fungos filamentosos do ambiente Antártico e reporta um dado inovador sobre a presença do gênero *Cercospora* em amostra da Antártica.

ABSTRACT

The interest in microorganisms, especially fungi derived from underexplored environments such as Antarctica has increased in recent decades. Antarctica ecosystems have characteristics of extreme temperature, salinity or pH which prevents the development of many forms of life, being the micro-organisms the best adapted to proliferate in substrates of this continent. Microorganisms that grow in Antarctic ecosystems are able to produce cold adapted enzymes, which have potential application in many sectors of economic importance. This project is associated with the FAPESP Project 2010/17033-0 entitled “Biotechnological Exploitation of fungi derived from Antarctica", coordinated by Prof. Dr. Lara Sette and aims to know the biodiversity, to select filamentous fungi with lignocellulolytic potential and to evaluate the production of these enzymes at low and medium temperatures. For this purpose, we used 160 isolates recovered from marine and terrestrial samples of the Antarctic continent that have been maintained in the research collection of DRM (CPQBA/UNICAMP) and in the Microbial Resource Center of UNESP (CRM-UNESP). After the first screening (on solid medium and in liquid medium), two fungi were selected for subsequent experiments, one from marine sample (P1) and another one from terrestrial sample (M7), which were identified as *Cadophora luteo-olivacea* and *Cadophora malorum*, respectively. The assays regarding the evaluation of different factors in the production of ligninases allowed the identification of the effects of each variable on the enzyme activity. However, the optimization of laccase production by *Cadophora luteo olivacea* P1 was not efficient because the low activity of this enzyme under the conditions studied. In lignocellulosic substrates the fungus *C. malorum* M7 presents the best xylanase activity when grown on sugarcane bagasse and corn cobs. Among the 160 filamentous fungi studied, 76 were taxonomically characterized, revealing the presence of 11 different genera belonging to the phylum Ascomycota. Among the genera identified from marine and terrestrial Antarctic samples, seven were found in both environments (*Cadophora, Cladosporium, Cosmosporas, Geomyces*, *Penicillium, Pseudeurotium* e *Thelebolus*), three were found only in the terrestrial samples (*Acremonium*, *Hypocrea/Trichoderma*, *Oidiodendron*) and one was found only in marine sample (*Cercospora*). This work expands our understanding of the diversity of filamentous fungi from Antarctic environment and reports an innovative data about the presence of the genus *Cercospora* in Antarctic sample.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Modelo representativo da estrutura da lignina (polímero dos alcoóis cumarílico, coniferilico e sinapílico).....19
Figura 2. Modelo representativo da estrutura da celulose.....20
Figura 3. Modelo representativo da estrutura da Hemicelulose.....21
Figura 4. Mapa da Baía do Almirantado, Ilha rei Jorge, Península Antártica. O símbolo (▲) indica o local de coleta das amostras.....27
Figura 5. Formação de guaiacoquinona (cor marrom) após cultivo a 15ºC por 3 semanas.....32
Figura 6. Percentual de fungos produtores de enzimas ligninolíticas em relação ao seu local de origem 33
Figura 7. Atividade de Lacase a 15ºC (A) e 25°C (B) dos fungos filamentosos marinhos e terrestres após 7 dias de cultivo.....34
Figura 8. Atividade de LiP a 15ºC (A) e 25°C (B) dos fungos filamentosos marinhos e terrestres após 7 dias de cultivo.....35
Figura 9. Número de fungos marinhos e terrestres produtores de enzimas ligninolíticas a 15ºC e 25ºC.....36
Figura 10. Árvore filogenética baseada nas sequências derivadas da região ITS dos fungos selecionados como melhores produtores de ligninases. As sequências adicionais utilizadas na árvore foram recuperadas como as mais próximas, segundo os bancos de dados. Valores de *Bootstrap* (1.000 replicatas) acima de 70 % estão listados na árvore. Códigos em negrito referem-se as sequências geradas no estudo.....37
Figura 11. Atividade enzimática em material lignocelulósico pelos fungos *C. luteo-olivaceae* P1 e *C. malorum* M7 a cultivados por 7 dias a 15ºC. Ligninases (A), Xilanases (B) e Celulases (C).....45
Figura 12. Abundância de fungos filamentosos isolados de amostras da Antártica.....47
Figura 13. Distribuição dos representantes dos gêneros de fungos da Antártica de acordo com a origem (marinha e terrestre).....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras coletadas na Antártica (expedição de março de 2010).....26
Tabela 2. Fungos produtores de enzimas ligninolíticas (origem e identificação taxonômica).....33
Tabela 3. Produção de enzimas ligninolíticas a 15ºC pelos fungos selecionados.....36
Tabela 4. Variáveis aplicadas ao 1º P&B para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.....38
Tabela 5. Atividade enzimática das enzimas ligninolíticas no 1º P&B (12 variáveis + 3 pontos centrais).....39
Tabela 6. Análise estatística sobre o efeito das 9 variáveis do 1º P&B (STATISTICA 7.0).....39
Tabela 7. Variáveis aplicadas ao 2º P&B para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.....40
Tabela 8. Atividade enzimática das enzimas ligninolíticas no 2º P&B (12 variáveis + 3 pontos centrais).....40
Tabela 9. Análise estatística sobre o efeito das 9 variáveis do 2º P&B (STATISTICA 7.0).....41
Tabela 10. Variáveis aplicadas ao delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.....41
Tabela 11. Atividade enzimática no Fatorial Fracionado (16 ensaios+3 pontos centrais=19 ensaios).....42
Tabela 12. Análise estatística sobre o efeito das 5 variáveis do delineamento Fatorial Fracionado 2^5 (STATISTICA 7.0).....42
Tabela 13. Variáveis aplicadas ao DCCR 2^3 para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.....43
Tabela 14. Atividade enzimática no DCCR 2^3 (14 ensaios + 3 pontos centrais).....44
Tabela 15. Análise estatística sobre o efeito das 3 variáveis do DCCR 2^3 (STATISTICA 7.0).....44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1. O ambiente Antártico 13
2.2. Micro-organismos do ambiente Antártico 14
2.3. Micro-organismo do ambiente marinho *15*
2.4. Diversidade microbiana dos ambientes Antártico e marinho 16
2.5. Exploração biotecnológica de fungos da Antártica: enzimas adaptadas ao frio 17
2.5.1. Enzimas lignocelulolíticas 19
2.5.2 Planejamento experimental – fatores que influenciam a produção de enzimas lingnocelulolíticas 23
3. OBJETIVOS 25
4. MATERIAL E MÉTODOS 26
4.1 Fungos filamentosos 26
4.2 Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas (meio sólido) 27
4.3 Avaliação da produção das enzimas ligninolíticas (meio líquido) 27
4.3.1 Lacase (Lac) 28
4.3.2 Manganês Peroxidase (MnP) 28
4.3.3 Lignina Peroxidase (LiP) 28
4.4 Avaliação da atividade de ligninases, xilanases e celulases por cultivo em estado semi-sólido pelos fungos da Antártica Cadophora luteo-olivaceae P1 e Cadophora malorum M7 29
4.5 Identificação taxonômica: diversidade de fungos filamentosos da Antártica 30
4.6 Avaliação da influência de diferentes fatores na produção enzimática e otimização das atividades enzimáticas (delineamento experimental) 31
5. RESULTADOS 32
5.1 Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas (cultivo em meio sólido) 32
5.2 Avaliação da produção das enzimas ligninolíticas em cultivo submerso a baixas (15ºC) e médias (25ºC) temperaturas. 34
5.3 Identificação taxonômica dos isolados selecionados 37
5.4.1 Otimização da produção enzimática pelo fungo marinho Cadophora luteo-olivaceae (P1) ... 38
5.4.1.1 Plackett-Burman (P&B) 38
5.4.1.2 Fatorial Fracionado 2^{5-1} 41
5.4.1.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2^3) 43

5.5 Avaliação da atividade de ligninases, xilanases e celulases por fermentação em estado semi sólido pelos fungos da Antártica C. luteo-olivaceae P1 e C. malorum M7 45
5.6 Avaliação da diversidade dos fungos marinhos e terrestres da Antártica 46
6. DISCUSSÃO 49
6.1 Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas a baixas (15°C) e médias temperaturas (25°C) 49
6.2 Otimização da produção enzimática 50
6.2.1. Fungo marinho Cadophora luteo-olivacea P1 ..... *50*
6.3 Avaliação da atividade de ligninases, xilanases e celulases por fermentação em estado semi sólido pelos fungos da Antártica C. luteo-olivaceae P1 e C. malorum M7 ..... *52*
6.4 Avaliação da diversidade dos fungos marinhos e terrestres da Antártica *53*
7. Conclusões 57
Referências 58
APÊNDICE 68

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem crescido o interesse por fungos derivados de ambientes poucos explorados como o ambiente Antártico, marinho, de águas profundas, principalmente por pouco se conhecer sobre a biodiversidade e biologia desses organismos. A sobrevivência às condições adversas e de estresse dos ecossistemas da Antártica resultaram em adaptações fisiológicas dos micro-organismos que habitam esses ambientes, incluindo a ausência de conidiogênese (*Mycellia sterilia*), produção de melanina, estabilidade e fluidez da membrana plasmática e aumento da flexibilidade das enzimas. A maior flexibilidade das enzimas adaptadas a baixas temperaturas é devido à menor quantidade de pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto nestas proteínas em comparação aos homólogos de micro-organismos mesófilos.

Dentre o arsenal enzimático dos fungos filamentosos, podemos destacar as enzimas lignocelulolíticas que são capazes de catalisar a degradação da celulose, hemicelulose e da lignina e que por apresentarem baixa especificidade ao substrato, podem degradar também diversos compostos orgânicos poluentes, como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (derivados do petróleo), agrotóxicos, corantes, efluentes têxteis, entre outros.

Neste contexto, a equipe de pesquisa coordenada pela Profa. Dra. Lara Durães Sette vem desenvolvendo, desde 2005, projetos associados à obtenção de recursos genéticos microbianos de ambiente pouco explorado (marinho e terrestre da Antártica e marinho da costa brasileira), seleção de isolados produtores de enzimas de interesse ambiental e industrial (lipases, proteases, ligninases e celulases) e aplicação em degradação de poluentes ambientais. O desenvolvimento desses projetos permitiu a estruturação de uma coleção de pesquisa associada à Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI do CPQBA/UNICAMP e à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) que contém cerca de 800 fungos filamentosos derivados de amostras de macro-organismos marinhos da costa brasileira e cerca de 100 leveduras e 250 fungos filamentosos recuperados de ambiente marinho (63%) e terrestre (37%) da Antártica. Os resultados da bioprospecção dos fungos marinhos da costa brasileira contidos na referida coleção vêm demonstrando o potencial para aplicação biotecnológica (LIRA et al., 2006; DA SILVA et al., 2008; VITA-MARQUES et al., 2008; BONUGLI-SANTOS et al., 2009; BONUGLI-SANTOS et al., 2010a; ROCHA et al., 2009; ROCHA et al., 2010; BONUGLI-SANTOS et al., 2010b; PASSARINI et al., 2011a; PASSARINI et al., 2011b). Estes resultados têm estimulado o desenvolvimento de estudos de diversidade e prospecção de enzimas de interesse ambiental e/ou

industrial produzida pelos fungos da Antártica, os quais podem ser utilizados em processos que custos associados às etapas de aquecimento dos processos industriais e ambientais.

O presente projeto está associado ao Projeto Fapesp 2010/17033-0 intitulado "Exploração biotecnológica de fungos derivados da Antártica" coordenado pela Profa. Dra. Lara Sette e ao Projeto " Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin - BAMMBO" fomentado pela Comunidade Europeia (FP7 2010–2013) e coordenado pelo Dr. Daniel Walsh (LIT, Ireland). Os objetivos principais estçao relacionados com a seleção de fungos filamentosos da Antártica com atividade ligninolítica (manganês peroxidase - MnP, lacase - Lac e lignina-peroxidase - LiP) em diferentes condições de cultivo, incluindo temperaturas médias e baixas, avaliar a produção de ligninases, celulases e xilanases e conhecer a diversidade dos fungos associados a amostras marinhas e terrestres do continente Antártico, os quais estão mantidos nas coleções de pesquisa associadas à Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O ambiente Antártico

Em 1957 o Conselho Internacional para a Ciência (ICSU) aprovou a criação do Comitê Científico para Pesquisa Antártica (SCAR), que foi formado por países que tinham como interesse em comum a pesquisa nessa região, sendo esses países: Argentina, Austrália, Bélgica, Chile, Estados Unidos da América, França, Japão, Noruega, Nova Zelândia, Reino Unido, República Sul Africana e a antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (DA SILVA, 2007).

Em 1958, os países participantes do Comitê reafirmaram seu interesse na região, motivando a Conferência em Washington, DC, convocada pelos Estados Unidos da América, com o propósito de discutir o futuro do continente. Em 1 de dezembro de 1959, como resultado da Conferência, foi assinado o Tratado da Antártica, que entrou em vigor em 23 de junho de 1961 (DA SILVA, 2007). Com o Tratado, a região da Antártica passou a ser uma reserva natural consagrada à paz e a liberdade para a pesquisa científica, a cooperação internacional para este fim, e a utilização pacífica da Antártica, proibindo a militarização da região, e sua utilização para explosões nucleares ou como depósito de resíduos radioativos (DA SILVA, 2007).

O continente Antártico é considerado o mais frio, elevado, seco e inóspito do planeta Terra e está situado na região polar austral. É permanentemente recoberto por uma camada de gelo e

rodeado por uma camada de mar congelado. O volume de gelo antártico possui aproximadamente 70% de água doce. As temperaturas podem chegar até -40^{o} C ou menos, durante os meses de inverno e a menor temperatura já registrada no planeta foi na região, chegando a atingir -89,2^{o}C, em 1983 (TINDALL, 2004). Devido às características inóspitas que prevalecem no continente destacam-se à baixa temperatura, temperatura média mensal inferior a 0ºC, frequentes ciclos de congelamento e degelo, ventos fortes e elevada incidência de radiação, especialmente UV, limitando assim o desenvolvimento de qualquer forma de vida (ONOFRI et al., 2007; D'ELIA, 2008; YERGEAU & KOWALCHUK, 2008).

Devido às características ambientais do continente, poucas são as plantas que conseguem sobreviver na região, sendo que sua vegetação se limita a musgos, liquens e algas. Também são poucos os animais que conseguem sobreviver no continente, somente os que são mais adaptados, como alguns animais superiores, peixes, aves e mamíferos marinhos. Dentre o grupo dos micro-organismos, podem ser observados apenas aqueles adaptados às condições extremas do continente Antártico. São consideradas extremófilas as formas de vida que habitam ambientes extremos das condições naturais terrestres (DA SILVA, 2007). Este termo foi usado pela primeira vez em 1974 por MacElroy (CAVICCHIOLI et al*.,* 2000). Na taxonomia, sugeriu-se que "ambiente extremo" é aquele em que a diversidade biológica se apresenta de forma restrita, ou seja, com a exclusão da maioria dos grupos taxonômicos de seres vivos.

2.2. Micro-organismos do ambiente Antártico

O estudo dos micro-organismos provenientes de ambientes extremos pode fornecer informação valiosa acerca da origem da vida na Terra e das estratégias adaptativas aos ambientes onde prosperou. Além disso, micro-organismos que se desenvolvem em ambientes extremos produzem enzimas que são adaptadas ao frio e que pode vir a ser importante para uma variedade de aplicações industriais (D'ELIA, 2008). Nos últimos 20 anos, houve um aumento na quantidade de trabalhos realizados com a microbiota das regiões polares, com ênfase na região da Antártica (TINDALL, 2004).

A Antártica oferece algumas oportunidades para o estudo sobre evolução microbiana (VINCENT, 2000). As comunidades microbianas são consideradas o componente dominante da biomassa dos ecossistemas da Antártica, e que controlam a maior parte do fluxo biológico de carbono, nutrientes e energia (WYNN-WILLIAMNS, 1996). Os micro-organismos provenientes desse continente podem ser considerados fontes potenciais de recursos genéticos para aplicação

biotecnológica. Entretanto, o conhecimento das relações e evolução de muitos grupos taxonômicos microbianos ainda é escasso (VINCENT, 2000), especialmente o grupo dos fungos.

Segundo Ruise et al. (2007) grande parte dos fungos que ocorrem na Antártica é cosmopolita, alguns dos propágulos são transportados para a Antártica, mas devido às condições extremas ali encontradas, são incapazes de crescer, enquanto que, os fungos conhecidos como indígenas, são capazes de crescerem e se reproduzirem mesmo em baixas temperaturas.

Os termos psicrofílico e psicrotrófico são utilizados para designação de micro-organismos que se desenvolvem em temperaturas frias. Os fungos psicrofilicos são aqueles capazes de crescer a 0 ºC e que possuem ótimo crescimento a ≤15 ºC e temperatura máxima de crescimento de ≤ 20 ºC e os psicrotróficos (ou psicrotolerantes) são aqueles que podem crescer a 0ºC e cuja máxima temperatura de crescimento pode estar acima de 20 ºC (RUISE et al.,2007). A maioria dos micro-organismos recuperados de amostras das regiões Ártica e Antártica são psicrotolerantes (RUISI et al., 2007) e essa predominância pode ser explicada pelo fato de que em alguns períodos do ano a temperatura do solo pode chegar a 15 ºC nestas regiões.

2.3. Micro-organismo do ambiente marinho

Os ecossistemas marinhos são considerados fontes de elevada riqueza microbiana (KONIH; WRIGHT, 1999). Os micro-organismos marinhos podem ser encontrados na coluna d'água, crescendo em superfícies, simbiontes de vida livre exercendo um importante papel nos ciclos biogeoquímicos dos oceanos, assim sendo os principais decompositores de materiais lignocelulósicos e diferentes espécies de animais (HAWKSWORTH, 1991).

Os fungos marinhos são separados em espécies obrigatórias ou facultativas. As obrigatórias são aquelas que crescem e esporulam exclusivamente na água do mar, e seus esporos são capazes de germinar neste ambiente. As facultativas são aquelas terrestres e aquáticas com adaptações que permitem seu crescimento no ambiente marinho (KOHLMEYER & KOHLMEYER 1979).

Em 1948, Fenical (1997) descreveu para a ciência *Phaeosphaeria typharus*, a primeira espécie de fungo marinho facultativo. Em 1969 foi descrita a espécie *Halotthia posidoniae,* que ficou conhecida como o primeiro fungo marinho obrigatório (LOQUE, 2009). Os micro-organismos encontrados nos ecossistemas marinhos estão associados a diferentes macro-organismos, tais como: poríferos, peixes, cnidários, tunicados e macroalgas (LOQUE, 2009). Entretanto, este grupo microbiano ainda é pouco estudado no que diz respeito às suas funções ecológicas, origem

evolutiva e como fontes de metabólitos que podem ser úteis para a medicina, agricultura, ambiente e indústria (OSTERHAGE et al., 2002; KLEMKE et al., 2004).

2.4. Diversidade microbiana dos ambientes Antártico e marinho

Em um ambiente tão extremo e restritivo como o Antártico, a diversidade de uma maneira geral tende a ser menor quanto mais alta as latitudes e, em alguns sistemas, os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares chegam a ser exclusivamente formadas por micro-organismos, como nos solos minerais dos desertos frios e em porções mais profundas de gelo glacial (VINCENT, 2000). Dessa forma, os micro-organismos têm um papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica (CLARKE, 2003). As comunidades microbianas antárticas são temas de grande interesse por estarem sujeitas a longos períodos de isolamento com baixos níveis de perturbação. Entretanto, pouco é conhecido sobre os níveis de endemicidade dentro dos diversos grupos microbianos na Antártica ou mesmo da presença ou adaptações dentro da população de espécies invasoras. Estudos de diversidade microbiana da Antártica são escassos (PIKUTA et al., 2007). O conhecimento da diversidade fúngica e o potencial biotecnológico destes micro-organismos são de extrema relevância e estratégico para o conhecimento da dinâmica dos ecossistemas antárticos e para a obtenção de compostos naturais de valor agregado (RAGUENES et al., 1997).

Nos últimos anos, estudos têm abordado a biodiversidade de bactérias e arquéias psicrófilas associadas a algas e outros substratos, mas ainda são poucos os trabalhos relacionados à diversidade fúngica nos ecossistemas Antárticos, embora estes micro-organismos representem um potencial de exploração biotecnológica a ser ainda conhecido e explorado (FENICE et al., 1997; BRADNER, 2003; BARBIER, 2009; JURGENS, 2010).

Os fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Acremonium, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium* e *Trichoderma* foram encontrados em amostras de solo da Antártica (SINGH et al., 2006). Outros fungos isolados a partir de amostras terrestres do continente antártico são: *Arthrobotrys ferox, Phoma herbarum, Hormoconis resinae Dacrymyces* spp., *Exidia* spp. *Chaetomium globosum, Stemphylium* sp., *Curvularia lunata, Memnoniella echinata, Paecilomyces varioti* (SHARMA et al., 2000). Quanto às leveduras, podemos destacar representantes das espécies *Leucosporidium antarcticum* (TURKIEWICZ et al., 2005), *Cryptococcus albidus, C. laurentii* (ZLATANOV et al. 2001), *Debaryomyces hansenii, Dipodascus australiensis, C. albidosimilis,*

Malassezia restricta, Sporidiobolus salmonicolor (ANENZ, 2006), *Rhodotorula rubra, Bullera alba, Candida humicola, C. famata, C. ingeniosa, C. auriculariae* (RAY et al., 1989) *e C. antarctica* (MARÍA et al., 2005), estando esta última espécie envolvida em inúmeros processos de patentes. Em estudos recentes realizados por Duarte et al. (2013) leveduras pertencentes aos gêneros *Bullera, Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Cystofilobasidium, Guehomyces, Leucosporidium, Metschnikowia, Meyerozyma, Rhodotorula, Tremella* e *Wickerhamomyces* foram recuperadas de amostras marinhas e terrestres da Antártica.

Nos ecossistemas marinhos a associação entre micro e macro-organismos é uma característica proeminente. Corais e esponjas são conhecidos por manterem relações simbióticas ou de parasitismo com micro-organismos como cianobactérias, fungos e bactérias, o que os torna um conglomerado em miniatura de vários organismos. Entretanto, para muitos dos organismos marinhos a natureza destas associações não foi, até o presente momento, rigorosamente investigada e definida.

Os fungos associados a amostras marinhas podem ser obtidos de esponjas, algas, madeiras, tunicados, sedimentos, moluscos, corais, plantas e peixes. Fungos pertencentes a gêneros cosmopolitas, como *Aspergillus, Penicillium, Alternaria* e *Cladosporium* são rotineiramente isoladas da superfície, tecidos internos e cavidades de algas, esponjas, ascídias e outros invertebrados marinhos. Em alguns casos, como o da esponja *Aplysina aerophoba*, a biomassa do organismo é composta por até 40% de micro-organismos. König et al. (2006) relataram a ocorrência de representantes dos gêneros *Gymnascella, Trichoderma, Phoma, Acremonium, Fusarium, Humicola, Cochliobolus e Curvularia* associados a invertebrados marinhos como esponjas e cnidários, sendo estes considerados facultativos por ocorrerem também em ambientes terrestres. Muitos destes fungos se desenvolvem melhor em água do mar e parecem estar completamente adaptados ao ambiente marinho. Entretanto, os estudos sobre micro-organismos marinhos ao longo da costa Brasileira são mínimos. Entre os fungos filamentosos caracterizados nestes estudos os gêneros com maior incidência são *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichoderma, Paecilomyces*, *Phoma, Cladosporium* e *Acremonium* (BERLINCK et al., 2004, DA SILVA et al., 2008, MENEZES et al., 2010, PASSARINI et al., 2013).

2.5. Exploração biotecnológica de fungos da Antártica: enzimas adaptadas ao frio

Há diversas razões para o continuo interesse em pesquisas com fungos de tolerância a baixas temperaturas, com destaque para a importância desses organismos como agentes de deteriorização

de alimentos refrigerados e congelados, e devido ao seu potencial valor comercial como fonte de enzimas ativas em temperaturas baixas (MARGESIN & SCHINNER, 1994).

As baixas temperaturas inibem fortemente as taxas de reações químicas dos micro-organismos, e o principal desafio enfrentado por micro-organismos psicrófilos é manter uma taxa adequada para as reações catalisadas por enzimas que estão envolvidas em processos celulares essenciais. Isto é conseguido através da sintetização de enzimas adaptadas ao frio e lábil ao calor, com uma atividade que pode ser 10 vezes maior a baixas temperaturas do que por seus homólogos mesófilos (GERDAY; FELLER, 1003).

As enzimas adaptadas ao frio possuem alta atividade específica em baixas temperaturas, propriedade extremamente útil em diversos setores da indústria biotecnológica (SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). Mais recentemente, o estudo destas enzimas tem sido estimulado visando diminuição do consumo de energia elétrica no setor industrial (GERDAY et al., 2000).

Estudos comparativos de modelos de proteínas e estruturas cristalinas revelaram que as enzimas adaptadas a baixas temperaturas tendem a exibir uma força de atenuação e do número de elementos estruturais conhecidos para estabilizar as moléculas de proteína. As substituições de aminoácidos levam a mudanças nas características estruturais que ocorrem em enzimas adaptadas ao frio, incluindo diminuições nos resíduos prolina, interações aromáticas e pares de íons, uma redistribuição de resíduos que facilitam a interação com o solvente, redução de aminoácidos hidrofóbicos e prevalência de estruturas secundárias tipo α-hélice e redução das estruturas secundárias tipo β-folha (MARGESIN et al., 2008).

As enzimas ativas a baixas temperaturas (adaptadas ao frio) podem alavancar a bioeconomia em diversos setores e importância sócio-econômica. Uma importante característica destas enzimas é a correlação da alta atividade catalítica e a estabilidade térmica a temperaturas baixas e moderadas, que pode ser parcialmente explicado pelo aumento da flexibilidade da molécula, devido à menor quantidade de pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto nestas proteínas em comparação aos homólogos de micro-organismos mesófilos e termófilos (GEORLETTE et al., 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

A compreensão das relações entre a estabilidade térmica, flexibilidade e eficiência catalítica das enzimas adaptadas ao frio é de fundamental importância para uma posterior aplicação destas no setor biotecnológico e posteriores experimentos de mutagênese direcionada, complementada por evolução dirigida, buscando-se uma otimização da biocatálise por psicrófilos ou psicrotróficos (GEORLETTE et al., 2004; D'AMICO et al., 2006).

Tendo em vista a fase inicial de investigação da taxonomia, ecologia, bioquímica e fisiologia dos micro-organismos associados ao ambiente Antártico, os mesmos podem ser considerados grandes promissores para o setor biotecnológico (GERDAY et al., 2000; GOMES & STEINER, 2004).

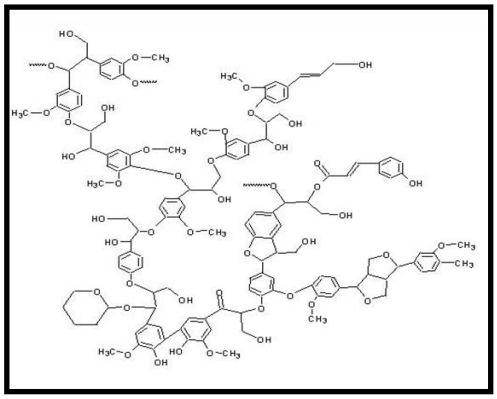
Dentre as enzimas produzidas por micro-organismos adaptados ao frio as lignocelulases (ou enzimas lignocelulolíticas) possuem aplicação potencial em biorremediação de processos e/ou ambientes de baixas/médias temperaturas, bem como na conversão da biomassa lignocelulósica a temperaturas compatíveis com a da fermentação (15-25°C) (MARGESIN et al., 2008).

2.5.1. Enzimas lignocelulolíticas

A lignocelulose é o maior componente da biomassa e compõe cerca de metade da matéria vegetal produzida por fotossíntese e também representa a fonte mais abundante de recursos orgânicos renováveis. É composta por três tipos de polímeros, a celulose, hemicelulose e lignina. Há muitos micro-organismos na natureza, como bactérias e fungos que vivem em lignoceluloses naturais (TENGERDY; SZAKACS, 2003).

O componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos é a celulose, que corresponde cerca de 50% da massa seca total. A celulose é um polímero linear, que possui porções amorfas e cristalinas, formado por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações β (1,4) – glicosídicas. As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados, composta por vários açúcares como a glicose, manose, galactose e xilose (AGUIAR; FERRAZ, 2011). A lignina se difere quanto à sua estrutura, sendo um biopolímero aromático amorfo, tridimensional (Figura 1), formado via polimerização oxidativa que ocorre na parede celular de plantas superiores em diferentes composições: madeiras duras de 25 a 35%, madeiras macias de 18 a 25% e gramíneas de 10 a 30% (BONONI, 1999; LARS, 2000).

Figura 1. Modelo representativo da estrutura da lignina (polímero dos alcoóis cumarílico, coniferilico e sinapílico)

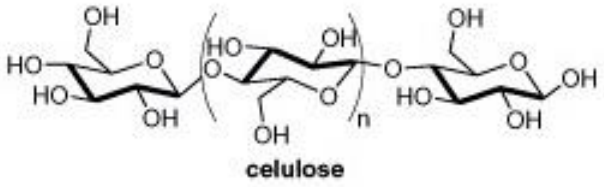


As propriedades químicas dos componentes da lignocelulose faz com que esse substrato tenha uma grande importância biotecnológica. Através das práticas agrícolas, papeleira, de madeira entre outras, as indústrias produzem grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos, o que pode representar um problema de poluição ambiental. No entanto, os resíduos agroindustriais gerados, considerados como "lixo", podem ser potencialmente convertidos em produtos, tais como os biocombustíveis, químicos e fontes de energia baratas para a fermentação (HOWARD et al., 2003).

As enzimas lignocelulolíticas têm um grande potencial de aplicação em diversos setores industriais (HOWARD et al., 2003). O uso de xilanases e lacases na indústria de branqueamento de polpas celulósicas e a aplicação de celulases na hidrólise enzimática do processo de produção de etanol de segunda geração são alguns dos exemplos da aplicação das lignocelulases (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

As celulases são enzimas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Assim, realizam a quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a molécula da celulose (Figura 2). A classificação das celulases as divide em três grandes grupos de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, sendo eles: as endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose e β-glicosidases (BG), hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO, 2010).

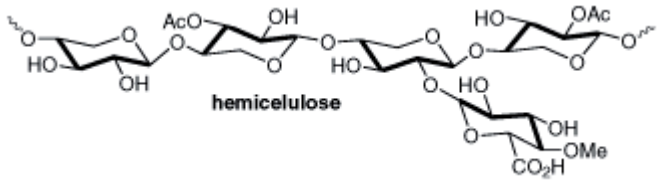
Figura 2. Modelo representativo da estrutura da celulose.



A xilana é a mais comum hemicelulose (Figura 3) e é composta principalmente por D-xilose, embora possa ter outros açúcares substituintes na cadeia principal. Devido a sua estrutura complexa, a degradação completa da xilana exige ação cooperativa de várias enzimas, conhecido como sistema xilanolítico. A principal enzima responsável pela despolimerização da xilana é a Endo- β-1,4- xilanase (EC 3.2.1.8), fazendo a quebra da principal cadeia dessa molécula e liberando oligossacarídeos, enquanto a β-xilosidase (EC 3.2.1.37) ataca a xilobiose e outros xilooligossacarídeos, liberando pequenos xiloossacarídeos e D-xilose. O sistema enzimático

xilanolítico é muito difundido entre os fungos, actinomicetos, bactérias e a produção dessas enzimas têm sido muito reportadas por *Penicillium* (TERRASAN et al., 2013).

Figura 3. Modelo representativo da estrutura da Hemicelulose



Além de fundamental para o equilíbrio das cadeias tróficas, a degradação da lignina apresenta grande importância econômica, tornando disponíveis substâncias de interesse na indústria, pecuária e na agricultura. A degradação extracelular da lignina consiste em um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das óxido-redutases. Existem dois principais tipos de enzimas envolvidas na degradação deste polímero pelos fungos ligninolíticos: 1) as peroxidases, que envolvem a lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) e a manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), glicoproteinas que dependem da presença de H_2O_2 para suas atividades catalíticas (MESTER & TIEN, 2000) e 2) as lacases (Lac, EC 1.10.3.2), que são enzimas oxidases multi-cobre, ou seja, glicoproteínas que contém cobre em seu sítio ativo e que não requerem H_2O_2 para sua atividade, catalisando a redução de O_2 para H_2O (HOEGGER et al., 2006).

A LiP ocorre em muitos fungos de degradação branca e foi a primeira enzima ligninolítica a ser descoberta por Tien & Kirk (1984) seguida da MnP em *Phanerochaete chrysosporium* (KUWAHARA et al., 1984), a qual necessita do íon Mn^{2+} para sua atividade. Em muitos fungos a MnP exerce um papel essencial na degradação da lignina, uma vez que geram o oxidante Mn^{3+} (HAMMEL, 1996). Entre as enzimas ligninolíticas a laccase apresenta grande potencial de utilização industrial, principalmente nos setores químico, têxtil e de alimentos (COUTO; HERRERA, 2006; MINUSSI et al, 2002).

Dentre os micro-organismos capazes de degradar a lignocelulose e utilizar os produtos dessa degradação como fonte de carbono e energia, um pequeno grupo de fungos filamentosos pertencente ao filo Basidiomycota desenvolveu a habilidade de degradar esse composto, os chamados fungos de decomposição branca. Os fungos de decomposição macia e marrom também são capazes de degradar a lignocelulose. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo de

degradação dos fungos de degradação macia em relação aos fungos de degradação branca e marrom (SANCHEZ, 2009).

Os fungos filamentosos produtores de enzimas ligninolíticas são fontes potenciais de recursos genéticos em processos industriais, tendo aplicação em diversos setores, como por exemplo, o químico, de combustível, de alimentos, de papel, o agronegócio, o têxtil, de cosmético, entre outros, e podem ser ainda utilizados em biorremediação de diversos poluentes ambientais (SETTE; BONUGLI-SANTOS, 2013).

A biorremediação se baseia na capacidade dos micro-organismos de degradar compostos orgânicos poluentes (MANCERA-LÓPEZ et al, 2008). Os processos ideais de biodegradação levam à mineralização completa dos compostos orgânicos, ou seja, à CO_2 e H_2O. Entretanto, degradações parciais ou simplesmente a biotransformação de um composto aromático em alguns respectivos derivados podem ocorrer, permitindo sua transformação em produtos menos tóxicos, de maior solubilidade em água, e que podem ser degradados posteriormente pela ação de outros micro-organismos (CERNIGLIA 1997, CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001). O uso de micro-organismos em processos de biorremediação é uma alternativa biotecnológica muito atraente pela possibilidade de obtenção da mineralização do poluente ou mineralização com baixos custos e sem introdução de compostos químicos.

Estudos relacionados à produção de enzimas ligninolíticas têm sido conduzidos ao longo dos anos com fungos terrestres de degradação branca, marrom e macia (FASANELLA, 2008). O principal problema relacionado com a produção destas enzimas em escala industrial é o baixo rendimento das mesmas para a maioria dos fungos de decomposição branca. Mesmo utilizando organismos recombinantes, que conseguem expressar eficientemente uma superprodução de enzimas industriais, a alta expressão de lacase e peroxidases em sistemas heterólogos não foi alcançado ainda, e essas enzimas ainda têm que ser obtidas de sistemas naturais (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

Poucos são os estudos relacionados à produção de enzimas ligninolíticas por fungos marinhos. Até onde vai o nosso conhecimento, não existem estudos sobre fungos ligninolíticos da Antártica. Devido ao fato destes micro-organismos estarem adaptados à baixa temperatura e salinidade do ambiente marinho Antártico podem apresentar vantagens biológicas em processos realizados a baixas temperaturas e salinos, como, por exemplo, a biorremediação de oceanos (águas frias) e o tratamento de efluentes de indústrias têxteis. D'Souza et al. (2006) reportaram a produção de uma quantidade elevada de lacase por um fungo basidiomiceto marinho não identificado. No estudo de Raghukumar et al. (1994) foram alcançados resultados positivos para a produção de

enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e lacase) pelo fungo de degradação branca *Flavadon flavus* isolado dos detritos da alga *Thalassia hemprichii*. Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Lara Sette enzimas ligninolíticas foram produzidas por fungos derivados de cnidários marinhos pertencentes ao filo Ascomycota (*Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 e *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857) e Zygomycota (*Mucor racemosus* CBMAI 847) em 12,5% e 23% de salinidade (BONUGLI-SANTOS et al., 2010a). Em adição, estudos de produção de lacase e detecção genes por três basidiomicetos de origem marinha (isolados a partir das esponjas coletadas na costa brasileira *Amphimedon viridis* e *Dragmacidon reticulatum*) foram reportados por Bonugli-Santos et al., (2010b). Neste estudo, os três fungos foram capazes de produzir lacase, sendo as maiores atividades desta enzima obtidas pelos fungos *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após 21 dias de cultivo em condições salinas. A lacase produzida pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou propriedades interessantes para o setor têxtil. O processo de produção foi otimizado utilizando a metodologia de desenho experimental e a patente foi registrada junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Número do registro: BR10201400850, data de depósito: 09/04/2014, título: "Processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho, enzima lacase e uso da mesma").

2.5.2 Planejamento experimental – fatores que influenciam a produção de enzimas lingnocelulolíticas

Uma das formas mais eficazes de aumentar a produção destas enzimas pode ser o estímulo através da suplementação do meio nutriente com uma variedade de substratos indutores. Compostos aromáticos ou fenólicos e também, principalmente os compostos que são relacionados à lignina ou derivados de lignina como, álcool veratrílico, guaiacol, 2,5-xilidina, 2,2 '-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) e glicerol tem sido utilizados como indutores (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009). Em adição, é conhecido que o sistema ligninolítico pode ser afetado por diferentes fatores abióticos e bióticos como: temperatura, pH, aeração, nutrientes, profundidade, propriedades físico-químicas, entre outros (BAUER; CAPONE 1985, LEAHY; COLWELL 1990, D'SOUZA et al. 2006).

A avaliação da influência de parâmetros pré-determinados (variáveis) que interferem significativamente sobre a resposta (produção de enzimas), tem sido eficientemente utilizada para a aumentar a produção enzimática. Isso pode ser feito variando-se um fator por vez ou através de métodos estatísticos. O primeiro método é o procedimento experimental mais difundido e usual,

"*one-at-a-time*", que envolve o estudo de uma variável por vez, no qual é avaliada uma das variáveis estudadas em diferentes condições e as demais são fixadas. Este método negligencia possíveis interações entre os fatores por não explorar completamente o espaço experimental. Tais limitações podem ser eliminadas empregando-se planejamentos experimentais estatísticos que usam um número menor de medidas e explora todo o espaço experimental. A mais bem sucedida técnica usada para análise e otimização das variáveis de um processo é conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que possibilita a avaliação dos efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre uma dada resposta (RODRIGUES; IEMMA 2009). O delineamento experimental como um todo permite a seleção prévia de variáveis significativas a um processo quando são vários os fatores estudados sobre a resposta. Ao final a metodologia da superfície de resposta pode ser empregada para obtenção de um modelo teórico e dedução das condições otimizadas (SU et al., 2011).

3. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo principal avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos recuperados de amostras marinhas e terrestres da Antártica frente à produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas, bem como conhecer a diversidade destes micro-organismos.

Objetivos específicos:

- Selecionar fungos ligninolíticos dentre as 160 linhagens depositadas na Coleção de Recursos Microbianos da Unesp/RC, utilizando cultivo em meio sólido (primeira triagem) e submerso (segunda triagem) a baixas e médias temperaturas.
- Avaliação de diferentes parâmetros de fermentação na produção das ligninases pelos fungos selecionados visando otimização da produção enzimática.
- Avaliar o perfil de produção das enzimas ligninases, xilanases e celulases dos fungos selecionados em cultivo em estado semi-sólido (materiais lignocelulósicos).
- Avaliação da diversidade dos fungos marinhos e terrestres da Antártica por meio de análises moleculares (sequenciamento).

4. MATERIAL E MÉTODOS

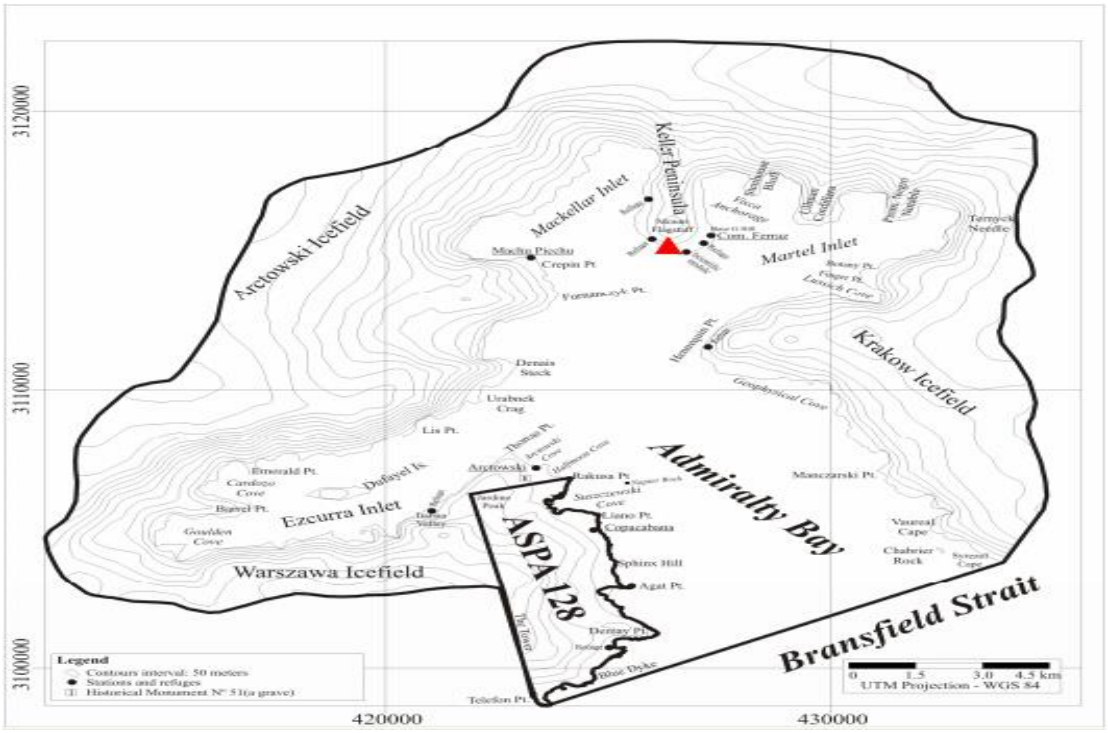
4.1 Fungos filamentosos

Foram utilizados no presente trabalho cerca de 160 fungos filamentosos isolados em meio de cultura ágar batata dextrose (PDA) a 15ºC e mantidos pelos métodos de ultracongelamento a -80°C e Castellani (preservação em água esterilizada a 4°C) na coleção de pesquisa associada à Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). A coleção de pesquisa da Antártica foi estruturada a partir dos isolados recuperados (sob a orientação da Profa. Dra. Lara Durães Sette) de diferentes substratos oriundos do continente Antártico coletados pelo Msc Fernando S. Nobre (CPQBA/UNICAMP), Prof. Dr. Eduardo Hadju (UFRJ) e pela equipe da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari (IO/USP) (Tabela 1 e Figura4).

Tabela 1. Amostras coletadas na Antártica (expedição de março de 2010)

Amostra	Local da Coleta	Coletor
Marinhas		
Isópode	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
Nacella concina	Estação Antártica Comandante Ferraz	Eduardo Hadju
Anfípode	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
Esponja	Estação Antártica Comandante Ferraz	Eduardo Hadju
Ascídia	Estação Antártica Comandante Ferraz	Eduardo Hadju
Salpa	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
Caramujo	Estação Antártica Comandante Ferraz	Eduardo Hadju
Estrela do Mar	Estação Antártica Comandante Ferraz	Eduardo Hadju
Sedimento marinho	Punta Ulmann	Priscila/Vivian H. Pellizari
Sedimento marinho	Refúgio 2	Priscila/Vivian H. Pellizari
Sedimento marinho	Botany Point	Priscila/Vivian H. Pellizari
Sedimento marinho	Estação Antártica Comandante Ferraz	Priscila/Vivian H. Pellizari
Algas	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
Terrestres		
Líquens	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
Madeira	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
Ossos de baleia	Punta Plaza	Fernando S. Nobre

Figura 4. Mapa da Baía do Almirantado, Ilha rei Jorge, Península Antártica. O símbolo (▲) indica o local de coleta das amostras.



4.2 Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas (meio sólido)

Os isolados foram submetidos a uma primeira triagem em meio sólido utilizando a metodologia descrita por Verma et al. (2010). Para tanto, os fungos foram cultivados em meio de cultura B&K (10 g/L glicose, 2 g/L peptona,1 g/L extrato de levedura e 20 g/L de Agar) acrescido de 4 mM de guaiacol. Neste método, a presença de coloração marrom sobre e ao redor do micélio em meio suplementado com guaiacol, é indicativo da presença de enzimas ligninoliticas, incluindo a lacase (Lac).

4.3 Avaliação da produção das enzimas ligninolíticas (meio líquido)

Os fungos ligninolíticos selecionados pela produção de composto de coloração marrom quando cultivados na presença de guaiacol (item 4.2) foram cultivados em meio PDA, e após o crescimento cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias dos isolados foram transferidos para Erlenmeyer de 150 mL contendo 50 mL de meio MA2 (2% de extrato de malte acrescido de 50 ml de água destilada). Os ensaios foram incubados a 15°C e 25°C por 7 dias a 150 rpm em

duplicata. Os extratos foram obtidos por centrifugação dos meios líquidos de cultivo a 10.000 rpm por 30 minutos a 4ºC. A partir dos extratos, a atividade enzimática foi determinada em triplicata e utilizando diferentes substratos enzimáticos de acordo com a metodologia descrita abaixo:

4.3.1 Lacase (Lac)

A atividade enzimática da lacase foi determinada utilizando como substrato enzimático o 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS). A mistura da reação foi composta de 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,6 mL da solução enzimática e 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v). Realizada a primeira leitura, os ensaios foram incubados a 37ºC por 10 minutos. Após esse período, foi realizada a segunda leitura. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Nas condições do ensaio, o valor do coeficiente de extinção molar (ε) do produto formado é de 36000 $M^{-1}cm^{-1}$ (BUSWELL et al., 1995).

4.3.2 Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade da manganês peroxidase foi quantificada através da oxidação do malonato de sódio a 270 nm. A reação foi composta de 0,8 ml de malonato de sódio 0,05M, 0,05 ml de sulfato de manganês 0,01 M, 0,1 ml de solução enzimática e 0,05 ml de peróxido de hidrogênio 2 mM. A reação foi iniciada com a adição do peróxido de hidrogênio, agindo como co-fator enzimático. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e após esse período foi realizada a segunda leitura das amostras. Nas condições do ensaio, o valor do coeficiente de extinção molar (ε) do produto formado é de 11590 $M^{-1}cm^{-1}$.

4.3.3 Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido (ε 310= 9300M-1 cm-1) na oxidação do álcool veratrílico, usado como substrato. A mistura foi composta de 0,2 mL de ácool veratrílico em tampão tartarato de sódio, 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,6 mL do extrato enzimático. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio. Após a primeira leitura, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm (ARORA; GILL, 2001).

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U L^{-1} do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Beer-Lambert:

$$U\ L^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \varepsilon \times R \times t$$

Onde:

ΔA diferença entre a absorbância final e a inicial

V volume da reação (0,001 L em todos os casos)

10^6 converte os mols de ε para μmols

ε coeficiente de extinção (M^{-1} cm^{-1})

R quantidade de caldo enzimático (L)

T tempo de reação (min)

4.4 Avaliação da atividade de ligninases, xilanases e celulases por cultivo em estado semi-sólido pelos fungos da Antártica Cadophora luteo-olivaceae P1 e Cadophora malorum M7

Os dois fungos selecionados foram submetidos a experimentos de produção de enzimas lignocelulolíticas por cultivo em estado semi-sólido. Para tanto, 3 cilindros de ágar + micélio dos fungos previamente cultivados em meio malte 2% foram utilizados para inocular 50 mL de caldo malte 2% os quais foram cultivados por 7 dias a 15ºC e agitação de 150 rpm. Após este período, 5 mL do inóculo líquido foi adicionado aos materiais lignocelulósicos (bagaço de cana, sabugo de milho e palha de arroz) os quais foram previamente esterilizados (2,5g/50ml) com 25 mL de água destilada e acrescentado de 20 mL do meio mínimo de Savitha (composição em $g.L^{-1}$: 7,0 KH2PO4, 2,0 Na2HPO4, 1,5 MgSO4.7H2O, 1,0 extrato de levedura, 0,1 CaCl2.2H2O, 0,008 FeCl2.4H2O, 0,0001 ZnSO4.7H2O, 1,5 diammonium tartarate). Os cultivos foram realizados a 7 dias a 15ºC sem agitação.

As atividades das enzimas ligninoçlíticas foram determinadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3. A determinação das atividades xilanol´pitica e celulolpítica, foi realizada por meio da estimativa da liberação de açúcares redutores utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (ADNS) (Miller, 1959). Para tanto, foi utilizada uma solução de xilana 1.0 % em tampão acetato de sódio pH 4.8 como substrato da atividade xilanolítica e uma solução de CMC 1.0 % em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4.8 como substrato da atividade celulolítica. As leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm para xilanases e 575 nm para celulases em espectrofotômetro Beckman

(DU 640). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose/glicose por minuto, de acordo com as respectivas curvas padrão.

4.5 Identificação taxonômica: diversidade de fungos filamentosos da Antártica

A identificação dos fungos filamentosos da Antártica foi feita sob a orientação do Prof. Dr. André Rodrigues (UNESP/RC) por meio de análise das seqüencias de DNA do *operon* ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2). Para tanto, foi utilizado como modelo o DNA genômico extraído. A extração do DNA genômico seguiu o método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) proposto por Moeller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004), modificado por Rodrigues et al. (2009). Foi realizada a amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 feita pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras, com a utilização de *primers* (ITS4 e ITS5) (WHITE et al., 1990) homólogos a regiões conservadas do *operon* ribossomal para o grupo dos fungos. As reações de amplificação com 25 μL de volume final consistiram em: 0,2 mM de cada dNTP, 10x de tampão KCl, 10 mg mL-1 de BSA, 1,5 mM de MgCl2, 0,5 μM de cada primer e 1U da enzima Taq polimerase (reagentes - Promega). As condições da reação de amplificação foram: desnaturação inicial de 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 2 minutos. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob UV, em transiluminador, após coloração com GelRed™ (Biotium). Após a confirmação dos amplicons, estes foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Os produtos de amplificação foram purificados em mini-colunas pelo kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e quantificados em *NanoDrop®* (Thermo Scientific) e, posteriormente, 20 ng μL^{-1} de DNA foram preparados para o sequenciamento utilizando *BigDye Terminator® v. 3.1 Kit* (Life Technologies), segundo o protocolo do fabricante. Os produtos foram sequenciados em ABI 3330xl (Life Technologies). Ambas as sequências, *forward* e *reverse*, foram geradas e compiladas em *contigs* utilizando o software BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

O resultado dos sequenciamentos foi comparado com sequências conhecidas depositadas em bancos de dados, como o Genbank (http://www.ncbi.nem.nih.gov) e o CBS (http://www.cbs.knaw.nl/index.htm). As informações existentes nas seqüências do gene ribossomal 28S e/ou região ITS permitiram, por meio da construção de árvores genealógicas, representar as linhas de descendência das linhagens avaliadas (SCHABEREITER-GURTNER et al., 2001; PEINTNER *et al*, 2003).

A identificação dos fungos selecionados e submetidos ao delineamento experimental foi realizada de forma polifásica. Além das análises moleculares acima descritas, análises morfológicas foram conduzidas a fim de confirmação das espécies.

4.6 Avaliação da influência de diferentes fatores na produção enzimática e otimização das atividades enzimáticas (delineamento experimental)

O planejamento de experimento e otimização de processos através do delineamento experimental foram realizados para o isolado marinho (*C. luteo-olivaceae* P1) e terrestre (*C. malorum* M7) que apresentaram os melhores resultados nos experimentos de produção enzimática, visando otimização da produção das enzimas ligninolíticas e avaliação da influência de diferentes fatores na atividade enzimática. Para tanto, os isolados selecionados foram cultivados de acordo com o item 3.3.

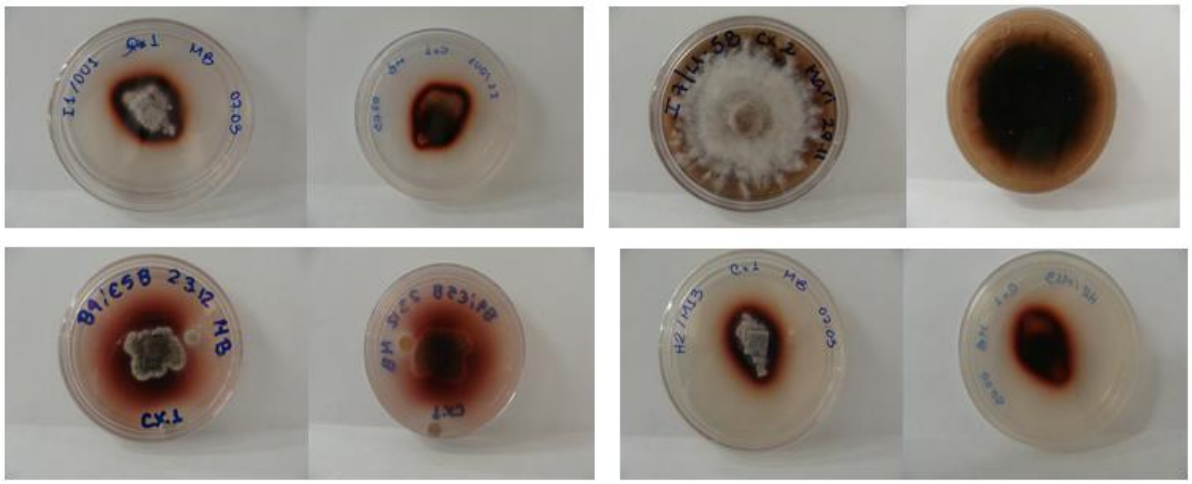
Inicialmente foi realizado um planejamento Plackett-Burman para avaliação das variáveis independentes salinidade (água do mar artificial em diferentes concentrações), temperatura, pH e diferentes fontes de carbono e nitrogênio (concentrações iniciais de malte, glicose, peptona, extrato de levedura) (Tabela 4), conforme matriz do planejamento que foi montada utilizando o software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995) (Tabela 6). Todas as diferentes variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior e foram acrescentados à matriz três ensaios no ponto central para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados. Após a avaliação da influência significativa das condições de cultivo iniciais, foi feito um novo planejamento Plackett-Burman utilizando as variáveis e as suas respectivas concentrações citadas na Tabela 7 e de acordo com a matriz gerada pelo software STATISTICA 7.0 (Tabela 9). Com base nos resultados obtidos no Plackett-Burman, um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} foi aplicado utilizando-se as variáveis independentes apresentadas na Tabela 10 e de acordo com a matriz da Tabela 12. Esses resultados serviram de base para a estruturação de um planejamento fatorial completo (DCCR) 2^2 com 4 pontos axiais utilizando as variáveis apresentadas na Tabela 13 e a matriz apresentada na Tabela 15.

5. RESULTADOS

5.1 Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas (cultivo em meio sólido)

Foram selecionados 29 fungos filamentosos ligninolíticos, os quais apresentaram produção de coloração marrom no reverso da placa junto ao micélio, devido à formação da guaiacoquinona (Figura 1), indicando a presença da enzima lacase. Alguns fungos apresentaram uma coloração marrom muito intensa ao redor do micélio, enquanto outros apresentaram uma coloração marrom um pouco mais clara, o que pode estar associado com o potencial enzimático de cada isolado (Figura 1).

Figura 5. Formação de guaiacoquinona (cor marrom) após cultivo a 15ºC por 3 semanas.



Fonte: fotos tiradas pelo próprio autor

Dentre os 29 fungos produtores de guaiacoquinona considerados positivos para ligninases (Tabela 2), 17 foram isolados a partir de amostras terrestres e 12 a partir de amostras marinhas. A maioria dos fungos ligninolíticos foi isolada de amostra de madeira (n=13, 45%) (Figura 2). Em adição, 10% dos fungos selecionados foram isolados a partir de amostras de estrela do mar (ambiente marinho) (Figura 2).

A grande maioria dos fungos ligninolíticos foram molecularmente identificados (no item 5.6 referente ao estudo de biodiversidade dos fungos filamentosos da Antártica) como pertencente ao gênero *Cadophora* (n=12), sendo a espécie *Cadophora malorum* mais representativa (n=10) do que a *C. luteo-olivacea* (n=2). Representantes dos gêneros *Penicillium* (n=2), *Cosmosporas* (n=2),

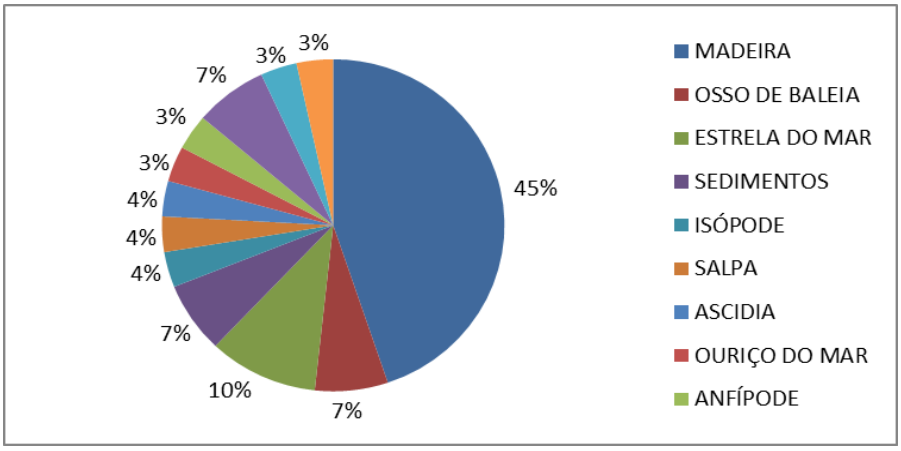
Geomyces (n=1), *Cladosporium* (n=1) e *Oidiodendron* (n=2) também foram selecionados como fungos ligninolíticos (Tabela 2).

Tabela 2. Fungos produtores de enzimas ligninolíticas (origem e identificação taxonômica)

Linhagem Positiva	Amostra de origem	Identificação taxonômica
M4D	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M8	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M1D	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M7	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M1A	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M5	MADEIRA	*Penicillium* sp.
M1	MADEIRA	*Cadophora malorum*
OB-1B	OSSO DE BALEIA	*Cosmospora* sp.
E5B	ESTRELA DO MAR	*Cladosporium cladosporioides*
P1	SEDIMENTO	*Cadophora luteo-olivacea*
OB-4B	OSSO DE BALEIA	*Cosmospora* sp.
IS4	ISÓPODE	*Cladosporium* sp.
S1	SALPA	*Cadophora malorum*
E4	ESTRELA DO MAR	*Cadophora malorum*
AS-2[a]	ASCIDIA	*Cadophora malorum*
M6A	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M3	MADEIRA	*Cadophora malorum*
M13	MADEIRA	*Cadophora malorum*
OU1	OURIÇO DO MAR	*Cadophora malorum*
M22	MADEIRA	*Geomyces* sp.
E5C	ESTRELA DO MAR	ND
A2B	ANFÍPODE	*Cadophora malorum*
M2	MADEIRA	ND
PL3B	SEDIMENTO	*Cadophora luteo-olivacea*
L1-5	LÍQUEN	*Oidiodendron* sp.
M12	MADEIRA	ND
L1-5B	LÍQUEN	ND
AI2-2	ALGA	*Cladosporium cladosporioides*
N2	NACELLA	*Penicillium* sp.

Amostras destacadas em vermelho = terrestres, em azul = marinhas.
ND = Não Determinado

Figura 6. Percentual de fungos produtores de enzimas ligninolíticas em relação ao seu local de origem



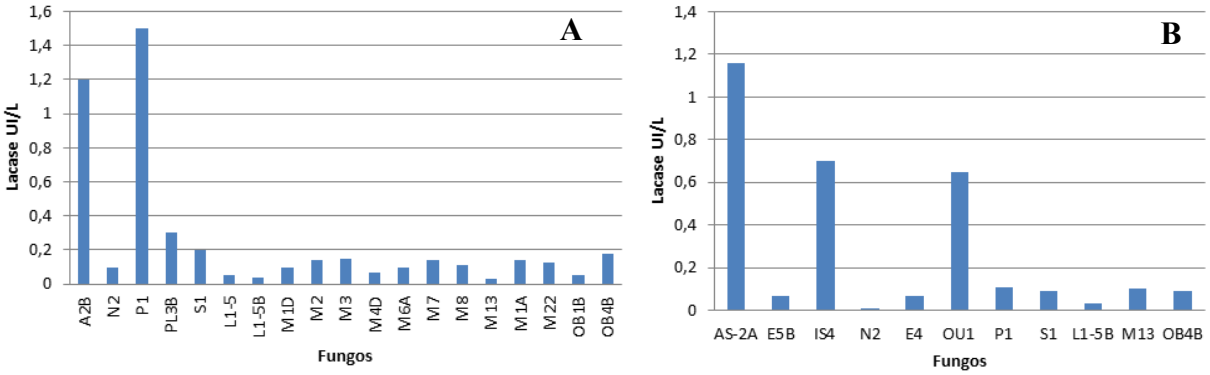
5.2 Avaliação da produção das enzimas ligninolíticas em cultivo submerso a baixas (15ºC) e médias (25ºC) temperaturas.

Os 29 fungos filamentosos selecionados nos experimentos de produção de enzimas ligninolíticas em meio sólido, foram submetidos a uma segunda triagem, por meio da determinação das enzimas ligninolíticas em meio líquido (meio caldo malte 2%, MB2) após 7 dias de cultivo a 15°C e 25ºC.

Dentre os fungos marinhos selecionados (destacados em azul na Tabela 2), os isolados P1 (originário de sedimento) e A2B (originário de anfípode) se destacaram quanto à produção de lacase a 15ºC (Figura 4A), sendo a maior atividade de lacase 1,50 $U.L^{-1}$ obtida com o isolado P1, seguida do isolado A2B (1,20 $U.L^{-1}$). Os isolados PL3B (originária de sedimento) e S1 (originária de *Salpa*) também apresentaram atividade para esta enzima, porém em menores quantidades (0,30 $U.L^{-1}$ e 0,20 $U.L^{-1}$, respectivamente). Para os fungos recuperados de amostras terrestres (destacados em vermelho na Tabela 2), a atividade da enzima lacase a 15ºC pode ser observada em praticamente todas as linhagens, porém foi produzida uma quantidade muito baixa, menor do que as apresentadas pelas amostras marinhas. As linhagens que apresentaram os melhores resultados são provenientes de osso de baleia e madeira, sendo o melhor resultado obtido para o isolado OB4B (0,18 $U.L^{-1}$), seguido dos isolados M3 (0,15 $U.L^{-1}$), M2 e M7 (0,14 $U.L^{-1}$) (Figura 7A).

Na temperatura a 25°C, três linhagens apresentaram destaque quanto à atividade de lacase (Figura 7B). A linhagem AS-2A (originário de ascídia) com atividade de 1,16 $U.L^{-1}$; IS4 (originário de Isópode) de 0,70 $U.L^{-1}$ e OU1 (originário de Ouriço do mar) de 0,65 $U.L^{-1}$. As 3 linhagens que apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática a 25ºC, não conseguiram produzir a enzima nos experimentos a 15ºC. Por outro lado, de forma geral houve uma queda na atividade de lacase com o aumento da temperatura para 25°C, incluindo o fungo P1 que apresentou a maior atividade de lacase a 15ºC (1,50 $U.L^{-1}$), sendo sua produção a 25ºC de 0,11 $U.L^{-1}$ para esta enzima. As linhagens P1 e S1 foram capazes de produzir lacase em ambas as temperaturas estudadas.

Figura 7. Atividade de Lacase a 15ºC (A) e 25°C (B) dos fungos filamentosos marinhos e terrestres após 7 dias de cultivo

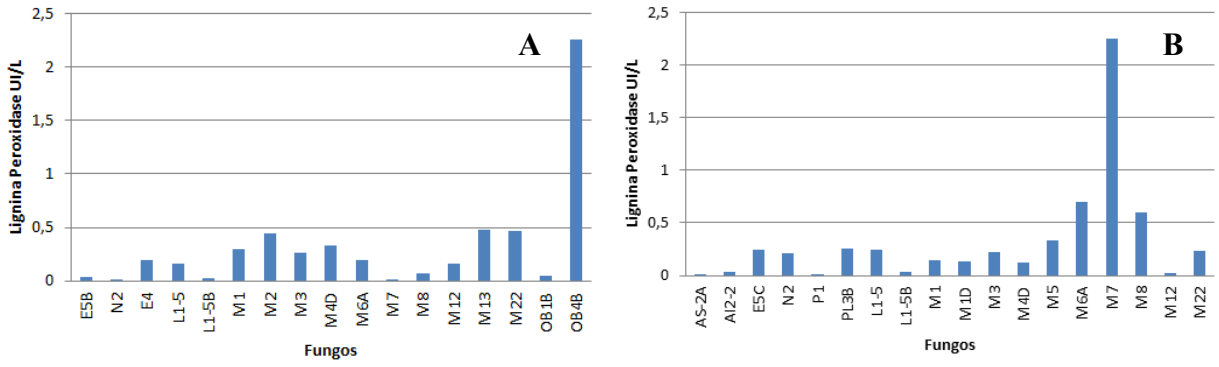


Os resultados da produção de lignina peroxidase (LiP) a 15°C e a 25°C estão apresentados na Figura 8A e B, respectivamente. A 15ºC a atividade de LiP foi verificada em alguns isolados, porém em uma quantidade relativamente baixa, principalmente nas amostras marinhas. A linhagem E4 (originária de estrela do mar) apresentou atividade de LiP de 0,20 $U.L^{-1}$ (Figura 8A). Os isolados originários de ambientes terrestres foram os que apresentaram as maiores atividades de LiP, sendo que quase todos conseguiram produzir esta enzima. A amostra OB4B (originário de osso de baleia) apresentou a maior atividade (2,25 $U.L^{-1}$). As linhagens M22 e M13 (ambos originários de madeira) apresentaram valores muito próximos na atividade enzimática, 0,47 $U.L^{-1}$ e 0,48 $U.L^{-1}$, respectivamente, seguidos da linhagem M2, também isolado a partir de madeira, com atividade de 0,44 $U.L^{-1}$ (Figura 8A).

Apenas três fungos marinhos, originários de estrela do mar (E5C), *Nacella* (N2) e sedimento (PL3B) foram capazes de apresentar atividade de LiP a 25ºC acima de 0,20 $U.L^{-1}$ (Figura 5B). Para os fungos terrestres, a atividade da LiP a 25°C foi presente em quase todos os isolados. Entre eles, os melhores produtores foram às linhagens originárias de madeira. O maior pico de atividade a esta temperatura foi alcançada pelo fungo M7 (2,25 $U.L^{-1}$), seguido dos isolados M6A (0,70 $U.L^{-1}$), M8 (0,60 $U.L^{-1}$) e M5 (0,33 $U.L^{-1}$), como demonstrado na Figura 8B.

O fungo M7, que apresentou a maior produção de LiP a 25°C apresentou atividade para esta enzima abaixo de 0,15 $U.L^{-1}$ a 1 C. Por outro lado, o fungo OB4B que apresentou a maior atividade de LiP a 15ºC, não foi capaz de produzir LiP quando cultivado a 25ºC. As linhagens L1-5 e L1-5B (ambas originárias de líquens), apresentaram resultados de atividade de LiP semelhantes em ambas as temperaturas testadas (Figura 8B).

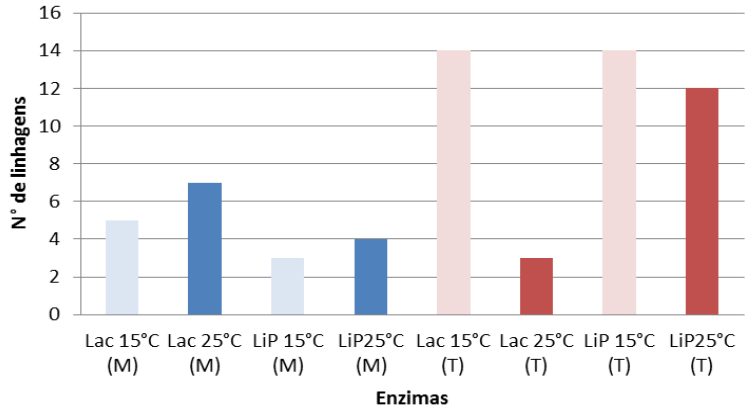
Figura 8. Atividade de LiP a 15ºC (A) e 25°C (B) dos fungos filamentosos marinhos e terrestres após 7 dias de cultivo.



Um maior número de fungos apresentou atividade das enzimas lacase e LiP a 15°C (n = 35) quando comparado ao número capaz de produzir estas enzimas a 25°C (n = 26) (Figura 8). Para os fungos de origem marinha as atividades de lacase e LiP a 25°C foram detectadas em um maior

número de isolados quando comparado à detecção a 15°C. Por outro lado, para os fungos recuperados de amostras terrestres um número maior de isolados apresentou atividade enzimática a 15°C (Figura 9).

Figura 9. Número de fungos marinhos e terrestres produtores de enzimas ligninolíticas a 15ºC e 25°C



Para a enzima manganês peroxidase (MnP) as atividades enzimáticas observadas foram bem mais altas em ambas as temperaturas testadas dos que os valores alcançados para as enzimas lacase e a LiP (dados não mostrados). Entretanto, os resultados de produção de MnP apresentaram valores muito diferentes para as três repetições (réplicas) dos ensaios enzimáticos e, portanto, os mesmos foram considerados como não confiáveis e não foram levados em consideração nesta etapa de seleção dos fungos ligninolíticos.

Analisando os testes realizados a baixas e médias temperaturas, quatro fungos marinhos (A2B, N2, P1 e OU1) e dois terrestres (OB4B e M7) apresentaram melhores atividades enzimáticas. Assim, os testes enzimáticos foram repetidos (a 15°C) visando seleção de um fungo oriundo de cada ambiente (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de enzimas ligninolíticas a 15ºC pelos fungos selecionados

Fungo	Lacase UI/L	MnP UI/L	LiP UI/L
Marinhos	-	-	-
P1	1,28	53,03	-
N2	0,19	21,74	-
A2B	0,12	5,08	-
OU1	0,12	55,71	-
Terrestres	-	-	-
M7	3,68	0	0
OB4B	0,02	0	0

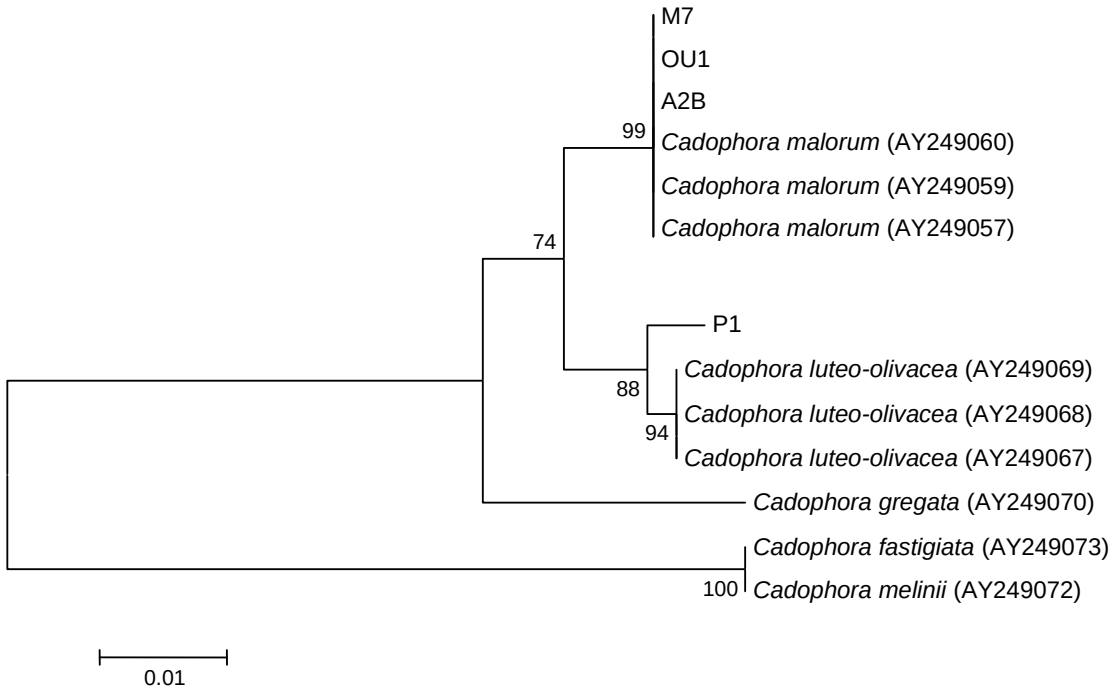
(-) = Não determinado

Com base nos resultados obtidos e levando-se em consideração a amostra de origem, o isolado P1 (marinho) M7 (terrestre) foram taxonomicamente identificados (item 5.3.) e selecionados para os experimentos subsequentes de otimização do processo de produção de enzimas ligninolíticas.

5.3 Identificação taxonômica dos isolados selecionados

Os fungos selecionados foram submetidos à identificação molecular com o propósito de verificar suas identidades e ausência de patogenicidade. Foi realizada a identificação molecular dos fungos marinhos A2B, OU1, P1 e N2 e dos fungos terrestres M7 e OB4B. Os dados derivados das análises de sequenciamento e filogenia demonstrados na Figura 10 permitiram identificar os fungos ligninolíticos da Antártica selecionados como melhores produtores como: *Cadophora malorum* (M7, OU1 e A2B) e *Cadophora luteo-olivacea* (P1). Segundo os resultados das buscas nas bases de dados, os isolados N2 e OB4B foram identificados como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Cosmospora*, respectivamente (Apêndice A).

Figura 10. Árvore filogenética baseada nas sequências derivadas da região ITS dos fungos selecionados como melhores produtores de ligninases. As sequências adicionais utilizadas na árvore foram recuperadas como as mais próximas, segundo os bancos de dados. Valores de *Bootstrap* (1.000 replicatas) acima de 70 % estão listados na árvore. Códigos em negrito referem-se as sequências geradas no estudo.



5.4 Planejamento Experimental

5.4.1 Otimização da produção enzimática pelo fungo marinho Cadophora luteo-olivaceae (P1)

Tendo em vista o potencial de aplicação das lacases para o setor ambiental e industrial, bem como a experiência prévia do nosso grupo de pesquisa da Profa. Lara Sette, esta enzima foi escolhida entre as ligninolíticas para embasar o processo de otimização. Cabe ressaltar, que as outras duas enzimas foram também determinadas durante os ensaios do planejamento experimental.

5.4.1.1 Plackett-Burman (P&B)

O processo de otimização da lacase do fungo marinho *Cadophora lúteo-olivacea* P1 teve início com o modelo Plackett-Burman. A produção das ligninases, primeiramente foi avaliada com nove variáveis, demonstradas na Tabela 4, especificadas em três níveis: (-1), central (0), e (+1), visando avaliação dos efeitos das mesmas frente à produção enzimática.

Tabela 4. Variáveis aplicadas ao 1º P&B para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.

Variáveis	-1	0	+1
1. Nº Cilindros Inóculo	3	4	5
2. Glicose (g/L)	0	5 (0,25g/50 ml)	10 (0,50g/50 ml)
3. Ext.Malte (g/L)	0	10 (0,50g/50 ml)	20 (1g/50 ml)
4. Peptona (g/L)	0	1 (0,05g/50 ml)	2 (0,1g/50 ml)
5. Ext.Levedura (g/L)	0	1 (0,05g/50 ml)	2 (0,1g/50 ml)
6. $CuSO_4$ (mM)	0	2,5	5
7. Temperatura	15	20	25
8. Salinidade (ml)	0 (0%)	25 ml (50%)	50 ml (100%)
9. pH	4,5	6,25	8

O desenho experimental elaborado foi baseado na Matriz Codificada para 12 variáveis do P&B que forneceu a base para a formulação dos 19 diferentes ensaios realizados em escala de 50 mL.

Nesta primeira etapa do desenho experimental, as variáveis significativas foram: sulfato de cobre ($CuSO_4$), utilizado como indutor na produção de lacase e salinidade (ASW), onde ambas apresentaram resultados negativos para a produção desta enzima, como pode ser observado na Tabela 5.

Os resultados da atividade enzimática da lacase mostrou um pico de produtividade de 0,93 $U.L^{-1}$ no ensaio 5, o qual foi composto por um meio contendo glicose e malte como fontes de carbono e peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio, como pode ser observado na

Tabela 6. Os ensaios 3, 4, 10, 12 e 19 também apresentaram atividade enzimática para esta enzima, mas com valores relativamente mais baixos (Tabela 5). Para a MnP o ensaio 4 resultou em uma atividade de 79,95 $U.L^{-1}$ e para a LiP o melhor resultado de atividade enzimática foi o ensaio 2 (4,01 $U.L^{-1}$).

Tabela 5. Atividade enzimática das enzimas ligninolíticas no 1º P&B (12 variáveis + 3 pontos centrais).

Ensaio	Inóculo	Glicose	Ext Malte	Peptona	Ext Lev.	$CuSO_4$	Temp	ASW	pH	Lac	MnP	LiP
1	5(1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	15(-1)	50(1)	8(1)	0	3,27	0,02
2	5(1)	10(1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	5(1)	15(-1)	0(-1)	8(1)	0,09	0	4,01
3	5(1)	10(1)	20(1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	25(1)	0(-1)	4,5(-1)	0,16	7,07	0
4	5(1)	10(1)	20(1)	2(1)	0(-1)	0(-1)	15(-1)	50(1)	4,5(-1)	0,12	79,95	0
5	3(-1)	10(1)	20(1)	2(1)	2(1)	0(-1)	15(-1)	0(-1)	8(1)	0,93	2,76	0
6	5(1)	0(-1)	20(1)	2(1)	2(1)	5(1)	15(-1)	0(-1)	4,5(-1)	0,08	8,16	0,07
7	3(-1)	10(1)	0(-1)	2(1)	2(1)	5(1)	25(1)	0(-1)	4,5(-1)	0,01	0	0,02
8	5(1)	0(-1)	20(1)	0(-1)	2(1)	5(1)	25(1)	50(1)	4,5(-1)	0,03	1,95	0,01
9	5(1)	10(1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	5(1)	25(1)	50(1)	8(1)	0,02	3,22	0,09
10	3(-1)	10(1)	20(1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	25(1)	50(1)	8(1)	0,11	0	0
11	3(-1)	0(-1)	20(1)	2(1)	0(-1)	5(1)	15(-1)	50(1)	8(1)	0	3,16	0,02
12	5(1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	2(1)	0(-1)	25(1)	0(-1)	8(1)	0,12	0,86	0,03
13	3(-1)	10(1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	5(1)	15(-1)	50(1)	4,5(-1)	0	0,57	0,07
14	3(-1)	0(-1)	20(1)	0(-1)	0(-1)	5(1)	25(1)	0(-1)	8(1)	0	0	0
15	3(-1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	0(-1)	25(1)	50(1)	4,5(-1)	0,01	7,53	0
16	3(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	15(-1)	0(-1)	4,5(-1)	0,1	1,15	0
17	4(0)	5(0)	10(0)	1(0)	1(0)	2,5(0)	20(0)	25(0)	6,25(0)	0,08	1,32	0
18	4(0)	5(0)	10(0)	1(0)	1(0)	2,5(0)	20(0)	25(0)	6,25(0)	0	3,16	0
19	4(0)	5(0)	10(0)	1(0)	1(0)	2,5(0)	20(0)	25(0)	6,25(0)	0,16	3,68	0,06

De acordo com a análise estatística (Tabela 6), a glicose e o extrato de malte apesar de não terem sido variáveis significativas apresentaram os maiores efeitos entre as 9 variáveis analisadas. Os efeitos foram positivos e resultaram em um aumento na produção enzimática de 1,39 e 1,35 $U.L^{-1}$, respectivamente.

Tabela 6. Análise estatística sobre o efeito das 9 variáveis do 1º P&B (STATISTICA 7.0)

	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p-Valor
Mean/Interc.	1,10461	0,384387	2,8737	0,018366
(1)Inóculo	-0,65779	0,837751	-0,78519	0,452516
(2)Glicose	1,39853	0,837751	1,66939	0,129381
(3)Ext.Malte	1,3561	0,837751	1,61873	0,139958
(4)Peptona	1,02431	0,837751	1,22268	0,2525
(5)Ext.Levedura	0,96258	0,837751	1,149	0,280175
(6)$CuSO_4$	-1,67631	0,837751	-2,00097	0,076434
(7)Temperatura	-1,08603	0,837751	-1,29637	0,227101
(8)Salinidade	-1,51813	0,837751	-1,81215	0,103382
(9)pH	0,93557	0,837751	1,11676	0,293021

O 2º P&B foi praticamente uma repetição do primeiro, tendo em vista a falta de reprodutibilidade nas réplicas do ponto central no 1° P&B. Para este experimento, a temperatura que foi fixada em 15ºC e o farelo de trigo foi incluído como uma das variáveis independentes.

No novo P&B pode ser observado um aumento da atividade da lacase (6,9 $U.L^{-1}$, ensaio 3 da Tabela 8). Nas condições estudadas, o farelo de trigo estava presente juntamente com a glicose e o extrate de malte. Este ensaio foi utilizado como modelo para a definição de um novo planejamento experimental. No 2° P&B, as atividades de MnP e LiP decaíram, sugerindo a inibição da produção destas enzimas pelo farelo de trigo.

Tabela 7. Variáveis aplicadas ao 2º P&B para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.

Variáveis	-1	0	+1
1. Nº Cilindros Inóculo	3	4	5
2. Glicose (g/L)	0	5 (0,25g/50 ml)	10 (0,50g/50 ml)
3. Ext. Malte (g/L)	0	10 (0,50g/50 ml)	20 (1g/50 ml)
4. Peptona (g/L)	0	1 (0,05g/50 ml)	2 (0,1g/50 ml)
5. Ext. Levedura (g/L)	0	1 (0,05g/50 ml)	2 (0,1g/50 ml)
6. $CuSO_4$ (mM)	0	2,5	5
7. Farelo de Trigo (g/L)	0	1 (0,05g/50 ml)	2 (0,1g/50 ml)
8. Salinidade (ml)	0 (0%)	25 ml (50%)	50 ml (100%)
9. pH	4,5	6,25	8

Tabela 8. Atividade enzimática das enzimas ligninolíticas no 2º P&B (12 variáveis + 3 pontos centrais).

Ensaio	Inóculo	Glicose	Ext Malte	Peptona	Ext Lev.	$CuSO_4$	Farelo Trigo	ASW	pH	Lac	MnP	LiP
1	5(1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	0 (-1)	50(1)	8(1)	0,04	0	0,01
2	5(1)	10(1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	5(1)	0 (-1)	0(-1)	8(1)	0	2,7	2,28
3	5(1)	10(1)	20(1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	2 (1)	0(-1)	4,5(-1)	6,9	0	0
4	5(1)	10(1)	20(1)	2(1)	0(-1)	0(-1)	0 (-1)	50(1)	4,5(-1)	0	0	0
5	3(-1)	10(1)	20(1)	2(1)	2(1)	0(-1)	0 (-1)	0(-1)	8(1)	0,12	0	0,05
6	5(1)	0(-1)	20(1)	2(1)	2(1)	5(1)	0 (-1)	0(-1)	4,5(-1)	0,23	2,64	0
7	3(-1)	10(1)	0(-1)	2(1)	2(1)	5(1)	2 (1)	0(-1)	4,5(-1)	0	1,72	0
8	5(1)	0(-1)	20(1)	0(-1)	2(1)	5(1)	2 (1)	50(1)	4,5(-1)	0,02	0,97	0
9	5(1)	10(1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	5(1)	2 (1)	50(1)	8(1)	0,06	0,4	0,05
10	3(-1)	10(1)	20(1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	2 (1)	50(1)	8(1)	0	0	0,01
11	3(-1)	0(-1)	20(1)	2(1)	0(-1)	5(1)	0 (-1)	50(1)	8(1)	0,1	3,68	0,05
12	5(1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	2(1)	0(-1)	2 (1)	0(-1)	8(1)	0,01	0	0
13	3(-1)	10(1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	5(1)	0 (-1)	50(1)	4,5(-1)	0,16	0,4	0
14	3(-1)	0(-1)	20(1)	0(-1)	0(-1)	5(1)	2 (1)	0(-1)	8(1)	0	0,74	0,01
15	3(-1)	0(-1)	0(-1)	2(1)	0(-1)	0(-1)	2 (1)	50(1)	4,5(-1)	0	0	0
16	3(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0 (-1)	0(-1)	4,5(-1)	0	0	0
17	4(0)	5(0)	10(0)	1(0)	1(0)	2,5(0)	1 (0)	25(0)	6,25(0)	0,04	0	0,03
18	4(0)	5(0)	10(0)	1(0)	1(0)	2,5(0)	1 (0)	25(0)	6,25(0)	0,08	0,23	0
19	4(0)	5(0)	10(0)	1(0)	1(0)	2,5(0)	1 (0)	25(0)	6,25(0)	0	0	0

Os resultados das análises estatísticas para a lacase revelaram que as variáveis analisadas não foram significativas (Tabela 8). O efeito positivo foi observado para as variáveis inóculo, glicose, malte e farelo de trigo, enquanto o negativo para peptona, extrato de levedura, $CuSO_4$ e salinidade (ASW) (Tabela 9).

Tabela 9. Análise estatística sobre o efeito das 9 variáveis do 2º P&B (STATISTICA 7.0).

	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p-Valor
Mean/Interc.	0,408895	0,333663	1,22547	0,251498
(1)Inóculo	0,861125	0,727201	1,18416	0,266678
(2)Glicose	0,853875	0,727201	1,17419	0,270451
(3)Ext.Malte	0,886375	0,727201	1,21889	0,253870
(4)Peptona	-0,826125	0,727201	-1,13603	0,285287
(5)Ext.Levedura	-0,808875	0,727201	-1,11231	0,294831
(6)$CuSO_4$	-0,813625	0,727201	1,08825	0,292178
(7)Farelo de Trigo	0,791375	0,727201	1,08825	0,304768
(8)Salinidade	-0,858875	0,727201	-1,18107	0,267844
(9)pH	-0,871375	0,727201	-1,19826	0,261417

5.4.1.2 Fatorial Fracionado 2^{5-1}

Com base nos dados anteriores, foi aplicado o modelo Fatorial Fracionado no terceiro delineamento experimental, utilizando a Matriz com os valores reais construída a partir da Matriz Codificada Fatorial Fracionado 2^{5-1} (2^4 - 16 ensaios + 3 pontos centrais = 19 ensaios) para a avaliação de 5 variáveis (Tabela 10). No delineamento fatorial fracionado algumas variáveis tiveram os seus valores fixados de acordo com o último planejamento, sendo elas: a temperatura (15ºC), o pH (4,5) e o inóculo (5 cilindros ágar + micélio) e outras foram excluídas (peptona, extrato de levedura, $CuSO_4$ e salinidade). Em contrapartida, duas novas variáveis foram adicionadas: a riboflavina e o ácido glutâmico.

Tabela 10. Variáveis aplicadas ao delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.

Variáveis	-1	0	+1
1. Glicose (g/L)	5 (0,25g/50 ml)	10 (0,5g/50 ml)	15 (0,75g/50 ml)
2. Ext. Malte (g/L)	15 (0,5g/50 ml)	20 (1g/50 ml)	25 (2g/50 ml)
3. Farelo de Trigo (g/L)	1 (0,05g/50 ml)	2 (0,1g/50 ml)	3 (0,2g/50 ml)
4. Riboflavina (%)	0	0,01	0,02
5. Ac. Glutâmico (%)	0	0,1	0,2

De forma geral, os resultados da atividade enzimática apresentados pelo delineamento fatorial fracionado foram menores que o 2º P&B para todas as enzimas testadas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase). A maior atividade de lacase foi de 3,33 $U.L^{-1}$ (Tabela 11, ensaio 2).

Tabela 11. Atividade enzimática no Fatorial Fracionado (16 ensaios + 3 pontos centrais = 19 ensaios).

Ensaios	Glicose	Ext Malte	Farelo Trigo	Riboflavina	Ac Glutâmico	Lac	MnP	LiP
1	(5) -1	(15) -1	(1) -1	(0) -1	(0,2) 1	0,47	0	0
2	(15) 1	(15) -1	(1) -1	(0) -1	(0) -1	3,33	0	0
3	(5) -1	(25) 1	(1) -1	(0) -1	(0) -1	0,02	0	0
4	(15) 1	(25) 1	(1) -1	(0) -1	(0,2) 1	0	0	0
5	(5) -1	(15) -1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	2,97	0	0
6	(15) 1	(15) -1	(3) 1	(0) -1	(0,2) 1	2,68	0	0,01
7	(5) -1	(25) 1	(3) 1	(0) -1	(0,2) 1	0,01	0,11	0
8	(15) 1	(25) 1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	0	0	0
9	(5) -1	(15) -1	(1) -1	(0,02) 1	(0) -1	3,23	0,05	0
10	(15) 1	(15) -1	(1) -1	(0,02) 1	(0,2) 1	3,02	0	0
11	(5) -1	(25) 1	(1) -1	(0,02) 1	(0,2) 1	0,03	0	0,02
12	(15) 1	(25) 1	(1) -1	(0,02) 1	(0) -1	0,06	0	0,04
13	(5) -1	(15) -1	(3) 1	(0,02) 1	(0,2) 1	2,94	0	0
14	(15) 1	(15) -1	(3) 1	(0,02) 1	(0) -1	2,79	0,69	0
15	(5) -1	(25) 1	(3) 1	(0,02) 1	(0) -1	0	0	0,02
16	(15) 1	(25) 1	(3) 1	(0,02) 1	(0,2) 1	0,02	0	0,03
17	(10) 0	(20) 0	(2) 0	(0,01) 0	(0,1) 0	2,33	0	0
18	(10) 0	(20) 0	(2) 0	(0,01) 0	(0,1) 0	2,33	0,11	0
19	(10) 0	(20) 0	(2) 0	(0,01) 0	(0,1) 0	1,08	0,17	0,02

A análise dos efeitos obtidos através do software (Tabela 12) mostra que o extrato de malte foi uma variável significativa, porém tendo um efeito negativo no planejamento (-2,66 $U.L^{-1}$). Entretanto, no 2º P&B a melhor atividade foi obtida com 20 $g.L^{-1}$ de extrato de malte e o valor da atividade foi mais de duas vezes maior do que a obtida no Fatorial Fracionado.

Tabela 12. Análise estatística sobre o efeito das 5 variáveis do delineamento Fatorial Fracionado 2^5 (STATISTICA 7.0)

	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p-Valor
Mean/Interc.	1,44193	0,180189	8,00231	0,004073
(1)Glicose	0,27797	0,392712	0,70782	0,530091
(2)Ext. Malte	-2,66223	0,392712	-6,77908	0,006591
(3)Farelo de Trigo	0,15490	0,392712	0,39444	0,719627
(4)Riboflavina	0,32967	0,392712	0,83846	0,462834
(5)Ác. Glutâmico	-0,40336	0,392712	-1,02710	0,379946

As variáveis farelo de trigo e riboflavina, apesar de não serem significativas apresentaram efeito positivo (0,15 e 0,32 $U.L^{-1}$, respectivamente). Já o ácido glutâmico apresentou efeito negativo (-0,40 $U.L^{-1}$).

5.4.1.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2^3)

Utilizando as informações e o direcionamento fundamentado nas outras etapas do desenho experimental, foi realizado o delineamento composto central rotacional, ficando estabelecida a análise das três variáveis que poderiam ser mais relevantes do ponto de vista produtivo. Como no último delineamento experimental o extrato de malte teve um efeito negativo com a concentração utilizada, neste delineamento este composto foi utilizado novamente como variável, mas na concentração de até 23 $g.L^{-1}$.

Em adição, como no 2º P&B e no fatorial fracionado as variáveis glicose e farelo de trigo não foram significativas, mas apresentaram efeito positivo, as mesmas foram fixadas no seu maior valor. As variáveis riboflavina e ácido glutâmico foram excluídas, pois devido ao efeito negativo no ensaio anterior. Assim, foram escolhidos dois novos indutores, o glicerol e o álcool veratrílico (Tabela 13).

Tabela 13. Variáveis aplicadas ao DCCR 2^3 para a produção de ligninases por *Cadophora luteo-olivacea* P1.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	1,68
1. Ext. Malte (g/L)	15 (0,5g/50 ml)	17	20 (1g/50 ml)	23	25 (2g/50 ml)
2. Glicerol (mM)	0	20	50	80	100
3. Al. Veratrílico (mM)	0	0,2	0,5	0,8	1

Como a enzima LiP apresentou atividade muito baixa nos últimos desenhos experimentais, neste último delineamento foi realizada somente a leitura da lacase e da MnP (Tabela 15).

Dentre as amostras analisadas dos 17 ensaios (Tabela 14), a maior atividade de lacase (2,16 $U.L^{-1}$) foi obtida no ponto central (ensaio 16) seguida do ensaio 6 (2,06 $U.L^{-1}$). No entanto, a atividade enzimática da lacase teve uma queda comparando com os desenhos experimentais anteriores, não havendo aumento da enzima pelos indutores glicerol e o álcool veratrilico. A produção de MnP também apresentou uma queda quando comparado com os planejamentos experimentais anteriores. Neste DCCR, a maior atividade enzimática de MnP foi obtida no ensaio 15 (3,56 $U.L^{-1}$), seguida do ensaio 10 (2,53 $U.L^{-1}$).

Tabela 14. Atividade enzimática no DCCR 2^3 (14 ensaios + 3 pontos centrais)

Ensaios	Ext Malte	Glicerol	Álcool Veratrílico	Lac	MnP
1	(17)-1	(20)-1	(0,2)-1	0,47	1,32
2	(23)1	(20)-1	(0,2)-1	0,08	0,23
3	(17)-1	(80)1	(0,2)-1	0,95	0
4	(23)1	(80)1	(0,2)-1	0	0
5	(17)-1	(20)-1	(0,8)1	0,01	0,23
6	(23)1	(20)-1	(0,8)1	2,06	0,11
7	(17)-1	(80)1	(0,8)1	0,28	0
8	(23)1	(80)1	(0,8)1	0,07	0,23
9	(15)-1,68	(50)0	(0,5)0	1,49	0
10	(25)1,68	(50)0	(0,5)0	0,01	2,53
11	(20)0	(0)-1,68	(0,5)0	0,01	0
12	(20)0	(100)1,68	(0,5)0	1,62	0
13	(20)0	(50)0	(0)-1,68	1,43	1,03
14	(20)0	(50)0	(1)1,68	0,64	0,34
15	(20)0	(50)0	(0,5)0	0,04	3,56
16	(20)0	(50)0	(0,5)0	2,16	0,11
17	(20)0	(50)0	(0,5)0	0,04	0,63

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 15. Não houve variáveis significativas no DCCR. As variáveis que apresentaram efeito positivo foram Glicerol (L), Álcool veratrílico (Q), bem como a interação extrato de malte (L) e álcool veratrílico (L).

Tabela 15. Análise estatística sobre o efeito das 3 variáveis do DCCR 2^3 (STATISTICA 7.0)

	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p-Valor
Mean/Interc.	0,776049	0,552687	1,40414	0,203057
(1)Ext.Malte (L)	-0,291750	0,519397	-0,56171	0,591836
(1)Ext.Malte (Q)	-0,167999	0,572208	-0,29360	0,777579
(2)Glicerol (L)	0,207051	0,519327	0,39482	0,704726
(2)Glicerol (Q)	-0,121523	0,572208	-0,21238	0,837866
(3)Ál. Veratrílico (L)	-0,062096	0,519397	-0,11955	0,908196
(3)Ál. Veratrílico (Q)	0,032120	0,572208	0,05613	0,956804
1L by 2L	-0,704090	0,678325	-1,03798	0,333798
1L by 3L	0,793596	0,678325	1,16993	0,280314
2L by 3L	-0,528935	0,678325	-0,77977	0,461075

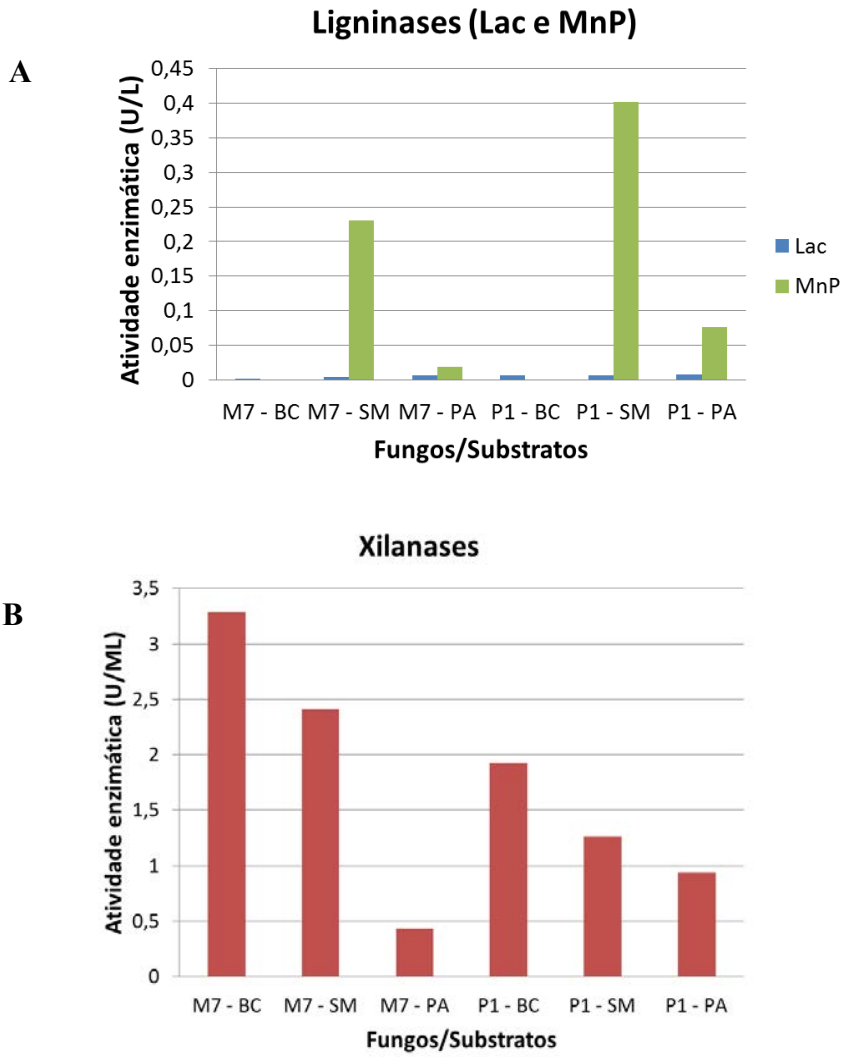
Considerando todo o planejamento experimental aplicado à otimização da lacase produzida pelo fungo marinho da Antártica *Cadophora luteo-olivacea* P1 a 15ºC, a melhor condição de produção desta enzima (6,9 $U.L^{-1}$) foi o ensaio 3 do 2º P&B (Tabela 2), contendo glicose (10 $g.L^{-1}$), extrato de malte (20 $g.L^{-1}$), farelo de trigo (2 $g.L^{-1}$) e pH 4,5. Para a enzima MnP a condição de melhor atividade (79,95 $U.L^{-1}$) foi a do ensaio 4 do 1º P&B, o qual continha glicose (10 10 $g.L^{-1}$),

extrato de malte (20 $g.L^{-1}$), peptona (2 $g.L^{-1}$), 100% de ASW, pH 4,5 e temperatura de 15ºC. Para a LiP, a maior atividade (4,01 $U.L^{-1}$) foi obtida nas condições do ensaio 2 do 1º P&B, o qual continha glicose (10 $g.L^{-1}$), $CuSO_4$ (5 mM), pH 8,0 e temperatura de 15ºC.

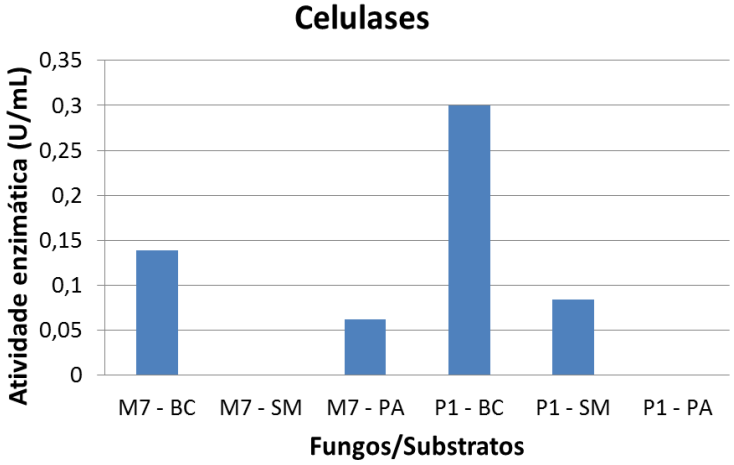
5.5 Avaliação da atividade de ligninases, xilanases e celulases por fermentação em estado semi sólido pelos fungos da Antártica C. luteo-olivaceae P1 e C. malorum M7

Os dois fungos selecionados *C. luteo-olivaceae* P1 (de origem marinha) e *C. malorum* M7 (de origem terrestre) foram cultivados em material lignocelulósico visando verificação da produção das enzimas ligninases, xilanases e celulases a 15ºC. Para tanto foram utilizados os substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho (SM) e palha de arroz (PA). Os resultados estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Atividade enzimática em material lignocelulósico pelos fungos *C. luteo-olivaceae* P1 e *C. malorum* M7 a cultivados por 7 dias a 15ºC. Ligninases (A), Xilanases (B) e Celulases (C).



C



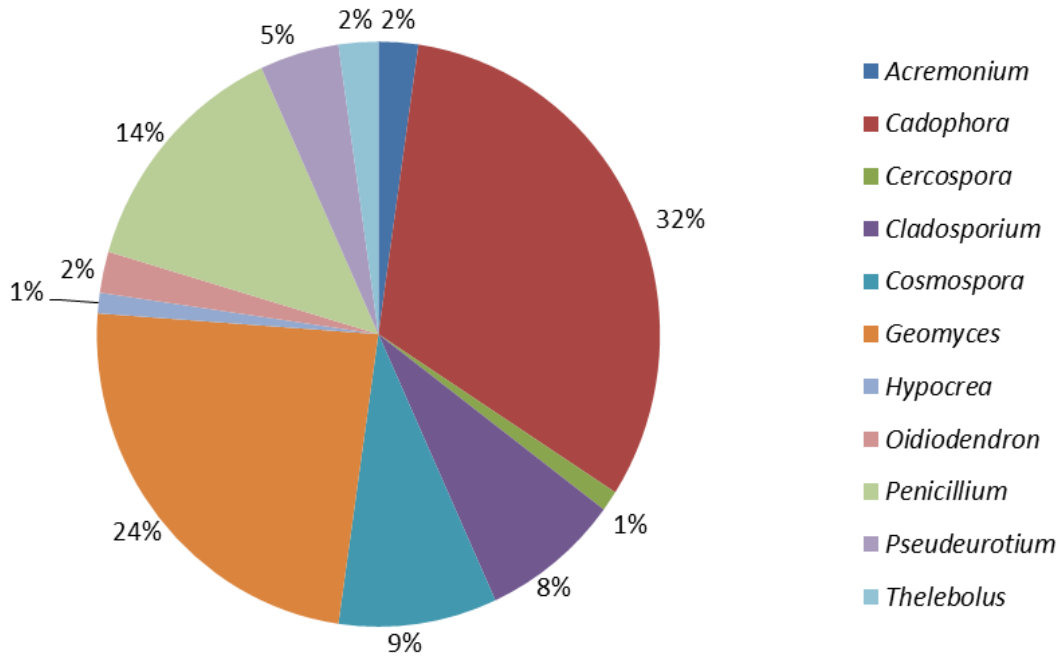
Os resultados da produção enzimática em estado semi-sólido revelaram que os dois fungos foram capazes de produzir xilanases em todos os substratos estudados. Esta enzima foi melhor produzida (quantitativamente) do que as ligninases e celulases, que apresentaram atividades muito baixas. O fungo de origem terrestre *C. malorum* M7 (isolado de amostra de madeira) foi o melhor produtor de xilanases quando cultivado em bagaço de cana (3,48 $U.mL^{-1}$) e sabugo de milho (2,41 $U.mL^{-1}$). A maior produção desta enzima (1,9 mL^{-1}) pelo fungo de origem marinha *C. luteo-olivaceae* P1 (isolado de sedimento) também se deu no substrato bagaço de cana.

Com relação à produção de ligninases a enzima lacase praticamente não apresentou atividade para os dois fungos e em todos os substratos estudados, sendo a MnP melhor produzida (0,40 $U.mL^{-1}$) pelo fungo de origem marinha *C. luteo-olivaceae* P1 (isolado de sedimento) quando cultivado em sabugo de milho. O cultivo nesse substrato também resultou na melhor atividade de MnP por *C. malorum* M7. As maiores atividades de celulases foram apresentadas em substrato bagaço de cana: *C. luteo-olivaceae* P1 e *C. malorum* M7.

5.6 Avaliação da diversidade dos fungos marinhos e terrestres da Antártica

Todos os fungos filamentosos identificados no presente trabalho (n=76) são pertencentes ao filo Ascomycota. Os dados derivados das análises de sequenciamento permitiram identificar os fungos da Antártica como pertencentes a 11 gêneros distintos: *Acremonium, Cadophora, Cercospora, Cladosporium, Cosmospora, Geomyces*, *Hypocrea, Oidiodendron, Penicillium, Pseudeurotium* e *Thelebolus* (Apêndice A), cujas abundâncias estão apresentadas na Figura 12.

Figura 12. Abundância de fungos filamentosos isolados de amostras da Antártica



Os representantes do gênero *Cadophora* (n=28) foram os isolados em maior abundância, seguida do gênero *Geomyces* (n=21), *Penicillium* (n=12) e *Cosmospora* (n=8), sendo os demais gêneros isolados em quantidade menor.

Dentro os isolados do gênero *Cadophora*, foi possível encontrar duas espécies *Cadophora malorum*, cujos representantes foram isolados de madeira (n=8), Ascidia (n=3), ouriço do mar (n=1), estrela do mar (n=1), líquen (n=1) e *Salpa* (n=1) e *Cadophora luteo-olivácea*, cujos representantes foram isolados de amostras de sedimento marinho (n=5), liquen (n=3) e madeira (n=1), sendo que a espécie *Cadophora malorum* foi encontrado em um maior número (n=15) do que o representante de ambiente marinho, *Cadophora luteo-olivacea* (n=11) e um representante do gênero *Cadophora* que não foi possível chegar à espécie coletado a partir de osso de baleia

Dentre os representantes do gênero *Geomyces* a maioria foi isolado de amostras de líquen (n=9), sendo obtidos também a partir de amostras de *Salpa* (n=5), estrela do mar (n=2), anfípode (n=2), madeira (n=1), isopode (n=1), *Nacella* sp (n=1) e sedimento (n=1), sendo assim recuperados de oito diferentes amostras.

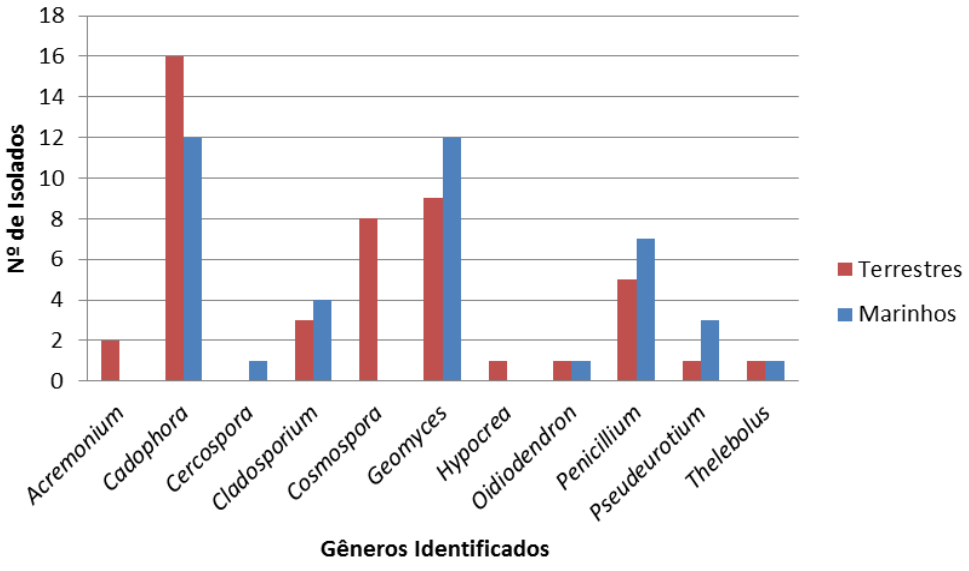
Para o grupo *Cosmospora*, todos os isolados identificados são de origem terrestre, recuperados a partir de amostras de ossos de baleia (n=7) e de solo de pinguineira (n=1). Já os

representantes do gênero *Penicillium* foram recuperados de sete diferentes amostras, incluindo marinhas e terrestres: estrela do mar (n=3), liquen (n=2), madeira (n=2), *Nacella* (n=2), isópode (n=1), osso de baleia (n=1) e *Salpa* (n=1).

Em adição foram identificados três representantes da espécie *Cladosporium cladosporioides* (recuperados de madeira e anfipode), dois representantes do gênero *Thelebolus* (recuperados de estrela do mar e solo de pinguineira), dois representantes do gênero *Oidiodendron* (recuperados de liquen e alga) e um representante dos gêneros *Acremonium* (recuperado de liquen), *Cercospora* (isolado de ouriço do mar), *Hypocrea* (recuperado de liquen), *Pseudeurotium* (isolado de madeira e de sedimento marinho).

Representantes dos gêneros *Cadophora, Cladosporium, Cosmospora, Geomyces*, *Penicilliu, Pseudeurotium* e *Thelebolus* foram encontrados tanto em amostras marinhas quanto em terrestres. Já os gêneros *Acremonium, Hypocrea/Trichoderma* e *Oidiodendron* foram encontrados apenas em amostras de origem terrestre, enquanto que o gênero *Cercospora* foi encontrado apenas em amostra marinha (Figura 13).

Figura 13. Distribuição dos representantes dos gêneros de fungos da Antártica de acordo com a origem (marinha e terrestre).



6. DISCUSSÃO

6.1 Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas a baixas (15°C) e médias temperaturas (25°C)

Os micro-organismos provenientes do continente Antártico enfrentam muitos estresses simultâneos, devido às características inóspitas deste ambiente, tendo assim que adotar estratégias adaptativas, tais como mudanças estruturais em suas membranas, proteínas constitutivas e enzimas (RUISE et al, 2007). A produção de enzimas adaptadas ao frio é uma estratégia eficiente para a manutenção das atividades a baixas temperaturas por esses organismos (D'AMICO et al, 2001).

Neste contexto, a seleção de fungos ligninolíticos isolados das amostras marinhas e terrestres da Antártica foi realizada a baixas (15°) e médias (25°C) temperaturas. Todos os 29 isolados selecionados na triagem inicial (meio sólido B&K contendo guaiacol) foram capazes de produzir enzimas ligninolíticas em meio líquido, apesar da quantidade das mesmas não terem sido expressivas.

Um maior número de isolados de origem terrestre foi capaz de produzir lacase e LiP a baixas temperaturas (15°C) quando comparado ao número de isolados capazes de produzir estas mesmas enzimas a 25°C. Por outro lado, os fungos de origem marinha apresentaram resultado inverso, sendo um maior número de isolados capazes de produzir as duas enzimas estudadas a 25°C. Esses resultados talvez possam ser justificados devido ao fato dos micro-organismos marinhos da Antártica estudados estarem mais protegidos do frio, pois habitam substratos e sedimentos dentro do oceano. Os resultados de produção enzimática a 15 e 25 ºC sugerem que Estes resultados evidenciam o potencial biotecnológico desses fungos para a aplicação em baixas e médias temperaturas.

Um alto número de isolados selecionados na triagem em meio sólido (45%) foi recuperado a partir de amostra de madeira, sendo este resultado considerado previsível, tendo em vista a presença da lignina no substrato de origem que é um dos principais constituintes da madeira. Em adição, um alto número de isolados provenientes de diferentes amostras marinhas (41%) também foi selecionado como produtor de ligninases (lacase).

Diferentes grupos de fungos têm sido relatados como produtores de enzimas ligninolíticas. Entre eles, os fungos basidiomicetos são micro-organismos considerados como os mais eficientes na produção de enzimas que são responsáveis pela quebra de materiais lignocelulósicos (BONUGLI-SANTOS et al, 2011). As principais enzimas relacionadas à degradação da lignina,

capacidade dos fungos de podridão branca, são a lignina peroxidase, manganês peroxidase e a lacase. Alguns fungos de podridão branca conseguem produzir todas estas enzimas, enquanto outros produzem duas ou somente uma delas (HATAKKA, 1994).

Fungos derivados de ambiente marinho têm sido relatados como produtores destas enzimas e vêm sendo utilizados em processos de descoloração de corantes e tratamento de efluentes coloridos (D'SOUZA-TICLO et al. 2009; VERMAL et al. 2010). Entretanto, tanto a produção de enzimas ligninolíticas por fungos de origem marinha quanto à aplicação das mesmas têm sido pouco estudados.

BUGNI e IRELAND (2004) destacam o potencial biotecnológico dos micro-organismos marinhos quanto à produção de compostos naturais diferentes daqueles produzidos por seus homólogos terrestres, pois estes estão adaptados às condições de salinidade e pressão do ambiente marinho. Dentre os produtos naturais produzidos por fungos marinhos, as enzimas ligninolíticas podem ser aplicadas na biorremediação de poluentes ambientais em condições ou processos salinos e alcalinos, tais como os efluentes de fábricas de papel e celulose, de destilarias a base de melaço e de indústrias têxteis (BONUGLI-SANTOS et al. 2010).

Levando-se em consideração a importância biotecnológica dos fungos terrestres e marinhos, um isolado de cada um desses ambientes foi selecionado para os estudos subsequentes. Com base na produção de enzimas ligninolíticas (em meio líquido) e nas amostras de origem, o isolado P1 (isolado de sedimento marinho) M7 (isolado de madeira) foram taxonomicamente identificados como *Cadophora luteo-olivacea* e *Cadophora malorum*, respectivamente, e foram selecionados para os experimentos subsequentes de otimização do processo de produção enzimática.

6.2 Otimização da produção enzimática

6.2.1. Fungo marinho Cadophora luteo-olivacea P1

O fungo de origem marinha *Cadophora luteo-olivacea* P1 foi submetido a uma sucessão de planejamentos experimentais visando avaliação dos efeitos de diferentes variáveis independentes na produção enzimática e otimização da produção. Para tanto, foram aplicados quatro modelos: dois do tipo Plackett-Burman (P&B), um Delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} e um Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 (DCCR). Mesmo sendo os estudos conduzidos visando otimização da produção de lacase, as enzimas MnP e LiP foram também avaliadas.

Os resultados não foram satisfatórios para a otimização da produção da lacase pelo fungo *Cadophora luteo-olivacea* P1, pois não foi observado aumento significativo e sucessivo da enzima ao longo do desenvolvimento do planejamento experimental.

As lacases extracelulares são geralmente produzidas em quantidades pequenas e, por isso, a sua produção deve ser estimulada. Uma variedade de substratos indutores, especialmente os compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou a derivados da lignina (e.g. guaiacol, álcool veratrílico, 2,5-xilidina, 2,2-azinobis (ABTS), ácido ferúlico têm sido utilizados visando aumento da produção desta enzima (TISMA et al, 2012). No presente trabalho diferentes tipos de indutores, bem como fontes de carbono e nitrogênio foram utilizados sem sucesso no aumento (significativo) da enzima escolhida. A maior atividade de lacase (6,9 $U.L^{-1}$) foi obtida no segundo P&B e alcançou níveis menores ao final do processo como um todo.

A natureza e a quantidade de fonte de carbono e nitrogênio disponível no meio de cultura exerce uma grande influência na produção de enzimas ligninolíticas (HATVANI & MECS, 2002). Para muitas espécies de fungo, a atividade das enzimas ligninolíticas pode ser suprimida ou estimulada pela alta concentração destes compostos no meio. No presente trabalho, houve uma queda na produção das enzimas ligninolíticas em condições com maiores concentrações de nitrogênio, sugerindo a inibição da produção por este composto.

A enzima MnP, que não foi foco da otimização no presente trabalho, apresentou atividade enzimática na maioria dos ensaios e um pico de produção (79.95 $U.L^{-1}$) no ensaio 4 do primeiro P&B, o qual que continha glicose e extrato de malte como fontes de carbono, cultivado em condição salina (100 % de água do mar artificial - ASW) e sem a adição de indutores. De acordo com Arora e Gill (2001), a alta atividade de enzimas ligninolíticas por fungos filamentosos em meios que contem extrato de malte, pode estar associada ao fato de que este composto é rico em aminoácidos aromáticos como o triptofano e a tirosina.

Apesar dos resultados da produção de lacase por *C. luteo-olivacea* P1 nos experimentos de otimização não terem sido expressivos, o fungo foi capaz de produzir MnP em quantidades mais significativas em condição salina e sem a presença de indutores. Assim, este isolado pode ser considerado como um recurso genético alvo em estudos futuros relacionados com a produção/ otimização e caracterização enzimática, bem como na aplicação em processos ou ambientes salinos.

6.3 Avaliação da atividade de ligninases, xilanases e celulases por fermentação em estado semi sólido pelos fungos da Antártica C. luteo-olivaceae P1 e C. malorum M7

Os materiais lignocelulósicos provenientes de atividades agrícolas como o bagaço de milho, palha de arroz, sabugo de milho, madeira, restos de culturas de grãos e frutíferas, tem sido aproveitados visando à utilização nos processos para renovação energética (AGUIAR FILHO, 2008). A composição dos resíduos lignocelulósicos utilizados no presente estudo é de: i) Bagaço de cana: 36% de celulose, 28% de hemicelulose e 20% de lignina; ii) Sabugo de milho: 36% de celulose, 28% de hemicelulose e 16% de lignina; iii) Palha de arroz: 33% de celulose, 26% de hemicelulose e 7% de lignina (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; SHLESER 1994; AWAFO 1997).

A biodegradação de materiais lignocelulósicos tem sido foco de estudos, correspondendo a uma importante etapa do ciclo do carbono na natureza, podendo também ser aplicada em processos tecnológicos. A aplicação de enzimas produzidas por fungos decompositores de materiais lignocelulósico tem ganhado atenção atualmente. O uso de enzimas como a lacase e a xilanase no processo de branqueamento de polpas celulósicas e a aplicação de celulases na hidrólise enzimática de celuloses nos processos de produção de etanol de segunda geração, são alguns exemplos importantes da aplicação tecnológica atual da biodegradação de materiais lignocelulósicos (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

Tendo em vista as baixas atividades enzimáticas obtidas durante a condução do desenho experimental para otimização da produção de ligninases (lacase) pelo fungo *C. luteo-olivaceae* P1 (cultivo submerso) e devido à seleção de um alto número de isolados provenientes de amostras de madeira, foi avaliada a produção de ligninases, xilanases e celulases em diferentes substratos por fermentação semi-sólida (bagaço de cana, sabugo de milho e palha de arroz).

Nestes experimentos, a produção de xilanases foi bem maior do que a de ligninases e celulases e os dois fungos foram capazes de produzir esta enzima em todos os substratos estudados, os quais contêm quantidades similares de hemicelulose (26-28%) e celulases (33-36%). Os substratos claramente favoreceram a produção de determinadas enzimas. Em bagaço de cana, as xilanases e celulases foram produzidas de forma mais expressiva do que nos outros substratos pelos dois fungos. As ligninases foram melhores produzidas (pelos dois fungos) em sabugo de milho, que é um substrato com cerca de 16% de lignina. A composição química da estrutura da lignina neste substrato pode ter favorecido a produção de ligninases, principalmente MnP.

Micro-organismos capazes de produzir enzimas hemicelulósicas como fonte de carbono e energia, podem ser úteis nos processos de obtenção de etanol de segunda geração, agregando valor à produção deste a partir de resíduos lignocelulósicos (DELABONA, et al, 2009). Atualmente há uma grande busca de processos para a hidrólise do bagaço de cana a açúcares fermentescíveis, que sejam de baixo custo e ao mesmo tempo evitem formação de compostos tóxicos para a fermentação alcoólica subsequente (SILVA, 2010).

Levando-se em consideração que os resultados de produção de xilanases em substrato bagaço de cana obtidos no presente estudo foram em temperaturas próximas à utilizada em processos que envolvem a fermentação alcóolica (15°C). Os fungos *C. luteo-olivacea* P1 e *C. malorum* M7 isolados de ambiente marinho e terrestre da Antártica podem ser considerados promissores em estudos de obtenção de etanol de segunda geração.

6.4 Avaliação da diversidade dos fungos marinhos e terrestres da Antártica

A Antártica é um continente remoto e inóspito, com o clima mais seco e frio conhecido na Terra. As condições adversas prevalecentes neste continente, como a baixa temperatura, limita a sobrevivência de plantas e animais. No entanto, ecossistema da Antártica é dominado por micro-organismos com um alto nível de adaptação e capazes de sobreviver a condições extremas (RUISE et al, 2007).

Nas últimas décadas, a região da Antártica tem sido investigada, principalmente, pela presença de bactérias e arqueobactérias psicrofílicas. No entanto, poucos são os estudos voltados para os fungos psicrofílicos. Esses micro-organismos são capazes de crescer ativamente e se reproduzir na Antártica e são considerados verdadeiramente indígenas.

Desde as primeiras expedições realizadas na região da Antártica, foram publicados cerca de 300 artigos científicos relatando a presença dos fungos nessa região Ruise et al. (2007), descreveram 232 espécies de fungos e oomycetos da Antártica continental em 2005, mas só foram fornecidos os nomes para as espécies ou variedades que eles consideravam tanto endêmicas, quanto capazes de crescer no ambiente. Os fungos não liquenizados representam, provavelmente, a biota mais diversificada da Antártica (BRIDGE; SPOONER, 2012).

Alguns fungos que se desenvolvem na Antártica são psicrofílicos, mas a maioria deles é considerada psicrotolerantes. As paredes celulares espessas dos esporos fúngicos são frequentemente resistentes a uma variedade de estresses, particularmente se eles incluem pigmentos de proteção, como a melanina ou carotenoides (ONOFRI et al, 2004).

Na Antártica, a distribuição dos fungos está relacionada aos diferentes substratos como solos, pedras, vegetação, briófitas e liquens, além de substratos marinhos. No presente trabalho, representantes de 11 diferentes gêneros foram recuperados a partir de amostras marinhas e terrestres da Antártica. Todos os isolados identificados no presente estudo pertencem ao filo Ascomycota. Representantes dos gêneros *Cadophora, Geomyces*, *Penicillium* e *Cosmospora* foram isolados em maior abundância. Trabalhos anteriores (ARENZ et al., 2006 e ARENZ; BLANCHETTE, 2009) reportaram a predominância do filo Ascomycota entre os isolados encontrados no continente Antártico, como encontrados no presente estudo. Ludley & Robinson. (2008), relataram que a maioria dos basidiomicetos encontrados nas regiões marítimas e continentais da Antártica é constituída por leveduras. Apesar de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota serem pouco encontrados no ambiente Antártico, o grupo de fungos decompositores de madeira predominante neste ambiente parecem ser os ascomicetos pertencentes ao gênero *Cadophora* (ARENZ & BLANCHETTE, 2009).

Representantes do gênero *Cadophora* tem sido encontrados como predominantes em vários locais na Antártica, sugerindo que eles sejam endêmicos (BLANCHETTE et al., 2004a,b). Isolados de *Cadophora* obtidos do ambiente Antártico foram reportados como decompositores de madeira (ARENZ et al., 2006). Segundo Onofri et al. (2004), *Cadophora malorum* é frequentemente isolado de solos da Antártica e apresenta uma ampla temperatura de crescimento, variando de -3 °C a 45 °C. No presente trabalho, oito fungos do gênero *Cadophora* foram isolados de amostras de madeira, sendo também obtidos a partir de outra amostra terrestre (líquen) e de quatro diferentes amostras marinhas. A predominância desse gênero nos fungos identificados da Antártica sugere que eles são importantes organismos na dinâmica do solo e na ciclagem de nutrientes das regiões polares.

O gênero *Geomyces* apresenta características psicrofílicas e é halotolerante (POOLE; PRICE, 1971; MERCANTINI et al., 1989). Espécies pertencentes a esse gênero foram reportadas por Zhdanova et al. (2000) como micro-organismos que conseguem crescer no ambiente Antártico a elevados níveis de contaminação por radiação, maiores que 220 mR h^{-1}, medido como nível de radiação gama. Visto que esse gênero possui uma alta resistência para sobreviver em ambientes extremos, tais resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, pois depois do *Cadophora*, o gênero *Geomyces* foi o segundo isolado em maior abundância.

O gênero *Penicillium* é um importante decompositor e também ciclador de matéria orgânica de todos os tipos. É um micro-organismo facilmente recuperado de amostras terrestres ou aquáticas, sendo considerado um gênero cosmopolita (HARAN et al., 1996; MENEZES et al., 2010). No

presente trabalho, esse gênero foi encontrado em seis diferentes tipos de substratos coletados da Antártica, evidenciando a sua característica cosmopolita.

Assim como o gênero *Penicillium,* o gênero *Hypocrea* (teleomorfo de *Trichoderma*) possui representantes cosmopolitas e são considerados como fungos de interesse biotecnológico (SIVAN; CHET, 1989), pois podem produzir e secretar diversas enzimas extracelulares de importância econômica (SIVAN; CHET, 1989).

Fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium* também são frequentemente encontrados em diversos ambientes e já foram reportados associados a algas marinhas bem como plantas terrestres, madeira e solos na Antártica (LOQUE, 2010). Representantes da espécie *Cladosporium cladosporioides* conseguem crescer em temperaturas que variam de 0º a 32ºC, com temperaturas ótimas variando entre 20º a 28ºC, com crescimento lento a -3ºC e até -10ºC (ONOFRI et al., 2004).

Quanto ao gênero *Cosmopora* (*Nectria*)*,* seus representantes são frequentemente encontrados em madeira e arbustos lenhosos e são considerados como agente patogênico de plantas e insetos (SINCLAIR; LYON 2005). Isolados de *Cosmospora vilior* foram detectados em lagos da Antártica (GONÇALVES et al., 2012).

A maioria dos fungos reportados na Antártica é encontrada na forma anamórfica. Nota-se que os fungos simplificaram a forma de vida "desistindo" da reprodução sexual, o que significa que os ciclos de vida podem ser concluídos em um tempo mais curto e sem altos custos metabólicos. Algumas exceções têm sido relatadas, como o gênero *Thelebolus,* frequentemente isolados de amostras do continente Antártico, tanto de ambientes terrestres como aquáticos (RUISE et al, 2007; HOOG et al., 2005).

Zuccaro et al. (2008) encontraram fungos pertencentes aos gêneros *Acremonium* e *Oidiodendron* associados a algas marinhas como a alga marrom *Fucus serratus* na região da Antártica.

Estudos anteriores sobre a diversidade de fungos da península da Antártica reportaram a presença de representantes do gênero *Pseudeurotium* em solo da região da Antártica (ARENZ E BLANCHETTE, 2009). Entretanto, até aonde vai o nosso conhecimento, não há relatos na literatura sobre a presença de representantes do gênero *Cercospora* em ambiente Antártico.

Os membros pertencentes ao gênero *Cercospora* são conhecidos por serem patógenos de plantas, abrangendo ao menos 43 famílias, incluindo as monocotiledônias, dicotiledônea e gimnospermas. Muitas plantas de culturas importantes como, por exemplo, a soja, é atacada por várias espécies de *Cercospora*, como *C. kikuchii* e *C.sojina*. Estes fungos atacam a parte aérea da planta causando manchas necróticas (ROBESON; MAHBUBUL, 1993).

Dentre os fungos identificados no presente trabalho, uma maior quantidade foi proveniente de amostras de ambiente terrestre (n=49), sendo a maioria isolada de madeira, seguida de líquen e osso de baleia. A maior parte dos fungos identificados derivados de ambiente marinho foi isolada a partir de amostras de sedimentos. De acordo com Ruise et al. (2007) a abundância e diversidade de micro-organismos da Antártica diminuem a partir da zona marinha para a zona continental. No presente trabalho foi observada uma diversidade de fungos maior em amostras terrestres do que em marinhas, mesmo partindo de um maior número amostral proveniente de ambiente marinho para o isolamento dos fungos.

7. CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para a triagem de 160 fungos da Antártica resultou na seleção de 29 linhagens, das quais duas (P1 e M7) foram selecionadas e identificadas como *Cadophora luteo-olivaceae* e *Cadophora malorum*, respectivamente.

- As melhores atividades enzimáticas foram obtidas a 15ºC, o que demonstra o potencial biotecnológico para a aplicação em baixas temperaturas.

- O processo de otimização das enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *Cadophora luteo-olivaceae* P1 não foi eficiente para aumentar a produção da enzima lacase.

- Os fungos *Cadophora luteo-olivaceae* P1 e *Cadophora malorum* M7 apresentaram maiores atividades de xilanases (quando cultivados em material lignocelulósico a 15ºC) em relação às enzimas ligninolíticas e celulolíticas.

- Os estudos de diversidade permitiram identificar 11 diferentes gêneros de fungos filamentosos isolados das amostras marinhas e terrestres da Antártica. Alguns deles, representados por fungos cosmopolitas (*Penicillium, Hypocrea/Trichoderma e Cladosporium*), outros predominantes no ambiente Antártico (*Geomyces, Cadophora, Cosmospora* e *Thelebolus*) e um gênero (*Cercospora*) ainda não reportado em ambiente Antártico.

- Dentre os gêneros identificados nas amostras marinhas e terrestres da Antártica, sete foram comuns aos dois ambientes (*Cadophora, Cladosporium, Cosmospora, Geomyces*, *Penicillium, Pseudeurotium* e *Thelebolus*), três foram encontrados apenas em amostras terrestres (*Acremonium*, *Hypocrea/Trichoderma* e *Oidiodendron*) e um apenas em amostra marinha (*Cercospora*).

- O presente trabalho relata pela primeira vez a presença de representante do gênero *Cercospora* na Antártica.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A & FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Quimica Nova**., v. 34, n.10, 1729-1738, 2011.

ARENZ, B.E., HELD, B.H., JURGENS, J.A., FARRELL, R.L., BLANCHETTE, R.A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology e Biochemistry**, v.38, p.3057–3064, 2006.

ARENZ, B.E & BLANCHETTE, R.A. Investigation of fungal diversity in wooden structures in soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. **J. Microbiology**., n.55, p.46-56, 2009.

ARORA, D. S. & GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enz. Microbial Technol**., v.28, p.602–605, 2001a.

ARORA, D. S & SHARMA,R.K. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Appl Biochem Biotechnol**., v 160., p. 1760-1788, 2010.

Baldrian P, Gabriel, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus. FEMS Microbiology Letters* 206: 69-74 (2002)

AWAFO, V.A.; CHAHAL, D.S.; SIMPSON, B.K. Optimization of ethanol production by Saccharomyces cerevisae (ATC 60868) anda Pichia stipits Y-7124: A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of whet straw. Journal of Food Biotechnology, 22, p.49-97, 1998.

BARBIER, B. A. Investigating the Biodiversity of Microbial Communities in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica: An Inter-Valley Comparison Study. Tese (Master of Science in Biological Science - Institution the University of Waikato)., p.92, 2009.

BAUER, J. E. & CAPONE, D. G Degradation and Mineralization of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Anthracene and Naphthalene in Intertidal Marine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.81-90, 1985.

BERLINCK, R.G.S., HAJDU, E., ROCHA, R.M., OLIVEIRA, J.H.H.L., HERNÁNDEZ, I.L.C., SELEGHIM, M.H.R., GRANATO, A.C., ALMEIDA, E.R.V.R., NUÑEZ, C.V., MURICY, G., PEIXINHO, S., PESSOA, C., MORAES, M.O., CAVALCANTE, B.CC, NASCIMENTO, G.G.F., THIEMANN O.M., SILVA M., SOUZA A.O., SILVA C.L., MINARINI P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **J Nat Prod.,** v.67, p.510-522, 2004.

BONONI, V.L. R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. ed. Microbiologia Ambiental, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna. p .243-268, 1997.

BONONI, V. L. R (org.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, p.184, 1999.

BONUGLI-SANTOS, R.C., DURRANT, L.R. e SETTE, L.D. (2010a). Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enz. Microb. Technol**., v.46, p.17-37, 2010a.

BONUGLI-SANTOS, R.C., DURRANT, L.R. e SETTE, L.D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Mycological Research.,** v.114: p.863-872, 2010b.

BRADNER, J. R. Antarctic Microfungi as a Potential Bioresource. Tese (Doctor of Philosophy, Department of Biological Sciences, Macquarie University Sydney and Macquarie University Biotechnology Research Institute Sydney, New South Wales, Australia, p.180, 2003.

BRIDGE, B.D & SPOONER. B.M. Non-lichenized fungi Antarctic Fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? **Fungal Ecology.,** v.5, p. 381-394, 2012.

BUGNI T.S. & IRELAND C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v.21, p.143-163, 2004.

BUSWELL, J. K., CAI, Y. J. & CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by Lentinula (Lentinus) edodes. **FEMS Microbiol**. Lett., v.128, p.81-88, 1995.

CAVICCHIOLI, R.; THOMAS, T. *Encylopedia of Microbiology, 2nd edition -Extremophiles*. Academic Press, San Diego, p. 317-337, 2000.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.324-333, 1997.

CERNIGLIA C. E., SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclyc aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In Britsh Mycological Society Symposium Series, **Fungi in Bioremediation**, ed. Gadd, G.M. Cambridge University Press, p. 136-187, 2001.

CHAGAS, E. P., DURRANT, L. R. (2001) Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosoporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and microbial technology**., v. 29, p.473-477, 2001.

CLARKE, A. Evolution, Adaptation And Diversity: Global Ecology In An Antarctic Context. In: Huiskes, A. H. L.; Gieskes, W. W. C.; Rozema, J.; Schorno, R. M. L.; Van Der Vies, S. M.; Wolff, W. J. (Eds). Antarctic Biology in a Global Context, Backhuys Publishers, Leiden, pp. 3-17, 2003.

CLOETE, T.E., CELLIERS, L. Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus Coriolus vercicolor in the presence of different concentrations of Mn(IV)oxide. **International Biodeterioration & Biodegradation**., v. 44, p. 243-253, 1999.

COUTO, S.R., HERRERA, J.L.T. laccases: A review. Biotechnology Advances, Industrial and biotechnological applications, , v.24, p.500–513 2006.

D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J.; FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **European Molecular Biology Organization**, v.7, p.385-389, 2006.

D'ELIA, T. Isolation of bacteria and fungi from lake vostok accretion ice. Tese (Doctor of Philosophy - Graduate College of Bowling Green State University), p.114, 2008.

D'SOUZA, D.T., TIWARI, R., SAH, A.K., RAGHUKUMAR, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**., v. 38, p.504–511, 2006.

D'SOUZA-TICLO, D., SHARMA, D., & RAGHUKUMAR, C. A. Thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine derived fungus. **Marine Biotechnology**,n.11, v.6, p.725–737, 2009.

DA SILVA, M.C.G. Diversidade de Microrganismos depositados em neve/gelo recente na Ilha Rei George/Península Antártica. Tese (Mestre em Ciências Biológicas – Universidade do Estado do Rio de Janeiro), p.52, 2007.

DA SILVA, M., PASSARINI, M.R.Z., BONUGLI, R.C. e SETTE, L.D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environ. Technol**., v.29**,** p.1331-1339, 2008.

DUARTE, A.W.F. ; DAYO-OWOYEMI, I. ; NOBRE, F. S. ; PAGNOCCA, FC ; CHAUD, L.S.C. ; PESSOA JR, A. ; FELIPE, M. G. A. ; SETTE, L.D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. Extremophiles (Tokyo. Print), p. 1023-1035, 2013.

ELISASHVILI, V & KASHLISHVILI. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes.* **Journal of Biotechnology,** v.144, p.37-42, 2009.

FASANELA, C.C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. Tese (Mestre em Microbiologia Agrícola – Universidade de São Paulo), 2008. FENICAL, W. **Marine Biotechnol**, v.15, p.39-341, 1997.

FENICE, M.; SELBMANN, L.; ZUCCONI , L.; ONOFRI, S. Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. **Polar Bio**l., v.17, p. 275-280, 1997.

GALHAUP, C., GOLLER, S. PETERBAUER, C. K. STRAUSS, J. HALTRICH, D.Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions, **Microbiology**., v.148, p. 2159-2169, 2002a

GEORLETTE, D., BLAISE, V., COLLINS, T, AMICO, S. D., GRATIA, E., HOYOUX, A., MARX, J. C., SONAN, G., FELLER, G., GERDAY, C. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS Microbiology Reviews.**, v.28, p.25–42, 2004.

GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J., CLAVERIE, P., COLLINS, T., D'AMICO, S., DUMONT, J., GARSOUX, G., GEORLETTE, D., HOYOUX, A., LONHIENNE, T., MEUWIS, M., FELLER, G. Cold-adapted Enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Tibtech**., v.18, p.103-107, 2000.

FELLER, G & GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature.,** v.1, p.200-208, 2003.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, California, v. 4, n. 8, p.1358-1363, 2006.

GIARDINA, P., PALMIERI, G., SCALONI, A., FONTANELLA, B., FARACO, V., CENNAMO, G., SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus.* **Biochemical Journal.,** v.341, p.655-663, 1999.

GOMES, J.; STEINER, W. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. **Food Technol. Biotechnol**., v.42, p.223–235, 2004.

HAMMEL, K. E. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. **New J. Chem**. v.20, p. 195-198, 1996.

HARAN, S., SCHICKLER, H., CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology.,** v.142**,** p.2321–2331, 1996.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol. Rev**., v.13, p.125-135, 1994.

HATVANI, N., MECS, I., 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by Lentinus edodes on solid medium. **Enzyme Microb**. Technol. 30, 381–386.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimensiono f biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Reasearch**, v.95, p.641-655, 1991.

HOEGGER, P. J., KILARU, S., JAMES, T.Y., THACKER, J.R., KUES, U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **FEBS Journal** v.273, p.2308–2326, 2006.

HOOG, G.S., GÖTTLICH, E., PLATAS, G.,GENILLOUD, O.,LEOTTA, G., BRUMMELEN, J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus Thelebolus in Antarctica. **Studies in Mycology.,** v.51, p.33-76, 2005.

HOWARD, R.L., ABOTSE, E., JANSEN VAN RENSBURG, E.L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology,** v.2, n.12, p. 602-619, 2003.

JURGENS, J. A**.** Fungal Biodiversity in Extreme Environments and Wood Degradation Potential**.** Tese (Doctor in Biological Sciences - Institution the University of Waikato), p.240, 2010.

KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A.D.; KONIG, G.M. New secondary metabolites from the marine endophytic fungus *Apiospora montagne*. **J of Nat Prod**, v.67, p. 1058-1063, 2004.

KOHLMEYER, J. & KOHLMEYER, E. The Higher Fungi. **Marine Mycology**. Academic Press, New York, 1979.

KÖNIG G.M., KEHRAUS, S., SEIBER, S.F.; ABDEL-LATEFF, A.; MULLER, D. Natural products from marine organism and their associated microbes. Chembiochem 7:229–238, 2006.

KUWAHARA, M., GLENN, J.K. Morgan, M.A., Gold, M.H. Separation and characterization of two extracellular H2O2 dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**., v.169, p.247-250, 1984.

LARS, H., GUNNAR, J., GÖRAN, P. JIEBING, L., PIERRE, L. & GUNNAR, H. Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? FEBS., v. 477, p. 79-83, 2000.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological reviews**, Washington., n.3, v.54, p. 305-315, 1990.

LIRA, S.P., DE VITA, A.M.; SELEGHIMA, M.H.R.; BUGNI, T.S.; LABARBERA, D.V.; SETTE, L.D.; SPONCHIADO, S.R.P.; IRELAND, C.M. and BERLINCK, R.G.S. New destruxins from the Marine-derived fungus *Beauveria felina*. **Journal of Antibiotics** (Tokyo), v.59, p.553-563, 2006.

LOQUE, C.P. Fungos associados à Macroalgas do litoral do Paraná e Península Antártica. Tese (Mestre em Ecologia – Universidade Federal de ouro Preto), p.77, 2009.

LUDLEY, K.E & ROBINSON, C.H. "Decomposer" basidiomycota in Artic and Antarctic ecosystems. **Soil Biol Biochem.,** v.40, p. 11-29, 2008.

MANCERA-LÓPEZ, M.E.; ESPARZA-GARCIA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VAZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**., v.61, p.151–160, 2008.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. **Journal of Biotechnology***,* v. 33, p. 1–14, 1994.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; MARX, J.C.; GERDAY, C. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

MARÍA, P.D.DE., CARBONI-OERLEMANS, C., TUIN, B., BARGEMAN, G., MEER, A., GEMERT, R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 37, 36–46, 2005.

MENEZES CB, BONUGLI-SANTOS RC, MIQUELETTO PB, PASSARINI MRZ, SILVA CHD, JUSTO MR, LEAL RR, FANTINATTI-GARBOGGINI F, OLIVEIRA VM, BERLINCK RGS, SETTE L.D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. Microbiology Research, 165: 466-482, 2010.

MESTER, T. & TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. Int. Biodeterior. Biodegrad, v.46, p. 51–59, 2000.

MINUSSI, R.C., PASTORE, G.M., DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. Trends in Food **Science & Technology**., v.13, p. 205–216, 2002.

MOELLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi. fruit bodies. and infected plant tissues. Nucleic Acids Research, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Applied Microbiology, 18, p. 312-331, 1996.

ONOFRI, S., SELBMANN, L., ZUCCONI, S.P. Antarctic microfungi as models for exobiology. **Planetary and Space Science**., n.52, p. 229-237, 2004.

ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; HOOG, G. S.; GRUBE, M.; BARRECA, D.; RUISI, S.; ZUCCONI, L. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v.40, p.1657–1664, 2007.

OSTERHAGE,C.;KONIG,G.M.;HOLLER, U.; WRIGHT,A.D. Rare sesquiterpenes from the algicoleus fungus *Drechslera dematioidea.* **J Nat Prod**., v.65, p. 306-313, 2002.

PASSARINI, M.R.Z., RODRIGUES, M.V.L., DA SILVA, M. SETTE, L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.364-370, 2011a.

PASSARINI, M.R.Z., SETTE, L.D., RODRIGUES, M.V.L. (2011b). Improved extraction method to evaluate selected PAHs degradation by marine fungi grown in fermentative medium. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso) v.22, p.564-570, 2011b.

PASSARINI, M.R.Z.; SANTOS, C.; LIMA, N.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge Dragmacidon reticulatum. Archives of Microbiology, 195: 99-111, 2013.

PIKUTA, E. V. et al.. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. Critical Reviews in Microbiology, v. 33, p. 183 - 209, 2007.

PEINTNER, U., MOSER, M.M., THOMAS, K.A., MANIMOHAN, P. First records of ectomycorrhizal *Cortinarius* species (*Agaricales*, *Basidiomycetes*) from tropical India and their phylogenetic position based on rDNA ITS sequences. **Mycological research**, Amsterdam, v.107, p.485-494, 2003.

POOLE, N.J & PRICE, P.C. The occurrence of *Chrysosporium pannorum* in soils receiving incremental cellulose. **Soil Biology and Biochemistry.,** v.3, p.161-166, 1971.

RAGHUKUMAR, C., RAGHUKUMAR, S., CHINNARAJ, A., CHANDRAMOHAN, T.M., D'SOUZA AND REDDY, C.A. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. **Botanica Marina.,** v.37, p.515-523, 1994.

RAGHUKUMAR C, D'SOUZA-TICLO D, VERMA AK. Treatment of colored effluents withlignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi. **Crit Rev Microbiol**., v.34, p.189–206, 2008.

RAGUENES, G. *et al*. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. International Journal of Systematic Bacteriology, 47: 989-995, 1997.

RAY, M.K., SHIVAJI, S., SHYAMAIA-RAO, N., BHARGAVA, P.M. Yeast strains from the Schirmacher Oasis Antarctica. Polar Biol, 9, 305-309, 1989.

ROBESON, D.J.; JALAL, M.A.F. A *Cercospora* isolate from soybean roots produces cerbetin B e cercosporin. **Phytochemistry**., v.33, n.6, p. 1546-1548, 1993.

ROCHA, L. C.; FERREIRA, H.V. ; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; BONUGLI-SANTOS, R.C.; PORTO, A.L.M. Bioreduction of alfa-Chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters**., v.31, p.1559-1563, 2009

ROCHA, L.C.; FERREIRA, H.V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R.G.S.; REZENDE, M.O.O.; LANDGRAF, M.D.; SELEGHIM, M.H.R.; SETTE, L.D.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of alfa-Bromoacetophenones by the Marine Fungus *Aspergillus sydowii*. **Marine Biotechnology**., v.12, p.552-557, 2010.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M. JR.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Rev Environ Sci Biotechnol**., v.6, p.127–141, 2007.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**., v.29, p. 185-194, 2009.

SAVITHA, J. et al. Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 564–568, 2007.

SCHABEREITER-GURTNER, C. GUADALUPE, P. WERNER, L. SABINE R. Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel eletrophoresis and phylogenetic 18 rDNA sequence analysis. **Journal of microbiological Methods.,** v.47, p.345–354, 2001.

SETTE, L. D**.** ; BONUGLI-SANTOS, R. C. . Ligninolytic enzymes from marine-derived fungi: production and applications. In: Antonio Trincone. (Org.). Marine enzymes for biocatalysis: Sources, biocatalytic characteristics and bioprocesses of marine enzymes. 1ed.Cambridge: Woodhead Publishing Limited, p. 403-427, 2013.

SHARMA, J.R. Mycological studies at Antarctica. Seventeenth Indian Expedition to Antarctica, Scientific Report 2000. Department of Ocean Development, Technical Publication 15, 165-168, 2000

SHLESER, R. Ethanol production in Hawaii. State of Hawaii. Energy Diviion, Department of Business, Economic Development and Tourism. Honolulu HI USA, 62pp, 1994

SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-Adpated Enzymes. **Annu. Rev. Biochem**., v.75, p.403-433, 2006.

SINCLAIR, W.A & LYON, H. Diseases of Trees and Shrubs, Second Edition,Cornell University Press, Ithaca, 2005.

SINGH, S. M., PUJA, G. BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. Current Science, 90: 1388-1392, 2006

SIVAN, A & CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes from *Trichoderma harzianum.* **J Gen Microbial.,** v.135, p. 675-682, 1989.

TENGERDY, R.P & SZAKACS,P. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal.,** v.13, p.169-179, 2003.

TERRASAN, C.R.F., TEMER, B., SARTO, C., SILVA, F.G., CARMONA, E.C. Xylanase and β-Xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, Physico-chemical Properties, and Application of the Crude Extract to Pulp Biobleaching. **Bioresources**., v.8, n.1, p.1292-1305, 2013.

TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: Purification, characterization and catalytic properties of unique H2O2 requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Science USA., v.81, p.2280-2284, 1994.

TINDALL, B. J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 271-283, 2004.

TURKIEWICZ, M., PAZGIER, M., DONACHIE, S.P., KALINOWSKA, H. Invertase and glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. Pol. Polar Res. 26, 125-136, 2006

VERMA, A. K., RAGHHUKKUMAR, C., VERMA, P., SHOUCHE, Y. S., NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**., v.21, p.217-233, 2010.

VINCENT, W.F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antartic Science**, v.12, p.374–385, 2000.

VITA-MARQUES, A.; SELEGHIMA, M.H.R. ; LIRA, S.P., SPONCHIADO, S.R.P.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O; COELHO, B.; NASCIMENTO, G.G.F; DE SOUZA, A.O.; MINARINI, P.R.R.; SILVA, C.L.; SILVA, M; THIEMANN, O; PASSARINI, M.R.Z.; SETTE, L.D.; BERLINCK, R.G.S. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of destruxin derivatives from a *Beauveria felina*. **Química Nova.**, v.31, p.1099-1103, 2008.

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

ZLATANOV, M., PAVLOVA, K., GRIGOROVA, D. Lipid Composition of Some Yeast Strains from Livingston Island, Antarctica. Eoha Microblol, 46, 402 406, 2001.

ZUCCARO, A & MITCHELL, J.I. Fungal communities of seaweeds. In: Dighton J, White JF, Oudemans P (eds) The fungal community, 3rd edn. CRC Press, New York, p.533–579, 2005

WHITE, T. J. et al. PCR Protocols: a guide to method and applications In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rRNA genes for phylogenetics. San Diego: Academic Press, p. 315-352, 1990.

WYNN-WILLIAMS, D.D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. **Biodiversity and Conservation**., v.5 , p.1271-1293, 1996

YERGEAU, E..; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. **Environmental Microbiology**, v.10, p.2223–2235, 2008.

APÊNDICE

Apêndice A. Identificação molecular dos fungos filamentosos de amostras marinhas e terrestres da Antártica.

Código	Amostra de Origem	Identificação	Sequenciamento ITS – Resultado das sequências mais relacionadas		
			NCBI-GenBank	Id (%)	Nº acesso
L1-6	Líquen	*Acremonium* sp.	*Acremonium alternatum* CBS 233.70 *Acremonium egyptiacum* UFMGCB 6056	100 100	AY566992 KC485438
L1-4B	Líquen	*Acremonium* sp.	*Acremonium egyptiacum* CBS 114785 *Acremonium sclerotigenum* CBS 281.80	100 99	FN706550 FN706549
L1-9	Líquen	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
L2-3B	Líquen	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
P1	Sedimento	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
PL-1F	Sedimento	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
PL3B	Sedimento	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
P1A	Sedimento	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
M1B	Madeira	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
P2	Sedimento	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51 *Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100 100	GU128589 GU128589
L2-3E	Líquen	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
M24	Madeira	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
L2-3D	Líquen	*Cadophora luteo-olivacea*	*Cadophora luteo-olivacea* CBS 357.51	100	GU128589
AS1	Ascídia	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	100	GU128592
M1	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
M1A	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
M1D	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
M4D	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
M8	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
OU1	Ouriço do mar	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
E4	Estrela do mar	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
M6A	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
M13	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
S1	*Salpa* sp.	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592

M3	Madeira	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* ATCC 36274	99	GU128590
AS1	Ascídia	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
AS-2A	Ascídia	*Cadophora malorum*	*Cadophora malorum* CBS 687.96	99	GU128592
OB1	Osso de baleia	*Cadophora* sp.	*Cadophora melinii* CBS 268.33	100	NR111150
OU2	Ouriço do mar	*Cercospora* sp.	*Cercospora ariminensis* CBS 137.56 *Cercospora apii* CBS 118712	100 100	KF251297 KF251296
MB9	Madeira	*Cladosporium cladosporioides*	*Cladosporium cladosporioides* ATCC 11275	100	KC585406
A2-1	Anfípode	*Cladosporium cladosporioides*	*Cladosporium cladosporioides* CBS 674.82	100	HM148014
AI2-2		*Cladosporium cladosporioides*	*Cladosporium cladosporioides* CBS 132.29	100	HM148010
IS4	Isópode	*Cladosporium* sp.	*Cladosporium sphaerospermum* ATCC MYA-4645 *Cladosporium* sp. CBS 280.49	100 100	HQ263345 EU167574
ITAE4	Solo de pinguineira	*Cladosporium* sp.	*Cladosporium cladosporioides* CBS 674.82 *Cladosporium coralloides ATCC 16160*	100 100	HM148014 AF393695
S3	*Salpa* sp.	*Cladosporium* sp.	*Cladosporium globisporum* CBS 812.96 *Cladosporium exile* CBS 125987	100 100	HM148096 M148091
ITAE3	Solo de pinguineira	*Cladosporium* sp.	*Cladosporium cladosporioides* CBS 132.29 *Cladosporium gossypiicola* ATCC 38026	100 100	HM148010 AF393702
ITA-2D	Solo de pinguineira	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 99	KC291731 JQ070093
OB2	Osso de baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 99	KC291731 JQ070093
OB3	Osso de baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 98	KC291731 JQ070093
OB4B	Osso de baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 98	KC291731 JQ070093
OB5A	Osso de baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 99	KC291731 JQ070093
OB6D	Osso de baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 99	KC291731 JQ070093
OB1B	Osso de baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 99	KC291731 JQ070093

OB1C	Osso de Baleia	*Cosmospora* sp.	*Cosmospora viridescens* CBS 102433 *Cosmospora butyri* ATCC 52620	99 99	KC291731 JQ070093
N2A	*Nacella* sp.	*Geomyces* sp.	*Geomyces destructans* ATCC MYA-4855 *Geomyces pannorum* UFMGCB 6058	99 99	KC171349 KC333881
AMF1	Anfípode	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
E1	Estrela do mar	*Geomyces* sp.	*Geomyces sp.* *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
E4A	Estrela do mar	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	99 99	KC811057 HQ703417
IS2	Isópode	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
L1-1	Líquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
L1-2	Líquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
L1-2A	Líquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
L1-3	Líquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
M22	Madeira	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
S2	*Salpa* sp.	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	99 99	KC811057 HQ703417
S4	*Salpa* sp.	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	99 100	KC811057 DQ189227
A11	Anfípode	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	99 100	KC811057 HQ703415
L1-12A	Liquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces sp.* UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	99 100	KC811057 HQ703415
L2-14D	Liquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995	99	KC811057

			Geomyces pannorum	100	HQ703415
S2B	*Salpa* sp.	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	99 100	KC811057 DQ189227
SDB1	*Salpa* sp.	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 100	KC811057 HQ703415
L2-3A	Líquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum* UFMGCB 6049	100 100	KC811057 KC485437
L2-13	Líquen	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703417
PUI	Sedimento	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum*	100 99	KC811057 HQ703416
S1B	*Salpa* sp.	*Geomyces* sp.	*Geomyces* sp. UFMGCB 5995 *Geomyces pannorum* UFMGCB 6110	100 100	KC811057 KC485453
L2-2	Líquen	*Hypocrea* sp.	*Hypocrea pilulifera* CBS 120927 *Hypocrea parapilulifera* CBS 120921	99 99	FJ860810 FJ860799
Al1-M1	Alga	*Oidiodendron* sp.	*Oidiodendron* sp.	97	JX270506
L1-5	Líquen	*Oidiodendron* sp.	*Oidiodendron* sp.	100	JX270395
E2A	Estrela do mar	*Penicillium* sp.	*Penicillium commune* CBS 311.48 *Penicillium solitum* CBS 14786	100	AY213672 HQ225713
E2B	Estrela do mar	*Penicillium* sp.	*Penicillium solitum* CBS 14786 *Penicillium echinulatum* NRRL 1151	100 100	HQ225713 AF033473
L1-2B	Líquen	*Penicillium* sp.	*Penicillium commune* CBS 311.48 *Penicillium solitum* CBS 14786	100 99	AY213672 HQ225713
L2-3C	Líquen	*Penicillium* sp.	*Penicillium glabrum* CBS 125543 *Penicillium spinulosum*	100 100	GU981567 KC167852
M5	Madeira	*Penicillium* sp.	*Penicillium solitum* CBS 14786 *Penicillium echinulatum* NRRL 1151	100 100	HQ225713 AF033473
M16	Madeira	*Penicillium* sp.	*Penicillium solitum* CBS 14786 *Penicillium echinulatum* NRRL 1151	100 100	HQ225713 AF033473
N2	*Nacella* sp.	*Penicillium* sp.	*Penicillium commune* CBS 311.48 *Penicillium camemberti* ATCC 10387	99 99	AY213672 GQ458039

N5	*Nacella* sp.	*Penicillium* sp.	*Penicillium commune* CBS 311.48 *Penicillium solitum* CBS 14786	100 99	AY213672 HQ225713
OB7C	Osso de baleia	*Penicillium* sp.	*Penicillium solitum* CBS 14786 *Penicillium echinulatum* NRRL 1151	100 100	HQ225713 AF033473
S4 A	*Salpa* sp.	*Penicillium* sp.	*Penicillium solitum* CBS 14786 *Penicillium echinulatum* NRRL 1151	100 100	HQ225713 AF033473
E2-1	Estrela do mar	*Penicillium* sp.	*Penicillium commune* NRRL 35686	100	EF200099
IS4A	Isópode	*Penicillium* sp.	*Penicillium echinulatum* NRRL 1151 *Penicillium solitum* CBS 14786	100 100	AF033473 HQ225713
M14	Madeira	*Pseudeurotium* sp.	*Pseudeurotium desertorum* CBS 986.72	97	AY129288
EACF3	Sedimento	*Pseudeurotium* sp.	*Pseudeurotium hygrophillum* CBS 102670	100	NR111128
EACF4	Sedimento	*Pseudeurotium* sp.	*Pseudeurotium hygrophillum* CBS 102670	100	NR111128
EACF2	Sedimento	*Pseudeurotium* sp.	*Pseudeurotium hygrophillum* CBS 102670	100	NR111128
E2	Estrela do mar	*Thelebolus globosus*	*Thelebolus globosus* CBS 113940	99	DQ028268
ITAEF	Solo de pinguineira	*Thelebolus* sp.	*Thelebolus globosus* UFMGCB *Thelebolus* sp. UFMGCB 3745	100 100	KC485430 HQ533859