

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Dissertação de Mestrado

Diversidade de fungos decompositores de madeira presentes em ecossistemas brasileiros: bioprospecção de espécies úteis em processo de biodegradação de poluentes aromáticos

Barbara Muniz Soares

Belo Horizonte
2013

Barbara Muniz Soares

Diversidade de fungos decompositores de madeira presentes em ecossistemas brasileiros: bioprospecção de espécies úteis em processo de biodegradação de poluentes aromáticos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Luiz Henrique Rosa

Coorientador: Carlos Augusto Rosa

2013
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Agradecimentos

À Deus pela oportunidade de uma vida repleta de possibilidades e de aprendizado;

Ao Prof. Carlos A. Rosa pela acolhida e ensinamentos. Agradeço as oportunidades que me foram concedidas, toda orientação profissional e cuidado dispensados a mim durante todos esses anos. É um grande privilégio fazer parte desta equipe de trabalho que tanto admiro;

Ao Prof. Luiz H. Rosa pela orientação e confiança. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com projetos extraordinários, pela paciência de ensinar e pelo apoio constante. Sua ajuda e solidez foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Dra. Viviane Alves Gouveia e Dra. Patrícia Faleiro Pimentel, a ao membro suplente Dra. Valéria Godinho por terem aceitado o convite e pelas contribuições, essenciais para a melhoria deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia pela oportunidade; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à Fatinha;

À Doutora Sônia Cláudia Queiroz pela colaboração e permissão para utilizar a infraestrutura do Laboratório de Resíduos e Contaminantes (LRC) da Embrapa Meio Ambiente ;

Aos amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de fungos e Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de fungos pelos bons momentos que compartilhamos e pelo apoio que me deram: Alice, Adriana Lessa, Alexandre, Ana Raquel, Arthur, Camila Gontijo, Camila Rodrigues, Camila Silva, Carla Pataro, César Faria, Cristiane Bigatti, Débora Gonçalves, Denise Scoaris, Fran Pinheiro, Fernanda Piló, Gabriella Breder, Gabriella Montadon, Grazielle Mendes, Hebert, Iara Santiago, Isis, Inayara, Jordana, Larissa (Té), Laura Esteves, Lília, Luciana Brandão, Mariana Costa (Zé), Mariana Rocha, Mariana Vieira, Mirna, Michelle, Monaliza, Natália Pereira, Priscila, Raquel Cadete, Renata Santos, Silvana Safar (Salim), Susana Johann, Vívian e Valéria Godinho. Agradeço a todos pela

prontidão em ajudar e tirar dúvidas e pela força que sempre me deram. Agradeço em especial pelas agradáveis horas de almoço, pelos dias das meninas, pela melhor equipe de limpeza do universo e, com certeza, pelos melhores e mais divertidos anos de trabalho que já tive.

Em especial, à minha dupla de trabalho Mariana Costa por toda ajuda, companheirismo e amizade. Sou grata pelo ter te conhecido, com você pude aprender o real significado de força e superação. Desejo a você muitas vitórias!

As Batutas (Zé, Camila e Té) pelos conselhos preciosos e por me proporcionar as experiências de vida mais absurdas. É bom saber que eu tenho companheiras.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-graduação em Microbiologia pelos ensinamentos, incentivo e convivência agradável.

A minha família querida, agradeço aos meus pais (Wagner e Luiza) por toda fé, dedicação, apoio e amor. Como em tudo que faço vocês são meus exemplos de vida e fazem parte desse projeto. Aos meus irmãos, Thiago e Juninho, por todos os momentos que passamos juntos e que me ajudaram a crescer. Ao Thiago pelo amor, companheirismo e paciência. A todos os familiares pela torcida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	Erro! Indicador não definido.
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	4
RESUMO	VIII
SUMMARY	X
1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1. Xenobióticos.....	12
1.2. Corantes industriais.....	13
1.3. Hidrocarbonetos derivados de petróleo	17
1.4. Fungos ligninolíticos	19
1.5. Fungos degradadores de corantes e hidrocarbonetos	24
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Áreas de coleta.....	32
4.2. Coleta e processamento das amostras	33
4.3. Isolamento e preservação dos fungos	34
4.4. Extração do DNA Total	34
4.5. Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	35
4.6. Amplificação da região ITS	36
4.7. Amplificação de fragmento do gene do Fator de Alongamento – 1 alpha	36
4.8. Purificação dos amplicons.....	37
4.9. Reações de sequenciamento.....	37
4.10. Análise computacional das sequências.....	38
4.11. Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância.....	39
4.12. Triagem dos Corantes.....	40
4.13. Análise da degradação de corantes por dosagem de carbono orgânico total (COT)....	41
4.14. Triagem do Petróleo.....	41

4.15.	Análise da degradação de antraceno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1.	Distribuição das espécies	44
5.2.	Diversidade de fungos potenciais degradadores	54
5.3.	Ensaio de degradação	59
5.2.	Avaliação da biodegradação	87
6.	CONCLUSÕES	91
7.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	92
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9.	ANEXOS	102
	ANEXA A – Quadro contendo a formulação dos meios de cultura utilizados	102
	ANEXO B - Quadro contendo a formulação das soluções utilizadas para a identificação molecular.	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) molécula de Remazol Brilhante Azul R e (B) molécula de Astrazon Golden Yellow GL.

Figura 2. Estrutura química dos precursores alcoólicos da lignina: álcool *p*-comumaril, álcool coniferil e álcool sinapil.

Figura 3. Representação do polímero de lignina, como predito por análise da lignina em Ressonância Magnética Nuclear (NMR).

Figura 4. Exemplo de vias de biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) por fungos .

Figura 5. Principais métodos utilizados por fungo para degradar químicos orgânicos.

Figura 6. Árvores filogenéticas ilustrando a relação entre os isolados de fungos obtidos de madeira coletadas em diferentes biomas brasileiros e sequências de espécies tipo ou de coleções de referência obtidas do GenBank.

Figura 7. Gráficos de crescimento e degradação dos fungos filamentosos em meio contendo o corante azólico Astrazon como única fonte de carbono.

Figura 8. Gráficos de crescimento e degradação dos fungos filamentosos em meio contendo o corante antraquinônico RBBR como única fonte de carbono.

Figura 9. Gráficos de crescimento e degradação das leveduras em meio contendo o corante antraquinônico RBBR.

Figura 10. Gráficos de crescimento e degradação das leveduras em meio contendo petróleo como única fonte de carbono acrescido do indicador DCPIP.

Figura 11. Gráficos de crescimento e degradação das leveduras em meio contendo petróleo como fonte de carbono acrescido do indicador DCPIP.

Figura 12. Curva de Carbono Orgânico Total presente em meio contendo Astrazon como única fonte de carbono, na presença de *Fusarium oxysporum* UFMGCB 6451.

Figura 13. Curva de Carbono Orgânico Total presente em meio contendo Remazol Brilhante Azul R como única fonte de carbono, na presença de *Fusarium cf. solani* UFMGCB 6451.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados poluentes de prioridade ambiental pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) norte americana.

Quadro 2. Substratos das enzimas ligninolíticas purificadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Total de isolados fúngicos obtidos de amostras de madeira em decomposição dos biomas selecionados de acordo com os substratos utilizados como fonte única fonte de carbono.

Tabela 2. Total de isolados fúngicos ativos obtidos de amostras de madeira em decomposição dos biomas selecionados de acordo com os substratos utilizados como fonte única fonte de carbono.

Tabela 3. Identificação molecular dos fungos degradadores obtidos de biomas brasileiros.

Tabela 4. Frequências das espécies isoladas nos diferentes biomas a partir de meio contendo Astrazon, Remazol Brilhante azul R e Petróleo como única fonte de carbono.

Tabela 5. Índices de diversidade das comunidades de fungos degradadores presentes nos biomas amostrados.

Tabela 6. Resultado da triagem feita para os todos os fungos obtidos, mostrando a relação entre número de isolados, a velocidade média de descoloração nos meios testados e a capacidade de crescimento dos fungos.

Tabela 7. Valores de biomassa seca e concentração de corante descolorida pelos fungos isolados do meio com Astrazon considerados como potenciais degradadores.

Tabela 8. Valores de biomassa seca e da concentração de corante descolorida pelos fungos isolados em Remazol Brilhante Azul R que foram considerados como potenciais degradadores.

Tabela 9. Valores de biomassa seca (mg) e da porcentagem (%) do indicador DCPIP metabolizado pelos fungos isolados em Petróleo, que foram considerados como potenciais degradadores desse composto na triagem.

Tabela 10. Porcentagem da redução de cor dosada em espectrofotômetro e porcentagem da redução de carbono total presente em amostra contendo o corante *azo* Astrazon como única fonte de carbono e o fungo *Fusarium oxysporum* UFMGCB 6451 em fase de crescimento.

Tabela 11. Porcentagem da redução de cor dosada em espectrofotômetro e porcentagem da redução de carbono orgânico total presente em amostra contendo o corante antraquinônico RBBR como única fonte de carbono e o fungo *Fusarium cf. solani* UFMGCB 6882 em fase de crescimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BTEX: benzene, toluene, etilbenzeno e xileno
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
cm: centímetro
CTAB: Brometo de cetil trimetilamônio
CO₂: dióxido de carbônico
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCPIP: 2,6- Dichlorofenolindofenol
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA: Agência de Proteção Ambiental
g: grama
g/L: grama por litro
GYMP: glicose, extrato de levedura, extrato de malte, Na₂PO₄
H₂O: água
HAF: *Hydrocarbon Adapted Fungi*
HCl: Ácido clorídrico
HMA: Hidrocarbonetos Monocíclicos Aromáticos
HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
ITS: Região espaçadora transcrita interna
Kg: quilogramas
L: litro
Lac: lacase
LiP: lignin peroxidase
MEA: Ágar extrato de malte
mg: miligramas
mg/L: miligramas por litro
min.: minutos
mL: mililitros
mm: milímetros
MMM: Meio Mínimo Mineral
Mn: Manganês

MnP: Manganês peroxidase
MSP - PCR: Reação em Cadeia da Polimerase por especificidade de metilação
NaCl: Cloreto de sódio
Na₂HPO₄: dihidrogenofosfato de sódio
NCBI: National Center for Biotechnology Information
PAST: Palaeontological Statistics
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
RBBR: Remazol Azul Brilhante R
r.p.m.: Rotações por minuto
rDNA: ácido desoxirribonucléico ribossomal
rpm: rotações por minuto
SDS: Sódio dodecil sulfato
COT: Carbono orgânico total
TBE: Tris borato
Tris-HCL: trishidroximetilaminometano
Tyr: tirosinase
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UFMGCB : Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais
YM: Ágar extrato de malte-extrato de levedura
µl: microlitros
µmol: micromolar
%: por cento
°C: graus Celsius

RESUMO

Fungos decompositores de madeira são considerados organismos chave para processos de ciclagem de carbono no meio ambiente devido a sua capacidade, principalmente, de degradar lignina. O processo de degradação de substratos lignocelulósicos é possível graças a um sistema de enzimas inespecíficas produzidas por algumas espécies de fungos e que podem ser utilizadas para a degradação de outras moléculas aromáticas naturais e sintéticas similares à lignina. Atualmente, os poluentes de maior consumo pelo homem são os corantes têxteis e derivados do petróleo, os quais são recalcitrantes nocivos ao meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a composição e diversidade de fungos presentes em madeira em decomposição de ecossistemas brasileiros e avalia-la quanto à capacidade de crescerem utilizando poluentes aromáticos como única fonte de carbono. Diferentes amostras de madeira em decomposição foram obtidas nos biomas Caatinga e nos ecótonos entre Mata Atlântica/Cerrado e Mata Amazônica/Cerrado. Noventa fragmentos de madeira em decomposição foram inoculadas em 3 meios de culturas distintos contendo corante do tipo *azo* Astrazon ou corante antraquinônico RBBR ou petróleo bruto como única fonte de carbono. Após 7-15 dias, 98 isolados fúngicos foram obtidos e agrupados em 85 morfotipos distintos de acordo com suas características macromorfológicas e por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo (GTG)₅. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo e, um representante de cada grupo foi selecionado para identificação molecular por meio de sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do RNA ribossomal. Os fungos degradadores foram identificados como pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Cosmospora*, *Purpureocillium*, *Acremonium*, *Pleurostoma*, *Aspergillus*, *Exophiala*, *Lodderomyces*, *Meyerozyma*, *Pseudozyma* e *Sporisorium*. As espécies mais frequentes foram *Hypocrea lixii*, *Fusarium* sp., *Meyerozyma carpophila* e *Pleurostoma ootheca*. A Caatinga foi o bioma que apresentou a maior diversidade de acordo com o índice de Fisher- α . Para avaliar a capacidade de utilizar os compostos estudados, dosamos o crescimento dos fungos obtidos por biomassa seca nos meios contendo Astrazon, RBBR e petróleo como única fonte de carbono, além da redução da cor desses meios por espectrofotometria. Cinquenta e cinco isolados foram considerados bons degradadores dos poluentes aromáticos, dos quais as espécies *Fusarium oxysporum*, *F.*

cf. solani, Purpureocillium lilacinum, Trichoderma sp., Hypocrea lixii, Exophiala cf. oligosperma, Penicillium simplicissimum, Meyerozyma carpophila, M. guilliermondii, Sporisorium sp., Pseudozyma sp., e P. hubeiensis apresentaram os melhores perfis de degradação. A mineralização dos corantes Astrazon e RBBR foi determinada pela quantificação do carbono orgânico total tendo mostrado que, para as espécies selecionadas, a redução de cor não estava ligada a quebra da cadeia carbônica. A degradação do petróleo foi determinada utilizando técnicas de Cromatografia líquida de alta eficiência utilizando antraceno como fonte de carbono. Os resultados desse experimento foram inconclusivos e deverão ser repetidos.

Palavras-chave: Fungos decompositores, madeira, poluentes aromáticos, diversidade.

SUMMARY

Woody decay fungi are considered key organisms in the carbon cycling process on the environment due, mainly, to their capacity of degrade lignin. The process of decompose lignocellulosics substrate is possible due to a system of unspecific enzymes produced by some fungi species and that can be utilized for the degradation of other aromatic molecules, natural or synthetic, similar to lignin. Nowadays, the pollutants of major consumption are dyes form textile industry and petroleum and its derivate, which are hazardous recalcitrant to the environmental. This work had the objective to characterize the composition and diversity of fungi present on decaying wood of Brazilian ecosystems and assess it for the capacity of growing using aromatic pollutants as their only source of carbon. Different samples of decaying wood were collected on Caatinga ecosystem and the ecotone between Mata Atlântica/Cerrado and Mata Amazônica/Cerrado. Ninety decay wood fragments were inoculates on 3 different medium containing the *azo* dye Astrazon or the anthraquinone dye Remazol Brilliant Blue R or crude oil as the unique source of carbon. After 7-15 days, 98 fungal isolates were obtain and grouped in 85 morphotypes according with their distinct characteristics macromorphological and by the PCR microsatellite technique (MSP-PCR), using the oligonucleotide (GTG)₅. The isolates with identical banding patterns were confirmed as belonging to the same group and a representant of each group were selected for molecular identification through the sequencing of the internal transcribes spacer region (ITS) of RNA ribosomal gene. The degraders fungi were identify as belonging to the genres *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Cosmospora*, *Purpureocillium*, *Acremonium*, *Pleurostoma*, *Aspergillus*, *Exophiala*, *Lodderomyces*, *Meyerozyma*, *Pseudozyma* e *Sporisorium*. The more frequently species were *Hypocrea lixii*, *Fusarium* sp., *Meyerozyma carpophila* e *Pleurostoma ootheca*. Caatinga were the biome that presented the most diverse group of species according with Fisher- α index.

To assess the capacity of this funig to degrade the pollutants tested, the dry biomass growth on the medium with Astrazon, RBBR and petroleum as the only source of carbon were measured together with the measurement of the fade color by spectofotometria. Fifty five fungi were considered good degraders of this aromatic pollutants, highlighting the species *Fusarium oxysporum*, *F. cf. solani*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma* sp., *Hypocrea lixii*, *Exophiala cf. oligosperma*, *Penicillium simplicissimum*, *Meyerozyma carpophila*, *M. guilliermondii*, *Sporisorium* sp.,

Pseudozyma sp., e *P. hubeiensis* which presents the best degradation profiles. The Astrazon and RBBR mineralization were determined by quantifying of total organic carbon, which showed, for the selected species, that the reduction of color was not linked to the breaking of the carbon chain. The crude oil degradation was determined using high performance liquid chromatography using anthracene as the unique source of carbon. These experiment results were inconclusive and should be repeated.

Keywords: Decaying fungi, wood, aromatic pollutants, diversity

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Xenobióticos

Qualquer substância indesejada introduzida no meio ambiente é considerada um contaminante e seus efeitos deletérios ou danos levam à poluição (Megharaj ET AL., 2011). Com o desenvolvimento industrial ocorreu um uso intensificado de compostos químicos sintéticos, produzidos em larga escala, que causam preocupação devido a sua presença contínua nos ambientes, causada por sua natureza móvel e recalcitrante que leva ao acúmulo dessas substâncias no ambiente (Saratale ET AL., 2009).

Compostos químicos sintéticos, exógenos aos sistemas biológicos, que apresentam atividade biológica e têm potencial para gerar danos aos organismos são chamados xenobióticos. Por definição, xenobióticos são substâncias que, apesar de serem eventualmente encontradas em um organismo, raramente são produzidas por ele e sua presença tem efeito tóxico (Fatta-kassinou ET AL., 2010). Estes compostos podem ser resultantes de processos industriais, práticas agrícolas ou mesmo do uso cotidiano de compostos químicos artificiais que, no ambiente, proporcionam a liberação de moléculas consideradas tóxicas (Fatta-kassinou ET AL., 2010; Harms ET AL., 2011). Os poluentes são, normalmente, transportados através da atmosfera e da água, podendo se armazenar em sedimentos e solos e, quando combinados com compostos orgânicos, podem causar uma contaminação prolongada do ambiente (Harms ET AL., 2011).

Nas últimas décadas, diferentes estudos têm relatado o efeito imunotóxico de alguns xenobióticos, além de sua associação com alterações hormonais em humanos e outros organismos. Hidrocarbonetos derivados do petróleo, solventes halogenados de fontes industriais, agentes disruptivos endócrinos (como por exemplo, o Bisfenol-A), medicamentos, explosivos, produtos químicos usados na agricultura, metais pesados, metalóides e alguns radionuclídeos são exemplos de xenobióticos que geram grande preocupação, em razão de seu potencial poluidor e da falta de informação sobre seus efeitos nos organismos vivos (Harms ET AL., 2011; Megharaj ET AL., 2011).

1.2. Bioremediação

A bioremediação microbiana é a alternativa limpa e menos onerosa para o tratamento de poluentes recalcitrante, isso porque quando comparada com processos convencionais de

tratamento apresenta uma eficiência maior de redução da concentração desses compostos nos efluentes (Megharaj ET AL., 2011).

A bioremediação é o processo definido como a utilização de sistemas biológicos para a diminuição ou eliminação dos efeitos nocivos causados por poluentes em locais específicos (De Lorenzo, 2008). Por ser um processo baseado em intervenção ambiental, é necessário um entendimento completo do sistema biológico selecionado para degradação, especialmente no que diz respeito às suas consequências ambientais (De Lorenzo, 2008). Dependendo no grau que a interferência ocorre, a bioremediação pode ser considerada uma atenuação natural (pouco ou nenhuma ação humana), como a bioestimulação (adição de nutrientes e/ou doadores de elétrons que promovam o crescimento e metabolismo de certos micro-organismos) ou como uma bioaugmentação, onde há adição proposital de um micro-organismo natural ou modificado geneticamente com as características catabólicas desejadas (De Lorenzo, 2008).

Apesar da maior parte dos estudos de bioremediação ter como foco o uso de bactérias como agentes ativos de detoxificação, os fungos, especialmente pela ação de suas enzimas oxidativas, representam uma parcela importante, e ainda pouco explorada, da comunidade microbiana quanto à ciclagem de polímeros recalcitrantes e de compostos xenobióticos. Assim, a descoberta de espécies envolvidas nesses processos e das vias catabólicas utilizadas podem ajudar a enriquecer e aprimorar os processos de retirada de poluentes do ambiente (Harms ET AL., 2011).

1.3. Corantes industriais

O mercado de corantes sintéticos produz anualmente 600-700 mil toneladas de corantes têxteis por ano e é responsável por gerar cerca de 6,6 bilhões de dólares em vendas no mundo (Fourcade ET AL., 2013 e Wesenberg, 2003). Os corantes atualmente usados na indústria têxtil são desenvolvidos para resistir à descoloração por exposição à umidade, luz, água, diferentes compostos químicos (incluindo agentes oxidantes) e ao ataque microbiano (Rodríguez ET AL., 1999). Para imprimir cor ao tecido, o corante torna-se parte dele e por isso, sua construção é planejada de forma a acoplar estruturas de anéis aromáticos a uma cadeia lateral, usualmente requerida por gerar ressonância na molécula e, dessa forma, transferir a cor ao material (Wesenberg ET AL., 2003). A correlação entre a estrutura química e cor reside na estrutura cromógeno-cromóforo adicionado a um auxocromo. O cromógeno é

uma estrutura aromática contendo anéis benzeno, naftaleno ou antraceno (www.miga.org/documents/Textiles.pdf). O grupo cromóforo é o responsável pela cor e os radicais que o compõem formam a base da classificação química dos corantes, gerando os tipos: azo (-N=N-), carbonil (=C=O), carbônico (=C=C=), carbono-nitrogênio (>C=NH ou -CH=N-), nitroso (-NO ou N-OH), nitro (-NO₂ ou =NO-OH), e sulfúrico (>C=S) (www.miga.org/documents/Textiles.pdf). Porém, a estrutura cromógeno-cromóforo nem sempre é suficiente para gerar solubilidade e levar à aderência do corante à fibra. Assim, grupos de radicais tais como aminas, hidroxil, carboxil e sulfônico, ou seus derivados, são usados como auxocromos ou grupos de ligação por afinidade (www.miga.org/documents/Textiles.pdf).

Os corantes do tipo *azo* são produtos sintéticos caracterizados pela presença dos anéis aromáticos acrescidos de soda cáustica, ácido fórmico, compostos metálicos e nitrato de sódio; sua composição confere uma afinidade maior a fibras celulósicas, como o algodão (Stolz, 2001). Correspondendo a 50-60% da produção mundial e com cerca de dois mil tipos diferentes, os corantes tipo *azo* são utilizados por um grande número de indústrias, tais como a têxtil, impressão de papel, alimentícia, couro, farmacêutica e cosmética (Saratale ET AL., 2009). Seu uso nessas indústrias advém da facilidade de síntese, aliada ao alto grau de solubilidade em água, estabilidade química e fotólica, bem como por sua baixa degradabilidade, o que torna duradoura a coloração por eles impressa, mas problemática sua remoção (Stolz, 2001). Já foi estimado que 20% do total de corantes usados são perdidos durante o processo de tingimento, dependendo do tipo da aplicação utilizado para cada classe de corante (Moreira ET AL., 2011). Na indústria têxtil essa perda é de 10 a 30%, o que corresponde a 280 mil toneladas de corantes descartados em efluentes anualmente no mundo (Solís ET AL., 2012). Por ser solúvel em água, corantes do tipo *azo* geralmente entra no ambiente via descarga de esgoto. Os efeitos adversos provocados por esse corante no ambiente incluem efeito inibitório na fotossíntese aquática, redução da quantidade de oxigênio dissolvido além do efeito tóxico sobre os organismos (Saratale ET AL., 2009).

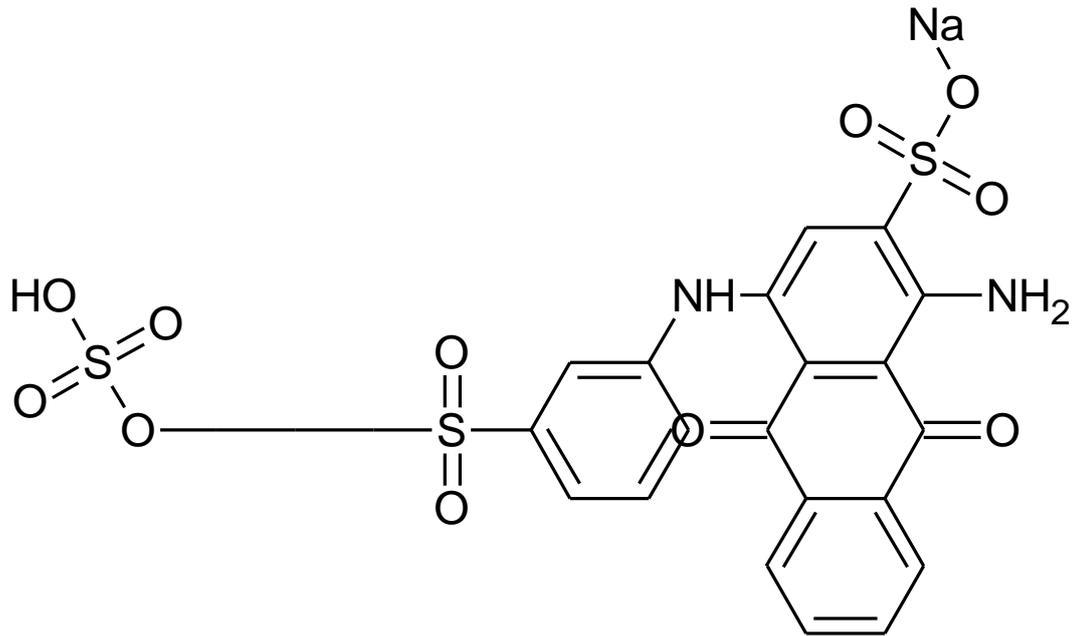
Quando esses corantes são quebrados em anaerobiose ocorre à produção de aminas aromáticas, compostos altamente tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (Solís ET AL., 2012). Atualmente, a opção de escolha para o tratamento dos resíduos industriais contendo corantes são as técnicas físico-químicas, tais como a adsorção, precipitação, oxidação química, fotodegradação ou filtração por membrana (Levin ET AL., 2011). Contudo, todas essas técnicas apresentam restrição por seu alto custo, formação de produtos secundários

perigosos ou alto requerimento energético, o que tem despertado considerável interesse nas indústrias têxteis para o uso de sistemas biológicos no tratamento desses resíduos (STOLZ, 2001).

A degradação oxidativa dos corantes azólicos é realizada, principalmente, por fungos, sendo catalisada por peroxidases e fenol-oxidases, como a manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) , lacase (Lac), tirosinase (Tyr), N-demetilase e celobiose dehidrogenase (SOLÍS et al. 2012). Entre as enzimas produzidas por fungos, as Lac representam a principal escolha para processos de bioremediação devido a sua inespecificidade oxidativa, não requerimento de cofatores e capacidade de utilizar oxigênio disponível como aceptor de elétrons (KALYANI ET AL., 2012). Além das Lac, a MnP também são enzimas importantes no processo de degradação de corantes *azo*, pois são capazes de gerar um complexo de ácido orgânico e Mn^{3+} a partir de sua oxidação inicial por H_2O_2 , transformando-a em um ativo oxidante (SOLÍS et al. 2012). Este potencial enzimático torna os fungos ligninolíticos bons candidatos para uso em processos de bioremediação de resíduos têxteis.

Neste trabalho, os corantes Remazol Azul Brillhante R (RBBR) e Astrazon foram escolhidos como modelo para o isolamento de fungos degradadores de corantes do tipo *azo* (Figura 1 a e b). O RBBR é um derivado de corantes antracênicos, que representa uma classe importante de organopoluentes tóxicos e recalcitrantes (Eichlerová ET AL., 2007). Corantes do tipo antraquinônico constituem a segunda classe de corantes têxteis mais importantes, com coloração que cobre todo o espectro visível (Osma ET AL., 2010). Além disso, o RBBR é utilizado como molécula modelo para o estudo de degradação de poluentes aromáticos, podendo ser usado como um método simples de indicar a presença de um complexo multienzimático e, portanto, do potencial de degradação dos fungos presentes (Machado ET AL., 2005; Machado & Matheus, 2006). Já o corante *Astrazon Golden Yellow GL* é um corante que tem o grupo cromóforo constituído por uma ligação do tipo $CH=N$, sendo, portanto, um derivado de corantes azólicos (Lorimer, 2001).

A



B

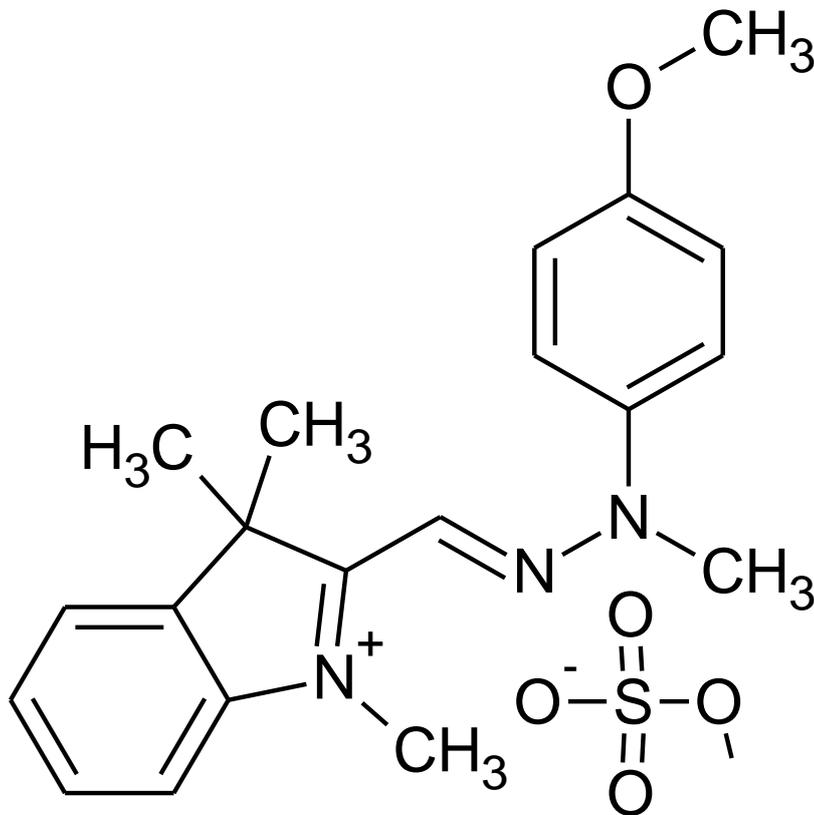


Figura 1. (A) molécula de Remazol Brillhante Azul R e (B) molécula de Astrazon Golden Yellow GL.

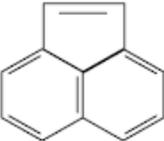
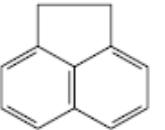
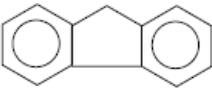
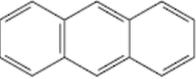
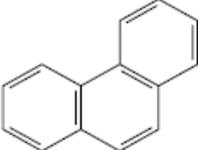
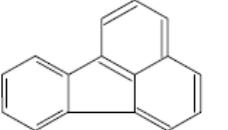
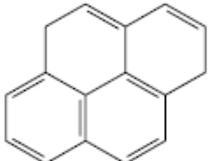
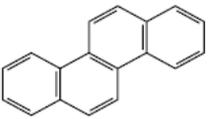
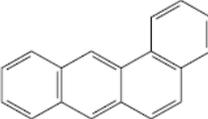
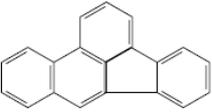
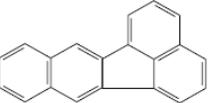
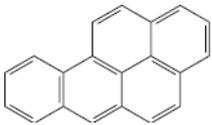
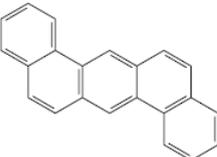
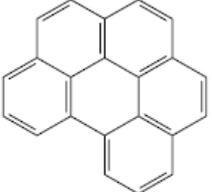
1.4. Hidrocarbonetos derivados de petróleo

O consumo anual de petróleo no mundo foi estimado em cerca de 4,6 trilhões de litros (Nashawi ET AL., 2010 e Elsafie ET AL., 2007). Desse total, cerca de 2 a 9 milhões de toneladas métricas de petróleo são liberados anualmente no ambiente devido a acidentes ou vazamentos durante os processos de extração, refino, transporte e utilização do petróleo (Megharaj ET AL., 2011). No solo, os níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos variam de 1µg até 300 g/Kg de solo dependendo da fonte de contaminação (Megharaj ET AL., 2011).

O petróleo é constituído de uma mistura complexa de componentes no estado gasoso, líquido e sólido, tornando muito difícil a determinação de sua composição. A definição geral coloca o petróleo como uma mistura composta de gás natural (metano) e óleo cru de composição variável, obtido por meio de processos biológicos e geológicos resultantes do acúmulo de matéria orgânica (UNEP, 1991). Em alguns tipos de petróleos os hidrocarbonetos atingem até 98% da composição total, seguido de outros componentes em menor quantidade tais como: enxofre, nitrogênio e oxigênio. Há ainda metais traço como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio (Bento, 2005). Os hidrocarbonetos originados do petróleo podem ser divididos em 4 classes: saturados, aromáticos, asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinolonas, carbazoles, sulfóxidos e amidos) (Leahy & Colwell, 1990). Em média, o petróleo apresenta cerca de 30% de compostos do tipo alcanos, 50% cicloalcanos e 15% aromático e cada hidrocarboneto difere em sua suscetibilidade ao ataque microbiano (Leahy & Colwell, 1990).

A toxicidade do petróleo cru é normalmente atribuída aos hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (HMAs) solúveis em água e aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) apresentados no quadro 1. O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos que apresentam baixo peso molecular, geralmente não persistindo no ambiente devido à sua elevada volatilidade e biodegradabilidade. Os HPAs, por terem alto peso molecular, são menos voláteis e degradam lentamente, podendo apresentar impactos a médio e longo prazo, especialmente em ambientes aquáticos (Bento, 2005). Os hidrocarbonetos não volatilizados são incorporados na cadeia trófica por meio da ingestão de plantas ou outros animais contaminados no solo ou água e, ao se ligarem às moléculas protéicas e ao tecido adiposo dos animais, são acumulados e transferidos por meio da cadeia trófica, sem alterações em sua estrutura (Tiburtius ET AL., 2004).

Quadro 1. Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados poluentes de prioridade ambiental pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) norte americana (BENTO, 2005).

Denominação (IUPAC)	Estrutura	Efeito	Denominação (IUPAC)	Estrutura	Efeito
Naftaleno		Tóxico	Acenaftileno		Mutagênico
Acenafteno		Mutagênico	Fluoreno		Mutagênico
Antraceno		Mutagênico	Fenantreno		Tóxico e Mutagênico
Fluoranteno		Carcinogênico e Mutagênico	Pireno		Carcinogênico e Mutagênico
Criseno		Carcinogênico e Mutagênico	Benzo(a) antraceno		Carcinogênico e Mutagênico
Benzo(b) Fluoranteno		Carcinogênico e Mutagênico	Benzo(k) fluoreteno		Carcinogênico e Mutagênico
Benzo(a) Pireno		Carcinogênico e Mutagênico	Dibenzo (a,h) antraceno		Carcinogênico e Mutagênico
Benzo(g,h,i) Perileno		Carcinogênico	Indeno		Carcinogênico

As tecnologias para a remediação de ambientes contaminados com petróleo incluem a separação mecânica, incineração, evaporação, dispersão e lavagem de solos e materiais contaminados (Hidayat ET AL., 2010). Essas tecnologias são onerosas e podem levar apenas à decomposição com formação de outros contaminantes (Das & Chandran, 2010).

1.5. Fungos ligninolíticos

Os fungos formam um reino monofilético que, segundo estimativas, contribuem para a diversidade global com aproximadamente 5 milhões de espécies, excedendo o número de espécies de plantas em 6 vezes (Blackwell, 2011). A principal marcação molecular que permite esta análise da especiação de fungos é a região transcrita interna (ITS) presente no RNA ribossômico, graças ao alto número de cópias e, conseqüentemente, fácil acesso, via técnica de PCR, mesmo dos DNAs fragmentados ou mal preservados; além de primers já extensivamente testados que amplificam a região ITS em diferentes grupos filogenéticos e sequência de comprimento entre 400-800 bps que facilita a análise filogenética (Nagy ET AL., 2012).

Entre as espécies fúngicas, os táxons decompositores de madeira são particularmente importantes por seu papel na ciclagem de nutrientes nas florestas, além de atuarem como substrato ou fonte de recursos para vários outros organismos que dependem deles (Halme & Kotiaho, 2011). Em geral, fungos degradadores de madeira podem ser designados como fungos da podridão branca e fungos da podridão marrom (Kirk & Farrell, 1987). Os fungos da podridão branca são encontrados, predominantemente, degradando a madeira de angiospermas, o que resulta em uma madeira de aparência esbranquiçada. Por outro lado, os fungos da podridão marrom são encontrados predominantemente degradando matéria orgânica de gimnospermas e se propagam bem em climas frios com uma estação curta de crescimento (TUOR et al., 1995). Apesar de serem colocados em um grupo de fisiologia semelhante, esses fungos representam grupos taxonômicos distintos (Tuor ET AL., 1995), sendo que a maior parte dos representantes desses grupos fazem parte do filo *Basidiomycota*, com a participação de apenas algumas espécies do filo *Ascomycota* (principalmente da família *Xylariaceae*) (Pointing, 2001).

A lignina, encontrada em madeira de plantas superiores, é um polímero aromático hidrofóbico de alto peso molecular comumente depositada nas células em padrões que a tornam efetiva como barreira contra ataques microbianos (Faulon & Hatcher, 1994). O

esqueleto da lignina é um polímero fenil-propanóide, opticamente inativo, sintetizado de forma aleatória a partir dos precursores coniferil, I-coumaril e álcool sinapil (Kirk & Farrell, 1997) como mostrado nas figuras 1 e 2. Diferenças na composição estrutural determina o tipo de madeira, sendo elas do tipo dura ou macia (Vanholme ET AL., 2010). A madeira macia é constituída por lignina tipo gaiacil, contendo mais de 95% de unidades álcool coniferil, com traços de álcool p-coumaril e sinapil; já a lignina de madeiras duras, classificada como guaiacil-siringil, contém uma quantidade maior de derivados de álcool sinapil (26 a 60%) que de álcool coniferil (Tuor ET AL., 1995).

A lignina representa aproximadamente 30% da matéria seca anual de um vegetal cuja degradação dá origem a maior parte da matéria orgânica do solo (Tuor ET AL., 1995). Assim, fungos degradadores de lignina são considerados agentes centrais para o ciclo global de carbono (Pointing, 2001). A lignina é um composto recalcitrante que é mineralizado por meio de um processo oxidativo aeróbico realizado quase que essencialmente pelos fungos decompositores de madeira (Osono, 2007; Tuor ET AL., 1995). Sua característica recalcitrante, aliada a uma degradação restrita a poucos micro-organismos e uma produção anual estimada em $20,3 \times 10^{12}$ Kg, faz da lignina o fator limitante do ciclo de carbono em ambientes dominados por plantas lignocelulósicas (Pointing, 2001). Porém, apenas a quebra da molécula de lignina não fornece energia suficiente para manter sua própria degradação (Osono, 2007). Assim, a decomposição da lignina é tida como uma função metabólica secundária que serve, principalmente, para liberar o acesso à celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos que representam fonte de energia e carbono para o crescimento fúngico (MCMULLAN et al., 2001).

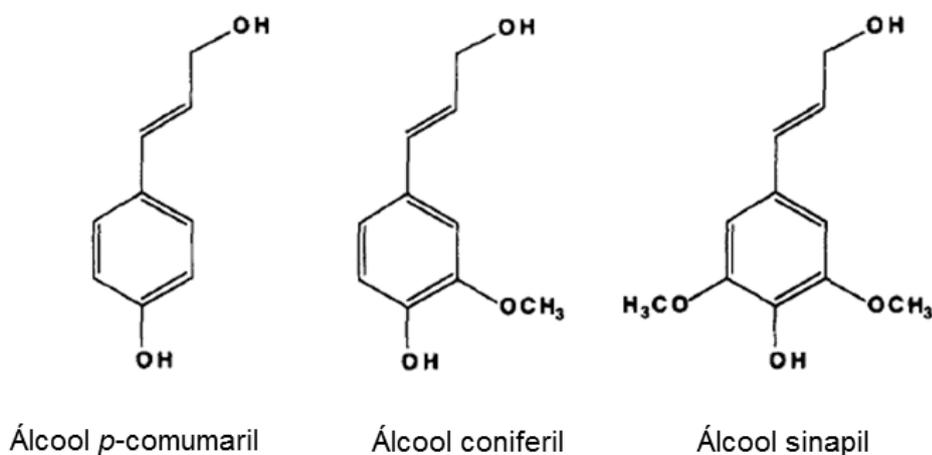


Figura 2. Estrutura química dos precursores alcoólicos da lignina: álcool *p*-comumaril, álcool coniferil e álcool sinapil.

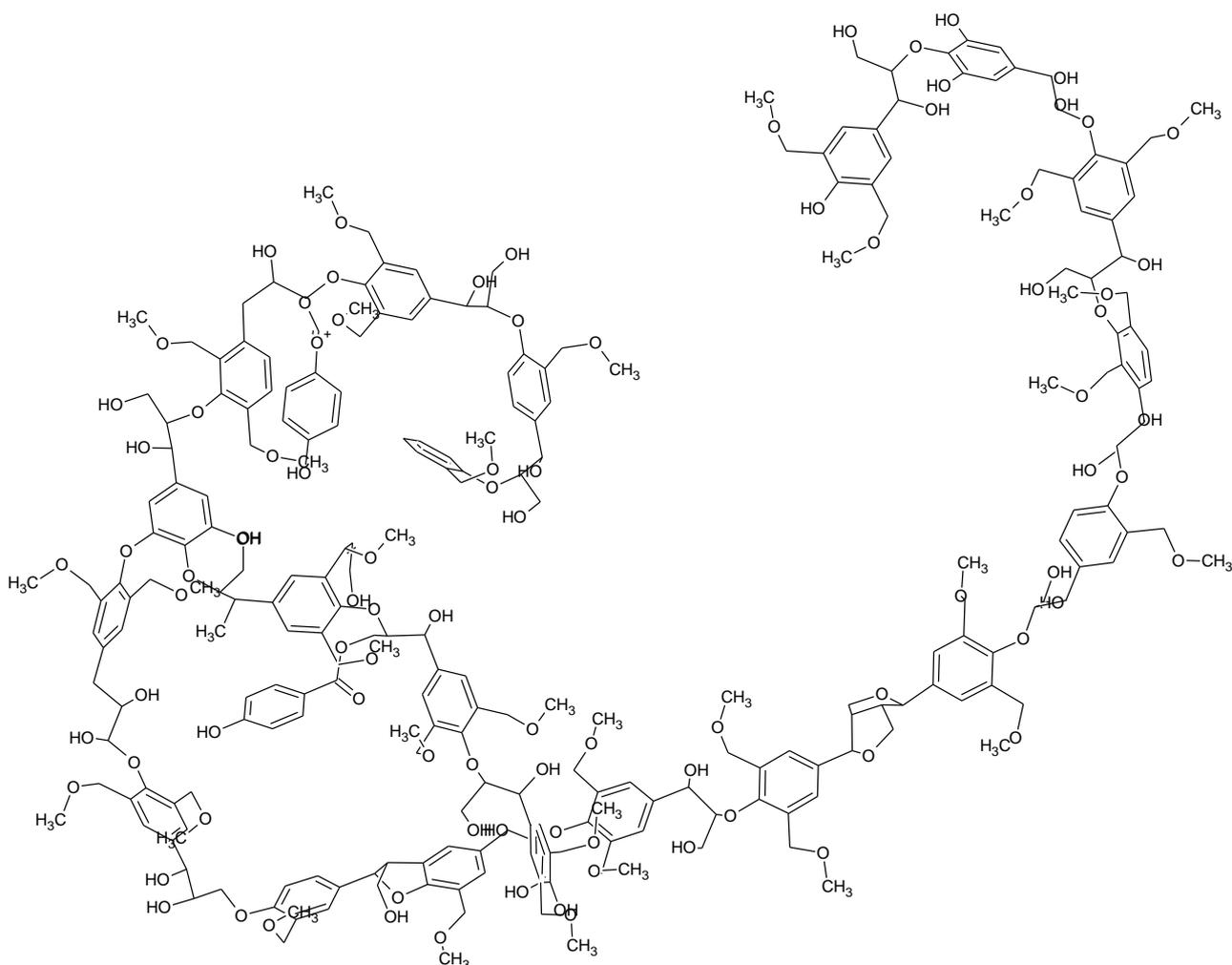


Figura 3. Representação do polímero de lignina, como previsto por análise da lignina em Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (VANHOLME et al., 2010).

Para a mineralização microbiana da lignina, dois processos são essenciais: (1) a quebra do polímero e a (2) clivagem dos anéis aromáticos, envolvendo tanto conversões oxidativas quanto de redução (Tuor ET AL., 1995). Estas reações de quebra podem ocorrer nas fases intra ou extracelular, dependendo do tamanho da molécula e de seu grau de insolubilidade. Quando a molécula resultante da quebra inicial da lignina é grande ou insolúvel, sua quebra ocorre em ambiente extracelular, seguido da entrada na célula dos compostos solúveis monoméricos ou de fragmentos oligoméricos resultantes, para a continuação do processamento (Vanholme ET AL., 2010). Em geral, os processos dependentes de

peroxidases ocorrem tanto intra quanto extracelularmente, enquanto as reduções dependentes de NAD(P)H ocorrem exclusivamente dentro da célula (Tuor ET AL., 1995). A compartimentalização das conversões oxidativas e reducionais determina que a célula fúngica possua um poderoso mecanismo de transporte através da parede celular (Tuor ET AL., 1995).

A lignina é degradada por peroxidases extracelulares em conjunto com um complexo secundário de enzimas como as lacases e P450 monoxigenases que, posteriormente metabolizam os produtos aromáticos dessa quebra (Stolz, 2001). A habilidade dos fungos em degradar diferentes compostos orgânicos vem de seu sistema enzimático constituído pelas enzimas lignina peroxidase (LiP), manganase peroxidase (MnP) e lacase (Lac) (MCMULLAN et al., 2001) como demonstrado no quadro 2. As LiPs são proteínas heme extracelulares que catalisam a oxidação dependente de H₂O₂ de diferentes compostos aromáticos não fenólicos, o que resulta na formação de radicais de cátion aril, que criam um ambiente instável, levando a várias reações não enzimáticas (Mcmullan ET AL., 2001 e Reddy, 1995). As MnPs são proteínas que contém um grupo *heme*, extracelulares e glicosiladas que catalisam a oxidação dependente de H₂O₂ do íon Mn²⁺ a Mn³⁺ capaz de mediar a oxidação de vários compostos fenólicos (Tuor ET SL., 1995). As lacases (benzenodiol/oxigênio oxidoreduases) são enzimas que contém cobre e utilizam o oxigênio molecular como oxidante, catalisando a oxidação de compostos fenólicos (Mcmullan ET AL., 2001 e Reddy, 1995). As peroxidases, lacases e manganases produzidas por cada micro-organismo, bem como a quantidade de cada enzima produzida, variam entre as diferentes espécies de fungos (Osono, 2007).

Quadro 2. Substratos das enzimas ligninolíticas purificadas (modificado de FIELD et al., 1993).

Enzimas	Compostos xenobióticos degradáveis
Lignina peroxidase	Clorofenol
	Diclorofenol
	Triclorofenol
	Pentaclorofenol
	Clorocatechol
	Antraceno
	Pireno
	Benzo(a)pireno
	Benzo(a)antraceno
	Perileno

Conclusão Quadro 2. Substratos das enzimas ligninolíticas purificadas (modificado de FIELD et al., 1993).

Enzimas	Compostos xenobióticos degradáveis
Lignina peroxidase	Dibenzo- <i>p</i> -dioxina Diclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina Corantes azóico
Manganase peroxidase	Diclorofenol Clorocatechol Nitroaminotolueno Corantes poliméricos Clorolignina
Mn ³⁺	Antraceno Pireno Benzo(a)pireno Benzo(a)antraceno Dibenzo(a)pireno Anthantreno
Lacase	Clorofenol Clorometilfenol Diclorofenol Triclorofenol Tetraclorofenol Pentaclorofenol Cloroguaiacols Clorocatecols

Devido à natureza complexa do polímero de lignina, as peroxidases podem funcionar como enzimas degradadoras não específicas e capazes de degradar uma ampla variedade de outros compostos recalcitrantes (Osono, 2007) como demonstrado no quadro 2. Assim como a lignina, esses compostos dificilmente serão utilizados como única fonte de carbono, sendo geralmente mineralizadas por co-metabolismo (Osono, 2007). Porém, o processo de degradação utilizando outra fonte de energia que não o poluente a ser degradado apresenta algumas limitações importantes para uso em processos de bioremediação. Os principais problemas encontrados são os baixos índices de conversão, acúmulo de intermediários tóxicos, necessidade de um co-substrato e a baixa eficácia devido à falta de regulação do

complexo enzimático durante o processo (Stolz, 2001). O modo de biodegradação ideal para bioremediação seria a assimilação de poluentes aromáticos como única fonte de carbono e energia, especialmente se esse processo resultar em uma substancial mineralização do substrato (Stolz, 2001).

Assim a capacidade de mineralizar uma série de compostos xenobióticos, aliada à sua ubiquidade, capacidade de oxidar compostos de baixa solubilidade e à forma de produção das enzimas, torna os fungos decompositores de madeira bons candidatos para utilização em processos de bioremediação (Reddy, 1995).

1.5. Fungos degradadores de corantes e hidrocarbonetos

Na indústria têxtil, diferentes corantes com estruturas diversas são utilizados em um curto período de tempo, na mesma instalação, o que pode gerar efluentes de composições variáveis. Dessa forma, é necessário que o processo de tratamento destes resíduos seja altamente inespecífico (Stolz, 2001). Os fungos possuem sistemas metabólicos que têm por característica a inespecificidade enzimática, tornando-os bons candidatos para utilização em processos de tratamento de efluentes complexos (Stolz, 2001).

Os fungos de podridão branca da madeira são os micro-organismos mais estudados para a descoloração de corantes especialmente por sua capacidade de atuar de forma inespecífica (Solís ET AL., 2012; Stolz, 2001; Pointing, 2001). Para que as enzimas fúngicas consigam quebrar as moléculas de corantes elas devem ser capazes de gerar uma reação de oxirredução, na qual há transferência de um elétron do corante para a enzima em estado oxidado, geralmente levando à mineralização desse poluente (Solís ET AL., 2012). *Phanerochaete chrysosporium* Burds. (*Basidiomycota*) é o fungo decompositor de lignina mais estudado como degradador de moléculas aromáticas, incluindo diferentes corantes industriais (Stolz, 2001). Outros fungos como *Geotrichum candidum* Link., *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. e *Pyricularia oryzae* Cavara também são capazes de descolorir corantes complexos, tais como os azólicos (Stolz, 2001).

Entretanto, alguns problemas que interferem na utilização de fungos ligninolíticos para o tratamento de efluentes contendo corantes podem ser apontados. Estações de tratamento de efluentes não são o habitat natural dos fungos ligninolíticos, assim, cuidados especiais devem ser tomados para que eles se estabeleçam de forma adequada (Saratale ET AL., 2009) Além disso, as enzimas ligninolíticas são expressas, na maioria das vezes, quando as fontes de

nitrogênio e/ou carbono se tornam escassas, sendo que os efluentes de tratamento são ricos nestes compostos (Wesenberg ET AL., 2003). Desta forma, não é comum encontrar relatos na literatura de poluentes utilizados como única fonte de carbono e energia, exigindo uma suplementação de outras fontes de energia para co-metabolização dos poluentes nos efluentes em tratamento (Mcmullan ET AL., 2001). Além disso, as taxas de degradação por fungos em laboratório são usualmente baixas, variando em torno de 50 a 150 mg/L em 5 a 10 dias para corantes (Stolz, 2001). Um estudo mais recente indicou a descoloração de 52 a 63% de corantes tipo *azo*, por meio de adsorção, em fungos basidiomicéticos (Solís ET AL., 2012).

Para fungos degradadores de petróleo, até o momento, a eficiência obtida em estudos de degradação, com diferentes espécies de micro-organismos, foi de 6 a 82% para fungos do solo, de 0,13 a 50% para bactérias do solo e de 0,003 a 100% para bactérias marinhas (Das & Chandran, 2010). Para que ocorra a degradação do petróleo é necessário que todos os seus componentes sejam quebrados gerando compostos de menor peso molecular ou mais polares, de forma a produzir dióxido de carbono e água no final do processo de degradação (Bento, 2005). A biodegradação do petróleo por populações microbianas, como mostrada na figura 4, é a forma menos onerosa de eliminar seus componentes poluentes quando comparado com as outras tecnologias de remediação disponíveis (Prenafeta-Boldú ET AL., 2006). Entretanto, a biodisponibilidade de derivados de petróleo no ambiente é um dos fatores mais limitantes da sua biodegradação por micro-organismos (Leahy & Colwell, 1990). Os hidrocarbonetos podem se ligar à matéria orgânica, dificultando sua remoção e degradação; além disso, sua suscetibilidade à degradação microbiana varia de acordo com suas características químicas, na seguinte ordem: alcanos lineares > alcanos ramificados > pequenos aromáticos > ciclo alcanos. Alguns compostos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular, podem não ser suscetíveis à degradação (Leahy & Colwell, 1990). A capacidade real de bactérias, leveduras e fungos filamentosos que participam do processo de biodegradação de hidrocarbonetos ainda não foi elucidada, já que poucos estudos exploraram essa temática (Bento, 2005).

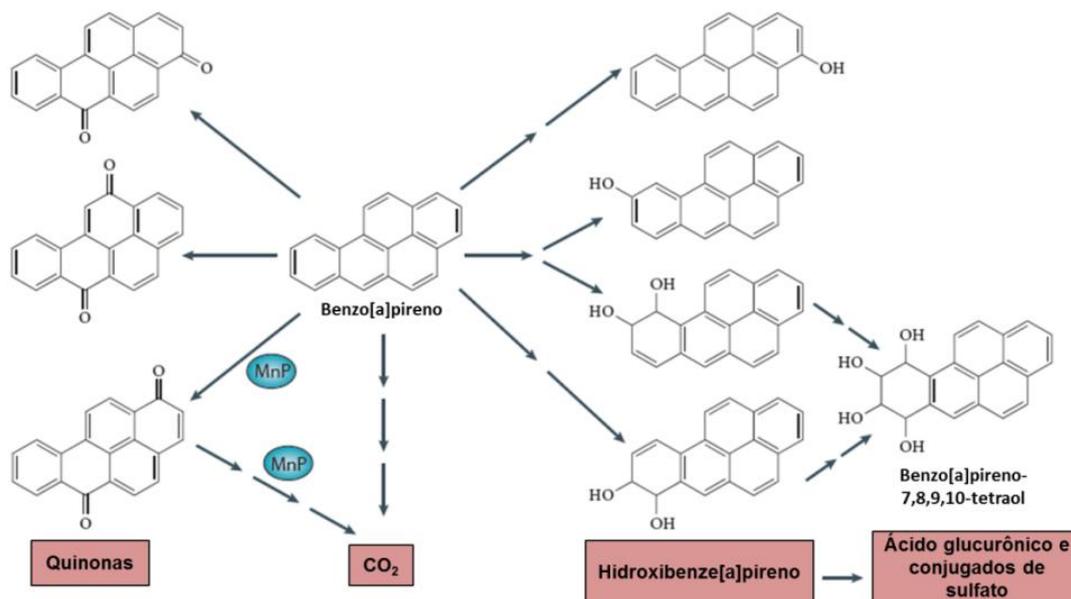


Figura 4. Exemplo de vias de biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) por fungos mostrando a via bioquímica e produtos já listados para a degradação cometabólica de benzo[a]pireno por fungos. Adaptado de HARMS (2011).

Bartha & Bossert (1984) listaram 33 gêneros de fungos isolados de ambientes marinhos capazes de degradar hidrocarbonetos. Espécies dos gêneros *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cephalosporium* foram obtidos de solos contaminados e provaram ter a capacidade de degradar hidrocarbonetos (Bartha & Bossert, 1984). Leveduras como *Geotrichum* sp., *Candida lipolytica* Diddens & Lodder, *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison e *Trichosporon mucoides* E. Guého & M.T. Smith obtidos de água contaminada também foram considerados bons candidatos para serem utilizados como degradadores de derivados do petróleo (Das & Chandran, 2010).

Em geral os fungos estão envolvidos em três tipos principais de metabolismo de hidrocarbonetos, os quais envolvem mecanismos enzimáticos distintos: reações de transformação parcial, degradação completa de hidrocarbonetos na presença de um segundo substrato compatível e utilização independente dos hidrocarbonetos como única fonte de carbono para crescimento (Prenafeta-Boldú ET AL., 2006). O processo de degradação rápida e completa da maior parte dos poluentes ocorre sob condições aeróbicas (Figura 5).

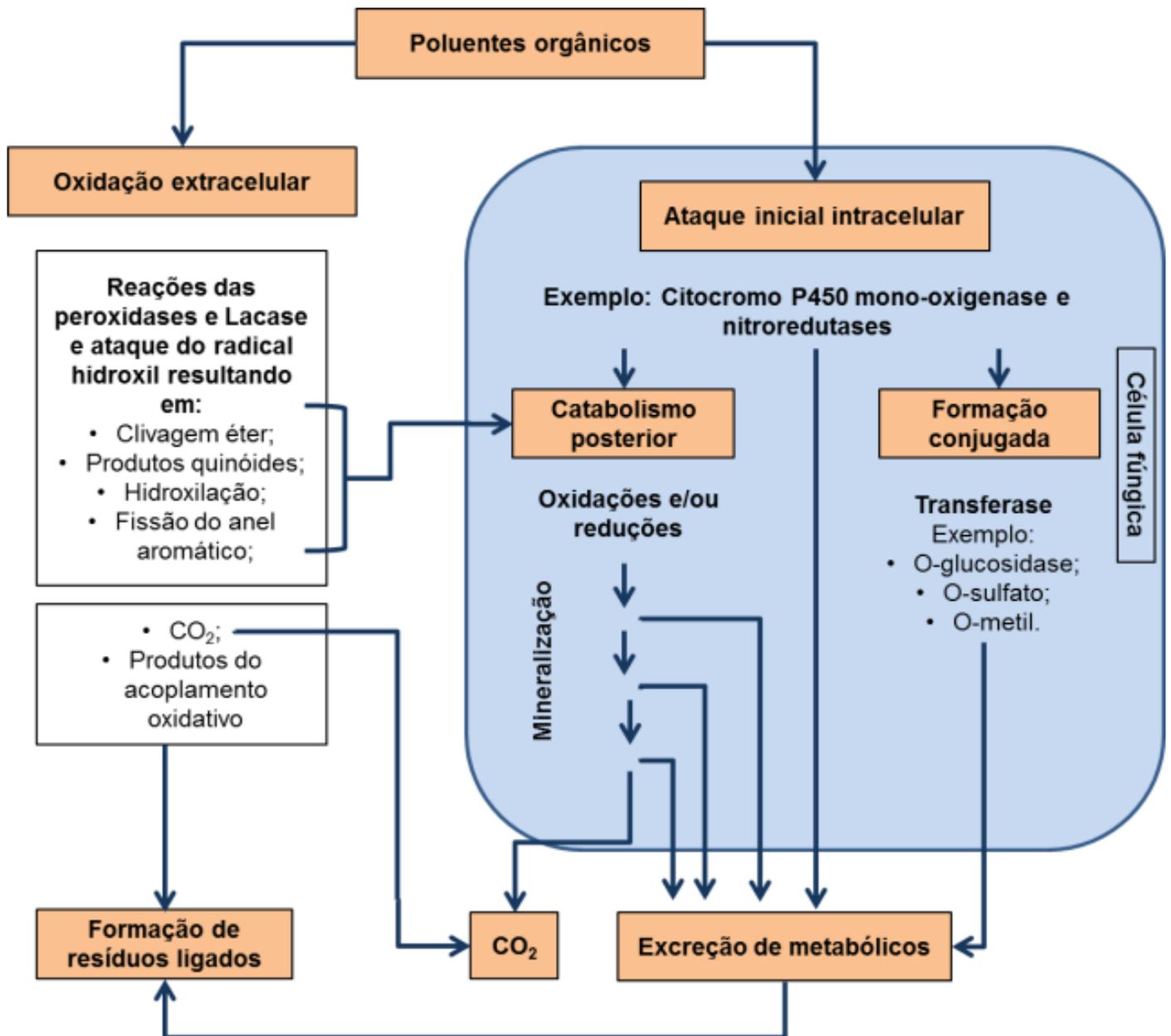


Figura 5. Principais métodos utilizados por fungo para degradar químicos orgânicos. Adaptado de HARMS et al. (2011).

O ataque inicial aos poluentes é um processo oxidativo, no qual a ativação e incorporação do oxigênio são catalisadas em uma reação cujas enzimas-chaves são oxigenases e peroxidases (Leahy & Colwell, 1990). A partir daí, reações periféricas direcionam os compostos para a formação de biomassa e energia, por meio de sua conversão a intermediários centrais do metabolismo microbiano. Outros mecanismos envolvidos no processo de degradação são a ligação de células microbianas ao substrato (adsorção) e a produção de biosurfactantes, que aumentam a solubilização e a remoção dos contaminantes

(Prenafeta-Boldú ET AL, 2006). Fatores físicos como a temperatura, disponibilidade de oxigênio e de luz influenciam diretamente a biodegradação de hidrocarbonetos, por afetar as características químicas dos poluentes, bem como a fisiologia e a diversidade da microbiota presente (Bento, 2005). Baixas temperaturas aumentam a viscosidade do petróleo presente e reduz a volatilidade dos hidrocarbonetos tóxicos de baixo peso molecular, retardando o início da biodegradação. Fatores nutricionais como nitrogênio, fósforo e, em alguns casos, o ferro podem atuar como fatores limitantes durante o processo degradativo (Prenafeta-Boldú ET AL, 2006). Já a foto-oxidação aumenta a disponibilidade biológica e, portanto, a atividade microbiana sobre o substrato (Bento, 2005).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Com o avanço da produção industrial ocorreu um aumento e diversificação dos produtos químicos lançados nos sistemas de tratamento de resíduos, o que vem gerando preocupação quanto ao destino desses compostos no meio ambiente. Nesse cenário, pesquisas para a melhoria do desenvolvimento de sistemas de tratamento e produção de materiais capazes de substituir produtos considerados tóxicos, são consideradas de grande importância para humanidade.

Atualmente no Brasil vigora uma legislação ambiental restritiva quanto à preservação dos recursos naturais. A Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 prevê a ausência de corantes e materiais particulados em águas do tipo continental e salina, mas permitindo a presença de tolueno, benzeno, xileno e etilbenzeno nos efluentes industriais, desde que a uma concentração máxima de 1,2, 1,6 e 0,84 mg/L, respectivamente. Além disso, é obrigatório que para liberação em corpos d'água, esses efluentes não sejam capazes de causar intoxicação ou possuir potenciais efeitos tóxicos aos organismos aquáticos, bem como inviabilizar o abastecimento de populações. Assim, é importante que as indústrias desenvolvam tecnologias para garantir a limpeza dos resíduos de produção tóxicos antes da liberação nos corpos hídricos. Apesar de toda a regulamentação criada para impedir a poluição por efluentes industriais, a contaminação das águas por rejeitos contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos aumentou 500% entre 1998 a 2008, resultando em mais de 20 mil áreas contaminadas, principalmente em decorrência do aumento na exploração de atividades agropecuárias e industriais (Melo, 2008).

Dentre as indústrias de maior impacto econômico e ambiental estão às têxteis e petrolíferas. No Brasil existem cerca de 30 mil indústrias têxteis, o que torna o país o quinto maior produtor têxtil no mundo (dados ABIT - Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção, 2012). O principal fator competitivo dentre as indústrias deste setor está no processo de coloração, o qual deve fornecer ao consumidor um produto de alta durabilidade. O processo de coloração e sua retificação utilizam tipicamente produtos químicos sintéticos, além de grande quantidade de água. A poluição causada pela presença dos resíduos de corantes em efluentes industriais é fator de preocupação para as indústrias desse setor, empresas de tratamento de águas residuais e para a sociedade. Os resíduos contendo monômeros de corantes do tipo *azo* representam uma das principais substâncias nocivas produzidas durante o processo de tingimento dos tecidos. Esse tipo de corante é o mais produzido no mundo, representando de 60-70% de todos os corantes fabricados (um milhão

de toneladas em 2007). Estima-se que até 20% desse corante é liberado nos efluentes industriais durante o processo de coloração, gerando problemas ambientais de difícil tratamento, graças à estabilidade química dessa molécula (Moreira ET AL., 2011).

A indústria do petróleo rendeu para os cofres públicos brasileiros cerca de R\$ 13 bilhões em *royalties* em 2011. No último ano a produção nacional de petróleo ultrapassou a marca de 768,5 milhões de barris, o que tornou o Brasil o 13^a colocado no *ranking* mundial de produtores de petróleo. Apesar de seu caráter mutagênico, teratogênico e cancerígeno já ter sido relatado, ainda não se sabe a extensão do impacto de derramamentos nos ecossistemas naturais ou para a sociedade. Além disso, já é conhecido que compostos aromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, bem como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos produzidos pela combustão incompleta do petróleo ou introduzidos no ambiente durante derrame, possuem alto risco de levar ao aparecimento de efeitos tóxicos no ambiente.

As indústrias petrolíferas e têxteis utilizam, em sua maioria, métodos de tratamento físico-químicos que, apesar de serem considerados eficientes na remediação tanto do petróleo quanto dos corantes, geram problemas tais como: custo elevado, produção de poluentes secundários, versatilidade limitada, interferência na eficiência pela presença de outros constituintes do efluente e uso limitado pela geração de lodo residual contaminado (Ertugrul, 2009). Dessa forma, diferentes pesquisas têm intensificado a busca de tecnologias capazes de minimizar a concentração final de poluentes presentes nos efluentes industriais, que sejam menos onerosas e dispendiosas em energia. Neste sentido, a remediação de resíduos utilizando populações microbianas vem sendo considerada um método menos invasivo e com melhor relação custo-benefício, se comparado com as metodologias físico-químicas de tratamento.

Entre os micro-organismos, os fungos são potenciais candidatos para a biocatálise e detoxificação de poluentes químicos. Sua habilidade de estender uma rede micelial, a baixa especificidade catalítica de suas enzimas e efetiva capacidade de crescer em ambientes com baixas concentrações de nutriente, são as características metabólicas que os tornam bons candidatos para utilização como agentes detoxificantes (Harms ET AL., 2011).. Desta forma, pesquisas que visam à detecção de fungos capazes de degradar poluentes aromáticos são consideradas importantes por contribuírem com o levantamento da diversidade e do potencial biotecnológico das espécies, permitindo, assim, o desenvolvimento de novas tecnologias de bioremediação que sejam eficientes, renováveis e de baixo custo. A partir do exposto acima, este trabalho visou responder as seguintes perguntas:

– Qual a composição e diversidade da comunidade de fungos presentes em amostras de madeira em decomposição de diferentes ecossistemas brasileiros capazes de degradar poluentes aromáticos?

– Espécies de fungos obtidos de madeira em decomposição presentes em ecossistemas naturais tropicais podem ser bons candidatos para utilização em processos de bioremediação de poluentes aromáticos?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a composição e diversidade de fungos presentes em madeira em decomposição de diferentes ecossistemas brasileiros e avaliá-los quanto à capacidade de degradar poluentes aromáticos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Preservar e montar uma coleção temática de fungos degradadores de corantes e hidrocarbonetos aromáticos de diferentes amostras de madeira em decomposição presentes em biomas brasileiros e incorporá-la à Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG;
2. Identificar os fungos degradadores por meio de técnicas morfológicas e moleculares;
3. Determinar a diversidade dos fungos degradadores obtidos dos diferentes biomas brasileiros;
4. Avaliar o potencial dos fungos isolados em degradar os corantes\hidrocarbonetos aromáticos *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Áreas de coleta

As amostras de madeira em decomposição foram coletadas ao longo de trilhas de diferentes tipos de vegetação sendo: (1) Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, ambiente de transição entre cerrado e Mata Atlântica em Minas Gerais (20°05'S/ 43°28'W); (2) Reserva Particular do Patrimônio Natural de Ipirá, Caatinga, Bahia (11°99'S - 34°54'W/ 12°94'S- 39°23'); e (3) Serra Preta/Mucajaí, ambiente de transição entre Cerrado e Mata amazônica, Roraima (11°99'S - 34°54'W/ 12°94'S- 39°23'W). Os pontos amostrados durante o trabalho procuraram acessar diferentes biomas do Brasil.

O cerrado é um bioma tipicamente brasileiro, constituído por um conjunto de ecossistemas como: savanas, matas, campos e matas de galerias que ocorrem na região central. Ocupando

21% do território nacional, esse bioma é considerado o segundo maior do país, ficando atrás apenas da Amazônia. É um dos hotspots para a conservação da biodiversidade no mundo, apresentando uma das mais ricas floras dentre as savanas e uma alta taxa de endemismo entre as espécies. Com apenas 2,2% de área protegida, estudos da biodiversidade desse ambiente tem sido feitos do intuito de desenvolver iniciativas de conservação (Klink & Machado, 2005).

As amostras de madeira em decomposição foram coletadas em dois ambientes de transição com o bioma cerrado: em Minas Gerais na Reserva Particular do Patrimônio Natural - Santuário do Caraça, onde há a transição com mata atlântica e com campos rupestres; e em Serra da Prata, localizada no município de Mucajaí, Estado de Roraima. Em Roraima, a região amostrada apresenta transição savana-mata amazônica, com presença de campinas/campinaranas. Por ser uma das regiões mais antigas de colonização do estado de Roraima, sua importância é justificada, tanto com relação à expansão da fronteira agrícola, quanto aos riscos associados a práticas tradicionais, com base no uso do fogo (Mourão ET AL, 2006). Já a Reserva Particular do Patrimônio Natural - Santuário do Caraça está inserida na porção sul do contraforte da Serra do Espinhaço, no Quadrilátero Ferrífero, e é considerada Unidade de Conservação de âmbito Federal, por meio da Portaria do IBAMA, nº 32, de 20 de março de 1994.

Outro bioma amostrado foi a Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro, que ocupa 10% do território nacional, com uma área de 700 a 800 mil Km², abrangendo parte dos estados Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. Apesar da sua amplitude, esse bioma é um dos ecossistemas brasileiros mais negligenciados, menos protegido e mais ameaçado pela ocupação humana (Almeida ET AL., 2011). Sua vegetação é predominante xerófila, com plantas decíduas e xerófilas (raízes largas, talos grossos e folhas reduzidas a espinhos). As coletas de amostras nesse bioma foram realizadas nos arredores do município de Serra Preta, no Estado da Bahia, localizado a 162 Km da cidade de Salvador, na Região Econômica do Paraguaçu, na microrregião Feira de Santana e território de identidade da Bacia do Jacuípe.

4.2. Coleta e isolamento das amostras

Trinta amostras de madeira em diferentes estágios de decomposição foram coletadas em cada área e processadas em até 24 horas após a coleta. Fragmentos de madeira em decomposição

(1g) foram inoculadas em 20 mL de meio *Hydrocarbon Adapted Fungi* (HAF) acrescido de 1% de petróleo bruto e em Meio Mínimo Mineral (MMM) acrescido de 0,05% dos corantes azólicos Remazol Azul Brilhante ou Astrazon.

As amostras foram incubadas nos meios, HAF acrescido de petróleo e MMM acrescido dos corantes por um período de 5 a 15 dias, á 28°C e 150 rpm, e avaliadas, diariamente, quanto à mudança de cor e turvação do meio. Após turvação do meio, 100 µL dos meios contendo as frações de madeira foram inoculados diretamente nas placas e nas concentrações de 10⁻¹ e 10⁻², nos meios sólidos HAF e MMM, respectivamente, de forma a garantir que só seriam isolados fungos capazes de crescer tendo apenas os poluentes como fonte de carbono.

4.3. Agrupamento e preservação dos fungos

Os fungos obtidos foram agrupados quanto às características morfológicas (cor do verso e da frente, formato e cor da borda, textura da colônia e capacidade de mudar a cor do meio) para posterior identificação molecular. Os fungos foram preservados a partir do crescimento em ágar extrato de malte (MEA) por 7 dias a 25°C. Após crescimento, 8 discos de 3 mm foram retirados da parte marginal do crescimento micelial de cada fungo e preservados em duplicata, em tubos de penicilina contendo 10 mL de água destilada (CASTELLANI, 1967) e em criotubos a -80°C, acrescidos de 20% de glicerol estéril.

As leveduras foram isoladas e purificadas em meio ágar extrato de malte e extrato de levedura (YM) por 24 ou 48 horas a 25°C, a partir do qual foram inoculadas em caldo GYMP por mais 24 horas a 25°C, para posterior congelamento. Para isso, 1 mL do caldo inoculado com a levedura foi depositado em criotubos e acrescido a 20% de glicerol estéril e posteriormente armazenado em ultrafreezer a -80°C.

4.4. Extração do DNA Total

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa e colaboradores (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em MEA e então fragmentos de micélio foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (pH) e deixado a -20 °C por 10 min.. O micélio foi triturado com auxílio de Beads de metal e foram acrescentados 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 min. a 60 °C em banho maria. Em seguida, foram adicionados 162 µL de

CTAB (pH), seguido de homogeneização e incubação por 10 min. a 65°C. Posteriormente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 min. em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado em gelo, por 30 min. e centrifugado a 13.200 rpm por 10 min.. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck) e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 min. e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% (Merck) p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 60 min., e então foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (pH). A amostra foi incubada a 65°C por 60 minutos para hidratação do DNA e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C para quantificação do DNA obtido.

4.5. Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

O iniciador (GTG)₅ foi utilizado para amplificação de regiões de microssatélite, conforme descrito por Lieckfeldt *et al.* (1993). A PCR foi realizada para um volume final de 25 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (tentando atingir uma concentração de 250 ng/µL de DNA, sendo que podem ser utilizadas amostras com concentração entre 50-500 ng/µL), 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 90 segundos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 6 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 1 hora e 30 min. a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

4.6. Amplificação da região ITS

Os iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') foram utilizados para amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rDNA, conforme descrito por White *et. al.* (1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 min. de anelamento a 55°C e 1 min. de extensão a 72°C, e uma extensão final por 5 min. a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), resolvido durante aproximadamente 30 min. a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.7. Amplificação de fragmento do gene do Fator de Alongamento – 1 alpha

Os iniciadores EF1-728F (5'- CATCGAGAAGTTCGAGAAGG -3') e EF1-986R (5'- TACTTGAAGGAACCCTTACC -3') foram utilizados para amplificação parcial do EF-1 α conforme descrito por Carbone & Kohn (1999). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador EF1-728F e EF1-986R 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizado. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo Protect - Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 45 segundos de anelamento a 54°C e 45 segundos de extensão a 72°C e uma extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, resolvido durante

aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.8. Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 45 μL , foram adicionados 11,25 μL de EDTA 125 mM e 135 μL de etanol absoluto (Sigma). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 13.000 rpm durante 25 min.. O sobrenadante foi descartado e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 μL de etanol 70% e realizado homogeneização por inversão. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 20 minutos a 37°C. O DNA então foi ressuspensso em 10 μL de água ultrapura. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.9. Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000, no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão gênica (NAGE). Para as reações de sequenciamento foram utilizados 80-120 ng do DNA purificado e os reagentes presentes no Kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 μL contendo 4 μL do pré-mix (presente no kit de sequenciamento) e 1 μL do iniciador (5 μmol -1), e completa-se o volume final com água para injeção esterilizada. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95°C por 25 min., seguido por 15 segundos de anelamento a 50°C e 3 minutos de extensão a 60°C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 μL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada para que as gotas do acetato de amônio se misturem à reação. Em seguida foram adicionados 28 μL de etanol absoluto (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 min. à temperatura ambiente, protegida da luz.

Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 min. a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado virando-se a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 150 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante 1 segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 min., protegida da luz, para evaporação do etanol residual.

O DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuspenso em 10 µL de “tampão de corrida” (presente no kit de sequenciamento). A placa foi então submetida à agitação em vórtex por 2 min., centrifugada por 1 segundo a 900 rpm e armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACE™ 1000.

4.10. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com sequências depositadas GenBank, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology e disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os isolados que apresentaram sequência com identidade \geq a 99% em relação às sequências de fungos depositadas no GenBank, foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para as sequências com identidade igual a 98% o gênero e espécies foram aceitos, mas o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi usado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade entre 95 e 97% somente o gênero foi aceito, para sequências com identidade $<$ 95% os isolados foram identificados como espécies desconhecidas ou identificados em família, classe, ordem .

As sequências dos táxons referentes à ordem, família, gênero ou outros níveis hierárquicos, não apresentaram identificação conclusiva (alinhamento com múltiplas espécies) foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas, submetidos ao alinhamento dos fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2. A análise filogenética foi conduzida utilizando o programa MEGA (*Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 5 (Tamura ET AL., 2011). Os táxons que apresentarem sequências menores que 300 pb foram considerados como não identificados. A análise de bootstrap foi com 1.000 repetições utilizando os

softwares incluídos no MEGA 5. Sequências de espécies de referências depositadas no GenBank foram adicionadas às análises filogenéticas. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia fúngica foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>) e Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>).

4.11. Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância

As contagens de isolados obtidos foram usadas para cálculo das densidades de cada local de coleta estudado e para cada táxon encontrado. Além disso, a abundância de cada táxon foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: porcentagem de abundância do táxon A = número de isolados do táxon A x 100/soma de isolados de todos os táxons. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons, presente nas comunidades fúngicas de cada área de coleta.

Para avaliar as características das comunidades nos diferentes locais de coleta, foram utilizados os índices de diversidade (Fisher), riqueza (Margalef) e dominância (Simpson). O índice de diversidade alpha de Fisher é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória, onde, comumente, algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (Fisher ET AL., 1943). Esse é um índice de diversidade paramétrico e assume que a abundância das espécies segue o padrão Log de distribuição. É calculado pela fórmula: $S = a \cdot \ln(1 + n/a)$ onde, S é o número de táxons presente na amostra, n é o número de indivíduos e a é o índice alpha de Fisher.

Já o índice de riqueza de Margalef estabelece uma relação entre o número de táxons encontrados e o número de indivíduos, levando em conta o efeito de diferente tamanho das amostras. Sua fórmula é dada por $(S-1)/\ln(n)$, onde S é o número de táxons encontrados e n representa o número de indivíduos.

O índice de Simpson calcula a diversidade de uma comunidade ao indicar a dominância de uma espécie sobre outras levando em conta o número de espécies presentes na amostra, bem como sua abundância. Esse índice calcula a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente de uma amostra pertencerem a mesma espécie. Seu cálculo é feito utilizando a fórmula $D = \sum(n / N)^2$, onde n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de organismos de todas as espécies. Nesse índice, 0 representa o máximo de diversidade e 1 nenhuma diversidade.

Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores estatísticos calculados a partir de 1000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (Hammer ET AL., 2001).

4.12. Triagem dos Corantes

Para a triagem, os fungos isolados a partir dos meios contendo os corantes como única fonte de carbono foram testados em duas etapas. Numa primeira etapa, foi realizado um experimento em duplicata com todos os fungos obtidos no isolamento, utilizando-se 5 mL de meio MMM adicionado dos corantes. Foram realizadas leituras visuais da modificação sofrida pelos corantes, tanto para as leveduras (7 e 15 dias) quanto para fungos filamentosos (15 e 30 dias), bem como a medida de suas respectivas massas secas. Essa primeira etapa teve como objetivo selecionar, do total obtido, apenas os fungos capazes de utilizar os corantes como fonte de crescimento, modificando seu padrão de cor.

Após essa primeira triagem, as leveduras selecionadas passaram por um teste mais detalhado do seu crescimento na presença dos corantes. Para isso, após um período de crescimento em placas de Petri com o meio contendo os corante, as leveduras foram ressuspensas em tampão de fosfato esterilizado até atingir uma densidade óptica igual a 1 (em 600 nm). Dez microlitros destas leveduras ressuspensas foram inoculadas, em triplicada, em placas de 96 poços contendo 190 μ L de MMM acrescido de 0,001 g dos respectivos corantes. As placas foram incubadas em temperatura ambiente com agitação de 180 rpm por até 7 dias para dosagem da decaimento dos corantes e crescimento da biomassa fúngica. As leituras foram realizadas durante 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias, nas faixas de comprimento de onda de 585 nm para RBBR e 530 para Astrazon, de forma a medir a descoloração do meio líquido. O comprimento de onda de 600 nm foi utilizado para medir o crescimento das leveduras;

Já para os fungos filamentosos selecionados na primeira triagem, um disco de aproximadamente 3 mm de diâmetro foi inoculado em tubos cônicos de 15 mL contendo 10 mL de MMM suplementado com cada um dos corantes alvos. Após a incubação por 3, 7, 15, 30 e 45 dias a 28°C com agitação de 150 rpm, a biomassa foi separada por centrifugação a 3500 rpm por 20 min para dosagem do crescimento por meio da determinação da massa micelial seca a 80°C em forno de Pauster por até 7 dias. Do sobrenadante foram retirados 200 μ L para análise em espectrofotômetro sobre os mesmos comprimentos de onda já citados para as dosagens da redução de cor dos corantes.

É importante ressaltar que antes de cada experimento os fungos foram crescidos em MMM acrescido de 0,05% dos respectivos corantes como única fonte de carbono, incubados a 28°C por até 7 dias, de forma a reativar os mecanismos metabólicos responsáveis pela modificação dos corantes.

4.13. Dosagem da degradação de corantes por dosagem de carbono orgânico total (COT)

Os fungos que apresentaram as maiores reduções de cor por biomassa nos experimentos anteriores foram crescidos em tubos cônicos de 50 mL de MMM, acrescido de 0,05% dos corantes azólicos Remazol Azul Brilhante ou Astrazon. Nos dias 0, 3, 7, 15 e 30 de crescimento, uma alíquota de 10 mL de meio foi retirada, filtrada e estocada a -4°C, para posteriores análises de concentração dos corantes pela técnica de dosagem de Carbono orgânico total (Saratale ET AL., 2009). Foi usado um analisador de carbono orgânico total, TOC-Vcpn da Shimadzu, com injeção de amostra direta. As amostras foram filtradas em membrana *Millipore* de 0,45 µm, em seguida 2 mL do corantes *azo* Astrazon ou 4 mL do corante antraquinônico RBBR foram diluídos em balão volumétrico. As amostras foram acrescidas com água Milli-Q até atingir um volume de 20 mL, sendo injetadas no analisador de carbono orgânico. Os valores de COT foram obtidos comparando-se os valores das amostras com os das curvas de calibração do equipamento.

4.14. Triagem do Petróleo

Para avaliar a capacidade dos fungos, obtidos a partir do isolamento em meio contendo petróleo como única fonte de carbono, de crescer e utilizar com eficiência esse composto foi realizada duas etapas de triagem. O primeiro experimento de triagem foi realizado em duplicata, utilizando-se 5 mL de meio HAF acrescido de 1% do petróleo bruto, com leituras visuais de metabolização do petróleo (leveduras em 7 e 15 dias e fungos filamentosos em 15 e 30 dias), bem como medida do crescimento fúngico pela pesagem de biomassa seca. Para obter uma avaliação visual foi utilizado 2,6-dichlorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor de elétrons, segundo metodologia descrita por Hanson et al. (1993). A utilização do DCPIP parte do princípio que a oxidação dos hidrocarbonetos pelo metabolismo microbiano gera uma transferência de elétrons para íons como O₂, nitratos ou sulfatos. A partir do momento que se incorpora no meio um aceptor de elétrons como o DCPIP, torna-se possível inferir a

habilidade do micro-organismo em utilizar o hidrocarboneto como substrato, já que a mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido) indica a oxidação do petróleo com liberação de elétrons.

As leveduras que nesta primeira triagem apresentaram capacidade de crescer e metabolizar o petróleo foram, após período de crescimento em placa, ressuspensas em tampão de fosfato esterilizado, até atingir uma densidade óptica igual a 1 (em 600nm). Um total de 10 µL desta suspensão de células em tampão foram inoculadas, em triplicada, em placas de 96 poços contendo 162 µL do meio HAF e 2 µL de petróleo, acrescidas de 20 µL de DCPIP (0,13 mg/mL). As leituras foram realizadas a 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Estas placas foram incubadas em temperatura ambiente com agitação de 180 rpm para dosagem da descoloração de DCPIP e crescimento da biomassa fúngica. As leituras foram realizadas sob os comprimentos de onda de 605 nm para DCPIP e de 600 nm para dosagem da quantidade de células leveduriformes presentes no meio.

Já para os fungos filamentosos selecionados na primeira triagem também por apresentaram capacidade de crescer e metabolizar o petróleo, um disco de aproximadamente 3 mm de diâmetro, retirado na parte mais externa da colônia, foi inoculado em tubos cônicos de 15 mL contendo 8 mL de meio HAF suplementado com 1 mL de petróleo e 1 mL de DCPIP. Após a incubação por 3, 7, 15 e 30 e 45 dias, a 28°C, com agitação de 150 rpm, a biomassa foi separada por centrifugação a 3500 rpm por 20 min. e, 200 µL do sobrenadante retirado para análise em espectrofotômetro, sob os mesmos comprimentos de onda já citado para as dosagens das leveduras. Já o crescimento fúngico foi avaliado por meio da determinação da massa seca micelial a 80°C em forno de Pauster por até 7 dias.

É importante ressaltar que antes de cada experimento os fungos foram crescidos em meio HAF acrescido de 1% de petróleo bruto como única fonte de carbono, incubados a 28°C por até 7 dias, de forma a reativar os mecanismos metabólicos responsáveis pela metabolização do petróleo.

4.15. Dosagem da degradação de antraceno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os fungos potencialmente degradadores de petróleo foram crescidos em Erlenmeyers com 200 mL de meio HAF acrescido de 1% de antraceno, dissolvido em 120 mL do solvente dimetilformamida. Nos dias 0, 3, 7, 15 e 30 de crescimento, uma alíquota de 10 mL de meio

foi retirada e estocada a -4°C , para posteriores análises. O antraceno foi extraído utilizando-se 3 volumes de etilacetado, posteriormente seco em sulfato de sódio anidro e evaporado até retirada completa da umidade em vácuo a 40°C . O resíduo foi redissolvido em metanol utilizando pulsos de ultrassom, com o volume complementado por metanol, até atingir 10mL. A seguir, 1 mL da amostra ressuspensa foi acrescido da fase móvel composta por Água MilliQ/ Acetonitrila (1:1) até atingir um volume final de 10 mL. Ao final as amostras foram filtradas (Millipore $0,45\mu\text{m}$) e $20\ \mu\text{l}$ injetado para a dosagem em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) SHIMADZU (BEZALEL et al., 1996).

A degradação de antraceno foi analisado por CLAE de fase reversa em coluna ZORBAX Eclipse PAH (Narrow Bore - $2,1\times 150\text{mm}$ - 5 Micron -P.N. 959701-918) com 40 min. de gradiente linear de água-metanol (50:50 até 5:95 v/v), utilizando uma taxa de fluxo de $0,5\ \text{mL}/\text{min}$ para separação de antraceno em comprimento de onda de 220 nm. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software CLASS-VP e apresentados com base na redução de área da curva de detecção do antraceno (tempo de retenção 17,1 min.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Distribuição das espécies

Ao final das coletas, 90 amostras de madeira em decomposição foram obtidas dos 3 biomas selecionados (Caatinga, ecótono Cerrado/Mata Atlântica e ecótono Cerrado/Mata Amazônica). No total foram obtidos 482 isolados fúngicos, a maior parte (43%) encontrada nas madeiras coletadas no ecótono Cerrado/Mata Amazônica, seguido pela Caatinga (28,6%) e ecótono Cerrado/Mata Atlântica (28,4%). O corante RBBR foi o substrato que permitiu o crescimento do maior número de isolados (44,4%), seguido de petróleo (29,3%) e o corante Astrazon (26,3%) (Tabela 3).

Tabela 1. Total de isolados fúngicos obtidos de amostras de madeira em decomposição dos biomas selecionados de acordo com os substratos utilizados como fonte única fonte de carbono.

Bioma	Substrato utilizado como única fonte de carbono			Total de isolados/biomas
	RBBR ^a	Astrazon	Petróleo	
Caatinga	63	35	40	138
Cerrado/Mata Atlântica ^b	52	25	60	137
Cerrado/Mata Amazônica ^c	99	67	41	207
Total de isolados/substrato	214	127	141	482

^aRBBR = Remazol Azul Brilhante R; ^bregião ecotonal entre Cerrado e Mata Atlântica; ^cregião ecotonal entre Cerrado e Mata Amazônica.

A diferença entre o número de fungos obtidos entre cada um dos biomas, pode ser explicada por Mcguire et al. (2011) que demonstrou uma correlação positiva entre a presença e riqueza de fungos em florestas neotropicais e a quantidade de precipitação de chuvas. A região onde se encontra o ecótono Cerrado/Mata Amazônica teve índice pluviométrico de 200 a 300 mm em fevereiro de 2012, que foi maior no período de coleta das amostras em comparação com o ecótono Cerrado/Mata atlântica e Caatinga, os quais apresentaram índices de -50 a +50 mm em abril de 2011 (Fonte: INPE/CPTEC, *Numerical Climate Prediction* - <http://clima1.cptec.inpe.br/gpc/>). Essa diferença na disponibilidade de água entre os biomas pode ter influenciado a maior quantidade de fungos obtida no bioma de Cerrado/Mata amazônica, em detrimento dos outros dois.

Após pré-triagem, apenas os isolados capazes de crescer na presença dos corantes e petróleo como fonte de carbono (capacidade evidenciada por meio da descoloração dos corantes e mudança de cor do indicador DCPIP para petróleo) foram selecionados para dar continuidade ao trabalho. Do total de fungos encontrados, 98 isolados (20,3%) demonstraram capacidade de crescer e, aparentemente, utilizar o poluente presente no meio de cultura como fonte de carbono. A maior parte dos fungos ativos foi encontrada na Caatinga (51%), seguido pelos ecótonos Cerrado/Mata atlântica (30,6%) e Cerrado/Mata Amazônica (18,4%). O substrato que permitiu as melhores taxas de obtenção de fungos com potencial degradativos foi o petróleo (51%), seguido por RBBR (35,7%) e Astrazon (13,3%) (Tabela 4).

Tabela 2. Total de isolados fúngicos ativos obtidos de amostras de madeira em decomposição dos biomas selecionados de acordo com os substratos utilizados como fonte única fonte de carbono.

Bioma	Substrato utilizado como única fonte de carbono			Total de isolados/biomas
	RBBR ^a	Astrazon	Petróleo	
	Caatinga	31	10	
Cerrado/Mata Atlântica ^b	1	3	26	30
Cerrado/ Mata Amazônica ^c	3	0	15	18
Total de isolados por substrato	35	13	50	98

^aRBBR = Remazol Azul Brilhante R; ^bregião ecotonal entre Cerrado e Mata Atlântica; ^cregião ecotonal entre Cerrado e Mata Amazônica.

Do total de fungos encontrados nas madeiras em decomposição dos biomas amostrados, 21,6% foi capaz de promover modificações das características visuais do meio, resultado similar às encontradas em outros estudos com fungos isolados de ambiente aquático de regiões de clima temperado (Junghanns ET AL., 2008; Macgrath & Di Toro, 2009) e em áreas de montanha de florestas tropicais (Martorell ET AL., 2012). Estudo realizado por Thouandetal et al. (2011) revisando diferentes grupos de degradadores sugere que a baixa quantidade de fungos potenciais degradadores isolados no ambiente pode ser devido à raridade ou baixa frequência de espécies que utilizam compostos recalcitrantes. Os fungos que cresceram nos meios com os poluentes como única fonte de carbono, mas não foram capazes de causar a descoloração dos meios com os corantes e a não mudança de cor do indicador DCPIP para o petróleo (384 isolados), foram classificados como tolerantes. Apesar destes fungos classificados como tolerantes aparentemente suportarem a toxicidade dos poluentes

(fato evidenciado pelo seu crescimento), não apresentaram capacidade de modificar as características dos compostos nos meios de cultura utilizados, sugerindo que estes fungos não são bons candidatos para uso como agentes degradadores de xenobióticos. A exposição prévia de uma comunidade microbiana aos poluentes estudados pode resultar no aumento de sua capacidade degradativa por adaptação, com mudança na produção enzimática, desenvolvimento de vias metabólicas por meio de mudança na leitura dos genes e/ou enriquecimento seletivo de espécies capazes de degradar as substâncias de interesse (Leahy & Colwell, 1990). Assim, essa ferramenta pode ser utilizada para a adaptação das espécies isoladas a degradação dos compostos utilizados. Ao final do processo de identificação foram caracterizados 14 gêneros e 28 espécies distintas de fungos com potencial de degradação de poluentes (Tabela 3). Dentre os fungos obtidos, os gêneros mais frequentes foram *Trichoderma*, *Meyerozyma*, *Fusarium* e *Pleurostoma*. Com exceção de *Pleurostoma*, todos os gêneros citados acima já foram relatados como degradadores de corantes e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Solís ET AL., 2012 e Das & Chandran, 2010). Do total de fungos obtidos, 67,3% foram identificados até o nível de espécie, 23,5% até gênero e 9,2% não puderam ser identificadas. Quatro isolados do gênero *Fusarium* (Figura 6a), 7 isolados de *Trichoderma* (Figura 6b), 1 isolado de *Penicillium* (Figura 6c) e 1 *Aspergillus* (Figura 6d) foram identificados apenas até gênero já que as sequências do gene ITS obtidas alinharam com um grande número de diferentes espécies do grupo. Assim as sequências das espécies isoladas neste trabalho foram comparadas por análises filogenéticas com sequências das espécies tipo ou de referência mais próximas após processamento por meio do BLAST, resultado evidenciado na figura 5. As árvores filogenéticas obtidas pela metodologia de *Neighbor-joining*, *Maximum Composite Likelihood*, com bootstrap de 1.000 repetições não apresentaram valores de separação suficiente para classificar as espécies obtidas de madeira em decomposição.

Tabela 3. Identificação molecular dos fungos degradadores obtidos de biomas brasileiros.

Bioma	UFMGCB ^a	Nº de isolados (UFC/mL) ^c	Fonte Carbono ^d	Sequência de referência BLAST mais próxima [Número de acesso GenBank]	Identidade (%)	Nº de bp ^e	Espécie ou grupo taxonômico proposto
Ecótono Mata Amazônica/ Cerrado	6822	2,87 x 10 ⁵	P	<i>Trichoderma spirale</i> [HQ607881]	99	482	<i>Trichoderma</i> sp. 1
	6880	7,11 x 10 ⁴	P	<i>Trichoderma asperellum</i> [JX677934]	100	513	<i>Trichoderma</i> sp. 7
	6833	1,66 x 10 ⁴	P	<i>Talaromyces amestolkiae</i> [JX965247]	100	463	<i>T. amestolkiae</i>
	RO16L11P	1,4 X 10 ⁴	P	<i>Candida tropicalis</i> [FJ986615]	99	469	<i>Lodderomyces tropicalis</i>
	6823	7,08 x 10 ³	P	<i>Hypocrea virens</i> [FJ610299]	99	515	<i>Hypocrea virens</i>
	6847	3,9 X 10 ³	P	<i>Penicillium chrysogenum</i> [JQ781835]	99	497	<i>P. cf. chrysogenum.</i>
	RO20L1P	1,6 X 10 ³	P	<i>Candida fukuyamaensis</i> [U62311]	99	506	<i>Meyerozyma carpophila</i>
	6838	1 x 10 ³	P	<i>Trichoderma koningiopsis</i> [JQ278015]	100	483	<i>T. koningiopsis</i>
	6882	1 x 10 ³	R	<i>Fusarium cf. solani</i> [JN235233]	98	343	<i>Fusarium cf. solani</i>
	6821	4 x 10 ²	P	<i>Penicillium simplicissimum</i> [AF203084]	98	488	<i>P. cf. simplicissimum</i>
Ecótono Mata Atlântica/ Cerrado	6591	6,88 x 10 ⁴	P	<i>Hypocrea lixii</i> [HE608891]	99	525	<i>Hypocrea lixii</i>
	6563	2,7 x 10 ⁴	P	<i>Cosmospora vilior</i> [JN541223]	98	487	<i>C. cf. vilior</i>
	6578	1,5 x 10 ⁴	P	<i>Trichoderma koningiopsis</i> [FJ884183]	98	499	<i>T. cf. koningiopsis</i>
	6559	8 x 10 ³	P	<i>Penicillium adametzii</i> [JN714929]	100	484	<i>P. adametzii</i>
	6581	9,47 x 10 ³	P	<i>Hypocrea lixii</i> [FJ860766]	99	500	<i>H. lixii</i>
	6549	3,2 x 10 ³	A	<i>Fusarium solani</i> [EU912432]	100	463	<i>F. solani</i>
	6553	2, x 10 ³	A	<i>Purpureocillium lilacinum</i> [HQ842824]	100	430	<i>P. lilacinum</i>
	6546	1 x 10 ³	A	<i>Fusarium solani</i> [AB551705]	100	418	<i>F. solani</i>
6597	6 x 10 ²	P	<i>Hypocrea lixii</i> [FJ442646]	100	435	<i>Hypocrea</i> sp. 2	

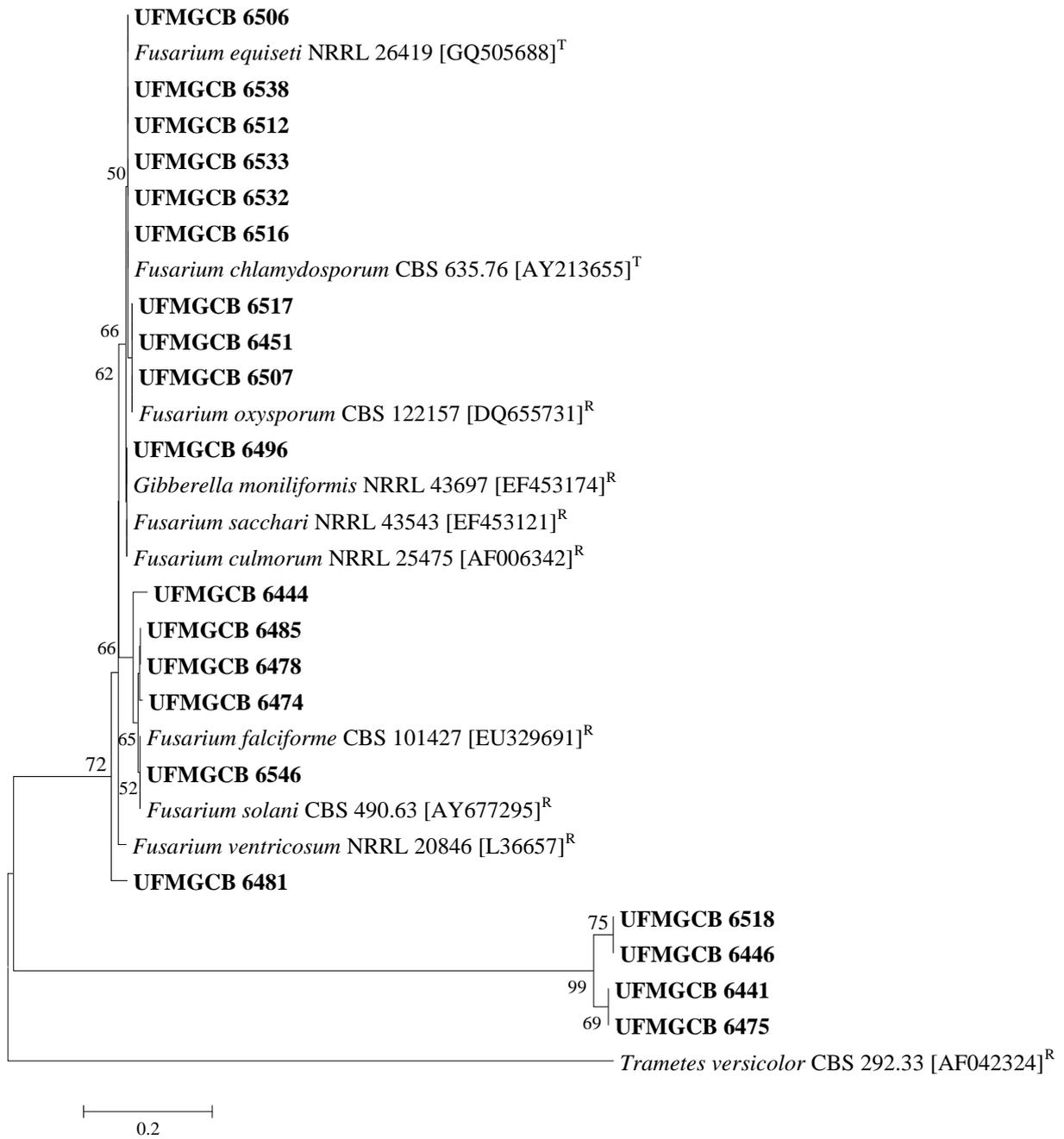
Continuação Tabela 3. Identificação molecular dos fungos degradadores obtidos de biomas brasileiros.

Bioma	UFMGCB ^a	Nº de isolados (UFC/mL) ^c	Fonte Carbono ^d	Sequência de referência BLAST mais próxima [Número de acesso GenBank]	Identidade (%)	Nº de bp ^e	Espécie ou grupo taxonômico proposto
Ecótono Mata Atlântica/Cerrado	6570	5 x 10 ²	P	<i>Hypocrea lixii</i> [HQ857113]	98	246	<i>Hypocrea</i> sp. 3
	6596	1 x 10 ²	P	<i>Hypocrea lixii</i> [FR848364]	98	519	<i>H. cf. lixii</i>
	6588	1 x 10 ²	P	<i>Hypocrea lixii</i> [JX082390]	98	397	<i>H. cf. lixii</i>
	6579	1 x 10 ²	P	<i>Trichoderma spirale</i> [HQ607881]	99	518	<i>T. spirale</i>
	6632	10	R	<i>Hypocrea lixii</i> [JQ040358]	100	490	<i>H. lixii</i>
Caatinga	6516	2,7 x 10 ⁵	R	<i>Fusarium chlamydosporum</i> [AY213655]	99	445	<i>Fusarium</i> sp. 1
	CAA9L19R	2,7 X 10 ⁵	R	<i>Candida fukuyamaensis</i> [U62311]	99	449	<i>Meyerozyma carpophila</i>
	CAA26L28R	2,18 X 10 ⁵	R	<i>Candida xestobii</i> [AM160626]	98	488	<i>M. carpophila</i>
	6521	1,96 x 10 ⁵	R	<i>Pleurostoma ootheca</i> [HQ878590]	99	347	<i>P. ootheca</i>
	6450	1,38 x 10 ⁵	A	<i>Purpureocillium lilacinum</i> [HQ842823]	99	311	<i>P. lilacinum</i>
	6502	1,29 x 10 ⁵	R	<i>Trichoderma koningiopsis</i> [JX238474]	100	565	<i>Trichoderma</i> sp. 5
	CAA19L25P	8,8 x 10 ⁴	P	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> [DQ008953]	99	507	<i>P. hubeiensis</i>
	6506	6,5 x 10 ⁴	R	<i>Fusarium equiseti</i> [JQ936153]	99	466	<i>Fusarium</i> sp.3
	6530	5,21 x 10 ⁴	R	<i>Purpureocillium lilacinum</i> [HQ842837]	99	490	<i>P. lilacinum</i>
	6522	4,7 x 10 ⁴	R	<i>Pleurostoma ootheca</i> [AY725469]	98	474	<i>P. ootheca</i>
	6498	3,4 x 10 ⁴	R	<i>Hypocrea koningii</i> [HQ607942]	99	582	<i>Hypocrea</i> sp. 4
	6511 ^b	29,39 x 10 ³	R	<i>Fusarium cf. incarnatum</i> [HM852057]	99	239	<i>F. cf. incarnatum</i>
	CAA16L22P	2,8 x 10 ⁴	P	<i>Pichia guilliermondii</i> [FJ455111]	99	577	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	6496	2,59 x 10 ⁴	R	<i>Gibberella moniliformis</i> [JX511973]	99	445	<i>Fusarium</i> sp. 2
	6538	2,38 x 10 ⁴	R	<i>Fusarium chlamydosporum</i> [AY213655]	100	523	<i>F. chlamydosporum</i>
6525	1,9 x 10 ⁴	R	<i>Acremonium zeae</i> [GQ167229]	95	553	<i>A. zeae</i>	

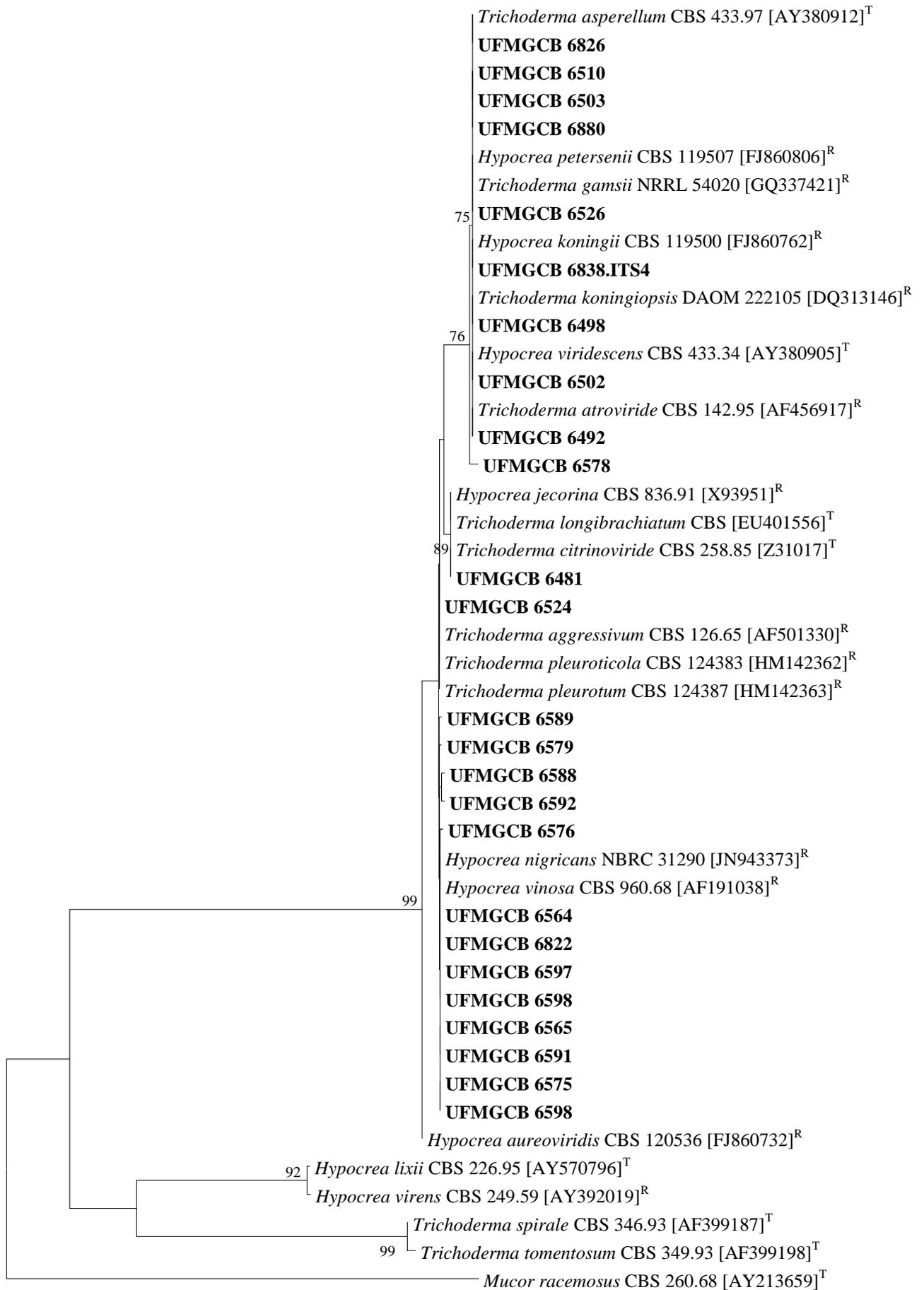
Conclusão Tabela 3. Identificação molecular dos fungos degradadores obtidos de biomas brasileiros.

Bioma	UFMGCB ^a	Nº de isolados (UFC/mL) ^c	Fonte Carbono ^d	Sequência de referência BLAST mais próxima [Número de acesso GenBank]	Identidade (%)	Nº de bp ^e	Espécie ou grupo taxonômico proposto
Caatinga	6533	1,6 x 10 ⁴	R	<i>Fusarium incarnatum</i> [FN597588]	98	452	<i>Fusarium</i> sp. 4
	6503	1,5 x 10 ⁴	R	<i>Trichoderma koningiopsis</i> [EU280141]	100	516	<i>T. koningiopsis</i>
	6441	1,38 x 10 ⁴	A	<i>Fusarium solani</i> [JN232142]	99	498	<i>F. solani</i>
	6532	1,16 x 10 ⁴	R	<i>Fusarium incarnatum</i> [FN597588]	99	465	<i>F. incarnatum</i>
	6517	1,1 x 10 ⁴	R	<i>Fusarium oxysporum</i> [KC254035]	99	448	<i>F. oxysporum</i>
	CAA27L30R	1 x 10 ⁴	P	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> [AB490161]	99	552	<i>Pseudozyma</i> sp.
	CAA27L31R	7 x 10 ³	R	<i>Sporisorium walkeri</i> [JN367322]	98	571	<i>Sporisorium</i> sp.
	6446	5,8 x 10 ³	A	<i>Fusarium oxysporum</i> [JN859461]	100	404	<i>F. oxysporum</i>
	6518	2,5 x 10 ³	R	<i>Fusarium oxysporum</i> [HQ682197]	99	431	<i>F. oxysporum</i>
	6536	2,2 x 10 ³	R	<i>Penicillium chrysogenum</i> [EF200101]	99	444	<i>P. chrysogenum</i>
	6524	2 x 10 ³	R	<i>Trichoderma pleurotum</i> [HM142363]	99	469	<i>Trichoderma</i> sp. 6
	6508 ^b	1 x 10 ³	R	<i>Fusarium oxysporum</i> [JF740776]	99	218	<i>F. oxysporum</i>
	6477	1 x 10 ³	P	<i>Penicillium simplicissimum</i> [FR670313]	99	494	<i>P. simplicissimum</i>
	6537	7 x 10 ²	R	<i>Aspergillus ustus</i> [AY373878]	99	477	<i>Aspergillus</i> sp.
	6468	6 x 10 ²	A	<i>Purpureocillium lilacinum</i> [FN598940]	100	304	<i>P. lilacinum</i>
	6535	1 x 10 ²	R	<i>Penicillium citrinum</i> [GU944574]	99	454	<i>P. citrinum</i>
	6470	1 x 10 ²	P	<i>Exophiala oligosperma</i> [DQ836797]	98	578	<i>E. cf. oligosperma</i>
	6481	40	P	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> [HQ882796]	99	401	<i>T. longibrachiatum</i>

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG, com identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA. ^bMicro-organismos com identificação realizada por BLASTn utilizando fragmentos do gene do Fator de alongação 1-(EF1- α). ^cContagem das colônias fúngicas isoladas em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. ^dFontes de carbono utilizadas para o isolamento de cada espécie, sendo: A para o corante Astrazon, R para o corante RBBR e P para petróleo. ^eNúmero de bases pareadas entre a sequência do isolado e a sequência com melhor alinhamento obtida por meio do BLASTN.

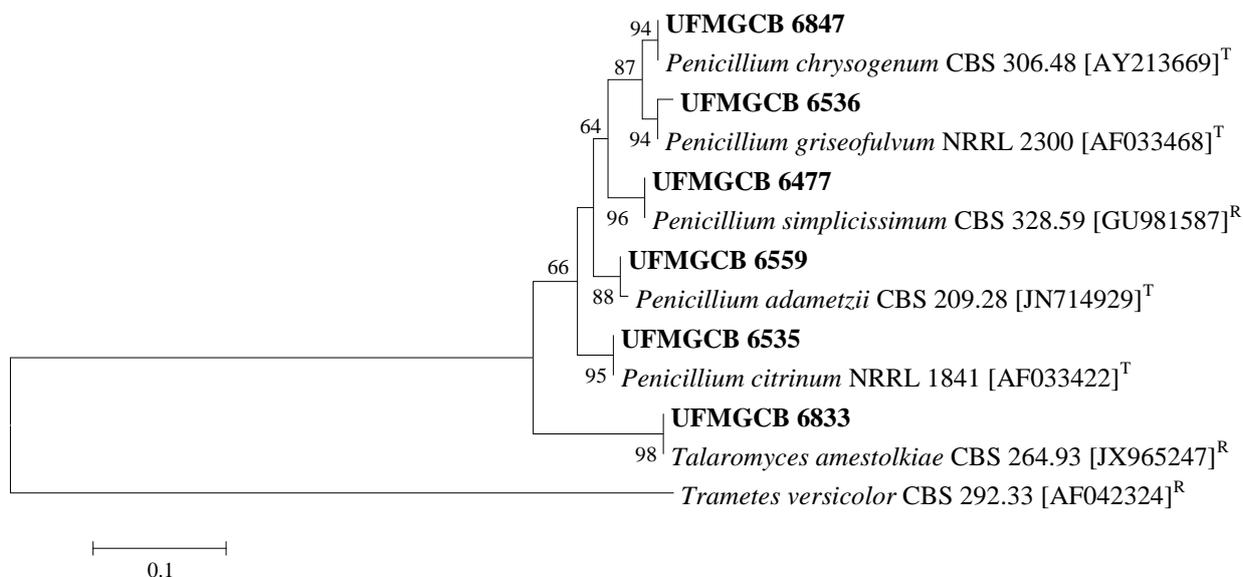


(a)

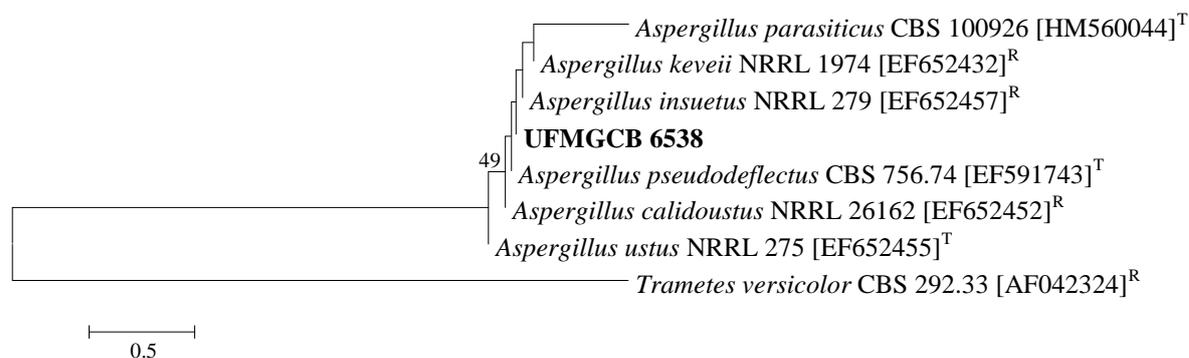


H
0.02

(b)



(c)



(d)

Figura 6. Árvores filogenéticas ilustrando a relação entre os isolados de fungos obtidos de madeira coletadas em diferentes biomas brasileiros e sequências de espécies tipo ou de coleções de referência obtidas do GenBank. As sequências dos fungos *Trametes versicolor* (AF042324) e *Mucor racemosus* (AY213659) foram utilizadas como grupo externo.

Fungos *Ascomycota* representaram 95,6% do total dos isolados obtidos e apenas 4,4% foram identificados como *Basidiomycota*. De acordo com Harms et al. (2011) a maior parte dos fungos degradadores de poluentes pertencem ao filo *Basidiomycota*, seguido de *Ascomycota* e em menor parte por fungos do subfilo *Mucoromycotina* (tradicional *Zygomycota*). A obtenção predominante de fungos *Ascomycota* presentes na madeira pode estar relacionada à sua maior riqueza em madeira em decomposição (Mitchell & Zuccaro, 2006). De acordo com Osono (2007), nas fases iniciais da degradação de material vegetal predominam fungos *Ascomycota* ligninolíticos.

Todos os gêneros de fungos filamentosos encontrados nesse estudo fazem parte do subfilo *Pezizomycotina*. De acordo com Koire & Cavalcanti (2011), os fungos *Pezizomycotina* são descritos como degradadores de biomassa vegetal, capazes de liberar açúcares que são utilizados como fonte de energia e carbono para seu crescimento. Fungos *Pezizomycotina* também são citados como degradadores de petróleo cru, corantes sintéticos, TNT, tolueno, diesel, pesticidas, hidrocarbonetos policíclico aromáticos, fragâncias, dentre outros (Harms ET AL., 2011).

De acordo com McMullan et al. (2001), os fungos do filo *Basidiomycota* produzem uma maior quantidade das enzimas presentes no sistema enzimático inespecífico ativado durante a degradação da lignina. Por isso, fungos que não fazem parte desse complexo têm sido pouco estudados em processos de bioremediação (Junghanns ET AL., 2008). Desta forma, a caracterização de diferentes espécies de *Ascomycota* com potencial para degradação de poluentes reforça a importância de aprofundar os conhecimentos sobre a participação destes fungos na degradação de matéria vegetal nos ecossistemas tropicais e para degradação de poluentes aromáticos.

Neste trabalho o gênero encontrado com mais frequência foi *Trichoderma*. Espécies de *Trichoderma* possuem alta taxa de sucesso como colonizadores de seus habitats (predominantemente substratos celulósicos), o que ocorre tanto por sua eficiência na utilização do substrato disponível no meio, quanto por sua capacidade de secretar diferentes enzimas (Schuster & Schmoll, 2010). *Trichoderma harzianum* foi identificado com maior frequência neste estudo (16 isolados), espécie que de acordo com Smith (1995) é capaz de degradar xenobióticos aromáticos por vias oxidativas.

O gênero *Fusarium* também foi obtido de diferentes amostras de madeira dos Biomas Caatinga, ecótono Cerrado/Mata atlântica e ecótono Cerrado/Mata amazônica. Espécies de *Fusarium* são sapróbios, comumente associadas com as raízes de plantas e restos da rizosfera e material orgânico, tendo sua sobrevivência associada à decomposição e utilização de uma

série substratos e tolerância a condições de alta salinidade e temperatura, além de baixa disponibilidade de água (Mandee, 2006). Apesar de apresentar menor capacidade de degradação quando comparada a fungos *Basidiomycota* (como, por exemplo, *Phanerochaete chrysosporium*), a importância das espécies de *Fusarium* reside na sua ubiquidade e capacidade competitiva em diferentes ambientes, o que pode facilitar seu estabelecimento e degradação natural de xenobióticos (Smith, 1995). O táxon desse gênero mais frequente foi identificado como *Fusarium* sp. UFMGCB 6516, o qual apresentou sequência próxima (99% de identidade) as espécies *F. chlamydosporum* (AY213655), *F. equiseti* (JF773657) e *F. oxysporum* (JQ736646). Para *Fusarium* sp. UFMGCB 6516 foi realizado o sequenciamento do gene do fator de alongação 1- α , cujo resultado também não foi conclusivo. Desta forma, sequenciamento da região de β -tubulina e a análise das características macro e micromorfológicas das estruturas reprodutivas serão necessários para permitir a identificação desse táxon até o nível taxonômico de espécie.

Quanto às leveduras, a espécie mais frequente obtida das amostras de madeira foi *Meyerozyma carpophila* (que anteriormente era parte do gênero *Candida*). Esta levedura faz parte do subfiló *Saccharomycotina*, que inclui espécies degradadores de n-alcanos, n-alkibenzenos, petróleo cru, anticoncepcionais, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e TNT (HARMS et al., 2011). Além disso, espécies desse gênero já foram descritas como produtoras de surfactantes e enzimas extracelulares P450, as quais são importantes no processo de degradação de moléculas aromáticas (Das & Chandran, 2010). *Meyerozyma carpophila* já foi relatada quanto sua capacidade de catabolizar os pesticidas aromáticos recalcitrantes Metolachlor e cloroacetanilidas e utilizá-lo como única fonte de carbono (Munoz ET AL., 2011), indicando sua habilidade em degradar outras moléculas com as mesmas características poluentes.

5.2. Diversidade de fungos potenciais degradadores

O ecótono Cerrado/Mata Amazônica apresentou a menor abundância de espécies com 12,8% do total de espécies obtidas (Tabela 4). O gênero que apresentou a maior abundância de espécies foi *Trichoderma*, com 90% do total de todos os fungos obtidos. A espécie isolada com maior frequência foi identificada como *Trichoderma* sp., sendo que sua sequência de ITS alinhou com sequências de *Trichoderma spirale* (HQ607881) e *Hypocrea lixii* (FJ884155), com 99% de identidade e apenas 4 bases diferentes. As outras espécies mais frequentes foram *Talaromyces amestolkiae* (4,5%) e *Lodderomyces tropicalis* (3,8%). As espécies *T.*

amestolkiae e *H. virens* ocorreram exclusivamente no bioma Mata amazônica/Cerrado (Tabela 4). Já o ecótono Mata Atlântica/Cerrado abrigou 26,3% de todas as espécies obtidas, sendo o segundo bioma em abundância de espécies de fungos. *Trichoderma* também foi o gênero mais frequente nesse ambiente de transição entre biomas Mata Atlântica/Cerrado, representando 94,5% do total de fungos obtidos, sendo que a espécie *H. lixii* foi a mais frequente (92,3%). A espécie *Cosmospora vilior* foi a segunda mais abundante, representando 3,6% de toda a população desse bioma. *Penicillium adametzii*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma spirale* e *Cosmospora vilior* foram às espécies encontradas exclusivamente no bioma Cerrado/Mata Atlântica (Tabela 4).

O bioma Caatinga foi o que apresentou a maior abundância de espécies com potencial de metabolização dos corantes e petróleo, correspondendo a 60,9% de todas as espécies obtidas nesse trabalho (Tabela 4). Os gêneros *Meyerozyma* e *Fusarium* foram os mais frequentes correspondendo, respectivamente, a 28,1 e 21,7% do total de fungos obtidos no bioma Caatinga. Os táxons mais frequentes foram *Meyerozyma carpophila*, *Fusarium* sp. e *Pleurostoma ootheca*, com 60,9% do total de fungos obtidos (Tabela 6). A presença consideravelmente maior de fungos do gênero *Fusarium* na Caatinga, quando comparado aos outros biomas, pode ser justificada pela sua capacidade de resistir a longos períodos de seca (Mandell, 2006). Outra característica relevante é a capacidade que espécies de *Fusarium* apresentarem-se metabolicamente ativos mesmo em baixos níveis de água e fontes de carbono (Mandell, 2006). O maior número de espécies ocorreu exclusivamente na Caatinga (Tabela 4). Os táxons *Trichoderma* sp., *Trichoderma koningiopsis* e *Fusarium solani* foram os únicos encontradas em todos os biomas, o que pode ser justificado pelo fato dessas espécies serem cosmopolitas. Entretanto, é importante ressaltar que esses resultados podem ser consequência da escolha do tipo de isolamento por enriquecimento, o qual pode não representar uma ausência total dessas espécies nos outros biomas amostrados.

Tabela 4. Frequências das espécies isoladas nos diferentes biomas a partir de meio contendo Astrazon, Remazol Brilhante azul R e Petróleo como única fonte de carbono. O valor da porcentagem de cada espécie para cada bioma foi construído a partir do contagem de UFC/mL obtida no isolamento.

Táxon	Abundância em porcentagem dos fungos por bioma			Total de isolados
	Cerrado/Mata Amazônica ^a	Cerrado/Mata Atlântica ^b	Caatinga	
<i>Trichoderma</i> sp.	87,87	0,15	9,5	17,1
<i>Hypocrea virens</i>	1,9	-	-	0,25
<i>Hypocrea lixii</i>	-	92,3	-	24,3
<i>Trichoderma</i> cf. <i>koningiopsis</i>	0,03	2	0,9	1
<i>Trichoderma spirale</i>	-	0,02	-	0,003
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	0,004	0,002
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	4,5	-	-	0,6
<i>Penicillium adametzii</i>	-	1,07	-	0,3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1,1	-	0,12	0,2
<i>Penicillium simplicissimum</i>	0,17	-	0,07	0,05
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	0,007	0,004
<i>Lodderomyces tropicalis</i>	3,8	-	-	0,5
<i>Meyerozyma carpophila</i>	0,4	-	28,14	17,2
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	1,6	1
<i>Fusarium solani</i>	0,3	0,56	0,8	0,7
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	21,8	13,2
<i>Fusarium</i> cf. <i>incarnatum</i>	-	-	2,34	1,5
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	-	-	1,4	0,8
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	1,2	0,7
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	-	-	5,1	3,1
<i>Pseudozyma</i> sp.	-	-	0,6	0,35
<i>Sporisorium</i> sp.	-	-	0,4	0,25
<i>Pleurostoma ootheca</i>	-	-	14,0	8,5
<i>Acremonium zeae</i>	-	-	1,1	0,67
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	0,04	0,02
<i>Exophiala</i> cf. <i>oligosperma</i>	-	-	0,006	0,004
<i>Cosmospora</i> cf. <i>viliior</i>	-	3,6	-	0,9
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	0,3	11	6,8

^aRegião ecotonal entre Cerrado/Mata Atlântica; ^bRegião ecotonal entre Cerrado/Mata Amazônica.

Segundo estudo de Smith et al. (1997), ao comparar características morfológicas e genéticas de populações presentes na região central e região de transição entre biomas, é possível encontrar uma diversidade fenotípica entre essas populações, com o aparecimento de características únicas em regiões ecotonais. Drenovsky et al. (2010) concluíram que áreas com características ambientais semelhantes apresentavam populações microbianas semelhantes, independente da sua localização geográfica. Assim, apesar das regiões de transição entre Cerrado/Mata Amazônica e Cerrado/Mata atlântica serem geograficamente distantes, o fato de compartilharem característica do bioma Cerrado pode ter determinado tanto a baixa abundância de espécies quanto a predominância de fungos do gênero *Trichoderma*.

Alguns estudos sugerem que a composição da comunidade de micro-organismos varia em termos espaciais (ex. regiões e continentes) pela heterogeneidade ambiental, por meio da ação de fatores como característica dos solos, climas, composição da comunidade de plantas, disponibilidade de carbono, entre outras (Fierer & Jackson, 2006; Martiny ET AL., 2006). A Caatinga é o bioma que apresenta características mais diferentes quando comparada aos outros dois biomas de transição, devido à baixa disponibilidade de água e de matéria orgânica (Almeida et al., 2011). De acordo com Collins et al. (2008), em ambientes áridos, tal como a Caatinga, os fungos seriam os principais responsáveis pela decomposição e transformação de carbono e nitrogênio por meio da decomposição das plantas, sendo que a população de fungos supera em número a de bactérias. Além disso, a dosagem da atividade das enzimas responsáveis pela decomposição da lignina produzida por fungos obtidos em ambientes áridos excedem a atividade dessas enzimas produzidas por fungos isolados de ambientes úmidos (Stursova & Sinsabaugh, 2008). Como os ambientes de ecótono apresentam maior umidade que a Caatinga e as enzimas responsáveis pela quebra da molécula de lignina são relatadas também como as principais responsáveis pela degradação de petróleo e de corantes têxteis, é possível sugerir que o maior número de espécies com potencial degradador isoladas na Caatinga pode ser devido a diferenças na produção de enzimas.

Neste trabalho, a diversidade da comunidade microbiana foi avaliada pelos índices de Fischer- α , Margalef e Simpson (Tabela 5). Os valores de Margalef têm como objetivo indicar a riqueza de espécie presente nos biomas estudados. A Caatinga foi o bioma com os mais altos valores de Margalef, seguido pelo ecótono Cerrado/Mata Amazônica. O ecótono Cerrado/Mata Atlântica apresentou o menor valor de Margalef. A Caatinga apresentou o maior valor de Simpson quando comparada com os biomas ecotonais. Já entre os ambientes de transição, o valor de Simpson para o ecótono Cerrado/Mata Amazônica foi maior em

comparação com o ecótono Cerrado/Mata Atlântica indicando uma maior diversidade de espécies presentes no bioma Cerrado/Mata Amazônica. O maior valor de Fischer foi encontrado no bioma Caatinga, seguido pelo Cerrado/Mata Amazônica e ecótono Mata Atlântica/Cerrado, o que sugere que a comunidade presente na Caatinga apresenta diversidade maior de espécies quanto comparada com os ambientes ecotonais. Os valores de Fischer- α foram confirmados o que foi demonstrado pelos valores de abundância e frequência das espécies. A proximidade entre os valores de Fischer- α obtidos para os ecótonos também corrobora a tendência encontrada pela análise de abundância e frequência das espécies obtidas das amostras de madeira em decomposição, indicando que as características do Cerrado entre os ecossistemas ecotonais pode ter sido um importante fator na determinação da diversidade da comunidade de fungos encontrada.

Tabela 5. Índices de diversidade das comunidades de fungos degradadores presentes nos biomas amostrados.

Índices	Biomias amostrados		
	Ecótono Cerrado/ Mata Amazônica	Ecótono Cerrado/ Mata Atlântica	Caatinga
Simpson	0,78 (0,8/0,92)*	0,55 (0,8254/0,9231)	0,91 (0,8637/0,9306)
Fischer- α	6,29 (4,942/27,26)	3,95 (5,946/21,33)	14,24 (6,644/14,24)
Margalef	2,67 (2,337/4,673)	2,15 (2,762/4,911)	5,17 (3,358/5,166)

*Os números entre parênteses representam os menores e maiores valores de diversidade, respectivamente. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições.

Não foram encontrados estudos comparando biomas semiáridos ou de savana com ambientes ecotonais. Porém, Nascimento et al. (2012) demonstraram que fungos isolados de amostras do Cerrado apresentaram índices de riqueza e diversidade semelhantes em dois diferentes locais amostrados, indicando que as características do bioma, tais como tipo e pH do solo, vegetação encontrada e disponibilidade de nutrientes são importantes na determinação na diversidade e riqueza da comunidade microbiana.

5.3. Degradação

Todos 482 isolados fúngicos obtidos no isolamento foram avaliados quanto à capacidade de crescer e metabolizar os corantes RBBR e Astrazon, e o petróleo contendo o indicador DCPIP (Tabela 6). Apesar de a maior número de fungos terem sido obtidos utilizando petróleo com única fonte de carbono, esse foi o poluente que permitiu o menor crescimento em biomassa fúngica. A principal variável que definiu a diferença no crescimento dos compostos pode ter sido a sensibilidade dos fungos aos efeitos tóxicos dos poluentes. O petróleo é considerado o composto mais tóxico dentre os avaliados, devido a sua capacidade de persistir no meio ambiente e por sua composição química variável, contendo diversas moléculas que, além de serem tóxicas aos seres vivos, são solúveis em meio aquoso, tornando-se parte da cadeia alimentar (Bento, 2005). Algumas espécies de fungos são capazes de crescer e utilizar apenas alguns compostos presentes em petróleo, o que afeta sua capacidade de crescer no óleo bruto (Prenafeta-Boldú, 2006). Dessa forma, tanto a variedade de moléculas presentes no petróleo bruto quanto sua toxicidade podem ter interferido no crescimento dos fungos obtidos. Apesar disso, a descoloração do indicador DCPIP ocorreu dentro dos tempos avaliados, sugerindo que a limitação do crescimento pode não ter sido determinante para a limitação da reação de oxirredução.

Fungos saprofíticos, como os obtidos neste trabalho são expostos a uma alta variação de condições ambientais, especialmente disponibilidade de água, temperatura, pH e a presença de gases que impactam na sua habilidade de crescimento, de colonizar diferentes matrizes e produzir as enzimas necessárias para decomposição (Magan,2008). Esses fatores podem ter atuado sobre a ecofisiologia dos isolados fúngicos, no ambiente, previamente à amostragem, o que pode ter causado as respostas diferentes de espécies do mesmo táxons sobre os compostos testados.

Tabela 6. Resultado da triagem feita para os todos os fungos obtidos, mostrando a relação entre número de isolados, a velocidade média de descoloração nos meios testados e a capacidade de crescimento dos fungos tendo RBBR, Astrazon e Petróleo + 2,6-dichlorofenolindofenol como única fonte de crescimento.

Substrato utilizado como única fonte de carbono									
Bioma	RBBR ^a			Astrazon			Petróleo acrescido do indicador 2,6-dichlorofenolindofenol		
	Nº de isolados	Descoloração (dias) ^d	Biomassa (mg) ^e	Nº de isolados	Descoloração (dias) ^d	Biomassa (mg) ^e	Número de isolados	Descoloração (dias) ^d	Biomassa (mg) ^e
Caatinga	63	15	91,7 ± 24	35	30	105,76 ± 20	40	15	68,8 ± 2,4
Cerrado/Mata Atlântica ^b	52	30	88 ± 14,4	25	30	103,2 ± 36,6	60	15	70,3 ± 3
Cerrado/Mata Amazônica ^c	99	15	87,3 ± 62,3	67	-	70 ± 13,4	41	30	79,23 ± 45,6

^aRBBR = Remazol Azul Brillhante R; ^bregião ecotonal entre Cerrado e Mata Atlântica; ^cregião ecotonal entre Cerrado e Mata Amazônica; ^dNúmero de dias necessários para descolorir os respectivos substratos presentes nos meios de crescimento. O valor indicado representa a quantidade de dias necessária para que pelo menos 80% dos fungos testados causasse a descoloração dos meios, podendo haver variação entre os isolados testados. ^eMédia da biomassa seca em mg obtida.

5.1.1. Fungos com potencial para degradação de corantes

Dos 127 isolados fúngicos obtidos utilizando Astrazon como única fonte de carbono, apenas 13 apresentaram capacidade de descolori-lo. Para esses fungos selecionados foram obtidas curvas de crescimentos avaliando aumento da biomassa em relação à concentração dos corantes durante 45 dias. Não houve um padrão de degradação para os corantes, sendo que a utilização e o crescimento tiveram ampla variação entre espécies, como apresentado na Tabela 7.

Além disso, também foi possível identificar que diferentes isolados da mesma espécie apresentaram diferenças de crescimento e potencial de degradação quando testados, sob as mesmas condições. A espécie com maior número de isolados selecionados na triagem foi *Purpureocillium lilacinum* (5 isolados). Para essa espécie, tanto a concentração de corante descolorido no meio, quanto à biomassa fúngica e o tempo em que o fungo apresentou maior atividade variaram entre esses isolados, independente do ecossistema no qual estes foram selecionados. O mesmo ocorreu para os isolados de *Fusarium solani* e *F. oxysporum*. Apesar disso, todos os fungos avaliados demonstraram capacidade semelhante de descoloração do corante Astrazon, com uma taxa de descoloração limitada a um máximo de 0,013 mg, independente da espécie. Isso indica que, mesmo que a capacidade de descolorir o corante seja condicionada por múltiplos fatores, as características moleculares do corante podem ter sido determinantes nesse processo. Já foi relatado que a presença do corante induz a produção das enzimas necessárias para o sua degradação é que são as características moleculares do corante que determinam de que forma o corante será quebrado e qual o grau de dificuldade para que essa reação aconteça (Solís ET AL., 2012). Assim, o isolamento e crescimento do fungo na presença do corante utilizado como modelo nesse estudo pode ter induzido, nos diferentes fungos obtidos, a produção das enzimas necessárias à quebra da molécula de Astrazon. Apesar disso, Stolz (2001) relatou que, para *Phanerochaete chrysosporium* e *Penicillium* sp., a produção de exoenzimas degradadoras de lignina estava diretamente ligada à capacidade desses fungos de degradar corantes *azo*, não existindo correlação aparente entre a estrutura da molécula de corante e sua capacidade de degradá-la. Assim podemos sugerir que existam, provavelmente, mais de um tipo de enzimas envolvidas no processo de degradação dos corantes azólicos, sendo que algumas podem ter atuação específica sobre a molécula enquanto outras apresentam uma atuação mais ampla.

Tabela 7. Valores de biomassa seca e concentração de corante descolorida pelos fungos isolados do meio com Astrazon considerados como potenciais degradadores^a.

Espécie^b	Bioma	Biomassa seca (mg)/dia	Concentração de corante descolorido(mg/L)/dia
<i>Fusarium cf. incarnatum</i> UFMGCB 6465	Caatinga	1,56±0,15	-0,2±0,02
<i>Fusarium oxysporum</i> UFMGCB 6446	Caatinga	5,04±0,15	-0,4±0,09
<i>F. oxysporum</i> UFMGCB 6451	Caatinga	0,58±0,085	0,55±0,13
<i>Fusarium solani</i> UFMGCB 6441	Caatinga	5,60±0,15	0,15±0,06
<i>Fusarium sp.</i> UFMGCB 6444	Caatinga	5,01±0,13	-0,4±0,07
<i>Purpureocillium lilacinum</i> UFMGCB 6450	Caatinga	2,82±0,39	0,2±0,01
<i>P. lilacinum</i> UFMGCB 6452	Caatinga	1,49±0,17	-0,1±0,01
<i>P. lilacinum</i> UFMGCB 6466	Caatinga	1,47±0,12	-0,1±0,02
<i>P. lilacinum</i> UFMGCB 6468	Caatinga	0,85±0,05	-0,1±0,01
Espécie não identificada UFMGCB 6539	Caatinga	8,23±0,64	-0,3±0,02
<i>Fusarium solani</i> UFMGCB 6546	Ecótono Mata Atlântica/Cerrado	0,89±0,14	0,000±0,02
<i>F. solani</i> UFMGCB 6549	Ecótono Mata Atlântica/Cerrado	0,58±0,085	0,5±0,01
<i>Purpureocillium lilacinum</i> UFMGCB 6553	Ecótono Mata Atlântica/ Cerrado	2,20±0,36	-0,2±0,01

^aOs Fatores biomassa seca (mg) e concentração do corante descolorido foram considerados a partir da média calculada para o total de 45 dias do experimento, servindo como base para seleção dos fungos com melhor capacidade de descolorir Astrazon. ^bEspécies isoladas em astrazon e selecionadas em triagem anterior com o nome da espécies e seu número de identificação na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMGCB).

A molécula de corante Astrazon é altamente estável e de difícil degradação (Stolz, 2001). Dos 13 isolados avaliados, todos apresentaram baixos índices de descoloração. Destes, 2 fungos se destacaram apresentando índices de descoloração total, obtido a partir da soma dos valores apresentados durante os 45 dias, de 16,1 mg/L (*Fusarium oxysporum*) e 5,7 mg/L (*Purpureocillium lilacinum*) (Figura 7). De acordo com nosso conhecimento não foram encontrados relatos de fungos capazes de degradar o corante Astrazon, sendo esses os primeiros índices de descoloração relatados. O fungo *F. oxysporum* (Figura 7a) teve um pequeno crescimento durante o experimento apresentando uma queda da biomassa seca entre os dias 30 e 45, provavelmente fruto da autólise das hifas velhas devido ao longo tempo de cultura (Pollack ET AL., 2009). Este mesmo fungo apresentou dois picos de descoloração do astrazon nos dias 3° e 15° do experimento, coincidindo com períodos de crescimento da biomassa (6,7 e 8,9 mg, respectivamente). Esta correlação positiva entre crescimento da biomassa fúngica e taxas de degradação *in vivo* já foi demonstrada em trabalho de Novotný ET AL., 2004; indicando a adaptação prévia dos fungos a ambientes contaminados por poluentes é determinante para a produção de enzimas degradativas.

O isolado de *P. lilacinum* UFMGCB 6450 (Figura 7b) apresentou o maior pico de crescimento (68 mg) também no 3° dia com queda no 7° dia. Após esse período o fungo obteve uma taxa um pouco menor de crescimento com picos nos dias 15° (26,5 mg) e 30° (23,5 mg) e queda no 45° dia. Apesar do pico de crescimento no 3° dia, o fungo quase não descoloriu o corante presente no meio, indicando uma possível adaptação do fungo a toxicidade do meio de cultura sem, porém, a produção suficiente de enzimas degradadoras que causassem a descoloração. Este fungo atingiu o pico de degradação no 15° dia com queda no 30° dia. Um pequeno pico de descoloração ocorreu no 45° dia, nos dois fungos testados. Esse pico pode ter sido causado devido à autólise das hifas, resultando na liberação das enzimas intracelulares degradadoras no meio (Chang ET AL., 2012).

De acordo com Novotný et al. (2004), fungos que apresentam baixo crescimento micelial geralmente têm um baixo desempenho na degradação dos compostos aromáticos. No caso do isolado *F. oxysporum* UFMGCB 6451, a baixa taxa de crescimento apresentada, parece não ter influenciado na sua capacidade de descolorir o corante Astrazon. Isto porque, dentre os fungos avaliados, esse isolado apresentou a maior redução da concentração de cor de Astrazon no meio de cultura. Esse fato sugere que este fungo é um bom candidato para uso em processos de bioremediação, já que as condições adversas não afetaram sua capacidade de transformar o corante estudado.

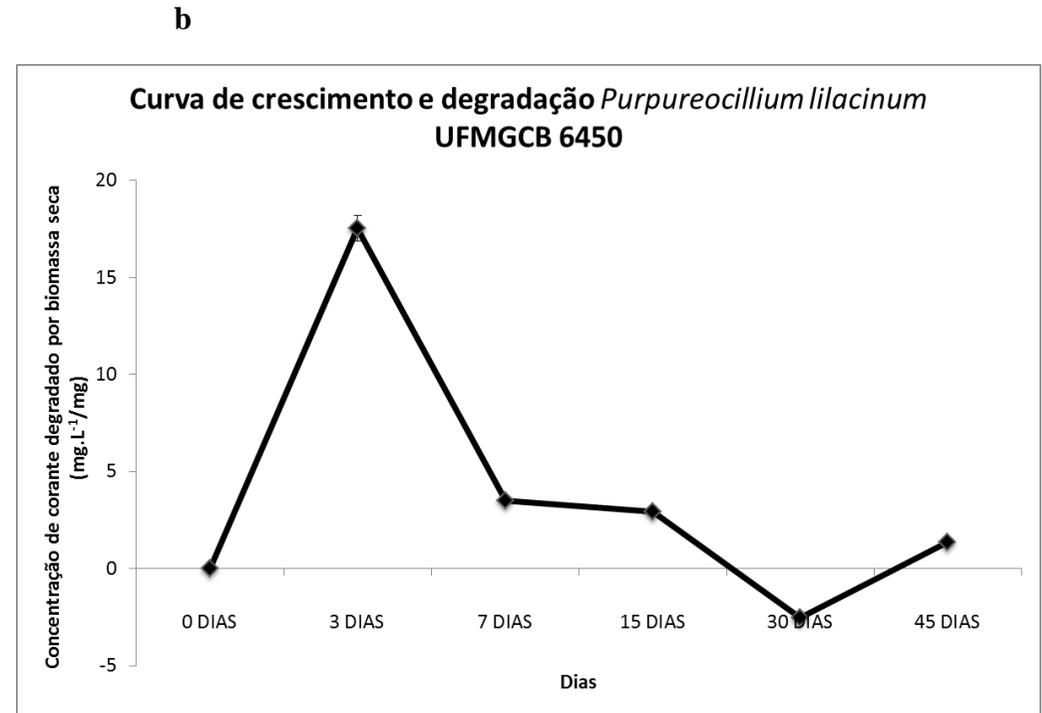
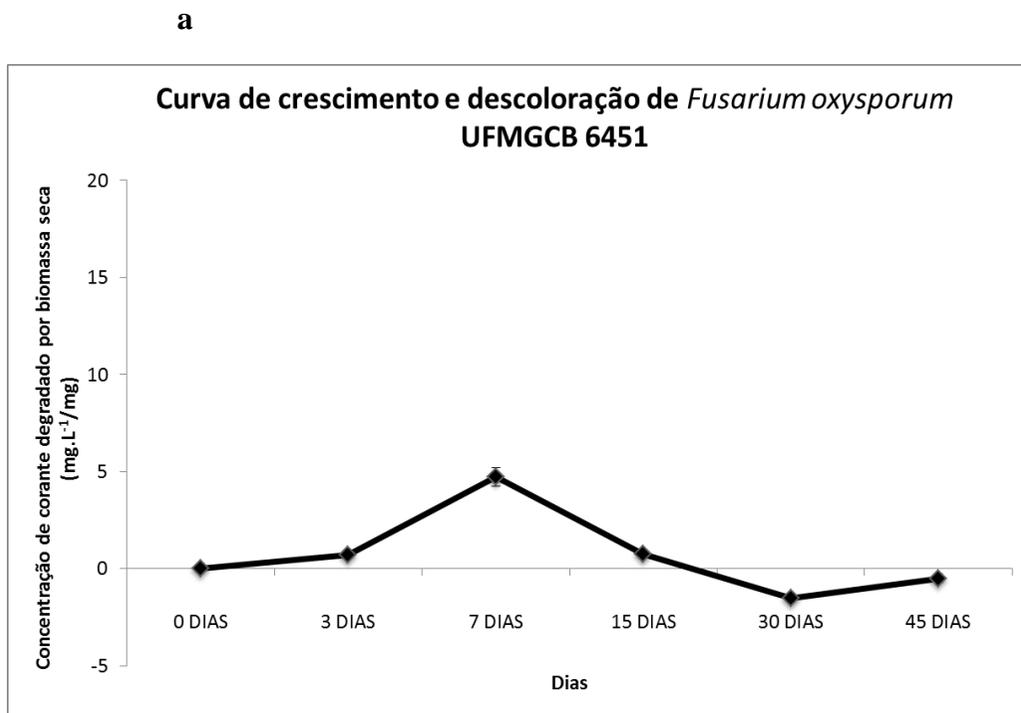


Figura 7. Gráficos de crescimento e degradação dos fungos filamentosos em meio contendo o corante azólico Astrazon como única fonte de carbono. Todas as leituras são resultado da média dos valores em triplicata, corrigido a partir dos testes controle. A- Gráfico obtido para *Fusarium oxysporum* UFMG 6451; B- Gráfico obtido para *Purpureocillium lilacinum* UFMG 6450.

O corante RBBR apresentou número maior de fungos (35) capazes de descolori-lo na triagem. Para esses fungos selecionados como potenciais degradadores foram construídas curvas de crescimentos nos mesmos moldes das construídas para avaliar a descoloração de Astrazon, onde foram avaliados o variação da biomassa seca em conjunto com a concentração dos corantes durante 45 dias (Tabela 8).

Os isolados avaliados para a descoloração de RBBR, assim como para os fungos capazes de descolorir o Astrazon, também não apresentaram um padrão de degradação entre as diferentes espécies e isolados. O tipo de bioma também não serviu como determinante quanto à capacidade de degradação dos fungos testados para esse corante. Porém, ao compararmos os isolados testados quanto a descoloração de RBBR e Astrazon percebemos que este último apresentou valores muito menores de descoloração. A maior parte dos fungos crescidos em RBBR descoloriu esse corante na faixa de 100 a 250 mg/L, diferente da média dos fungos avaliados quanto a descoloração de Astrazon (que variou entre 8 a 40 mg/L). Isto pode ter ocorrido devido às características dos corantes tais como tipo de estrutura (simples como RBBR) e peso molecular quando com comparados com moléculas que apresentam alto índice de substituição (como o Astrazon) em sua estrutura química e alto peso molecular (Arora ET AL., 2011). Além disso, o RBBR é utilizado como molécula modelo para isolamento de espécies degradadoras de poluente aromáticos por selecionar fungos produtores de enzimas envolvidas na quebra da lignina (Machado & Matheus, 2006) o que poderia também justificar a obtenção de um maior número de isolados.

Tabela 8. Valores de biomassa seca e da concentração de corante descolorida pelos fungos isolados em Remazol Brilhante Azul R que foram considerados como potenciais degradadores^a.

Espécie^b	Bioma	Biomassa seca (mg)/dia^c	Concentração de corante descolorido(mg/L)/dia^d
<i>Acremonium zeae</i> UFMGCB 6525	Caatinga	25,4±2,7	200±30
<i>Aspergillus</i> sp. UFMGCB 6537	Caatinga	6,03±1,5	27±3,5
<i>Fusarium chlamyosporum</i> UFMGCB 6538	Caatinga	2,38±0,38	11±0,9
<i>Fusarium incarnatum</i> UFMGCB 6512	Caatinga	8,87±1,44	23±3,8
<i>F. incarnatum</i> UFMGCB 6532	Caatinga	5,7±1,4	100±10
<i>Fusarium oxysporum</i> UFMGCB 6507	Caatinga	3,17±0,5	6±0,8
<i>F. oxysporum</i> UFMGCB 6508	Caatinga	7,52±0,79	7±0,4
<i>Fusarium oxysporum</i> UFMGCB 6517	Caatinga	3,23±0,44	3±0,4
<i>Fusarium oxysporum</i> UFMGCB 6518	Caatinga	3,71±0,46	-3±1,5
<i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 6496	Caatinga	2,65±0,51	14±1
<i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 6506	Caatinga	2,44±0,35	13±1,2
<i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 6516	Caatinga	6,92±0,61	4±1
<i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 6519	Caatinga	1,97±0,36	-2±0,8
<i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 6533	Caatinga	5,65±1,39	4,9±0,7
<i>Hypocrea</i> sp. UFMGCB 6498	Caatinga	8,7±0,64	34±3
<i>Meyerozyma carpophila</i> UFMGCB CAA26L28R	Caatinga	0,035± 0,02	11,670±4,25
<i>M. carpophila</i> UFMGCB CAA9L19R	Caatinga	-0,04±0,03	12,93± 4,05
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> UFMGCB CAA16L22P	Caatinga	-0,05± 0,03	12,24± 4,35
<i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 6536	Caatinga	3,28±0,45	12±1,5

Conclusão Tabela 8. Valores de biomassa seca e da concentração de corante descolorida pelos fungos isolados em Remazol Brilhante Azul R que foram considerados como potenciais degradadores desse corante na triagem^a.

Espécie^b	Bioma	Biomassa seca (mg)/dia	Concentração de corante descolorido/dia
<i>Penicillium citrinum</i> UFMGCB 6535	Caatinga	4,28±0,56	13±1,4
<i>Pleurostoma ootheca</i> UFMGCB 6521	Caatinga	2,02±0,39	-1±0,7
<i>Pleurostoma ootheca</i> UFMGCB 6522	Caatinga	2,54±0,37	7±0,9
<i>Pseudozyma</i> sp. UFMGCB CAA27L30R	Caatinga	-0,06±0,028	12,7±3,47
<i>Purpureocillium lilacinum</i> UFMGCB 6530	Caatinga	2,23±0,54	17±1
<i>Sporisorium</i> sp. UFMGCB CAA27L31R	Caatinga	-0,07±0,01	13,4±1,19
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 6502	Caatinga	3,10±0,33	2,1±0,5
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 6510	Caatinga	7,37±1,92	29±3,4
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 6524	Caatinga	-3,9±2	70±3
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 6526	Caatinga	2,82±0,366	4,5±1,2
Espécie não identificada UFMGCB 6500	Caatinga	4,96±0,52	9±1
<i>Hypocrea lixii</i> UFMGCB 6632	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	5,98±0,83	28±3,4
<i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i> UFMGCB 6882	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	8,1±0,66	44±2
<i>Hypocrea virens</i> UFMGCB 6869	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	3,74±0,82	-3±1,7
<i>Meyerozyma carphophila</i> UFMGCB RO20L1P	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	-0,022±0,044	12,57± 4,34
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 6880	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	7,44±1,12	1,3±0,6

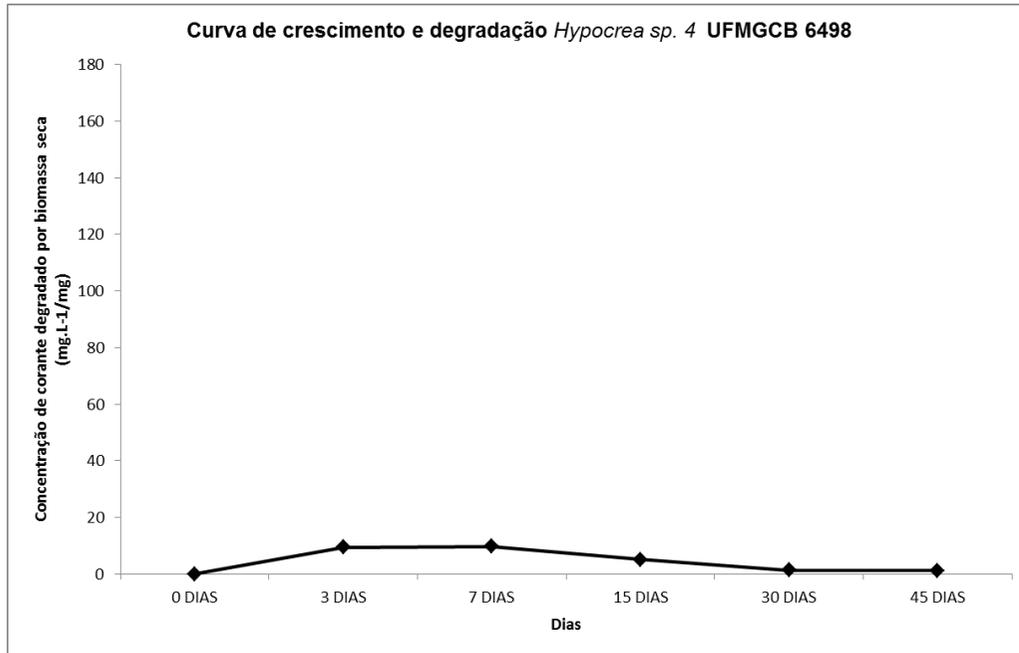
^aOs Fatores biomassa seca (mg) e concentração do corante descolorido foram considerados a partir da média calculada para o total de dias do experimento, servindo como base para seleção dos fungos com melhor capacidade de descolorir RBBR. ^bEspécies isoladas em RBBR e selecionadas em triagem anterior com o nome da espécie e seu número de identificação na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMGCB).

Dos 35 fungos avaliados quanto à capacidade de crescer e descolorir o RBBR, 4 fungos filamentosos (2 isolados da espécie *Trichoderma* sp., 1 *Hypocrea lixi* e 1 *Fusarium* cf. *solani*) apresentaram as maiores taxa de descoloração do corante dentre os avaliados (Figura 8). A concentração residual do corante nos meios depois dos 45 dias de experimento variaram de 47,4 mg/L até 182,7 mg/L para esses fungos. Os dois isolados de *Trichoderma* (Figuras 8a, b) apresentaram pico de degradação no 7º dia e pico de crescimento no 30º dia. A partir desse período, tanto a descoloração quanto a biomassa fúngica decaíram até o fim do experimento no 45º dia. Esse crescimento tardio contradiz os estudos que caracterizam fungos desse gênero como de rápido crescimento (Schuster & Schmoll, 2010), indicando que o corante pode ter um efeito prejudicial sobre o metabolismo desses fungos. A semelhança nas curvas de descoloração indica que ambos os isolados de fungos do gênero *Trichoderma* podem utilizar o RBBR de forma semelhante. Esse fato é ainda reforçado pela curva de descoloração do isolado de *Hypocrea lixi* (Figura 8c), cujo padrão apresentado se aproxima ao das outras espécies de *Trichoderma*, exibindo um pico de degradação que se inicia no 3º dia e se mantém estável até o 15º dia, porém atingindo seu pico no 7º dia. A diferença entre essas curvas é maior para a biomassa já que essa espécie apresentou um padrão diferente de crescimento, com picos no 7º e 30º dias.

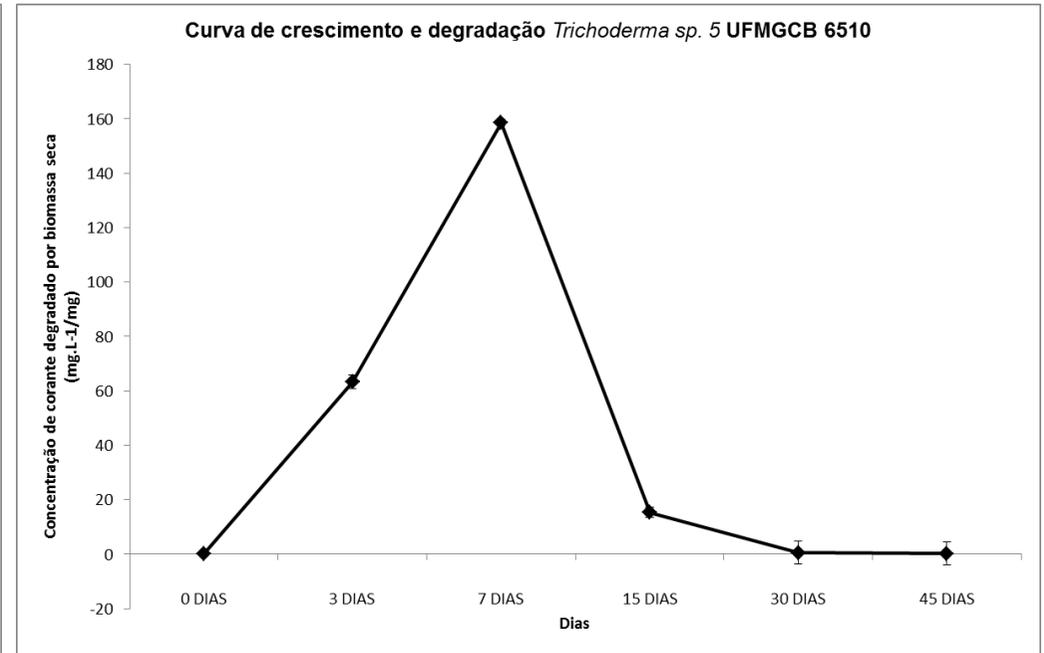
O isolado *Fusarium* cf. *solani* UFMGCB 6882 apresentou curva de descoloração com pico no 15º dia com queda nesse valor até o fim do experimento (Figura 8d). Esse isolado apresentou ainda um ciclo de crescimento constante, com picos de biomassa nos dias 7º e 30º, porém sem demonstrar queda de biomassa que indique morte do fungo. De acordo com Harms et al. (2011), a capacidade de um fungo em crescer constantemente na presença de poluentes é uma característica importante para espécies em processos de bioremediação.

Osma et al. (2010) utilizando lacase imobilizada obteve uma redução de 44% do corante RBBR em 42 horas, com descoloração total do meio de cultura em 95 horas. Neste estudo, utilizando fungos *in vivo*, observamos uma redução de 108,7; 84,1; 90,6 e 90%, respectivamente, para Figura 8 a,b,c,d em 7 dias, porém estes valores não se mantiveram durante todo o experimento. Esse fenômeno indica que uma parte da descoloração pode ter ocorrido por adsorção das moléculas dos corantes às células fúngicas, efeito já evidenciado em outros trabalhos com espécies de *Fusarium* e *Trichoderma* na presença de corantes (Solís ET AL., 2012).

a



b



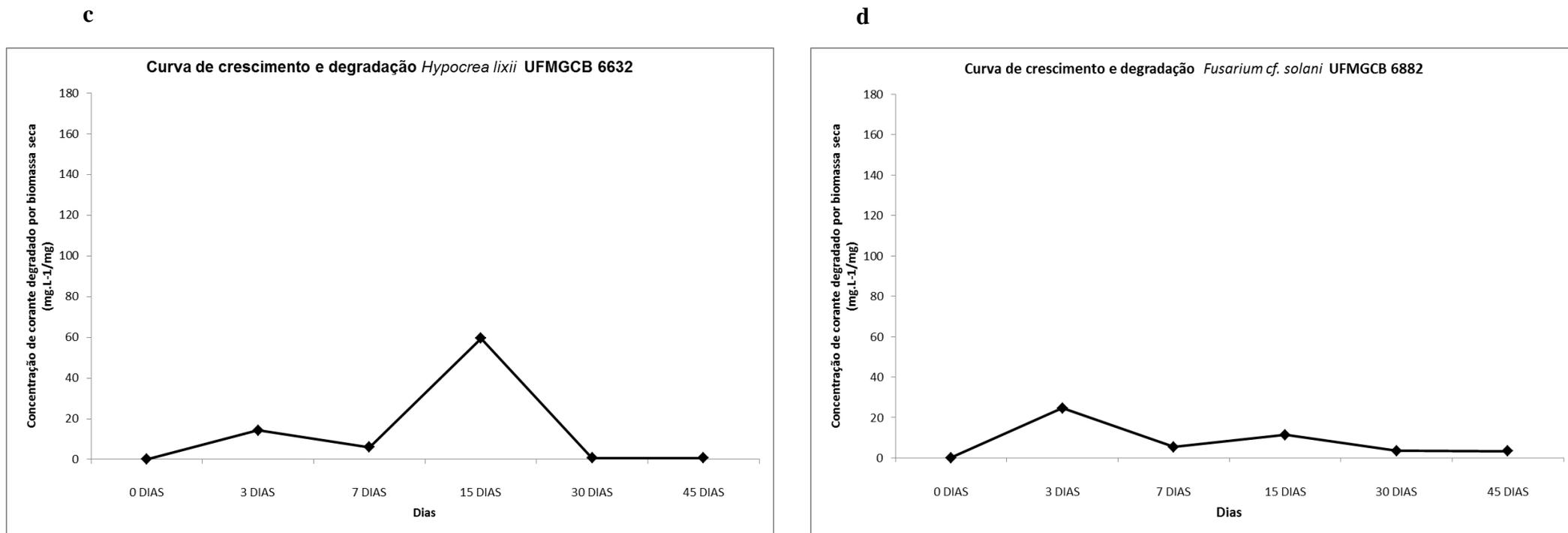


Figura 8. Gráficos de crescimento e degradação dos fungos filamentosos em meio contendo o corante antraquinônico RBBR como única fonte de carbono. Todas as leituras são resultado da média dos valores em triplicata, corrigidos a partir dos testes controle. a- Gráfico obtido para *Hypocrea* sp. 4 UFMGCB 6498; b- Gráfico obtido para *Trichoderma* sp. 5 UFMGCB 6510 ; c- Gráfico obtido para *Hypocrea lixii* UFMGCB 6632; d- Gráfico obtido para *Fusarium cf. solani* UFMGCB 6882.

Seis leveduras foram capazes de crescer e descolorir RBBR. Para esses isolados, testamos também a capacidade de crescimento em meio rico (ágar extrato de malte-extrato de levedura) e a capacidade de reduzir a cor o RBBR na presença de 1% de glicose. De acordo com Prenafeta-Boldú et al. (2006), como os poluentes aromáticos são de difícil degradação, a presença de glicose pode promover maior crescimento fúngico bem como maior produção de enzimas que favoreceriam a degradação dos xenobióticos presentes. Todas as leveduras obtidas apresentaram capacidade de reduzir a cor do corante RBBR em presença de glicose, porém em quantidade inferior ao dos testes tendo apenas com o corante como fonte de carbono. Quatro isolados se destacaram por seu poder de descolorir o corante em meio sem glicose. Duas leveduras isoladas do meio com petróleo apresentaram capacidade de utilizar o corante, com valores de descoloração iguais ou superiores ao das leveduras isoladas tendo o RBBR como única fonte de carbono.

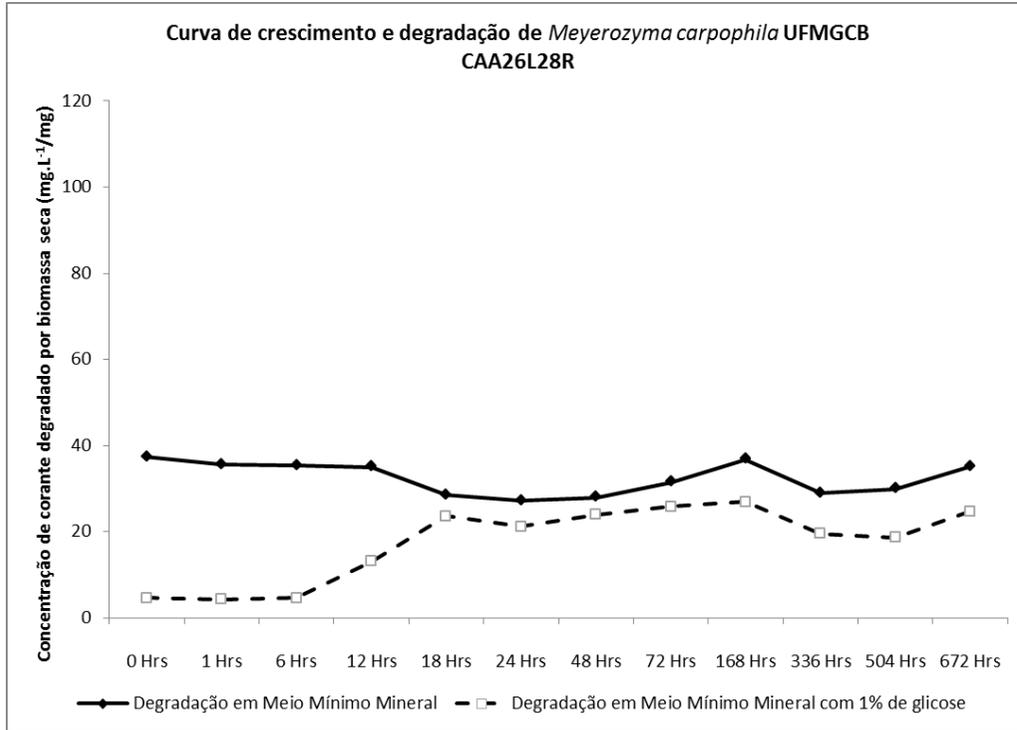
As leveduras, em geral, apresentaram valores de crescimento muito baixos, quase próximo de zero no meio contendo apenas o corante como fonte de carbono (Figura 9). Esse crescimento é inferior ao atingido pelas leveduras quando na presença de meio rico, sem adição de corante, o que indica a toxicidade do RBBR para os isolados fúngicos. As curvas de crescimento dos isolados de *M. carpophila* e *M. guilliermondii* na presença do RBBR e da concentração de corante no meio durante o experimento não apresentam diferenças significativas, pois ocorreu queda da concentração do RBBR maior com 1 hora. Esse fato pode ter ocorrido em decorrência da adsorção da molécula de corante às células, provavelmente, devido à atração eletrostática entre a molécula carregada de RBBR e a superfície celular também carregada (Solís ET AL., 2012). A descoloração se manteve praticamente estável, com uma queda maior na concentração do corante por volta de 7 dias (32% de descoloração) para todos os isolados de leveduras).

Duas das leveduras encontradas com potencial de descolorir RBBR (Figura 9e, f) são basidiomicéticas (*Sporisorium* sp. e *Pseudozyma* sp.) e apresentaram taxas de descoloração próximas das encontradas para as leveduras do gênero *Meyerozyma* (respectivamente 28,8 e 25%), apresentando curvas de crescimento similares. Leveduras basidiomicéticas são pouco citadas como capazes de descolorir corantes, sendo as citadas às espécies *Rhodotorulla minuta*, *Trichosporon multisporum* e *Trichosporon akiyoshidainum* (Martorell ET AL., 2011). Leveduras dos gêneros *Sporisorium* e *Pseudozyma* não são conhecidas na literatura associados à degradação de corantes. Algumas espécies do gênero *Pseudozyma* foram relatadas por sua capacidade de degradar poluentes tóxicos ambientais como plásticos sólidos,

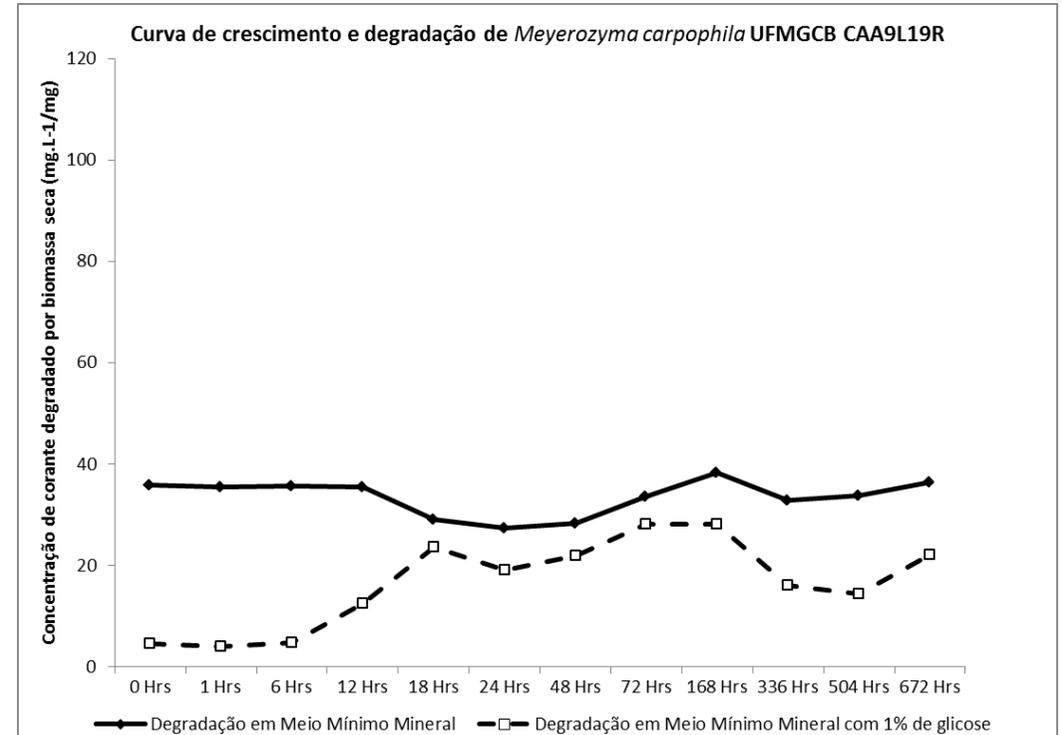
além de serem produtores de cutinases, enzima utilizada como hidrolizante para gorduras e outros compostos (Hyuk-Seong ET AL., 2007; Shinozaki ET AL., 2012).

As leveduras obtidas das amostras de madeira em decomposição deste trabalho atingiram valores de descoloração do corante semelhantes ao atingido pelos fungos filamentosos. De acordo com Martorell et al. (2011), algumas leveduras podem ser utilizadas eficientemente no tratamento de efluentes de resíduos orgânicos, como das indústrias alimentícia, óleo e melação. Além disso, leveduras apresentam vantagens quando comparadas com outros micro-organismos que vem sendo utilizados nos processos de bioremediação, devido a sua alta capacidade de acumular corantes e metais pesados (ex. Pb[II] e Cd [II]), crescimento e descoloração rápido quando comparados com fungos filamentosos e, por isso, têm sido utilizadas com maior frequência em processos de degradação de diferentes corantes *azo* (Solís ET AL., 2012).

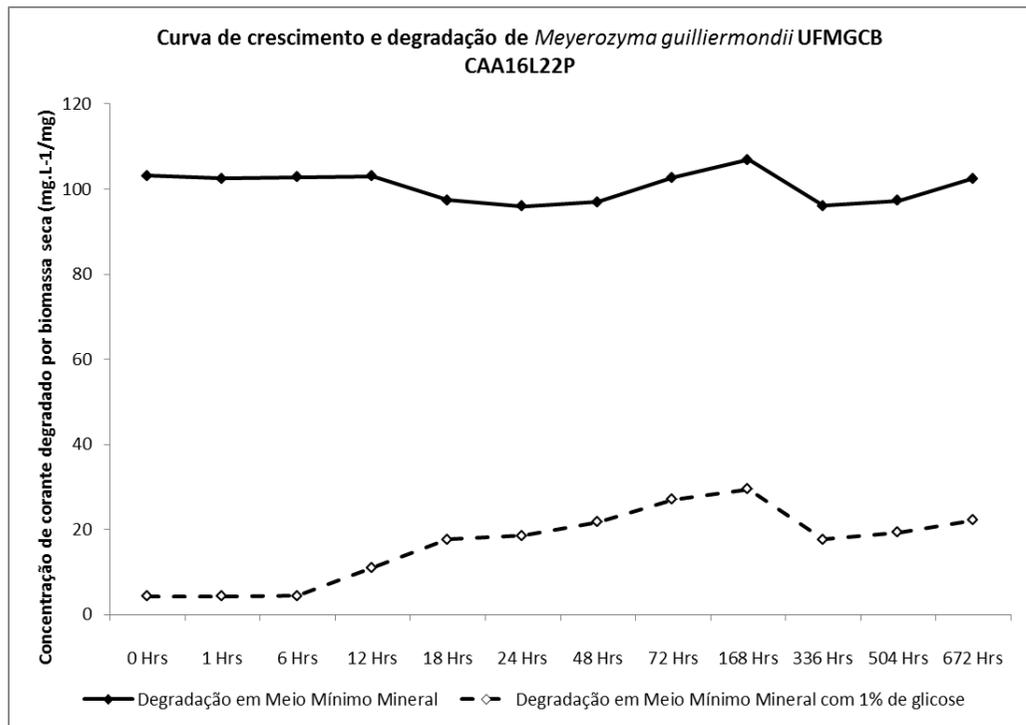
a



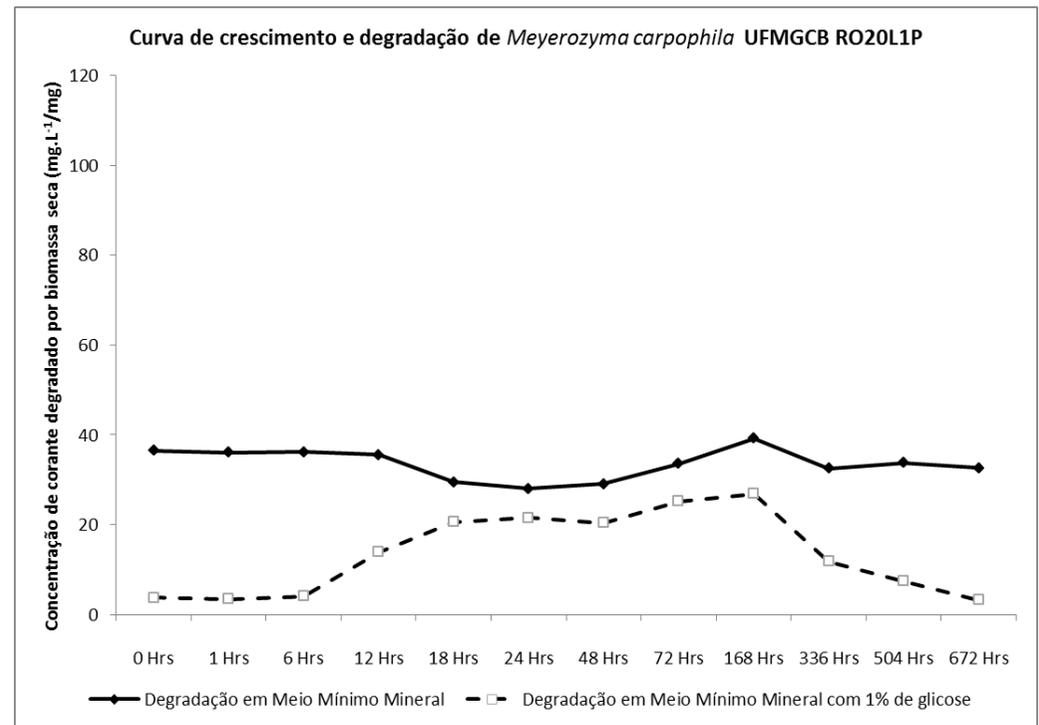
b



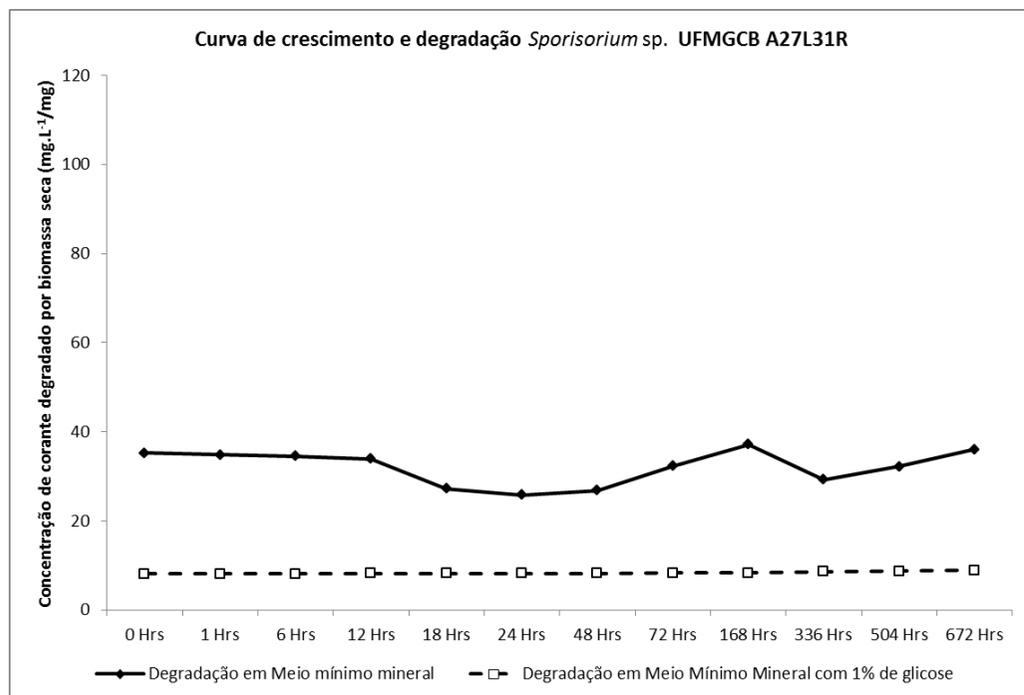
c



d



e



f

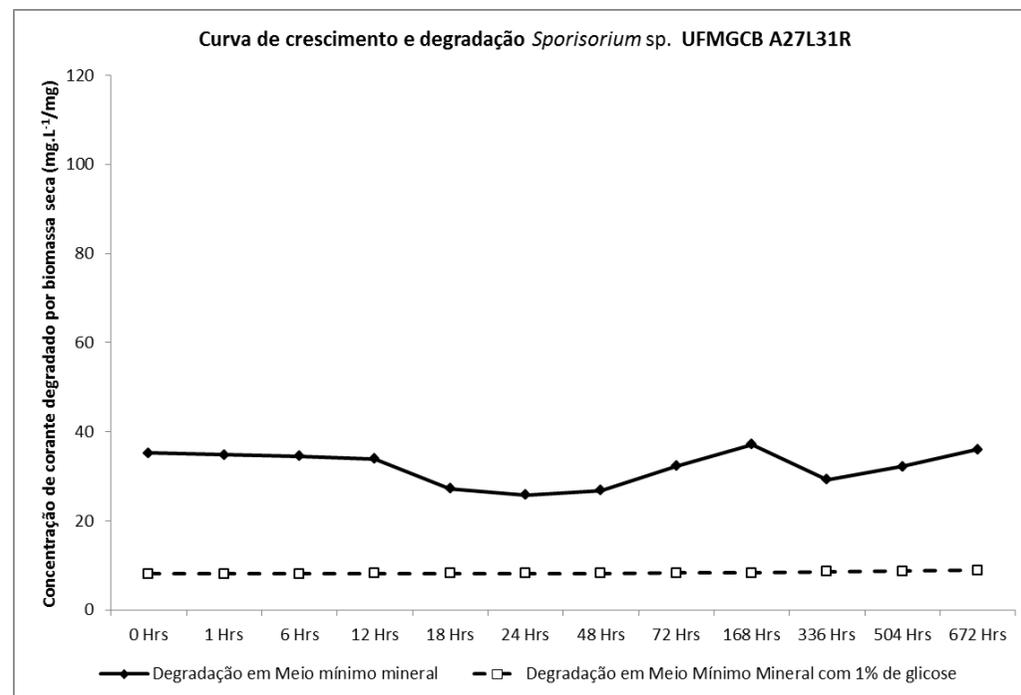


Figura 9. Gráficos de crescimento e degradação das leveduras em meio contendo o corante antraquinônico RBBR. Todas as leituras são resultado da média dos valores em triplicata, corrigidos a partir dos testes controle. a- Gráfico obtido para *Meyerozyma carpophila* UFMGCB CAA26L28R; b- Gráfico obtido para *Meyerozyma carpophila* UFMGCB CAA9L19R; c- Gráfico obtido para *Meyerozyma guillermondi* UFMGCB CAA16L22P; d- Gráfico obtido para *Meyerozyma carpophila* UFMGCB RO20L1P; e- Gráfico obtido para *Sporisorium* sp. UFMGCB CAA27L31R; f- Gráfico obtido para *Pseudozyma* sp. UFMGCB CAA27L30R.

5.1.2. Fungos com potencial para degradação de hidrocarbonetos aromáticos

Dos 50 fungos selecionados pelo teste de triagem como prováveis degradadores de hidrocarbonetos aromáticos, 10 foram considerados iguais após análise do bandeamento do fragmento de (GTG)₅. Dentre os 50 isolados selecionados, 40 foram avaliados quanto ao crescimento a partir da dosagem da biomassa seca e a capacidade de oxidar o aceptor de elétrons DCPIP, indicador utilizado para evidenciar reações envolvidas na degradação de petróleo (Hanson ET AL., 1993; Bücken ET AL., 2011). A utilização do DCPIP com indicador da utilização de petróleo por micro-organismos se baseia no fato que, durante a oxidação microbiana das fontes de carbono, há transferência de elétrons para aceptores como o oxigênio, nitratos e sulfatos (Junior ET AL., 2009). Ao incorporar o indicador DCPIP no meio, é possível inferir a habilidade de o micro-organismo utilizar o petróleo como substrato por meio da mudança de cor do indicador de azul (oxidado) para incolor (reduzido) (Junior ET AL., 2009; Bücken ET AL., 2011). A dosagem da degradação e do crescimento foi realizada com o objetivo de visualizar quais seriam os melhores potenciais degradadores e qual o tempo necessário para a máxima utilização desse poluente (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de biomassa seca (mg) e da porcentagem (%) do indicador DCPIP metabolizado pelos fungos isolados em Petróleo, que foram considerados como potenciais degradadores desse composto na triagem^a.

Espécie^b	Bioma	Biomassa seca (mg)/dia	Porcentagem de residual de DCPIP/dia
<i>Exophiala cf. oligosperma</i> UFMGCB 6470	Caatinga	7,35±0,088	-2±1
<i>Fusarium cf. incarnatum</i> UFMGCB 6480	Caatinga	8,11±0,08	18±2
<i>Fusarium cf. solani</i> UFMGCB 6485	Caatinga	7,85±0,23	17±2,5
<i>F. solani</i> UFMGCB 6478	Caatinga	5,48±0,06	12±1,2
<i>Fusarium sp.</i> UFMGCB 6475	Caatinga	7,23±0,059	-8±0,9
<i>Fusarium sp.</i> UFMGCB 6474	Caatinga	5,51±0,1	12±1
<i>Meyerozyma carpophila</i> UFMGCB CAA9L19R	Caatinga	-0,22±0,01	1,8±0,01
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> UFMGCB CAA16L22P	Caatinga	-0,28±0,01	2,46±0,014
<i>Penicillium simplicissimum</i> UFMGCB 6477	Caatinga	6,89±0,11	0,017±0,002
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> UFMGCB CAA19L25P	Caatinga	-0,17±0,013	2,02±0,012
<i>Pseudozyma sp.</i> UFMGCB CAA27L30R	Caatinga	-0,33±0,014	2,31±0,014
<i>Sporisorium sp.</i> UFMGCB CAA27L31R	Caatinga	-0,37±0,014	2,79± 0,016
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> UFMGCB 6481	Caatinga	7,73±0,37	8,4±1,2
<i>Trichoderma sp.</i> UFMGCB 6492	Caatinga	7,42±0,15	18±3
<i>Cosmospora cf. vilior</i> UFMGCB 6563	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,91±0,1	-0,5±0,3
<i>Hypocrea cf. lixii</i> UFMGCB 6592	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	9,14±0,24	25±4
<i>H.cf. lixii</i> UFMGCB 6596	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,72±0,12	-5,3±0,4

Continuação Tabela 9. Valores de biomassa seca (mg) e da porcentagem (%) do indicador DCPIP metabolizado pelos fungos isolados em Petróleo, que foram considerados como potenciais degradadores desse composto na triagem^a.

Espécie^b	Bioma	Biomassa seca (mg)/dia	Porcentagem de residual de DCPIP/dia
<i>H.cf.lixii</i> UFMGCB 6565	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	7,91±0,11	-18±4,5
<i>H.cf.lixii</i> UFMGCB 6588	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	9,32±0,73	2±0,4
<i>H.lixii</i> UFMGCB 6562	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,38±0,13	11±1
<i>H.lixii</i> UFMGCB 6576	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,84±0,05	5±0,3
<i>H.lixii</i> UFMGCB 6581	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,06±0,069	6,6±0,5
<i>H.lixii</i> UFMGCB 6582	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	5,84±0,04	0,77±0,5
<i>H.lixii</i> UFMGCB 6591	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,99±0,06	3±0,5
<i>Hypocrea</i> sp. UFMGCB 6564	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	7,86±0,16	23±4
<i>Hypocrea</i> sp. UFMGCB 6570	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	7,61±0,11	-0,13±0,6
<i>Penicillium adametzii</i> UFMGCB 6559	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	17,61±1,36	1,5±0,6
<i>Trichoderma cf. koningiopsis</i> UFMGCB 6578	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	5,86±0,05	4±0,3
<i>Trichoderma harzianum</i> UFMGCB 6598	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,99±0,12	12±2
<i>Trichoderma spirale</i> UFMGCB 6579	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,32±0,12	-0,9±0,7
Espécie não identificada UFMGCB 6577	Ecótono Cerrado/Mata Atlântica	6,89±0,07	16±2
<i>Fusarium oxysporum</i> UFMGCB 6821	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	6,56±0,03	3±4
<i>Hypocrea virens</i> UFMGCB 6823	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	29,48±0,24	15±1,6
<i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 6847	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	14,16±0,61	-1,9±1

Conclusão Tabela 9. Valores de biomassa seca (mg) e da porcentagem (%) do indicador DCPIP metabolizado pelos fungos isolados em Petróleo, que foram considerados como potenciais degradadores desse composto na triagem^a.

Espécie^b	Bioma	Biomassa seca (mg)/dia	Porcentagem de residual de DCPIP/dia
<i>Talaromyces amestolkiae</i> UFMGCB 6832	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	7,04±0,48	22±3
<i>T. amestolkiae</i> UFMGCB 6833	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	7,13±0,04	15±2
<i>Trichoderma koningiopsis</i> UFMGCB 6834	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	6,34±0,13	21±3
<i>T. koningiopsis</i> UFMGCB 6838	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	8,89±0,44	22±3
<i>Trichoderma</i> sp. UFMGCB 6826	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	15,5±2,39	16±1,8
<i>Trichoderma spirale</i> UFMGCB 6822	Ecótono Cerrado/Mata Amazônica	23,62±0,13	0,51±0,17

^aOs Fatores biomassa seca (mg) e concentração do indicador DCPIP metabolizado foram considerados a partir da média calculada para o total de dias do experimento, servindo como base para seleção dos fungos com melhor capacidade de utilizar petróleo como única fonte de carbono. ^bEspécies isoladas em petróleo e selecionadas em triagem anterior com o nome da espécies e seu número de identificação na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMGCB).

De todos os fungos avaliados, 45% conseguiram reduzir a coloração do DCPIP acima ou igual a 60% em 45 dias. Entretanto, estes resultados não indicam necessariamente que houve a degradação da mesma porcentagem do petróleo presente, mais sim que está havendo uma reação de oxirredução e qual velocidade ela modifica o meio de cultura. Como o petróleo é a única fonte de carbono disponível para os fungos, a reação de oxirredução provavelmente está atuando sobre sua molécula. Geralmente, para testes de degradação de petróleo é seus derivados, o indicador DCPIP é utilizado para uma avaliação qualitativa (Hanson ET AL., 1993; Junior ET AL., 2009), porém, seguindo estudo de Bücken et al. (2011), esse indicador também é utilizado por sua capacidade de avaliar quantitativamente a atividade oxiredutora das enzimas fúngicas, podendo indicar o potencial dos fungos obtidos em meio contendo petróleo de degradar as moléculas presentes nesse poluente.

Fungos do gênero *Trichoderma/Hypocrea* corresponderam a 82,7% dos fungos obtidos e selecionados como candidatos a bons degradadores de hidrocarbonetos aromáticos, com destaque para a espécie *Hypocrea lixii* (56,3% dos isolados), cuja capacidade em degradar xenobióticos aromáticos presumidamente sob vias oxidativas já foi relatada por Smith (1995). A presença do petróleo durante o isolamento pode ter atuado como um agente seletivo para as espécies desse gênero presentes na madeira em decomposição das regiões amostradas. Espécies de *Trichoderma* apresentam alta taxa de sucesso como colonizadores de seus habitats (predominantemente material celulósico), o que ocorre tanto por sua eficiência na utilização do substrato disponível no meio quanto por sua capacidade de secretar metabólitos secundários e enzimas (Schuster & Schmoll, 2010). Sua resposta ao ambiente se dá na forma de regulação do crescimento, conidiação e produção enzimática (Schuster & Schmoll, 2010), o que são requisitos a serem explorados no tratamento de poluentes industriais tóxicos.

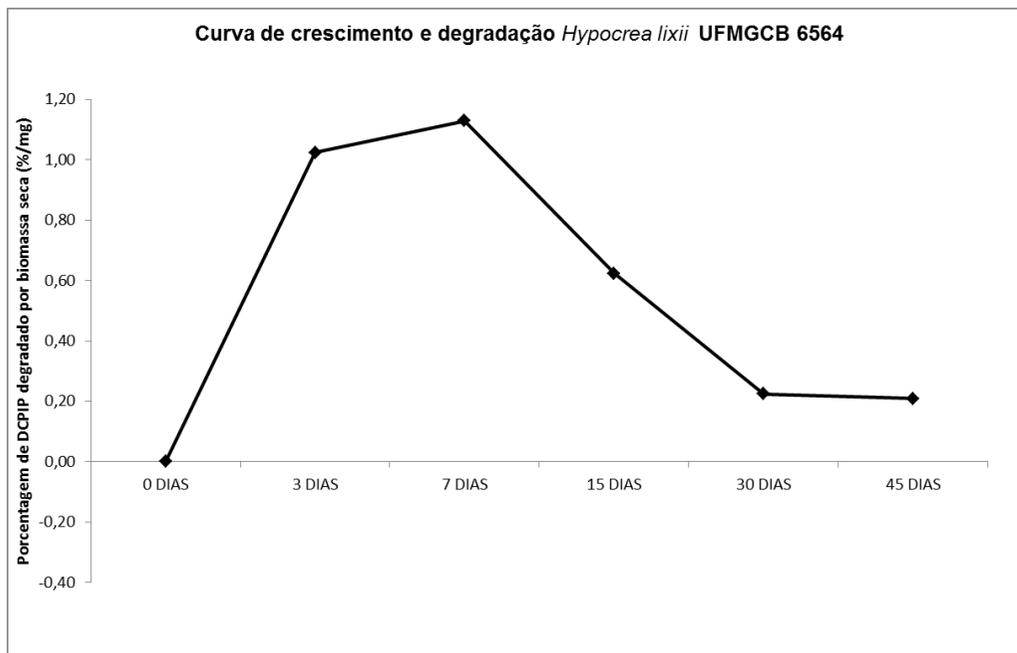
De todos os fungos filamentosos avaliados, 4 converteram DCPIP de forma mais eficiente, os quais foram selecionados como potenciais degradadores de hidrocarbonetos aromáticos (Figura 10), sendo que, 2 deles são isolados de *H. lixii* obtidos do bioma Caatinga (Figura 10a) e ecótono Cerrado/Mata Atlântica (Figura 10b); os outros 2 são as espécies *Exophiala* cf. *oligosperma* e *Penicillium simplicissimum*. Ambos os isolados de *H. lixii* (figura 10a e b) apresentaram curvas semelhantes de redução de DCPIP e crescimento com valor máximo de biomassa no 15º dia, com posterior queda, indicando morte da cultura. Já a quebra do indicador DCPIP caiu de forma constante até o 15º dia, quando o processo de redução do indicador DCPIP começa a estabilizar, atingindo seu platô mais baixo no 30º e 45º dia. Apesar de serem isolados frequentemente obtidos de ambientes contaminados, a influência

das espécies de *Trichoderma* para a degradação de HPA tem sido escassamente estudada (Argumedo-Delira ET AL., 2012).

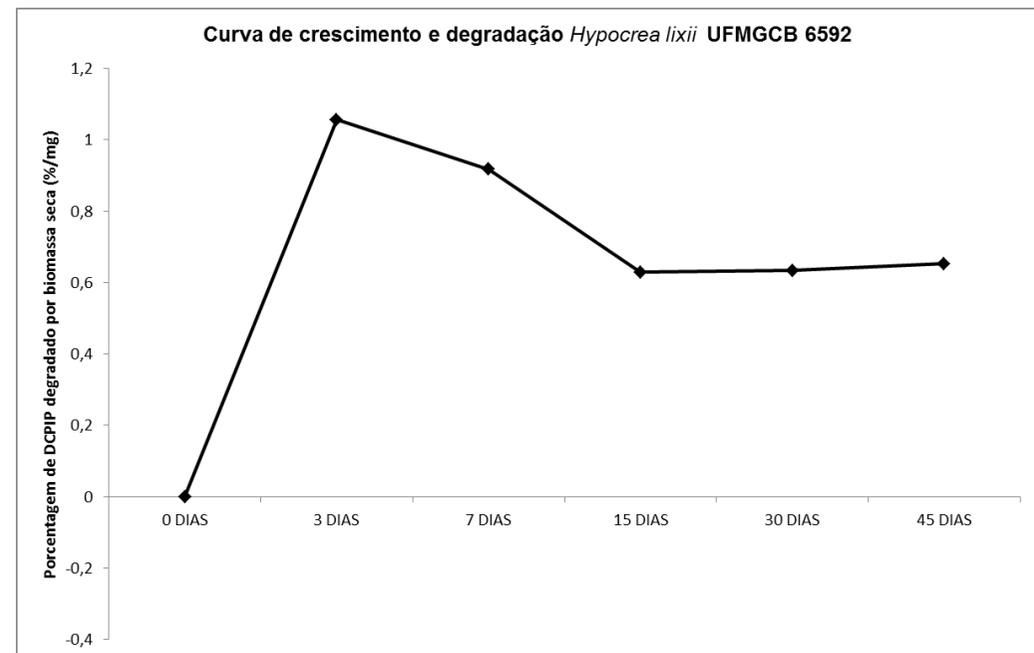
O isolado de *Exophiala* cf. *oligosperma* UFMGCB 6470, encontrado na Caatinga, apresentou a descoloração mais rápida do indicador, atingindo seu ponto mais baixo no 3º dia, o que pode indicar uma utilização mais rápida do petróleo no meio de cultura. Esse fato é corroborado pela curva de crescimento que atinge seu pico no mesmo período com crescimento discreto até o fim do experimento. Espécies de *Exophiala* são reconhecidas como degradadores de diferentes classes de xenobióticos tais como hidrocarbonetos aromáticos (Prenafeta-Boldú ET AL., 2006). *Exophiala oligosperma* foi isolada de filtro de ar exposto a tolueno e tem sido repetidamente encontrado em ambientes aquecidos, associados à presença humana e pobres em nutrientes, como saunas e piscinas, podendo causar doença na pele (De Hoog ET AL., 2003; Prenafeta-Boldú ET AL., 2006).

Espécies do gênero *Penicillium* já foram relatadas como assimiladoras de hidrocarbonetos aromáticos, com espécies crescendo na presença de moléculas aromáticas de cadeia longa (Elshafie ET AL., 2007). *Penicillium simplicissimum* foi isolado em efluentes de indústrias de papel sendo relatado como degradador de estireno, porém esse resultado não pode ser reproduzido por outros estudos (Prenafeta-Boldú ET AL., 2006). *Penicillium simplicissimum* UFMGCB 6477 foi capaz de crescer tendo petróleo como única fonte de carbono, reduzindo DCPIP de forma relativamente constante até o fim do teste. Seu crescimento se repete em um ciclo constante, com picos no 3º, 15º e 45º dias, indicando que talvez esse isolado consiga crescer nesse substrato, tornando-o um bom candidato para a utilização em escala industrial.

a



b



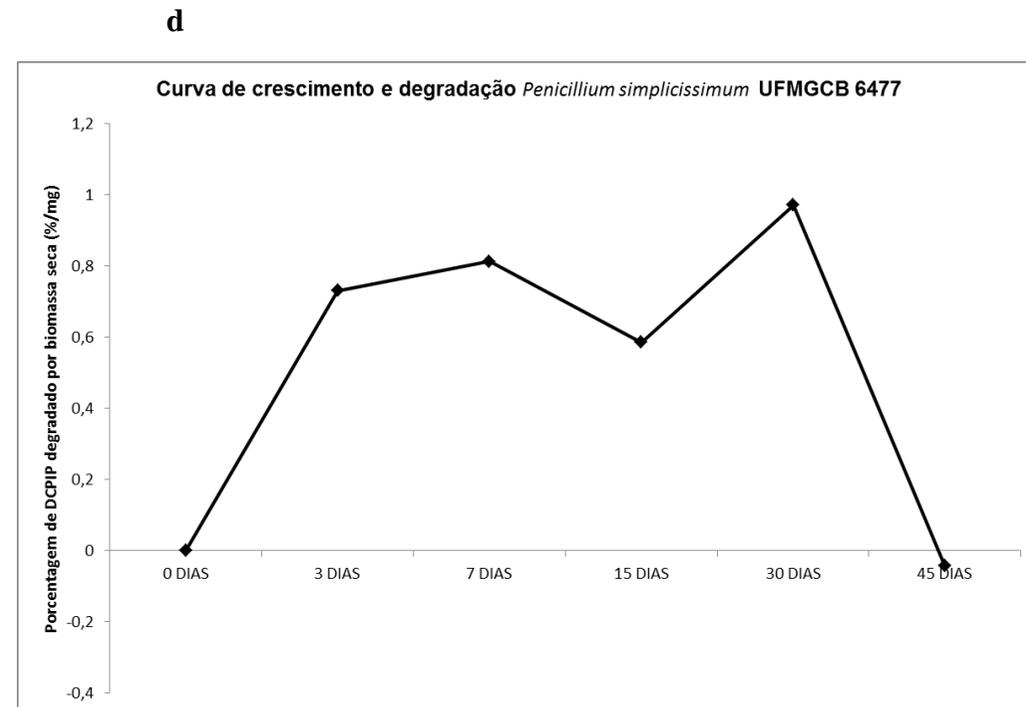
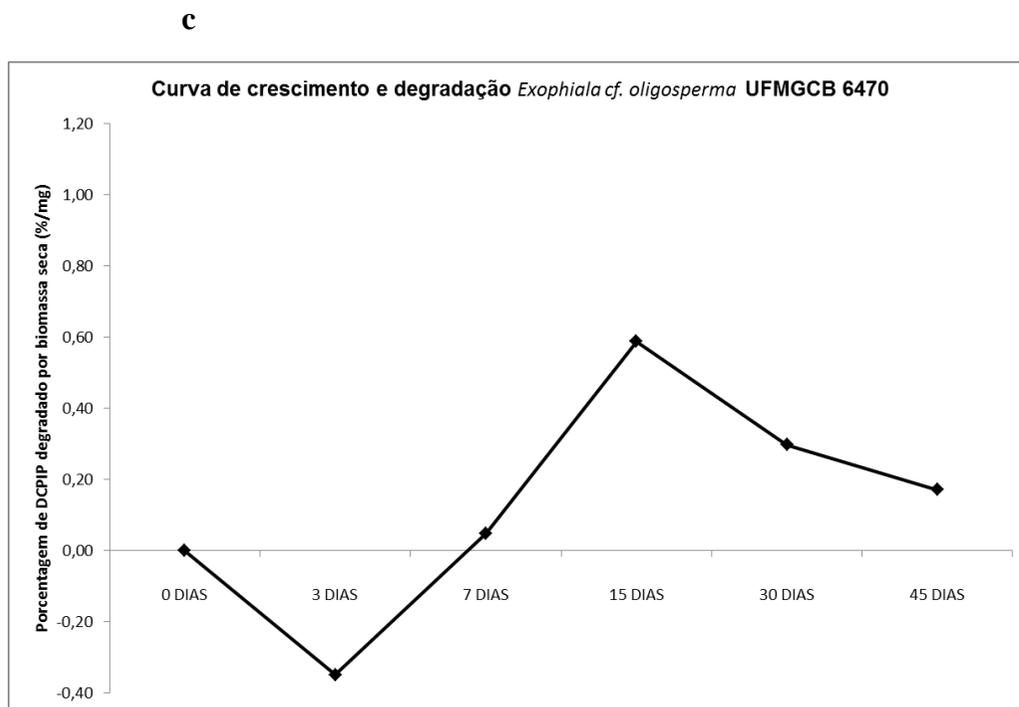


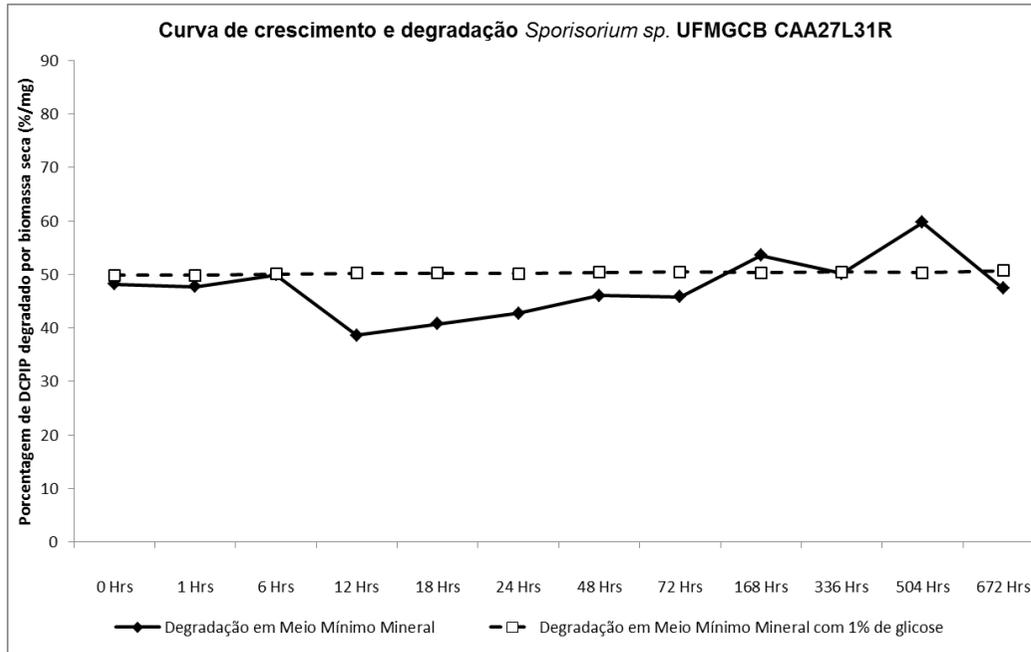
Figura 10. Gráficos de crescimento e degradação das leveduras em meio contendo petróleo como única fonte de carbono acrescido do indicador DCPIP. Todas as leituras são resultado da média dos valores em triplicata, corrigidos a partir dos testes controle. a- Gráfico obtido para *Hypocrea lixii* UFMGCB 6564; b- Gráfico obtido para *Hypocrea lixii* UFMGCB 6592; c- Gráfico obtido para *Exophiala cf. oligosperma* UFMGCB 6470; d- Gráfico obtido para *Penicillium simplicissimum* UFMGCB 6477.

Todas as 5 leveduras selecionadas por sua capacidade de reduzir > 60% do indicador DCPIP, apresentaram curvas de crescimento e de utilização do DCPIP similares, com queda crescente no crescimento em paralelo com queda na detecção do indicador no meio. Ambas as curvas de crescimento e redução do indicador apresentam pontos de picos e platôs no mesmo período de tempo, indicando que há uma relação direta entre os processos. Uma hipótese é que, o crescimento negativo apresentado pelas leveduras sugira um evento de autólise das células, o que estaria acelerando a liberação de metabólitos celulares no meio de cultura (Emri ET AL., 2008).

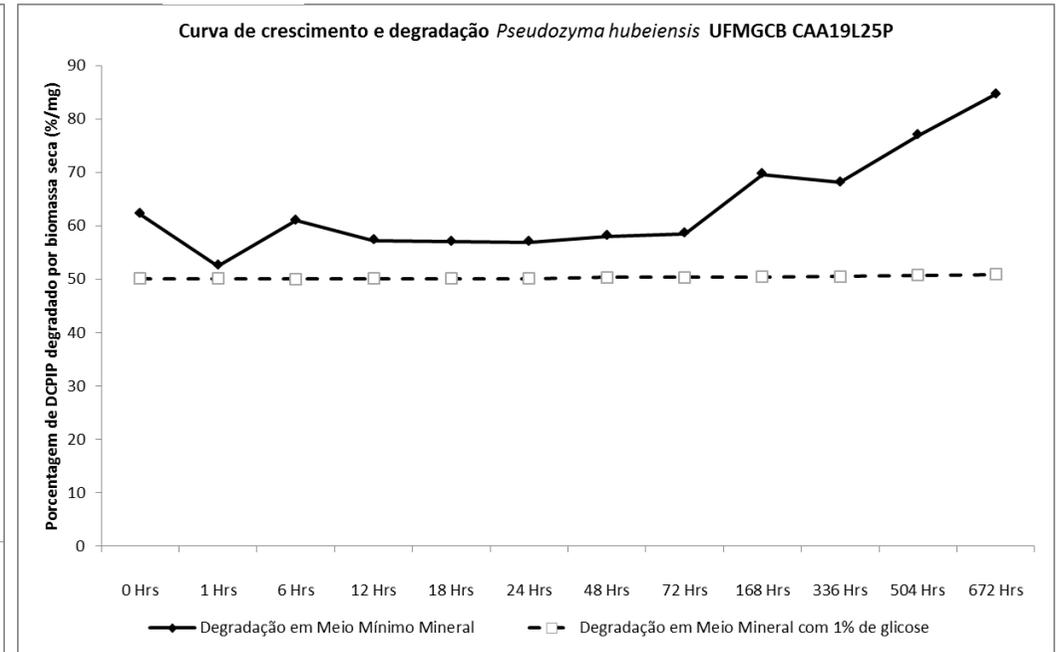
A comparação das curvas de crescimento em meio rico e com petróleo indicam que a morte das leveduras pode ter ocorrido por falta de carbono e energia, já que está é a principal variável entre os meios de crescimento (Figura 11). Esse fato pode ser confirmado pela retomada do crescimento das leveduras após 48 horas com não redução na presença do indicador em meio contendo petróleo e 1% de glicose (Figura 11a). A potencial nova espécie de *Sporisorium* sp. CAA27L31R apresentou a maior redução na leitura do DCPIP dentre as espécies testadas, indicando uma produção potencialmente mais de enzimas, o que aliado com a autólise pode permitir seu uso eficiente na limpeza de efluentes de petróleo (Emri ET AL., 2008). Leveduras do gênero *Sporisorium* não são conhecidas como degradadoras de petróleo, porém algumas espécies têm sido relatadas como capazes de produzir lipases ou degradar compostos fenólicos (Hesham ET AL., 2006) sendo, portanto, consideradas promissoras para o processo de tratamento de locais contaminados com petróleo e seus derivados.

Espécies de *Pseudozyma* foram relatadas como produtoras de glicolípides biosurfactantes e lipases, com capacidade documentada de degradar plástico (Hyuk-Seong ET AL., 2007). A presença de *Meyerozyma guillermondii* já foi documentada durante todo o processo de degradação de HPAs em reatores de lodo contendo óleos intemperizados, sendo que este estudo recomendou a utilização dessa espécie cometabolizando os poluentes com outra fonte de energia (Hesham ET AL., 2006). O isolado dessa espécie, UFMGCB CAA16L22P obteve resultados semelhantes para a redução do DCPIP tanto na presença quanto na ausência de glicose.

a



b



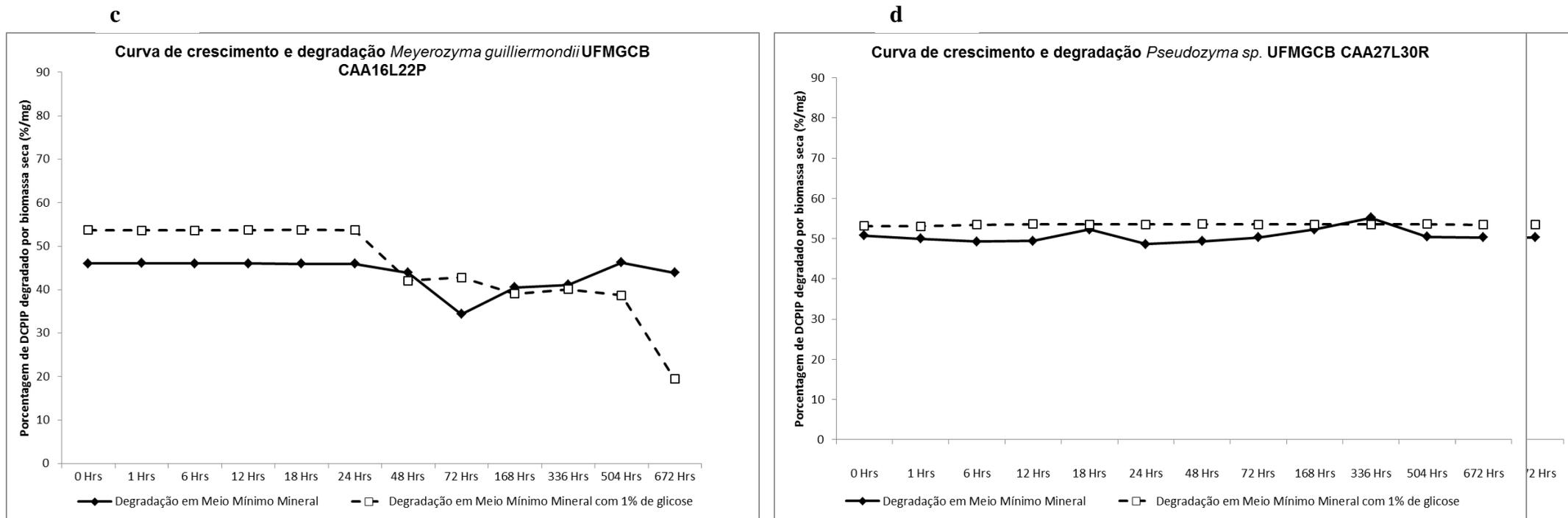


Figura 11. Gráficos de crescimento e degradação das leveduras em meio contendo petróleo como fonte de carbono acrescido do indicador DCPIP. Todas as leituras são resultado da média dos valores em triplicata, corrigidos a partir dos testes controle. a- Gráfico obtido para *Pseudozyma hubeiensis* UFMGCB CAA19L25P; b- Gráfico obtido para *Sporisorium sp.* UFMGCB CAA27L31R; c- Gráfico obtido para *Meyerozyma guilliermondii* UFMGCB CAA16L22P; d- Gráfico obtido para *Pseudozyma sp.* UFMGCB CAA27L30R.

5.2. Avaliação da biodegradação

5.2.1. Carbono Orgânico Total

A determinação de carbono orgânico total (COT) é recomendada para prevenir a liberação de efluentes contaminados ou utilização de água com a presença de compostos orgânicos que possam causar danos, já que esse método é capaz de detectar, teoricamente, a presença de todos os tipos de compostos orgânicos (Thomas ET AL., 1999). A quantificação de COT foi utilizada para avaliar se os fungos que apresentaram a maior capacidade de descolorir os corantes também foram capazes de quebrar e transformar as moléculas de Astrazon e RBBR. O isolado *Fusarium oxysporum* UFMGCB 6451 foi selecionado no teste de dosagem de biomassa e redução de cor como melhor degradador do corante *azo* Astrazon. Nesse teste, o fungo apresentou um aumento na porcentagem de descoloração até o 15º dia sendo que, no 30º dia houve uma leitura negativa dessa porcentagem (Tabela 10).

Tabela 10. Porcentagem da redução de cor dosada em espectrofotômetro e porcentagem da redução de carbono total presente em amostra contendo o corante *azo* Astrazon como única fonte de carbono e o fungo *Fusarium oxysporum* UFMGCB 6451 em fase de crescimento.

Dias	Porcentagem (%) de descoloração do corante (Espectrofotômetro)	Porcentagem (%) de redução da presença de carbono orgânico total (COT)
0	0	0
3	0	-15,8929
7	0,8	-9,56169
15	0,35	-7,66234
30	-1,52	-3,87987
45	1,14	Sem dosagem

^aPorcentagem de corante descolorida do meio de cultura dosados em espectrofotômetro. A concentração inicial foi medida no tempo 0 sendo que os valores de porcentagem apresentados para os dias seguintes são relativos a esta concentração inicial. ^bPorcentagem de carbono presente no meio de cultura dosados em aparelho de COT. A concentração inicial foi medida no tempo 0 e considerada como 100%, sendo que os valores de porcentagem apresentados para os dias seguintes são relativos a esta concentração inicial. ^cNão foram preparadas amostras de corante para a dosagem em 45 dias.

As dosagens de COT (Tabela 10) indicam um aporte de carbono no meio no 3º dia com subsequente redução de sua concentração no meio. Essa redução ocorreu de forma

contínua durante os 30 dias de dosagem, porém, sem atingir valor menor que o inicial (Figura 12). A diferença de descoloração e de carbono total dosado para esse corante não foram grandes o suficientes para indicar, sem dúvidas, a utilização de Astrazon por esta espécie, apesar da evidência visual de diferença de cor.

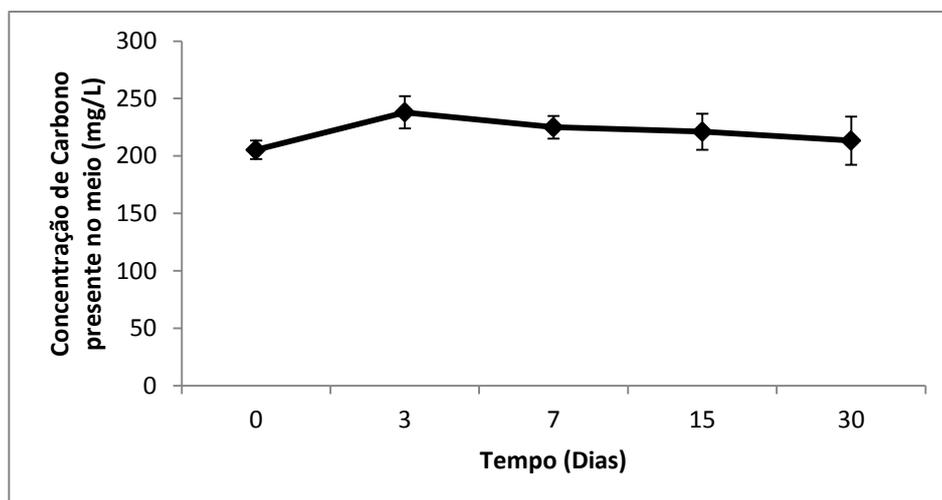


Figura 12. Curva de Carbono Orgânico Total presente em meio contendo Astrazon como única fonte de carbono, na presença de *Fusarium oxysporum* UFMGCB 6451 dosado por Carbono orgânico total.

O isolado *Fusarium cf. solani* UFMGCB 6882 foi selecionado por ter apresentado a maior capacidade de descolorir o corante RBBR. Esse fungo apresentou uma redução gradual durante os 45 dias, sendo detectado apenas 5,64% do corante no final desse período, pela dosagem no espectrofotômetro (Tabela 11). A dosagem da redução de RBBR por meio do COT também seguiu a mesma tendência encontrada para o corante Astrazon, com um aumento da concentração de carbono no 3º dia de experimento. Diferentemente do que ocorreu para o Astrazon, a porcentagem de carbono presente aumentou gradualmente e atingiu valor máximo com 30 dias.

Tabela 11. Porcentagem da redução de cor dosada em espectrofotômetro e porcentagem da redução de carbono orgânico total presente em amostra contendo o corante antraquinônico RBBR como única fonte de carbono e o fungo *Fusarium cf. solani* UFMGCB 6882 em fase de crescimento.

Dias	Porcentagem (%) de descoloração do corante (Espectrofotômetro) ^a	Porcentagem de redução da presença de carbono orgânico total (TOC) ^b
0	0	0
3	73,64	-3,30843
7	88,17	-8,50231
15	62,19	-12,4867
30	36,22	-17,6094
45	5,64	Sem dosagem ^c

^aPorcentagem de corante descolorida do meio de cultura dosados em espectrofotômetro. A concentração inicial foi medida no tempo 0 sendo que os valores de porcentagem apresentados para os dias seguintes são relativos a esta concentração inicial. ^bPorcentagem de carbono presente no meio de cultura dosados em por aparelho de COT. A concentração inicial foi medida no tempo 0 e considerada como 100%, sendo que os valores de porcentagem apresentados para os dias seguintes são relativos a esta concentração inicial. ^cNão foram preparadas amostras de corante para a dosagem em 45 dias.

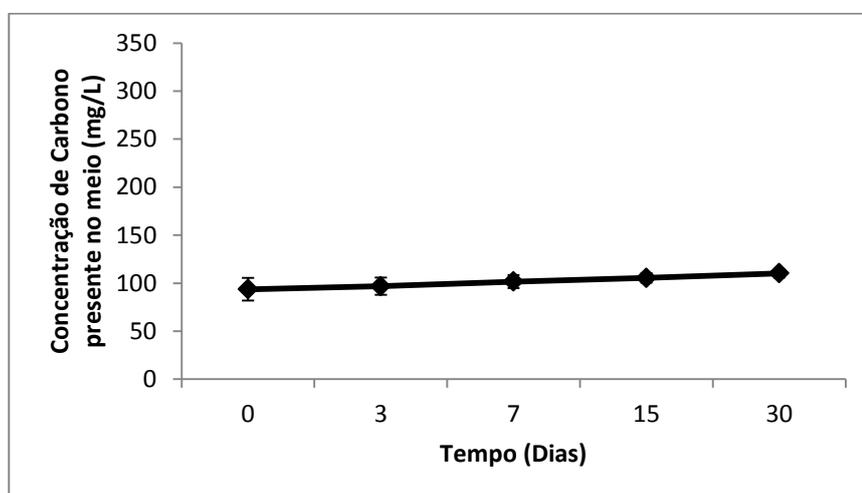


Figura 14. Curva de Carbono Orgânico Total presente em meio contendo Remazol Brilhante Azul R como única fonte de carbono, na presença de *Fusarium cf. solani* UFMGCB 6451 dosado por Carbono Orgânico Total.

Uma redução no valor de COT indica a mineralização do corante presente no meio (Saratale ET A., 2009), porém, nesse caso não houve uma redução desses valores. Assim, a redução da cor pode ter sido resultado da quebra das ligações químicas responsáveis pela cor

o que ocorreria sem a mudança do teor de carbono. Apesar da quebra das ligações de um corante ser um importante passo na inativação das moléculas, a não redução da quantidade de carbono pode indicar a formação de aminas aromáticas, subprodutos da quebra de corantes azólicos ou que contenha nitrogênio e que são consideradas carcinogênicas (Saratale ET AL., 2009 e Novotný ET AL., 2011). Sendo assim, apesar de sua capacidade de produzir enzimas que descolorem as moléculas de Astrazon e RBBR ou de retirá-las do meio por adsorção, esses fungos não seriam considerados bons candidatos para o tratamento das moléculas de corantes por bioremediação caso sejam capazes de gerar aminas aromáticas.

Porém, a não redução da concentração de carbono deixa uma pergunta: qual foi a fonte de carbono utilizada pelos fungos para seu crescimento se a única fonte de carbono e, conseqüentemente, de energia, presente no meio são os corantes? Um estudo de Lamour publicado em 2000 concluiu que fungos crescendo em ambientes de baixa concentração de carbono suprem a necessidade desse nutriente por meio de retirada da reserva presente no citoplasma para ser incorporada na biomassa. Esse resultado é corroborado pelo achado que, fungo da espécie *Fusarium oxysporum* crescido em meio sem a adição de carbono, apresenta crescimento críptico, por meio da utilização de dióxido de carbono atmosférico ou da reciclagem de nutrientes (Parkinson ET AL. 1991). Ainda de acordo com estudo feito por Schnürer & Paustian publicado em 1986, o crescimento em ambientes com pouca disponibilidade de carbono seria possível graças à translocação desse nutriente presente no citoplasma para as regiões apicais do fungo, levando à formação de uma hifa altamente diferenciada, com regiões de crescimento ativo e degenerada ou em autólise, no mesmo micélio, gerando um crescimento enfraquecido.

Sendo assim, não é possível afirmar que esses fungos são bons degradadores de corante, já que nas condições estudadas não houve diminuição do COT, necessitando de maiores estudos, tal como maior tempo de incubação do fungo na presença dos poluentes a fim de verificar se a quebra da molécula ocorre ou não em um maior tempo de incubação dos corantes na presença dos fungos. Outra possibilidade é que o fungo esteja usando os outros nutrientes presentes no meio mínimo mineral para seu crescimento em detrimento do corante.

5.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A dosagem em CLAE foi feita com o intuito de quantificar com exatidão a capacidade dos fungos selecionados em teste anterior em utilizar e degradar hidrocarboneto policíclico

aromático. Porém, como este composto tem uma composição variável e complexa, optamos por selecionar apenas um composto, comum em petróleo, para essa dosagem. Assim, selecionados antraceno, um hidrocarboneto policíclico aromático que apresenta baixa solubilidade em água (0,07 mg/L) (Eibes ET AL., 2006). Sua estrutura contendo 3 anéis de benzeno é comum a vários das moléculas recalcitrantes e tóxicas presentes no petróleo o que, aliada a sua baixa disponibilidade no meio, faz dessa molécula um ótimo modelo (Bezalel ET AL., 1996).

Os resultados desse experimento foram analisados em relação à redução da área da curva para o tempo e comprimento de onda determinados. O resultado obtido não foi conclusivo visto que houve um aumento da porcentagem de antraceno presente no meio. Entretanto, novas análises devem ser feitas de forma a descartar erros durante o experimento. Aumento dos dias de incubação dos fungos na presença de antraceno pode evidenciar sua degradação posterior.

6. CONCLUSÕES

De acordo com o último Inventário de Liberação de Compostos Tóxicos publicado pelo departamento de proteção de meio ambiente, só nos Estados Unidos foram lançados, em 2011, cerca de 4 bilhões de toneladas de compostos químicos tóxicos no ambiente. O acúmulo dessas substâncias no ambiente é resultado da falta de degradadores de ocorrência natural para estes compostos. A partir dos resultados desse estudo, é possível concluir que existe uma elevada diversidade de fungos presentes em ambientes naturais tropicais com capacidade para crescer tendo compostos poluentes como única fonte de carbono. A detecção desses fungos capazes de crescer em poluentes, sem ter sido previamente expostos a ambientes contaminados, é importante por indicar seu potencial quanto à produção enzimas ou outros metabólitos capazes de atuar sobre moléculas poluentes. Assim, esse estudo indica que fungos presentes em ecossistemas tropicais naturais podem representar bons candidatos para o processo de bioremediação de poluentes aromáticos.

Os fungos que apresentaram maior capacidade de crescer e processar os poluentes foram isolados do bioma Caatinga, evidenciado a importância de inventários taxonômicos de fungos presentes naturais. Além disso, a pesquisa em ambientes naturais permitiu evidenciar a ocorrência de espécies relatadas pela primeira vez como capacidade de crescer nos poluentes estudados.

Apesar dos testes terem mostrado que os fungos obtidos tem capacidade tanto de crescer quanto de descolorir os corantes Astrazon e RBBR e o indicador redox DCPIP em petróleo, não foi possível confirmar essa capacidade na dosagem desses poluentes pelos métodos quantitativos COT e CLAE. Mais experimentos visando entender de que forma esses poluentes são afetados pelo crescimento fúngico e quais fatores abióticos afetam essa provável degradação são necessários.

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- “Identificação Molecular de Fungos Isolados de Efluente Industrial com Potencial de Degradação de Corantes Têxteis”, apresentado na forma de pôster no XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, realizado no Centro e Artes e Convenções da UFOP;
- “Diversidade de Fungos Degradadores de corante e hidrocarbonetos aromáticos isolados de madeira em decomposição”, apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM);
- “Caracterização de fungos Ligninolíticos capazes de descolorir o corante Remazol azul brilhante R (RBBR)”, apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM);
- “Diversidade de fungos isolados de madeira em decomposição com potencial para degradação de hidrocarbonetos derivados de Petróleo”, apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM);
- “Diversidade de fungos isolados de madeira em decomposição com potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos”, apresentado na XX SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA da UFMG, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa;
- “Caracterização de fungos ligninolíticos para testes de degradação do corante Astrazon”, apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis, 2012.

ALMEIDA, D.A.C.; IZABEL, T.S.S., GUSMÃO, L.F.P. Fungos conidiais do bioma Caatinga I. Novos registros para o continente americano, Neotrópico, América do Sul e Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, p. 043-053, 2011.

ARORA, S.; SAINI, H.S.; SINGH, K. Effect of Dye Structure on the Decolorisation Efficiency of *Candida Tropicalis* and *Bacillus Firmus*. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v.2, p.2-4, 2011.

BARTHA, R. & BOSSERT, I. The treatment and disposal pf petroleum wastes. **Petroleum Microbiology**, R.M. Atlas Ed., p. 553-578, Macmillan, New York, NY , USA, 1984.

BENTO, D. M. Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. Rio Grande. Departamento de Geociências, 2005. (Dissertação de Mestrado).

BEZALEL, L.; HADAR, Y.; FU, P.P; FREEMAN,J.P; CERNIGLIA, C.E. Initial oxidation products in the metabolism of Pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the White rot fungi *Pleurotus ostreatus*. **Applied and environmental Microbiology**, v.62, no 7, p.2554-2559, 1996.

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

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N.A.; ROESCH, L.F.; SEMINOTTI R.J.J.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p.172-178, 2011.

CARVALHO, C.R.; GONÇALVES, V.N.; PEREIRA, C.B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.; ALVES, T.M.A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M.E.G.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. The diversity and biological activity of the endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v.57, p.95-107, 2012.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 42, p.181-184, 1967.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y-H.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, p.587–595, 2004.

CHANG, A. J.; FAN, J.; WEN, X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 72, p. 26-30, 2012.

COLLINS, S.L.; SINSABAUGH, R.L.; CRENSHAW, C.; GREEN, L.; PORRAS-ALFARO, A.; STURSOVA, M.; ZEGLIN, L.H. Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. **Journal of Ecology**, v.96, p.413-420, 2008.

DAS, N. & CHANDRAN, P. Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, v.2011, p. 1-13, 2010.

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

DE LORENZO, V. Systems biology approaches to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 579–589, 2008.

DENG, J., CARBONE, I., AND DEAN, R.A. The evolutionary history of cytochrome P450 genes in four filamentous Ascomycetes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 30, 2007.

DENG, Y.; ZHANG, Y.; HESHAM, A.;LIU, R.;YANG, M. Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. **Applied Microbial and cell physiology**, v. 86, p. 1933-1939, 2010.

DRENOVSKY, R.E.; STEENWERTH, K.L.; JACKSON,L.E.; SCOW, K.M. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, p. 27–39, 2010.

DRUZHININA. I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews – Microbiology**, v.9, p. 749-759, 2011.

EIBES, G.; CAJTHAML, T.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. **Chemosphere**, v.64, p. 408–414, 2006.

EICHELEROVÁ, I.;HOMOLKA, L.; BENADA, O.; KOFRONOVÁ; O. HUBÁLEK, T.; NERUD,F. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. **Chemosphere**, v.69, p.795-802, 2007.

ELSHAFIE, A.; ALKINDI, A.Y.; AL-BUSAIDI, S.; BAKHEIT, C.; ALBAHRY, S.N. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1692–1696, 2007.

EMRI, T.; MOLNÁR, Z.; SZILÁGYI, M.; PÓCSI, I. Regulation of Autolysis in *Aspergillus nidulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, p.211–220, 2008.

EPA: UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Toxic Release Inventory (TRI): National Analysis Overview 2011, 2013.

ERTUGRUL, S.; SAN, N.O., DÖNMEZ, G. Treatment of dye (Remazol Blue) and heavy metals using yeast cells with the purpose of managing polluted textile wastewater. **Ecological engineering**, v. 35, p. 128-134, 2009.

FATTA-KASSINOS, D.; BESTER, K.; KÜMMERER, K. (eds.). Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies, Environmental Pollution . Capítulo 2. **Springer Science + Business Media**, v.16, p. 27-50,2010.

FAULON, J.; HATCHER, P.G. Is There Any Order in the Structure of Lignin? **Energy & Fuels**, v.8, p. 402-407,1994.FIELD, J.A.; JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G. & DE BONT, J.A.M Screening for lignolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. **Tibtech**, v. 111, p. 44-49, 1993.

FIELD, J.A.; DE JONG, E.; COSTA, G.F.; DE BONT, J.A.M. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by New Isolates of White Rot Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2219-2226, 1992.

FIERER, N. & JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.103, p.626–631, 2006.

FISHER, R.A.; CORBERT, A.S.; WILLIAMS, C.B. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. **The Journal of animal ecology**, v.12, p.42-58, 1943.

FOURCAUDE, F.; DELAWARDE, M.; GUIHARD, L.; NICOLAS, S.; AMRANE, A. Electrochemical Reduction Prior to Electro-Fenton Oxidation of Azo Dyes: Impact of the Pretreatment on Biodegradability. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p.1385-1395.

HALME, P & KOTHIAHO, J.S. The importance of timing and number of surveys in fungal biodiversity research. **Biodiversity and Conservation**, DOI 10.1007/s10531-011-0176-z, 2011.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4(1), p 9, 2001. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

HANSON. K. G.; DESAI, DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potencial crude oil microorganisms. **Biotechnology techniques**, v.7, p145-148, 1993.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 9, p. 177-192, 2011.

HIDAYAT, A.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. Determination of chrysene degradation under saline conditions by *Fusarium* sp. F092, a fungus screened from nature. **Fungal biology**, v. 116, p.706-714, 2012.

HYUK-SEONG, S.; HYUN-JU U.; JIHO M.; SUNG-KEUN R.; TAE-JU C.; YANG-HOON K.; JEEWON L. *Pseudozyma jejuensis* sp.nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 1035–1045, 2007.

JUNGHANNS, C.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technology**, v.99, p. 1225–1235, 2008.

JUNIOR, J.S.; MARIANO, A.P.; DE ANGELIS D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.2774-2778, 2009. <http://www.sei.ba.gov.br/>. Acessado em Junho de 2011.

KALYANI, D.; DHIMAN S.S.; KIM H.; JEYA M.; KIM I.W.; LEE J.K. Characterization of a novel laccase from the isolated *Coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass. **Process Biochemistry**, v.47, p.671-678, 2012.

KIRK, T.K; FARRELL, R.L. Enzimatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v41, p.465-505, 1987.

KOIRE, A. M. AND CAVALCANTI, A. R.O. Fusion of the subunits α and β of succinyl-CoA synthetase as a phylogenetic marker for Pezizomycotina fungi. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 669-675, 2011.

KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, **The Yeast Handbook**, Rosa CA & Péter G (eds).pp. 11-30 Springer-Verlag, Heidelberg, 2006.

LACHANCE, M. A., BOWLES, J. M., STARMER, W. T. & BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999.

LAMOUR, A; VAN DEN BOSCH, F.; TERMORSHUIZEN, A.J.; JEGER, M.J. Modelling the growth of soil-borne fungi in response to carbon and nitrogen. *Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology* (2000) 17, 329-346

LEAHY, J.G. & COLWELL, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological reviews**, v. 5, p. 305-315, 1990.

LEVIN, L.; GRASSI, E.; CARBALLO, R. Efficient azoic dye degradation by *Trametes trogii* and a novel strategy to evaluate products released. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 214-222, 2012.

LORIMER, J. P.; MASON, T. J.; PLATTES, M.; PHULL, S.S.; WALTON, D. J. Degradation of dye effluent. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, p. 1957–1968, 2001.

MACHADO, K.M.G.; & MATHEUS, D.R. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic Enzymatic Complex produced by *Pleurotus Ostratus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.468-473, 2006.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic Enzymes Production and Remazol Brilliant Blue R Decolorization by tropical Brazilian Basidiomycetes Fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.246-252, 2005.

MACGRATH, J.A. & DI TORO, D.M. Validation of the target lipi model for toxicity assessment of residual petroleum constituents: monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 1130–1148, 2009.

MAGAN, N. Ecophysiology: Impact of Environment on Growth, Synthesis of Compatible Solutes and Enzyme Production. **British Mycological Society Symposia Series**, 2008.

MANDEEL, Q.A. Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, p. 480–494, 2006.

MARTINY, J.B.H., BOHANNAN, B.J.M., BROWN, J.H., COLWELL, R.K., FUHRMAN, J.A., GREEN, J.L., HORNER-DEVINE, M.C., KANE, M., KRUMINS, J.A., KUSKE, C.R., MORIN, P.J., NAEEM, S., ØVREÅS, L., REYSENBACH, A.L., SMITH, V.H. & STALEY, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p.102–112, 2006.

MCGUIRE, K.L.; FIERE,N.; BATEMAN, C.; TRESEDER, K.K; TURNER, B.L. Fungal Community Composition in Neotropical Rain Forests: the Influence of Tree Diversity and Precipitation. **Microbial Ecology**, DOI 10.1007/s00248-011-9973-x, 2011.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. & SMYTH, W. F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology Biotechnology**,v. 56, p.81–87, 2001.

MELO, I.S.; AZEVDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2 ed. rev. ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

MEGHARAJ M, RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective, **Environmental International**, doi:10.1016/j.envint.2011.06.003, 2011.

MITCHELL, J. I. AND ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**, v. 20, p. 62 – 74, 2006.

MOREIRA NETO, S. L.; ESTEVES, P. J.; SANTOS, V. T. O.;PARANHOS, A. P.; VITALI, V. M.; CESCATO, F.; MACHADO, K. M. G. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.27, p. 2665–2673, 2011.

MUNOZ, A.; KOSKINEN,W.C.;COX, L.; SADOWSKY, M.J. Biodegradation and Mineralization of Metolachlor and Alachlor by *Candida xestobii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 619–627, 2011.

NAGY, L.G.; KOCSUBÉ, S.; CSANÁDI, Z.; KOVÁCS, G.M.; PETKOVITS, T.;VÁGVÖLGYI, C.; PAPPS,T. Re-Mind the Gap! Insertion – Deletion Data Reveal Neglected Phylogenetic Potential of the Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) of Fungi. **PLoS ONE** . doi:10.1371/journal.pone.0049794

NASCIMENTO, C.A.; GOMES, E.P.C.; DE SOUZA, J.L.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. Zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles assemblages from soil of Brazilian Cerrado áreas. **Fungal Ecology**, v. 5, p. 114–123, 2012.

NASHAWI, I.S.; MALALLAH, A.; AL-BISHARAH, M. Forecasting World Crude Oil Production Using Multicyclic Hubbert Model. **Energy Fuels**, v. 24, p. 1788–1800, 2010.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVÁ, P.; CAJTHAMLA, T.; KASINATHA, A.; LANGB, E.; SASĚKA, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p.1545–1551, 2004.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; BENADA, O.; KOFRONĚOVÁ, O.; HEISSENBERGER, A.; FUCHS, W. Potential of combined fungal and bacterial treatment for color removal in textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 879–888, 2011.

OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8509–8514, 2010.

OSONO, T. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. **Ecological Research**, v.22, p.955-974, 2007.

PARKINSON, S.M; JONES, R.; MEHARG, A.A; WAINWRIGHT, M.; KILLHAM, K. *Fusarium oxysporum* grown under oligotrophic and near oligotrophic conditions. **Mycology Research**, v. 95, p. 1345-1349, 1991.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57. p. 20–33, 2001.

POLLACK, J.K; HARRIS, S.D; MARTEN, M.R. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 1–8, 2009.

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 45 – 52, 2004.

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

[Resolução CONAMA, nº 430, de 13 de maio de 2011](#). "Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **DOU** nº 92, p.89, de 2011.

REDDY, C.A. The potential for White fungi in treatment of pollutants. **Current Opinion in biotechnology**, v. 6, p. 320-328, 1995.

RODRIGUÉZ, E.; PICKARD,M.A.; VAZQUEZ-DUHALT,R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. **Current Microbiology**,v. 38 p. 27–32,1999.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; KALYANI, D.C.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2493-2500, 2009.

SCHUSTER, A. & SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p.787–799, 2010.

SCHNÜRER, J. & PAUSTIAN, K. Modelling fungal growth in relation to nutrient limitations in soil. In **Perspectives in Microbial Ecology** (ed. F.Megusar & M. Gantar), pp. 123-130, 1986.

SHINOZAKI, Y.; MORITA, T.; CAO, X-H; YOSHIDA, S.; KOITABASHI, M.; WATANABE,T.; SUZUKI, K.; SAMESHIMA-YAMASHITA, Y.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; FUJII, T.; KITAMOTO H.K. Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, DOI 10.1007/s00253-012-4188-8.

SMITH, T.B.; WAYNE, R.K.; GRIMAN, D.J; BRUFORD, M.W. A Role for Ecotones in Generating Rainforest Biodiversity. **Science**, v. 276, p.1855-1857 1997.

SOLÍS, M.; SOLÍS,A.;PÉREZ,H.I.;MANJARREZ,N.;FLORES,M. Microbial Decolouration of Azo Dyes: A Review. **Process Biochemistry**, doi:10.1016/j.procbio.2012.08.014.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 56-69, 2001.

STURSOVA, M & SINSABAUGH, R.L. Stabilization of oxidative enzymes in desert soil may limit organic matter accumulation. **Soil biology and biochemistry**, v. 40, p.550-553, 2008.

SMITH, W.H. Forest occurrence of *Trichoderma* species: Emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.32, p.179-183, 1995.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMAS, O.; EL KHORASSANI, H.; TOURAUD, E.; BITAR, H. TOC versus UV spectrophotometry for wastewater quality monitoring. **Talanta**, v. 50, p. 743–749, 1999.

THOUAND, G.; DURAND, M.; MAUL, A.; GANCET,C.; BLONK,H. New concepts in the evaluation of biodegradation/persistence of chemical substances using a microbial inoculum. **Frontiers in microbiology**, v. 2, 2011.

TIBURTIUS, E.R.L; ZAMORA, P.P; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTEXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química nova**, v. 27, p.441-446, 2004.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p.1-17, 1995.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. **Reference methods for marine pollution studies**, no 20, p. 97, 1991.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B., MORREEL, K.; RALPH, J. & BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. **American Society of Plant Biologists**, v. 153, pp. 895–905, 2010.

YESILADA, O.; ASMA, D.; CING, S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 933-938, 2003.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161–187, 2003.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.,

9. ANEXOS

ANEXA A – Quadro contendo a formulação dos meios de cultura utilizados.

Nomeclatura do Meio	Formulação
Ágar extrato de malte (MEA)	15,0 g/L de extrato de malte; 15,0 g/L de glicose; 1,0 g/L de peptona; 20,0 g/L de ágar; 0,2 g/L de clorafenicol.
Ágar extrato de malte extrato de levedura (YM)	5,0 g/L de peptona 3,0 g/L de extrato de levedura; 3,0 g/L de extrato de malte; 10,0 g/L de glicose; 20,0 g/L de ágar; 0,2 g/L de clorafenicol.
<i>Hydrocarbon Adapted Fungi</i> (HAF)	2,0 g/L de NH_4NO_3 ; 0,8 g/L de KH_2PO_4 ; 0,4 g/L de Na_2HPO_4 ; 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
Meio mínimo mineral (MMM)	0,7 g/L de KCl; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 3,0 g/L de Na_2HPO_4 ; 1,0 g/L de NH_4NO_3 ; 4,0 g/L de MgSO_4 ; 0,2 g/L de FeSO_4 ; 0,2 g/L de MnCl_2 ; 0,2 g/L de CaCl_2 .
GYMP	20,0 g/L de glicose; 5,0 g/L de extrato de levedura; 10,0 g/L de extrato de malte; 2,0 g/L de Na_2PO_4 .
Tampão fosfato (pH 5,5)	9,078 g/L de KH_2PO_4 ; 11,876 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

ANEXO B - Quadro contendo a formulação das soluções utilizadas para a identificação molecular.

Nomeclatura da solução	Formulação
CTAB	2 M de Tris; 82,0 g/L de NaCl; 2 M de EDTA; 20,0 g/L de CTAB.
EDTA	0,005 M ácido etilnodiamino tetra acético; 0,1 M de NaCl; 10 g/L de SDS.
Tampão de lise	0,05M de Tris-HCl; 0,005M de EDTA; 0,1 M de NaCl; 1,0 g/L de SDS.
Tris-EDTA	0,01 M de Tris-HCl; 0,001 M de EDTA.
TBE 10X (pH 8,0)	107,81 g/L de Tris; 5,8 g/L de EDTA; 55,0 g/L de ácido bórico.

