



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MICHEL RODRIGO ZAMBRANO PASSARINI

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ASSOCIADOS A ESPONJAS
MARINHAS E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE**

**DIVERSITY OF FILAMENTOUS FUNGI ASSOCIATED WITH MARINE
SPONGES AND EVALUATION OF LACCASE PRODUCTION**

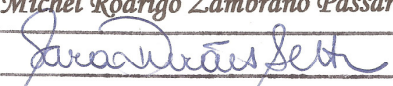
Campinas
2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

MICHEL RODRIGO ZAMBRANO PASSARINI

**“CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A ESPONJAS
MARINHAS E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Michel Rodrigo Zambrano Passarini

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética de Microrganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P266c

Passarini, Michel Rodrigo Zambrano, 1979-
Caracterização da diversidade de fungos
filamentosos associados a esponjas marinhas e
avaliação da produção de lacase / Michel Rodrigo
Zambrano Passarini. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Lara Durães Sette.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fungos filamentosos. 2. Esponjas. 3. Lacase.
4. Taxonomia polifásica. 5. Bibliotecas rRNA ITS e
18S. I. Sette, Lara Durães. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Diversity of filamentous fungi associated with marine sponges and evaluation of laccase production

Palavras-chave em Inglês:

Filamentous fungi

Sponges

Laccase

Polyphasic taxonomy

ITS and 18S rRNA libraries

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Lara Durães Sette [Orientador]

Wellington Luiz de Araújo

Rafaella Costa Bonugli Santos

Derlene Attili de Angelis

Suzan Pantaroto de Vasconcellos

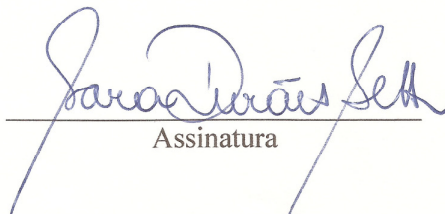
Data da defesa: 06-09-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 06 de setembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lara Durães Sette (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo


Assinatura

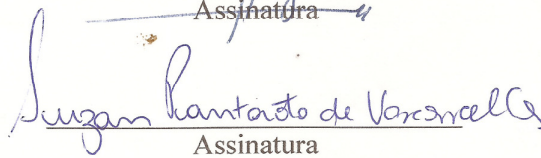
Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos


Assinatura

Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis


Assinatura

Profa. Dra. Suzan Pantorato de Vasconcellos


Assinatura

Prof. Dr. André Rodrigues

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Maia Merzel

Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Assinatura

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dária R. Z. Passarini e Sérgio D. Passarini, e a meu irmão Matheus H. Z. Passarini pela compreensão e apoio durante os anos de desenvolvimento deste projeto.

A minha noiva Júlia R. Ottoni, pelo amor, carinho, companheirismo e por estar ao meu lado em todas as decisões importantes.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho que me ajudaram em todas as etapas de elaboração e desenvolvimento deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Lara Durães Sette que, nos últimos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual e pela atenção e apoio durante o processo de orientação.

A Dra. Valéria de Oliveira Maia e a Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, que, nos últimos anos de convivência, muito me ensinaram, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Professor Nelson Lima e ao Cledir Santos, pela colaboração no desenvolvimento de parte do projeto científico realizado no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho DEB/Uminho em Portugal.

A Cristiane Ottoni, por ter desenvolvido toda a parte experimental relacionada com a indução e expressão da enzima lacase. Experimentos realizados no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho DEB/Uminho em Portugal.

Ao Prof. Roberto Berlinck por ser responsável pela realização da coleta das amostras das esponjas marinhas *Dragmacidon reticulatum*.

Ao amigo, Leandro, pelo companheirismo e apoio dentro e fora da Divisão de Recursos Microbianos – DRM/CPQBA.

Aos amigos Alysson, Fernando, Milena, Suzan, Cynthia, Rafaella, Maria Raphaella, Bruna, Bárbara, Samantha, Viviane, Mariana, Daniela, Natália, Giselle e Éricka, pelo companheirismo e trabalho em equipe. Ao Armando Dias pela ajuda na metodologia de DGGE.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço pelo suporte financeiro do projeto e pela concessão da bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. FUNGOS NO AMBIENTE MARINHO	5
3.1.2. FUNGOS ASSOCIADOS A ESPONJAS MARINHAS.....	7
3.2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS POR FUNGOS FILAMENTOSOS (ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS).....	12
3.2.1. LACASE: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	14
3.2.2. PRODUÇÃO DE LACASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS DERIVADOS DE AMBIENTE MARINHO.....	17
3.2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DA ENZIMA LACASE	20
3.3. TAXONOMIA POLIFÁSICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS	21
3.4. MALDI-TOF ICMS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	30
4.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE IMAGENS	32
4.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO ISOLADO CBMAI 1335.....	33
4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR MALDI-TOF ICMS	33
4.3.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	34
4.3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	34
4.3.3. ANÁLISES DOS DADOS.....	34
4.4. TAXONOMIA MOLECULAR.....	36
4.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DOS ISOLADOS.....	36
4.4.2. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA (<i>FINGERPRINTING</i>).....	37
4.4.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	38
4.4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DA β -TUBULINA E CALMODULINA PARA O ISOLADO CBMAI 1335.....	40
4.4.5. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA LACASE DOS ISOLADOS CBMAI 1328 E CBMAI 1330.....	41
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES FÚNGICAS: CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS-METODOLOGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO.....	43
4.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA DA COMUNIDADE	43
4.5.2. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES RIBOSSOMIAIS ITS E 18S.....	46
4.5.3. ANÁLISES POR DGGE (<i>DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS</i>).....	47
4.5.4. CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	48
4.5.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
4.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE	50
4.6.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	50

4.6.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE	51
4.6.2.1. TRIAGEM INICIAL.....	51
4.6.2.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS ISOLADOS SELECIONADOS NA TRIAGEM INICIAL: CBMAI 1328 E CBMAI 1330.....	52
4.6.2.2.1. DETECÇÃO DA LACASE EM DIFERENTE SUBSTRATO	52
4.6.2.2.2. EFEITO INDUTOR DE ÍONS COBRE NA SÍNTESE DE LACASE.....	52
4.6.2.2.3. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR	53
4.6.2.2.4. EXPRESSÃO DE LACASE PELA INFLUÊNCIA DE CuSO_4 NOS ISOLADOS CBMAI 1328 E CBMAI 1330.....	53
4.6.2.2.4.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	53
4.6.2.2.4.2. EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS.....	53
4.6.2.2.4.3. REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR).....	57
4.6.2.2.4.4. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A ESPONJAS MARINHAS <i>Dragmacidon. reticulatum</i>	59
5.2. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA (<i>FINGERPRINTING</i>) E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ISOLADAS DAS AMOSTRAS.....	63
5.3. CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA E CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE IMAGENS DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS.....	65
5.4. TAXONOMIA MOLECULAR DOS FUNGOS	67
5.5. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR MALDI-TOF ICMS.....	72
5.6. POTENCIAL NOVAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Penicillium</i>	75
5.7. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE FUNGOS: CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS.....	80
5.7.1. DIVERSIDADE FÚNGICA NÃO CULTIVADA ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DE ESPONJA ESTUDAS.....	82
5.7.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	89
5.8. PRODUÇÃO DE LACASE PELOS FÚNGOS DERIVADOS DAS ESPONJAS <i>D. reticulatum</i>	96
5.8.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE.....	96
5.8.2. EFEITO INDUTOR DE ÍONS COBRE NA SÍNTESE DE LACASE E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	98
5.8.3. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS COBRE NA EXPRESSÃO GÊNICA DE LACASE.....	101
5.9. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA LACASE.....	103
6. CONCLUSÕES.....	112
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
8. ANEXO I (DECLARAÇÃO CIBio).....	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A e B. Fotos da esponja marinha <i>Dragmacidon reticulatum</i>	8
Figura 2. Esquema de um equipamento MALDI TOF	26
Figura 3. Mapa com a localização dos pontos de coleta das amostras de esponja marinha <i>D. reticulatum</i>	32
Figura 4. Ribotipos distintos obtidos para os fungos filamentosos isolados das amostras DR6 e DR9.....	64
Figura 5. Relação dos ribotipos e dos isolados para cada meio de cultivo..	65
Figura 6. Banco de imagens construído na Universidade do Minho.....	66
Figura 7. Árvore filogenética do gene ITS-DNAr mostrando os fungos filamentosos isolados da esponja marinha.....	69
Figura 8. Árvore filogenética do gene D1D2-DNAr de alguns isolados das amostras de esponjas.....	70
Figura 9. Diversidade dos gêneros encontrados nas amostras e entre as amostras DR6 e DR9.....	71
Figura 10A e B. Dendrogramas obtidos a partir de análises por MALDI-TOF ICMS, mostrando a similaridade entre os isolados do gênero <i>Trichoderma</i> e <i>Penicillium</i>	73
Figura 11A, B e C. Árvores filogenéticas baseadas em análises dos	

genes ITS, β -tubulina e Calmodulina, mostrando relação entre os <i>Penicillium</i> spp. isolados das amostras.....	76
Figura 12. Extração de DNA genômico das amostras de esponjas com 4 protocolos distintos	80
Figura 13. Amplificação da região do DNAr ITS1-5,8S-ITS2 (par de <i>primers</i> 1 – ITS1F/ITS4) a partir do DNA extraído das amostras de esponja.....	81
Figura 14. Amplificação da região do DNA ITS1-5,8S-ITS2 (par de <i>primers</i> 2 - ITS1F/ITS4-ITS3/ITS4) a partir do DNA extraído das amostras de esponja	81
Figura 15. Amplificação da região do DNAr SSU-18S (par de <i>primers</i> 4-SSUf/SSUr710-SSU13f/SSUr710 e par de <i>primers</i> 5- SSUf/SSUr830-SSU13f/SSUr830) a partir do DNA extraído das amostras de esponja DR6 e DR9.....	82
Figura 16. Árvore filogenética baseada em análises da região DNAr-ITS, mostrando os clones derivados das amostras.....	84
Figura 17. Árvore filogenética baseada em análises da região DNAr-18S, mostrando os clones das amostras.....	86
Figura 18. Gel de DGGE mostrando o padrão de bandas das comunidades fúngicas oriundas das amostras.....	87
Figura 19. Grupos taxonômicos encontrados nas metodologias dependente e independente de cultivo.....	89
Figura 20. Curva de rarefação da riqueza dos isolados recuperados a partir das amostras de esponjas marinhas	90

Figura 21. Curva de rarefação da riqueza dos clones recuperados a partir das amostras de esponjas marinhas.....	91
Figura 22. Diagrama de Venn gerado pelo programa MOTHUR, mostrando a diversidade encontrada nas duas bibliotecas construídas.....	93
Figura 23. Efeito da adição de CuSO ₄ na formação de biomassa e na produção de lacase pelo isolado <i>Nigrospora</i> sp. CBMAI 1328.....	100
Figura 24. Efeito da adição de CuSO ₄ na formação de biomassa e na produção de lacase pelo isolado <i>Arthopyrenia</i> sp. CBMAI 1330.....	101
Figura 25. Detecção da expressão gênica da lacase sintetizada pelas linhagens CBMAI 13328 e CBMAI 1330, em diferentes tempos e concentrações de CuSO ₄ por RT-PCR	102
Figura 26. Amplificação do gene da lacase para as amostras CBMAI 1328 e CBMAI 1330.....	104
Figura 27. Árvore filogenética construída baseada no alinhamento dos aminoácidos de sequências proteicas do gene da lacase de ascomicetos derivados marinhos.....	105
Figura 28. Alinhamento proteico dos clones de lacase relacionados aos isolados <i>Arthopyrenia</i> sp. (CBMAI 1330) e <i>Nigrospora</i> sp. (CBMAI 1328) com os isolados que apresentaram maior similaridade no banco de dados.....	107
Figura 29. Árvore construída baseada no alinhamento de sequências proteicas dos genes de lacase, ferroxidases/lacases e ferroxidases.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos isolados de esponjas marinhas.....	10
Tabela 2. Fungos isolados do ambiente marinho com capacidade de produção de enzimas envolvidas na degradação de material ligninocelulósico.....	19
Tabela 3. Isolamento de fungos filamentosos a partir da esponja marinha <i>Drasmodon reticulatum</i>	60
Tabela 4. Distribuição dos fungos recuperados de <i>D. reticulatum</i> isolados após análises macro e microscópicas	61
Tabela 5. Relação dos fungos filamentosos recuperados da esponja <i>D. reticulatum</i> e os meios de cultivo utilizados	62
Tabela 6. Comparação da identificação dos fungos filamentosos isolados das amostras DR6 e DR9 obtidos por diferentes metodologias.....	78
Tabela 7. Similaridade de clones das amostras DR6 e DR9 a partir de insertos dos genes DNAr ITS e 18S comparadas com sequências do GenBank.....	85
Tabela 8. Estimativas de riqueza e diversidade para bibliotecas de clones de rRNA a partir de amostras de esponjas marinhas.....	91
Tabela 9. Estimativas de riqueza e diversidade para bibliotecas de clones de rRNA a partir de amostras de esponjas marinhas	93

Tabela 10. Avaliação da produção de lacase pelos fungos filamentosos que apresentaram ribotipos distintos nos experimentos de ARDRA.....	97
Tabela 11. Similaridade dos clones a partir de amplificações do gene da lacase dos isolado <i>Nigrospora</i> sp. CBMAI 1328 e <i>Arthorpyrenia</i> sp.CBMAI 1330.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-ácido sulfônico)

AC – meio ágar celulose

ACE - estimador de riqueza baseado no conceito de cobertura de amostra

AG – meio ácido gálico

bp – pares de bases

CaCl₂.2H₂O – cloreto de cálcio diidratado

CH₃COONa – acetato de sódio

cDNA – DNA complementar

CO₂ – dióxido de carbono

CuSO₄ – sulfato de cobre

CTAB – brometo de cetil trimetilamônio

CYA – meio ágar de Czapek com extrato de levedura

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNAr - ácido desoxirribonucléico ribossomal

dNTP - desorribonucleotídeo trifosfatado

DR6 e DR9 – amostras da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*

DRM - Divisão de Recursos Microbianos

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FeSO₄.7H₂O – sulfato ferroso heptahidratado

G25N – meio ágar com glicerol a 25% e nitrato

H₃BO₃ – ácido bórico

HCl – ácido clorídrico

K₂HPO₄ – hidrogenofosfato de potássio

KBr – brometo de potássio

KCl – cloreto de potássio

kDa – kilodaltons

LB – meio Luria-Bertani ágar

MA2 - meio de cultura ágar malte 2%

MEA – meio ágar com extrato de malte

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MgCl₂.6H₂O – cloreto de magnésio hexahidratado

MgSO₄.7H₂O – sulfato de magnésio heptahidratado

mM - milimolar

MS – (*malt extract/soy*) meio extrato de Malte/Soja

MS+R – meio extrato de Malte/Soja + Rovral (fungicida)

MS+RBBR - meio extrato de Malte/Soja + corante RBBR

NaCl - cloreto de sódio

NaOAc – acetato de sódio

Na₂SO₄ – sulfato de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄ – hidrogênio fosfato dissódico

NaH₂PO₄ – fosfato monobásico de sódio

NaNO₃ – nitrato de sódio

PCR - reação em Cadeia da DNA Polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

RAPDs - *Random Amplification of Polymorphic DNAs*

RNA_r - ácido ribonucleico ribossomal

RNAse – enzima que degrada RNA

rpm - rotação por minuto

RT- PCR – reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SARAMIS™ - *Spectral Archiving and Microbial Identification System*, software

SDB - meio Caldo Sabouraud Dextrose

SrCl₂.6H₂O – cloreto de estrôncio hexahidratado

TAE – Tris/acetato/EDTA

TBE – Tris/ácido bórico/EDTA

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TM – meio Tubaki

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

Da – Dalton

g – gravidade

g L⁻¹ - grama por litro

Kg – kilograma

M - molar

mm - milímetro

mL L⁻¹ – mililitros por litro

mg L⁻¹ – miligramas por litro

mg mL⁻¹ - miligramas por mililitro

mL - mililitros

m/z – massa/carga

p/v – peso/volume

v/v – volume/volume

ng - nanogramas

nm – nanômetro

pmol mL⁻¹ – picomolar por mililitro

U L⁻¹ – unidade por litro

μL - microlitro

μM – micromolar

μm - micrômetro

μg mL⁻¹ - micrograma por mililitro

RESUMO

O oceano representa um habitat promissor na busca por novos micro-organismos, os quais podem apresentar capacidade de produzir enzimas de interesse industrial diferentes das produzidas por seus parceiros terrestres. Neste contexto, duas amostras da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum* foram coletadas no litoral Norte do Estado de São Paulo, objetivando a caracterização da diversidade fúngica por métodos dependentes e independentes de cultivo, bem como a avaliação da produção, expressão da enzima e caracterização do gene da lacase. Com relação à parcela cultivada das amostras, 108 fungos filamentosos foram isolados. Destes, 64 ribotipos distintos foram submetidos aos experimentos de taxonomia polifásica e aos relacionados com a lacase. Análises macro- e microscópicas, moleculares (genes ribossomais ITS/28S) e pela técnica de MALDI TOF ICMS, resultaram na caracterização de 38 isolados distribuídos em 23 gêneros pertencentes ao Filo Ascomycota e um ao Filo Zygomycota. Estes foram posteriormente depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI). Dentre os isolados obtidos, uma potencial espécie nova de *Penicillium* foi identificada. Os resultados da triagem enzimática permitiram a seleção de dois isolados identificados como *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 ($0,30 \text{ U L}^{-1}$) e *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 ($0,40 \text{ U L}^{-1}$), os quais foram submetidos à uma nova avaliação da atividade e expressão (RT-PCR) com indução de íons cobre e caracterização dos genes da lacase. A adição de íons cobre na concentração de 5 mM, proporcionou aumento das atividades enzimáticas dos isolados CBMAI 1328 e CBMAI 1330 em 3,9X ($25,2 \text{ U L}^{-1}$) e 1,2X ($9,0 \text{ U L}^{-1}$) após 120 h, respectivamente. Os resultados da expressão dos genes da lacase para o isolado CBMAI 1328 foram os mesmos encontrados pela indução com cobre (maior expressão em 5 mM após 120 h), entretanto para o isolado CBMAI 1330, a maior expressão foi após 96 h sem adição de cobre. Os resultados da caracterização dos genes da lacase revelaram a possível existência de 3 novos putativos genes de lacases marinhas. Com relação à parcela não cultivada, foi possível a identificação de 7 gêneros e de um fungo não cultivado (*uncultured fungi*) do Filo Ascomycota bem como 3 gêneros e um fungo não cultivado (*uncultured fungi*) do Filo Basidiomycota a partir da técnica de DGGE e do sequenciamento direto do gene rDNA ITS e do gene 18S. Em ambas as abordagens utilizadas, a maior diversidade foi encontrada na amostra DR9. Os dados derivados do presente trabalho, ressaltam a importância em se utilizar a taxonomia polifásica, bem como empregar metodologias dependente e independente de cultivo (em paralelo) para um melhor e maior conhecimento da real diversidade em amostras ambientais. Estes resultados ampliam o conhecimento dos fungos filamentosos recuperados de esponjas marinhas e demonstram o potencial biotecnológico destes micro-organismos.

Palavras-chave: fungos filamentosos; esponjas marinhas; lacase; taxonomia polifásica; bibliotecas rDNA ITS e 18S.

ABSTRACT

The ocean represents a promising habitat in the search for new microorganisms, which may have the ability to produce enzymes of industrial interests different from that produced by their terrestrial counterparts. In this context, two samples of the marine sponge *Drummacidon reticulatum* were collected on northern coast of São Paulo State, aiming at the characterization of fungal diversity by cultured-dependent and -independent approaches as well as the evaluation of the production, characterization and expression of laccase enzyme gene. Regarding the cultivated portion of the samples, around 108 filamentous fungi were isolated, belonging to 64 different taxonomic groups (ribotypes), which were subjected to enzymatic activity assays. Polyphasic taxonomy approaches (macro- and microscopic, molecular - ITS/28S ribosomal genes - and MALDI TOF ICMS analyses) resulted in the characterization of 38 isolates distributed in 23 genera belonging to the phylum Ascomycota and one to the phylum Zygomycota, which were deposited in the Brazilian Collection of Micro-organisms from Environment and Industry (CBMAI). Among the isolates recovered one possible new species of *Penicillium* was identified. Enzymatic screening allowed the selection of two isolates identified as *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 (0,30 U L⁻¹) and *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 (0,40 U L⁻¹), which were subjected to a new activity evaluation and expression (RT-PCR) with the induction of copper ions and the laccase genes characterization. The addition of copper ions in a concentration of 5 mM resulted in an increase in the enzymatic activities of CBMAI 1328 and CBMAI 1330 strains in 3,9X (25,2 U L⁻¹) and 1,2X (9,0 U L⁻¹) after 120h, respectively. The results of the expression of the laccase genes for CBMAI 1328 strain were the same found by induction with copper (expression increased in 5 mM after 120 h), however for CBMAI 1330 the higher expression was after 96 h without addition of copper. Results of laccase genes characterization revealed the existence of three possible putative new marine laccase genes. Regarding to the uncultured portion of the samples, from the DGGE and direct sequencing of the ITS rRNA gene and 18S gene approaches, was possible to identify seven species of fungi and one uncultured fungus from phylum Ascomycota and three species and one uncultured fungus from phylum Basidiomycota. For both approaches used the greatest diversity was achieved in the DR9 sample. Data derived from the present work highlight the importance of using polyphasic taxonomy as well as applying culture-dependent and culture-independent methodologies (in parallel) in order to have a better and greater knowledge of the real diversity in environmental sample. These results expand the knowledge of fungi recovery from marine sponges and demonstrate the biotechnological potential of these micro-organisms.

Key words: filamentous fungi; marine sponges; laccase; polyphasic taxonomy; ITS and 18S rRNA libraries.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os oceanos representam um cenário propício para o desenvolvimento de projetos de pesquisas na busca por novas moléculas produzidas por micro-organismos, devido ao seu potencial biotecnológico (Bugni & Ireland, 2004; Gesner et al., 2005; Taylor, 2007; Thakur & Müller, 2004). Fungos derivados do ambiente marinho podem representar uma importante fonte de recursos genéticos a serem explorados, sendo considerados um grupo de organismos com grande impacto em estudos de bioprospecção de compostos de interesse industrial.

Neste sentido, as condições de isolamento e a correta preservação e identificação dos fungos devem ser consideradas etapas fundamentais na prospecção de compostos de interesse industrial. A taxonomia de fungos é baseada principalmente nas características morfológicas e fenotípicas. Entretanto, a classificação de alguns taxons pode ser de difícil realização com base em métodos de taxonomia convencional (Hettick et al., 2008). Técnicas moleculares de *fingerprinting* genético como ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis*), RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNAs*), AFLPs-PCR (*Amplified Fragment Length Polymorphism-PCR*), bem como o sequenciamento de genes ribossomais (Lima et al., 2008) também são utilizados na caracterização dos fungos filamentosos. Entretanto, a taxonomia convencional e molecular podem ser insuficientes para a especiação de algumas linhagens. Assim, novos métodos estão sendo desenvolvidos na intenção de facilitar e tornar a taxonomia dos fungos filamentosos mais acurada. A técnica de MALDI-TOF ICMS tem sido

amplamente utilizada na identificação e caracterização de grupos de fungos filamentosos incluindo entre outros, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium* (Santos et al., 2010).

A composição e a diversidade da comunidade microbiana apresenta um papel biogeoquímico relevante para a funcionalidade dos ecossistemas marinhos (Gao et al., 2010). Métodos moleculares que utilizam abordagens independentes de cultivo têm demonstrado eficiência na caracterização de comunidades microbianas em ambientes diversificados (Sette et al., 2010). Entretanto, diferenças entre comunidades microbianas recuperadas de amostras ambientais por meio da utilização de métodos dependentes e independentes de cultivo têm sido verificadas em diversos estudos (Chandler et al., 1997; Sette et al., 2010; Stephen et al., 1996), enfatizando a necessidade de se combinar as duas estratégias, dependentes e independentes de cultivo, para um melhor e maior conhecimento das comunidades de micro-organismos presentes nos ambientes estudados (Sette et al., 2010). Adicionalmente, o conhecimento da parcela não cultivada de micro-organismos de amostras ambientais pode direcionar o isolamento e cultivo de representantes da comunidade microbiana potencialmente importante do ponto de vista biotecnológico, além de permitir a identificação de micro-organismos ainda não conhecidos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos principais a avaliação da diversidade cultivada e não cultivada de fungos filamentosos associados a amostras da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*, bem como avaliar a produção da enzima e expressão do gene da lacase pelos fungos filamentosos recuperados das amostras estudadas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho é parte dos projetos Temáticos da Fapesp 05/60175-2 intitulado “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de micro-organismos associados” e 10/50190-2 intitulado “Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades anti-virais, anti-*Leishmania* e anti-inflamatória, ambos coordenados pelo Professor Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (USP – São Carlos) e teve como objetivos gerais a caracterização das comunidades de fungos filamentosos presentes em amostras de esponjas marinhas através de métodos dependentes e independentes de cultivo e a avaliação da produção e expressão da enzima lacase, bem como a caracterização do gene que codifica para esta enzima.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Isolamento de fungos filamentosos a partir de amostras de esponjas marinhas *Drummacidon reticulatum* em diferentes meios de cultura;
- 2) Seleção de fungos pertencentes a grupos taxonômicos distintos através de *fingerprinting* genético;
- 3) Caracterização das comunidades de fungos presentes nas amostras de esponjas por meio de métodos dependentes e independentes de cultivo (bibliotecas genômicas);

4) Avaliação da produção da enzima lacase pelos fungos selecionados, bem como da indução da atividade e expressão da enzima na presença de íons cobre e caracterização de seus genes;

5) Identificação taxonômica dos isolados com potencial para utilização biotecnológica bem como os representantes dos grupos taxonomicamente distintos por meio da utilização de uma abordagem polifásica;

6) Depósito dos isolados produtores de lacase bem como os representantes dos ribotipos distintos na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FUNGOS NO AMBIENTE MARINHO

Os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos que realizam um importante papel ecológico nos mais variados ecossistemas como decompositores, participando ativamente dos ciclos dos elementos da natureza, e influenciando as atividades relacionadas ao homem (Bennett, 2010; Mueller et al., 2004; Santos et al., 2010; Trabulsi & Alterthum, 2005). Podem apresentar-se como dois tipos morfológicos: fungos filamentosos (formam hifas ou filamentos revestidos de parede rígida) e as leveduras (normalmente unicelulares).

Morfologicamente, os fungos filamentosos são complexos e heterogêneos, exibindo diversas formas estruturais ao longo de seu ciclo de vida. Apresentam estrutura vegetativa de crescimento constituída por um filamento tubular, originada a partir de um esporo reprodutivo (Tavares, 2006).

São organismos ubíquos, presentes em vegetais, animais, detritos e em abundância no solo. Podem utilizar substâncias simples, incluindo quase todo tipo de carbono a partir de matéria orgânica inanimada, como fonte de energia para seu desenvolvimento ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Podem também tolerar condições ambientais extremas, como a baixa atividade de água e a alta pressão osmótica. (Pei-Chih et al., 2000; Trabulsi & Alterthum, 2005). São capazes de produzir metabólitos de interesse industrial que são utilizados para produção de fármacos, alimentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas, entre outras aplicações (Hettick et al., 2008; Santos et al., 2010).

Os fungos filamentosos encontrados no ambiente marinho são definidos por sua ecologia e fisiologia e podem ser divididos em fungos marinhos obrigatórios e

facultativos. Os fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambientes marinhos ou estuários, enquanto os facultativos são fungos de água doce ou áreas terrestres, também capazes de crescer em ambiente marinho (Kohlmeyer, 1974). Visando uma classificação mais geral para estes organismos, o termo “fungos derivados de ambiente marinho” (*marine-derived fungi*) é frequentemente utilizado, pois grande parte dos fungos isolados de amostras marinhas (*e.g.*, esponjas, algas, madeiras, tunicados, sedimentos, moluscos, corais, plantas, peixes) não foram comprovadamente classificados como micro-organismos marinhos obrigatórios ou facultativos (Osterhege, 2001).

Em 1991, Hawksworth estimou a existência de cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos filamentosos no mundo. Estudos subsequentes demonstraram que esta estimativa de 1,5 milhões de espécies estava subestimada e, dez anos depois, Hawksworth (2001) publicou um trabalho concluindo que sua primeira estimativa, em 1991, era muito baixa. O *Dicionário de Fungos* (Kirk et al., 2008) reportou a existência de 97.330 espécies cientificamente descritas. O’Brien e colaboradores (2005) fizeram uma estimativa da existência de cerca de 3,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos. Mueller e Schmit (2007) fizeram uma revisão a respeito da diversidade global de fungos e enfatizaram a utilização de três fatores cruciais para estimar a quantidade de espécies de fungos que habitam o planeta, sendo elas: distribuição biogeográfica, níveis de endemismo e especificidade do hospedeiro. Entretanto, recentes estimativas baseadas em métodos de sequenciamento de alto rendimento sugerem que mais de 5,1 milhões de espécies de fungos podem existir (Blackwell, 2011). Neste sentido, podemos dizer que a

diversidade fúngica global pode ser realmente muito maior do que a estimada se levarmos em conta a grandeza que os oceanos representam para o planeta e a baixa quantidade de fungos marinhos que foram descritas (Kis-Papo, 2005).

O oceano é provavelmente o habitat mais promissor para exploração da diversidade microbiana visto que cobre mais de 70% da superfície do planeta e representa um ambiente cuja biodiversidade e os recursos genéticos são ainda pouco conhecidos. A associação entre macro e micro-organismos é uma proeminente característica dos ecossistemas marinhos. Entretanto, para muitos dos organismos marinhos, a natureza destas associações não foi rigorosamente investigada e definida até o presente momento. De acordo com Kubanek e colaboradores (2003), um mililitro de água do mar pode conter de 10^3 a 10^4 células fúngicas e, embora existam grandes populações de eucariontes heterotróficos nas águas costeiras, a diversidade e suas funções em processos de ciclagem de carbono e nutrientes permanecem inexploradas (Gao et al., 2010).

Jones (2011) estimou que o número de taxa de fungos marinhos que pode ser encontrado é de aproximadamente 10.000. Esta estimativa foi feita com base em grupos de fungos facultativos ou derivados de algum tipo de ambiente marinho (entre eles água, espuma, areia e solo), fungos planctônicos, fungos isolados de grandes profundidades e sequências ambientais não cultivadas.

3.1.2. FUNGOS ASSOCIADOS A ESPONJAS MARINHAS

Esponjas marinhas (Filo Poríferas) estão distribuídas em cerca de 15.000 espécies e sua biomassa representa um importante componente na diversidade bêntica nos oceanos (Gao et al., 2008; Taylor et al., 2007). Estão entre os mais

antigos animais multicelulares (surgiram há cerca de 600 milhões de anos), são sésseis e alimentam-se por filtração, sendo extremamente eficientes na obtenção de alimentos na água circulante.

Assim, como outras esponjas marinhas, a espécie *Dragmacidon reticulatum* (Figura 1) (anteriormente chamada de *Pseudaxinella reticulata*), foi primeiramente catalogado por Ridley & Dendy (1886). A espécie é comum em todo o litoral da Bahia e está frequentemente situada em locais com alta sedimentação, especialmente por areia. A distribuição geográfica desta espécie de esponja é ampla, podendo ser encontrada na costa dos E.U.A., desde os Estados da Carolina do Norte, Carolina do Sul e Flórida, bem como no Golfo do México, Caribe e no Brasil, desde o Amapá até Santa Catarina. Pesquisas tem mostrado que extratos brutos desta espécie apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e ictiotóxica (Muricy et al. 2008; Muricy & Hajdu, 2006).

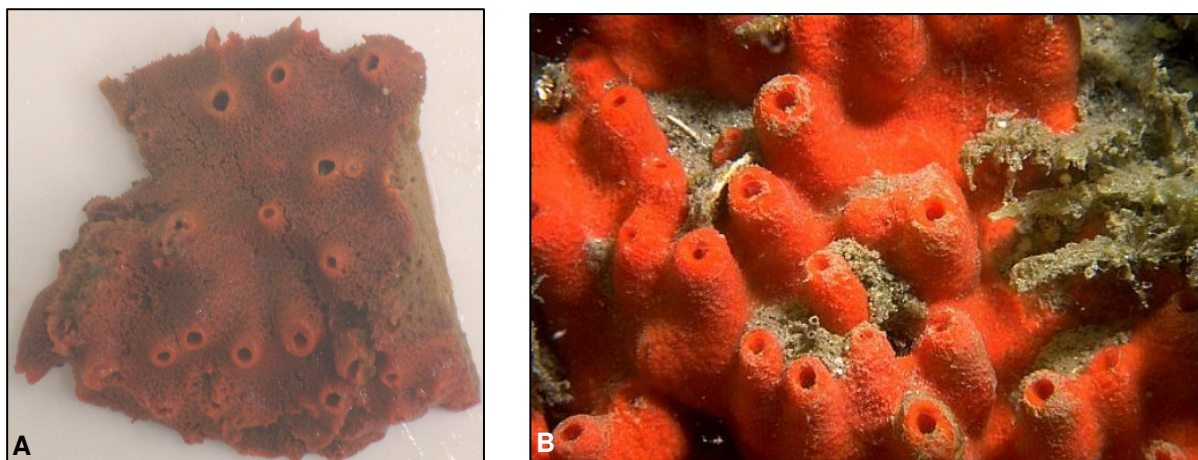


Figura 1. **A-** *D. reticulatum* processada no CEBIMar/USP; **B-** *D. reticulatum* fotografada em São Sebastião (SP). O tamanho real é de aproximadamente 60x90 mm (Foto E. Hajdu).

Nos últimos anos, estes macro-organismos marinhos tem chamado atenção de pesquisadores por dois principais fatores: são filogeneticamente muito próximos a uma ampla variedade de micro-organismos e são uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos bem como enzimas com potencial biotecnológico (Taylor et al., 2007; Trincone, 2011; Wang, 2006). Bugni e Ireland (2004) apresentaram um levantamento com base em trabalhos de isolamento e cultivo de fungos derivados de ambiente marinho a partir de diversos substratos. Os autores puderam concluir que a maior diversidade taxonômica de fungos foi oriunda das amostras de esponjas marinhas. Deste modo, um grande número de isolados dentre os mais diversos gêneros de fungos vêm sendo recuperados a partir de várias esponjas marinhas (Tabela 1). Portanto, os dados apresentados acima refletem o grande potencial de exploração da biodiversidade fúngica em ambientes marinhos.

As esponjas marinhas têm como característica a captura de alimentos pela filtração, podendo abrigar uma vasta diversidade de micro-organismos eucariontes e procariontes. Fitoplâncton, algas e outros micro-organismos planctônicos estão entre os componentes da alimentação das esponjas. Uma vez ingeridos por estes macro-organismos, qualquer célula microbiana que consiga sobreviver ao sistema de defesa das esponjas e à sua digestão torna-se um micro-organismo residente, podendo se desenvolver no micro-ambiente do interior das esponjas (Zhu et al., 2008).

As interações entre micro-organismos e as esponjas podem ocorrer de diferentes formas: os micro-organismos podem ser fontes de alimentos (Reiswig, 1971) ou estabelecer relação de simbiose mutualística com as esponjas marinhas

(Wilkinson, 1992). Os micro-organismos também podem representar patógenos e parasitas e, nesses casos, são considerados uma grande e constante ameaça à biodiversidade dos ecossistemas marinhos (Hummel et al., 1988; Zhu et al., 2008). Estima-se que 1 Kg de esponja é capaz de bombear até 24.000 litros de água em um único dia, e as interações com os micro-organismos podem representar 40% do volume do tecido da esponja com densidades superiores a 10^9 células microbianas por mL de tecido da esponja (Taylor, 2007).

Tabela 1. Fungos isolados de esponjas marinhas.

Esponja	Fungo	Filo	Refs
<i>Gelliode fibrosa</i>	<i>Aspergillus, Bionectria, Bipolaris, Cochliobolus, Eupenicillium, Leptosphaerulina, Nigrospora, Fusarium, Paraphaeosphaeria, Penicillium, Trichoderma</i>	Ascomycota	Li & Wang, 2009
<i>Mycale armata</i>	<i>Candida, Cladosporium, Lacazia, Penicillium, Aspergillus, Tubercularia</i>		
<i>Haliclona caerulea</i>	<i>Ampelomyces, Tubercularia, Didymella, Phaeosphaeria</i>		
<i>Gelliodes carnosa</i>	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Fusarium, Microsphaeropsis, Nectria, Cryptococcus</i>	Ascomycota, Basidiomycota	Liu et al., 2010
<i>Haliclona simulans</i>	<i>Candida, Xylaria, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Fusarium, Mycosphaerella, Sterigmatomyces</i>		
<i>Dragmacidon reticulatum</i>	<i>Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Mucor, Nectria, Penicillium, Trichoderma</i>	Ascomycota, Zygomycota	Menezes et al., 2010
<i>Amphimedon viridis</i>	<i>Aspergillus, Bionectria, Fusarium, Penicillium, Trichoderma, Atheliales</i>	Ascomycota, Basidiomycota	
<i>Mycale laxissima</i>	<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Trichoderma, Phoma, Bionectria</i>	Ascomycota	

O crescente interesse na busca por novos metabólitos tem sido responsável pela descoberta de novas informações a respeito das interações entre esponjas e micro-organismos. No entanto, ainda existe uma grande lacuna com relação ao conhecimento destas interações, como por exemplo, a falta de estudos sobre

diversidade de fungos que habitam estes hospedeiros e sobre a fisiologia de micro-organismos associados às esponjas. Estudos anteriores realizados com bactérias, indicaram que comunidades microbianas associadas às esponjas são realmente únicas e pelo menos parcialmente esponja-específica, e a existência de micro-organismos específicos de esponjas pode tornar-se uma espécie de paradigma nesse campo (Taylor, 2007).

Muito do que se sabe atualmente a respeito da diversidade fúngica e suas interações com hospedeiros marinhos estão baseados em resultados a partir de isolamento de linhagens provenientes dos mais variados substratos como mangues, areia, sedimentos e macro-organismos encontrados nestes ecossistemas (Gao et al., 2010). A caracterização da diversidade fúngica baseadas em técnicas de isolamento e cultivo apresentam algumas limitações importantes, tais como a inability para separar a biomassa do material particulado e a necessidade da utilização de uma alta variedade de meios e condições de cultivo (Anderson et al., 2003). Desta forma, os métodos convencionais de cultivo podem recuperar somente uma pequena porção (1-10%) da comunidade microbiana de amostras ambientais (O' Brien et al., 2005).

Alternativamente, os métodos moleculares têm sido aplicados para explorar as estruturas da vasta diversidade das comunidades microbianas (Ahlgren & Roca, 2006). A detecção genética molecular por meio da extração do DNA diretamente das amostras ambientais, sem a necessidade de isolamento e cultivo, pode reduzir o tempo e o custo das análises além de permitir o conhecimento da parcela não cultivada dessas amostras (Schwarzenbach et al., 2007). Técnicas moleculares como construção de bibliotecas gênicas, T-RFLP (*Terminal restriction*

fragment length polymorphism) e DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), têm fornecido resultados satisfatórios e promissores na investigação da ecologia microbiana e elucidação de características funcionais de comunidades de micro-organismos em amostras ambientais (Anderson & Cairney, 2004; Gao et al., 2010). A tecnologia de DGGE acoplado ao uso da construção de bibliotecas gênicas a partir de genes de DNAr como ITS e/ou 18S, tem se mostrado uma eficiente abordagem molecular em vários ecossistemas (Anderson et al., 2003; Arenz et al., 2006; Wang et al., 2008).

3.2. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS POR FUNGOS FILAMENTOSOS (ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS)

A bioprospecção de micro-organismos como fonte de diversidade química teve início nos anos 40 e 50. Durante este período, programas de triagem para identificar substâncias ativas microbianas foram bem sucedidas na identificação de muitos antibióticos tais como cefalosporina, tetraciclina e aminoglicosídeos (Mendes, 2002).

Nas últimas décadas os micro-organismos têm recebido atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores em produtos naturais. De acordo com a literatura, os registros sobre novos compostos produzidos por fungos marinhos iniciaram em 1990, possuindo um aumento considerável a partir do ano de 1998 e, embora os mais altos números de novos compostos reportados tenham sido registrados entre 1998 e 2000, a tendência indica que a descoberta de novos metabólitos está ainda em crescimento (Bugni & Ireland, 2004). Segundo Boot et al. (2006), a exploração da diversidade estrutural de produtos naturais obtidos a

partir de fungos derivados de ambiente marinho tem aumentado de forma crescente.

Nos últimos anos, estão aumentando as pesquisas relacionadas à busca por enzimas produzidas por micro-organismos, com atividade versátil e que possam ser utilizadas em diversos seguimentos industriais. Um grupo de enzimas amplamente estudado é o das enzimas ligninolíticas, que são moléculas extracelulares relevantes para o desenvolvimento dos fungos em seu habitat natural, pois permitem, após a mineralização do polímero da lignina em CO_2 e H_2O (Raghukumar et al., 2008), o acesso aos polissacarídeos das plantas (celulose e hemicelulose), os quais servem como fonte primária de carbono e energia (Aro et al., 2005; Steffen et al., 2002). Estas enzimas oxidam os compostos aromáticos até a clivagem da estrutura do anel aromático, que é seguida pela degradação por outras enzimas.

A lignina é um biopolímero de alto peso molecular encontrado em plantas e responsável pela rigidez, impermeabilidade e resistência aos ataques microbiológicos e mecânicos. Existem três enzimas extracelulares produzidas por fungos ligninolíticos capazes de degradar a lignina: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac), sendo a produção destas estimuladas pela limitação de nutrientes (Hamman, 2004; Steffen et al., 2007). A lacase realiza um importante papel na degradação da lignina uma vez que a lignina contém em sua estrutura química grupos hidróxifenólicos, que constitui um substrato para a lacase (Arora & Sharma, 2010).

Dentre as enzimas ligninolíticas a lacase apresenta grande potencial de utilização industrial, principalmente nos setores químico, têxtil e de alimentos,

além de também poder ser utilizada na degradação de compostos poluentes ambientais, em processos de biorremediação (Couto & Herrera, 2006; Minussi et al., 2002).

3.2.1. LACASE: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

Lacase (EC 1.10.3.2) é um benzenodiol, ou seja, uma oxidorredutase (enzimas que catalisam processos de oxidação e redução), podendo apresentar várias isoformas moleculares. Pode ser produzida por micro-organismos como bactérias, actinomicetos e fungos, bem como por plantas e insetos, participando *in natura* de ambos os processos de biossíntese e degradação da lignina. São glicoproteínas, com cobre no sítio ativo (podendo conter de um a quatro átomos de cobre). Catalisa a redução de oxigênio molecular para água com simultânea oxidação de compostos fenólicos e polifenólicos, os quais são seus principais substratos. Apresentam um peso molecular entre 60 a 80 kDa e um conteúdo de carboidrato entre 15 e 20% (Arora & Sharma, 2010; Baldrian, 2006).

Sequências proteicas de lacase apresentam um aminoácido cisteína e dez resíduos de histidina, os quais estão envolvidos nas ligações entre os átomos de cobre, os quais podem ser de três tipos: 1) cobre do tipo I: confere a cor azul esverdeado e está envolvido com a transferência de elétrons. É o sítio ativo da enzima, onde ocorre a oxidação do substrato. Ligados a este cobre estão duas moléculas de histidinas e uma cisteína; 2) cobre do tipo II: também tem função na transferência de elétrons e possui duas moléculas de histidinas ligadas a ele; 3) cobre do tipo III: são responsáveis pela ligação do oxigênio e apresentam seis moléculas de histidinas.

Muito embora exista uma forte preferência destas enzimas em utilizar o O_2 como substrato oxidante, as mesmas apresentam usualmente uma baixa especificidade ao substrato oxidante. Sua catálise envolve: a) redução do cobre tipo I pela redução do substrato; b) transferência interna de elétrons do cobre tipo I para o cobre tipo II e III; 3) redução de O_2 da água nos sítios do cobre tipo II e III. A oxidação de um substrato pela lacase envolve a perda de um único elétron formando um radical livre (cátion), geralmente instável, podendo sofrer uma oxidação catalisada pela lacase ou uma reação não enzimática (Arora & Sharma, 2010). As estruturas que são encontradas nos sítios ativos das lacases são bem conservadas, no entanto, o restante da estrutura da enzima apresenta uma grande diversidade (Mayer & Staples, 2002).

A lacase não necessita da presença de um mediador como no caso da manganês peroxidase e da lignina peroxidase, no entanto, sua presença aumenta a gama de substratos que podem ser degradados pela lacase (Raghukumar et al., 2008). Esses mediadores naturais podem ser metálicos ou fragmentos da lignina gerados por outras enzimas ligninolíticas. Substâncias como ácidos fenólicos também são propostos como mediadores naturais (Baldrian, 2006). Esta enzima é estável em pH de 2 a 7 e em temperaturas entre 20 e 80 °C, permanecendo ativa em pH entre 4 e 7 (Baldrian, 2006; Hamman, 2004). No entanto a atividade da lacase apresenta uma faixa de pH ótimo entre 3 a 4,5 e uma temperatura ótima variando de 20 a 37 °C (Arora & Sharma, 2010). Sua produção pode ser aumentada com a utilização de meios de cultura ricos (como extrato de malte ou extrato de levedura), presença de certos substratos como compostos fenólicos, e ação de alguns indutores como íons cobre, ácido gálico e álcool veratrílico.

Entretanto, sua atividade pode ser reprimida com a utilização de repressores como a glicose, íons metálicos como magnésio, cádmio, manganês, zinco; reagentes como ácidos graxos, glutathione, detergentes de amônia quaternária, dentre outros (Arora & Sharma, 2010).

A lacase foi detectada pela primeira vez em exudados de uma árvore japonesa chamada *Rhus vernicifera* por Yoshida em 1883 e em 1985 foi caracterizada por Bertrand (Mayer & Staples, 2002). Lacases produzidas por fungos foram descobertas muito tempo mais tarde (Call & Mucke, 1997).

A participação da lacase na degradação de compostos xenobióticos tem sido amplamente estudada. Essa enzima pode oxidar substratos diversos como os corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, organofosforados, tinturas sintéticas (como o corante RBBR – Remazol Brilhante Blue R), bifenilpoliclorados, explosivos nitrados, pesticidas, polímeros e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre outros (Baldrian, 2006; Durán & Esposito, 2000). Estas enzimas, por serem produzidas extracelularmente, permitem o acesso a compostos apolares e insolúveis, ao passo que as enzimas do Citocromo P-450, sendo processadas intracelularmente, não podem acessar estes mesmos compostos (Hamman, 2004).

Atualmente existem diversos trabalhos descrevendo as mais variadas metodologias de *screening* de fungos filamentosos isolados de diferentes biomas e com a capacidade de produzir enzimas ligninolíticas. A adição de compostos fenólicos e a incorporação da lignina em meios de cultivo já foram estratégias utilizadas por Dion (1951) e Westermarck e Eriksson (1974), respectivamente. Arora e Sandhu (1985) utilizaram um meio de cultivo contendo lignina e guaicol para triar

fungos ligninolíticos. A utilização de corantes sintéticos poliméricos como Poly R-478 e RBBR são amplamente utilizados para *screening* de fungos com habilidade de degradar compostos poluentes ambientais como os HPAs (Arora & Sharma, 2010; Da Silva et al., 2008).

As lacases desempenham papéis importantes para os organismos onde estas enzimas podem ser encontradas. Em plantas estão envolvidas na lignificação e podem causar patogenicidade (Arora & Sharma, 2010). Em fungos, estão envolvidas na morfogênese e na formação de pigmentos, como a melanina bem como o ácido cinabarinico, que confere cor vermelho alaranjado nos corpos de frutificação dos mesmos, possuindo também ação antimicrobiana. A lacase do fungo patogênico *C. neoformans* foi reportada como sendo um fator de virulência em infecções pulmonares bem como no cérebro de camundongos (Waterman et al., 2007). As lacases também podem ser responsáveis pela cola polifenólica que adere às hifas uma às outras e estão envolvidas na diferenciação sexual de alguns fungos (Aisemberg et al., 1989; Robene-Saustrate et al., 1992).

3.2.2. PRODUÇÃO DE LACASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS DERIVADOS DE AMBIENTE MARINHO

Atualmente a procura por novas moléculas, principalmente em ambientes ainda pouco explorados como o ambiente marinho, vem despertando o interesse de microbiologistas e biotecnologistas devido à possibilidade de novos compostos, incluindo as enzimas com potencial aplicação industrial.

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados com objetivo de encontrar fungos oriundos de ambiente marinho e que possuam a capacidade de degradar

compostos lignocelulósicos. Inicialmente estes estudos focaram em fungos de águas temperadas, especialmente linhagens que habitam madeira (Jones, 2011). A vegetação dos mangues e as algas marinhas contêm 50% de material lignocelulósico como polímeros estruturais e são os principais contribuintes do substrato lignocelulósico no ambiente marinho costeiro. Este ambiente possui o segundo maior grupo ecológico de fungos marinhos (Hyde & Jones, 1988) e pode ser considerado um nicho estratégico para obtenção de fungos ligninolíticos.

Existem alguns relatos de fungos filamentosos isolados de substratos marinhos (Chinnaraj & Untawale 1992; Menezes et al., 2010; Vishwakiran et al., 2001) sendo, as informações sobre a produção de enzimas ligninolíticas por fungos derivados de ambiente marinho é ainda incipiente. O grupo da pesquisadora Raghukumar reportou a descoloração de corantes sintéticos e produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de ambientes marinhos (Raghukumar et al., 1999; Raghukumar & Rivonkar, 2001; D'Souza et al., 2006). Outros trabalhos reportaram a capacidade de fungos isolados de mangue em degradar material lignocelulósico (Leong et al., 1991; Mouzouras, 1989). Na Tabela 2 estão apresentados alguns fungos isolados do ambiente marinho que apresentaram capacidade de produção de lacase bem como outras enzimas envolvidas na degradação de material lignocelulósico.

Tabela 2. Fungos isolados do ambiente marinho com capacidade de produção de enzimas envolvidas na degradação de material ligninocelulósico.

Filo	Gênero/espécie	Enzima ou substrato	Local e substrato	Ref.
Ascomycota	<i>Halosarpheia ratnagiriensis</i>	lacase e MnP	Madeiras de mangue em decomposição	Raghukumar et al. 1996
	<i>Sordaria finicola</i>	lacase e MnP	Folhas de manga em decomposição	
	<i>Phaeosphaeria spartanica</i>	Degradação de ligninocelulose	Pantanos salinos	Bergbauer and Newell 1992 Schaumann et al. 1986
	<i>Lulworthia</i> sp.	lacase		
	<i>Penicillium commune</i>	lacase	Manguezal de Pernambuco; Coral da costa Norte São Paulo	Gomes, 2007; Bonugli-Santos et al., 2010a
	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	lacase, MnP e LiP		
	<i>Hypoxylon oceanicum</i>	lacase	Madeiras de mangue em decomposição	Cruz et al., 2006
	<i>Dendryphiella arenaria</i>	lacase	Golfo do México e Mar do Japão	
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	lacase	Lama do mar da China Oriental	Chen et al., 2011
	<i>Cladosporium Cladosporioides</i>	lacase, MnP e LiP		Bonugli-Santos et al., 2010a
Zygomicota	<i>Gongronella</i> sp.	lacase	Folhas de manga em decomposição	Raghukumar et al., 1994
	<i>Mucor racemosus</i>	MnP e LiP	Coral da costa Norte São Paulo isolado de grama do mar em decomposição de uma lagoa de corais na costa oeste da Índia	Bonugli-Santos et al., 2010a
Basidiomycota	<i>Flavodon flavus</i>	lacase, MnP e LiP		Raghukumar et al., 1999
	<i>Marasmiellus</i> sp.	lacase	Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i>	Bonugli-Santos et al., 2010b
	<i>Peniophora</i> sp.	lacase	Esponja marinha <i>Amphimedon viridis</i>	
	<i>Tinctoporellus</i> sp.	lacase	Esponja marinha <i>Drumacidon reticulatum</i>	

MnP: manganês peroxidase; LiP: lignina peroxidase

A presença de enzimas ligninolíticas no ambiente marinho é esperada pois, de acordo com Bugni e Ireland (2004), os fungos de habitat marinho são organismos heterotróficos, exercendo importante papel na decomposição do

tecido vegetal e animal (celulose, lignina, queratina, entre outros) e na reciclagem de nutrientes.

3.2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DA ENZIMA LACASE

Devido ao fato da enzima lacase apresentar versatilidade em oxidar uma ampla gama de compostos fenólicos e não fenólicos sintéticos ou biológicos, a mesma apresenta grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizada em diferentes ramos industriais. Na indústria de papel e celulose, esta enzima é utilizada para separar a lignina da fibra de celulose, de forma limpa, sem gerar acúmulo de compostos químicos; no processamento da madeira para a fabricação da pasta de papel e no processo de branqueamento do papel (Garcia, 2006). Na agricultura, as lacases podem ser utilizadas como agentes ligninolíticos para quebrar a lignina presente nas forrageiras, as quais são utilizadas na alimentação de ruminantes. A quebra das estruturas da lignina nestas plantas melhora a digestibilidade das mesmas pelos animais e aumenta seu valor nutricional (Arora & Sharma, 2010).

As lacases, juntamente com outras enzimas do sistema ligninolítico dos fungos podem ser aplicadas em processos de tratamento de efluentes industriais, como os da indústria têxteis, por meio da descoloração/degradação de corantes (Arora & Sharma, 2010; Ciullini et al., 2008; Kirby et al., 2000). Esta enzima também é utilizada na indústria de bebidas, através da remoção de compostos fenólicos nas preparações do mosto e dos vinhos (Minussi et al., 2002) e nos processos de estabilização de vinhos, sucos de frutas e de cervejas (Garcia, 2006). Na indústria alimentícia, a lacase tem sua aplicação voltada a processos

que modificam a aparência e a cor dos alimentos. Podem ter seu uso empregado na dessulfuração de combustível fóssil, na remoção do enxofre orgânico, biosolubilização do carvão em outros compostos orgânicos bem como na degradação de herbicidas e outros xenobióticos com potencial impacto no meio ambiente, tanto nos solos quanto nos oceanos (Arora & Sharma, 2010)

Na área médica, as lacase podem ser utilizadas na síntese de novos compostos como flavonóides, pigmentos utilizados como cosméticos, aldeídos aromáticos, compostos heterocíclicos e compostos terapêuticos para tratamentos de enfermidades como infecções e até mesmo no combate ao câncer. Nesse contexto, é evidente a importância da prospecção de novas enzimas com potencial aplicação industrial, principalmente de ambientes cuja biodiversidade ainda não foi completamente explorada, como o ambiente marinho.

3.3. TAXONOMIA POLIFÁSICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação e classificação de micro-organismos são importantes aspectos relacionados a diversas áreas da microbiologia. Para o estudo de produtos naturais, é de fundamental importância que a identificação e preservação dos organismos isolados sejam realizadas de maneira apropriada, caso contrário as investigações tornam-se difíceis de serem realizadas e impossíveis de serem reproduzidas (Bugni & Ireland, 2004).

Historicamente, os fungos filamentosos vêm sendo identificados e classificados principalmente por análises de características morfológicas (taxonomia convencional), através da observação das estruturas de reprodução sexual. Entretanto, esses métodos convencionais são laboriosos (Wang et al.,

2008), consomem um grande tempo de trabalho e, na maioria das vezes, não permitem a identificação de fungos que não esporulam ou que esporulam pouco (Sette et al., 2006).

A utilização de marcadores bioquímicos como uma ferramenta no auxílio da taxonomia também tem sido empregada, mostrando bons resultados em discriminar algumas linhagens de espécies diferentes, como no caso de espécies de *Aspergillus* (Samson et al., 2006). Rodrigues et al. (2009), utilizaram uma caracterização química de aflatoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus* utilizando HPLC, fluorescência e detecção UV. Fraga et al. (2008), utilizaram diferentes tipos de ácidos graxos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico) na diferenciação de linhagens de *Aspergillus*, entretanto, esta metodologia ainda não foi validada em um número suficiente de isolados. Outra metodologia consiste na utilização da produção de compostos bioativos como antimicrobianos, antioxidantes e atividade hemolítica, uma vez que perfis de metabólitos secundários são característicos de cada espécie (Samson et al., 2006; Samson & Vargas, 2009).

As informações derivadas de ácidos nucléicos apresentam alta sensibilidade e especificidade e podem ser empregadas na classificação de linhagens microbianas em diversos níveis taxonômicos hierárquicos, desde o estabelecimento de relações infra-específicas até supra-genéricas (Stackebrandt & Liesack, 1993; Tang et al., 2007). Um dos marcadores moleculares mais utilizados na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal (DNAr). O DNAr nos eucariotos estão presentes repetidas vezes e cada unidade consiste de regiões codificadoras para os genes RNAr 18S, 5.8S e 28S, e dois

espaços internos, ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) que separam essas regiões. Cada unidade de DNAr é separada por um espaço intergênico IGS (*Intergenic Spacer*) (Burton et al., 2005).

Os genes ribossomais 18S e 28S e as regiões ITS e IGS estão entre os sítios mais estudados em fungos. As informações contidas nestas moléculas têm sido extensivamente utilizadas em estudos de diversidade e caracterização de comunidades (Abel et al., 2006; De Bellis & Widden, 2006; James et al., 2006; Wang et al., 2008), identificação e detecção (Abarca et al., 2004; Abel et al., 2006; Wang et al., 2008), tipagem (Mummey & Rillig, 2007; Sutar et al., 2004; Yli-matilla et al., 2004) e para o estabelecimento de relações filogenéticas (Larsson, 2007; Takamatsu et al., 2006).

Os genes que codificam para a formação do RNAr 18S e 28S são muito conservados e podem ser utilizados para diferenciação em nível de gênero e espécies. Por outro lado, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam uma maior variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies e/ou entre linhagens da mesma espécie (Abel et al., 2006; Burton et al., 2005; O' Brien et al., 2005; Yli-matilla et al., 2004). A subunidade maior do DNAr dos eucariotos (LSU rDNA) compreende os domínios D1/D2 relatados como úteis para a identificação da maioria dos fungos filamentosos do grupo dos ascomicetos (Kurtzman & Robnett, 1997, 1998), de zigomicetos de importância médica (Voigt et al., 1999), sendo domínios utilizados também na filogenia dos fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus* (Liou et al., 2007).

Entretanto, a classificação de alguns taxons pode ser difícil de ser realizada (Hettick et al., 2008) com base em métodos de taxonomia convencional e

caracterização bioquímica (Hedayati et al., 2007). Esta complexidade taxonômica pode estar relacionada a fatores como: a) necessidade de uma melhor compreensão da estrutura e do comportamento de certas populações fúngicas; b) a identificação das fases de reprodução dos fungos (anamórfica - forma reprodutiva assexual; e teleomórfica - forma reprodutiva sexuada), nas quais dois diferentes nomes são utilizados para identificar um único organismo (Santos et al., 2010); c) a variabilidade das características fenotípicas (Samson et al., 2006); d) re-classificação de linhagens devido a novas tecnologias desenvolvidas.

Não existe apenas um método empregado na identificação de grupos de fungos filamentosos como *Aspergillus*, sendo ele morfológico, fisiológico ou molecular. A utilização de métodos fenotípicos na identificação de espécies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, demonstrou ser uma ferramenta de um poder discriminatório moderado, uma vez que as características fenotípicas podem variar, como no caso de alguns metabólitos estarem completamente ausentes em alguns isolados (Geiser et al., 2007; Hedayati et al., 2007).

Recentemente, ferramentas moleculares de *fingerprint* genético tais como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNAs*), AFLPs-PCR (*Amplified Fragment Length Polymorphism-PCR*) e MLEE (*Multi-locus Enzyme Electrophoresis*) vêm sendo utilizadas na caracterização de fungos filamentosos, entretanto, as mesmas não têm sido efetivas como métodos de discriminação entre espécies e entre linhagens da mesma espécie (Geiser et al., 2007; Hedayati et al., 2007). A metodologia de sequenciamento de um único gene RNA ribossomal (como *large subunit* 28S – região D1D2; *internal transcribed spacers* ITS1-5.8S-ITS2; *small*

subunit 18S; e *intergenic spacers* IGS), pode ser insuficiente para a especiação de algumas linhagens, apresentando nível de confiança insatisfatório (Godet & Munaut, 2010; Lima et al., 2008), o que pode levar a erros na identificação de alguns táxons como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cordyceps*, entre outros (Hettick et al., 2008; Santos et al., 2010).

Sequências de DNA multilocos, ou seja, a utilização de uma análise molecular através de vários genes estão sendo empregadas com o intuito de identificar várias espécies de micro-organismos. Existe um extenso banco de dados disponível para genes RNA ribossomais e alguns genes que codificam proteínas como β -tubulina e calmodulina. A análise de todos estes genes concomitantemente pode ser uma efetiva ferramenta para identificar espécies bem definidas, no entanto, a fraqueza de apenas um destes locus simples, pode fazer com que a identificação não seja feita corretamente (Geiser et al., 2007; Samson & Vargas, 2009).

DNA *barcoding* é uma metodologia que utiliza pequenos marcadores genéticos (cerca de 500 a 600 bp) para uma identificação rápida e fácil de espécies particulares, podendo ser facilmente acessados com primers universais para uma ampla gama de organismos. Com relação ao grupo dos fungos, DNA *barcodes* do gene do fator 1- alfa de alongamento (*tef1*) estão sendo utilizados na identificação de *Fusarium*, *Trichoderma* e espécies de *Hypocrea*. Zygomycetos, demateaceous, *Trichophyton* e *Trichoderma*, estão sendo identificados através do gene ribossomal ITS (Druzhinina et al., 2005; Geiser et al., 2007; Schwarz et al., 2006). Para a identificação da espécie *Penicillium* subgenero *Penicillium*,

atualmente tem-se utilizado a região *cox1* (Seifert et al., 2007). De acordo com Geiser et al. (2007), espécies de *Aspergillus* podem ser distinguidas utilizando sequências do gene calmodulina e β -tubulina, bem como a região espaçadora intergênica (IGS), sendo que esta apresenta elevada variabilidade intra-específica útil para DNA *barcoding*.

Visando uma identificação taxonômica mais acurada, uma abordagem polifásica deve ser empregada por meio da utilização de métodos baseados em dados convencionais (fenotípicos) e moleculares (genotípicos). Algumas das limitações descritas acima levaram a um grande interesse na utilização de uma tecnologia alternativa, considerada rápida e confiável empregada na identificação de linhagens fúngicas, denominada MALDI-TOF ICMS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight - Intact Cell Mass Spectrometry*) (Santos et al., 2010; Schimidt & Kallow, 2005).

3.4. MALDI-TOF ICMS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica estabelecida em química orgânica há muitos anos. No entanto, até recentemente, a baixa volatilidade das proteínas e suas instabilidades térmicas constituíram um impedimento para que pudessem ser estudadas por massas (Santos et al., 2010). Esta dificuldade foi ultrapassada com a introdução de técnicas que dispersam efetivamente proteínas e outras macromoléculas para a fase gasosa como é o caso da técnica de MALDI. Essa tecnologia consiste de um método que torna possível a ionização de macromoléculas biológicas tais como as proteínas que

são difíceis de serem ionizadas por não serem facilmente decompostas, através da utilização de uma matriz (líquida ou sólida) que é misturada com a amostra.

Esta matriz (composta de porções aromáticas) é utilizada para transferir a energia do laser indiretamente para o analito, de maneira tal, que ocorra a ionização da amostra, evitando a decomposição da mesma (Santos et al., 2010; Watson, 1997). As amostras são submetidas a um vácuo e a uma energia de laser pulsado de nitrogênio na região do comprimento de onda de 337 nm. A energia é absorvida após a aplicação do laser onde, as moléculas do analito e da matriz são transformadas da fase sólida para a fase gasosa, formando uma pluma de íons. Os íons formados são separados dentro do analisador TOF (*time-of-flight*), de acordo com a relação massa/carga (m/z). Os dados gerados em um detector são processados e reportados por digitalização do sinal analógico ou por contagem de pulso único, gerando picos (espectros) que são comparados com banco de dados (BioTyper™ - Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany ou SARAMIS® - AnagnosTec GmbH, Potsdam-Golm, Germany) (Kemptner et al., 2009; Santos et al., 2010) (Figura 2).

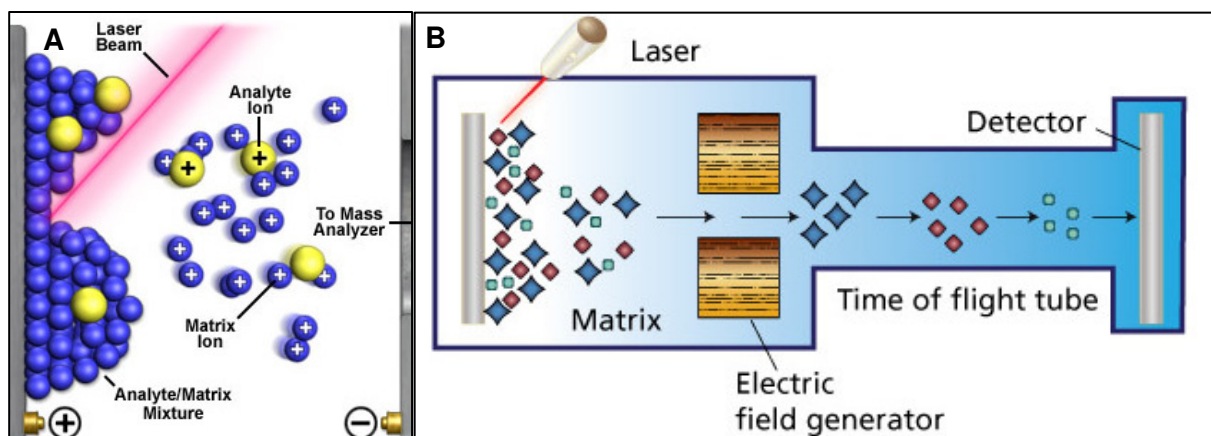


Figura 2. Esquema de um equipamento MALDI TOF. **A-** ionização da matriz e da amostra devido à exposição à radiação laser (Dr. Chris Hendrickson, Florida State University). **B-** íons carregados através de um tubo de voo para o detector, que mede a contagem de partículas em função do tempo (<http://www.sigmaaldrich.com>).

O desenvolvimento da tecnologia de espectrometria de massas MALDI-TOF para caracterização de macromoléculas grandes tem sido amplamente utilizado em análises de proteínas bacterianas isoladas ou em misturas complexas e podem fornecer evidências para a realização de uma classificação quimiotaxonômica.

MALDI-TOF MS tem sido usado extensivamente como uma poderosa ferramenta na caracterização de proteínas, desde a utilização em estudos de expressão gênica (Rode et al., 2009), aplicações na confirmação de sequências de proteínas recombinantes, comparação de proteínas homólogas de diferentes tecidos, identificação de regiões com modificação pós transcricional, análises de nucleotídeos incluindo aqueles com complexos protéicos (Watson, 1997), como também na identificação de amostras biológicas como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Hettick et al., 2008; Kemptener et al., 2009; Qian et al., 2008; Santos et al., 2010; Seyfarth et al., 2008).

Entretanto, poucos trabalhos têm sido realizados focando a utilização da tecnologia de MALDI-TOF ICMS em células intactas de fungos (Schmidt & Kallow,

2005), ou seja, análises de organismos intactos através de biomarcadores característicos como as proteínas encontradas na parede fúngica, sem a necessidade de extração, separação ou amplificação (Santos et al., 2010). Alguns gêneros como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* já foram devidamente caracterizados por meio da identificação dos perfis das proteínas intactas a partir de amostras de esporos (Kemptener et al. 2009).

No trabalho realizado por Hettick e colaboradores (2008), a técnica de MALDI-TOF MS foi utilizada para gerar alta reprodutibilidade em *fingerprints* de massa espectral em doze espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e cinco diferentes linhagens de *A. flavus*. Os autores observaram que este método foi capaz de classificar corretamente cada espécie de *Aspergillus* com 100% de precisão, bem como as cinco linhagens de *A. flavus* entre 95 e 100% de precisão. Em outro trabalho, Seyfarth e colaboradores (2008) mesclaram as tecnologias de sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA com MALDI-TOF MS, com o intuito de identificar o agente causador de uma insuficiência respiratória em um paciente, infecção causada devido à imunidade debilitada deste paciente, decorrente de uma leucemia.

Os autores identificaram o fungo *Fusarium proliferatum* como o agente causador desta infecção, tanto através da técnica de sequenciamento como pelo uso do MALDI-TOF, mostrando como a tecnologia de MALDI-TOF MS representa um potencial inovador, podendo ser também uma alternativa de menor custo e tempo com relação ao sequenciamento da região ITS-rRNA destes micro-organismos. Qian e colaboradores (2008) utilizaram a técnica de MALDI-TOF MS com o objetivo de diferenciar espécies de leveduras e concluíram que esta é uma

metodologia rápida na identificação de leveduras, para o agrupamento de linhagens dentro de espécies e para sequências de alterações durante a transição da fase leveduriforme para a formação de hifas em *C. Albicans*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos foram isolados a partir de duas amostras da esponja marinha *Drasacidon reticulatum*. A coleta das esponjas foi realizada no período entre 29/11/2008 a 06/12/2008 em duas diferentes localidades: Praia Saco do Poço, região da Ilha Bela (coordenadas 23°45'32" sul; 45°15'8" oeste) - amostra DR6 e Costa do Aquário, região da Ilha de Búzios (coordenadas 23°47'759" sul; 45°09'380" oeste) - amostra DR9, ambas no litoral Norte do Estado de São Paulo (Figura 3). As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos e processadas no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo - CEBIMar/USP logo após a coleta.

Com o intuito de eliminar os micro-organismos presentes no exterior das esponjas, as mesmas foram previamente lavadas com água do mar artificial estéril (ASW: KBr 0,1 g L⁻¹; NaCl 23,48 g L⁻¹; MgCl₂.6H₂O 10,61 g L⁻¹; CaCl₂.2H₂O 1,47 g L⁻¹; KCl 0,66 g L⁻¹; SrCl₂.6H₂O 0,04 g L⁻¹; Na₂SO₄ 3,92 g L⁻¹; NaHCO₃ 0,19 g L⁻¹; H₃BO₃ 0,03 g L⁻¹) (Menezes et al., 2010). As esponjas foram então cortadas com auxílio de um bisturi estéril em pequenos pedaços (aproximadamente 1,5 cm de diâmetro) e em seguida foi realizado o plaqueamento direto dos pedaços (3 por placa de Petri) das regiões internas das esponjas. Para o isolamento dos fungos filamentosos foram utilizados os seguintes meios: Extrato de Malte/Soja

(MS, extrato de malte 30 g L⁻¹; peptona de soja 3 g L⁻¹; ágar 12 g L⁻¹; ASW 800 mL L⁻¹); Meio Tubaki (TM, glucose 30 g L⁻¹; extrato de levedura 0,5 g L⁻¹; peptona 1 g L⁻¹; K₂HPO₄ 1 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,01 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹; ASW 800 mL L⁻¹); Meio Ágar celulose (AC, papel 10 g L⁻¹; extrato de levedura 1 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹; ASW 800 mL L⁻¹) (Menezes et al., 2010); Meio ácido gálico (AG, extrato de malte 30 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹; ácido gálico 500 mg L⁻¹; ASW 800 mL L⁻¹) (Conceição, 2005, modificado); Meio Rovral (MS+R) (Naves et al., 2008, modificado) e Meio Remazol Brilhante Blue R (MS+RBBR) (Da Silva et al., 2008, modificado) Os meios (MS+R) e (MS+RBBR) contêm em sua formulação os mesmos constituintes do meio MS, adicionando apenas os reagentes Rovral[®] (500 mg L⁻¹ do fungicida iprodiona - Bayer S.A.) e RBBR (1 g L⁻¹ do corante sintético Remazol Brilliant Blue R) para cada meio correspondente.

Todos os meios foram preparados com água do mar artificial (ASW) e o antibiótico rifampicina (300 mg L⁻¹) foi adicionado aos mesmos visando a inibição do crescimento de bactérias. As placas foram mantidas a 28 °C por 20-30 dias e o crescimento dos fungos filamentosos foi diariamente acompanhado. Após a purificação, os isolados foram preservados pelos métodos de ultracongelamento a -80 °C em glicerol 10% (criopreservação) e Castellani (preservação em água sob temperatura de refrigeração).

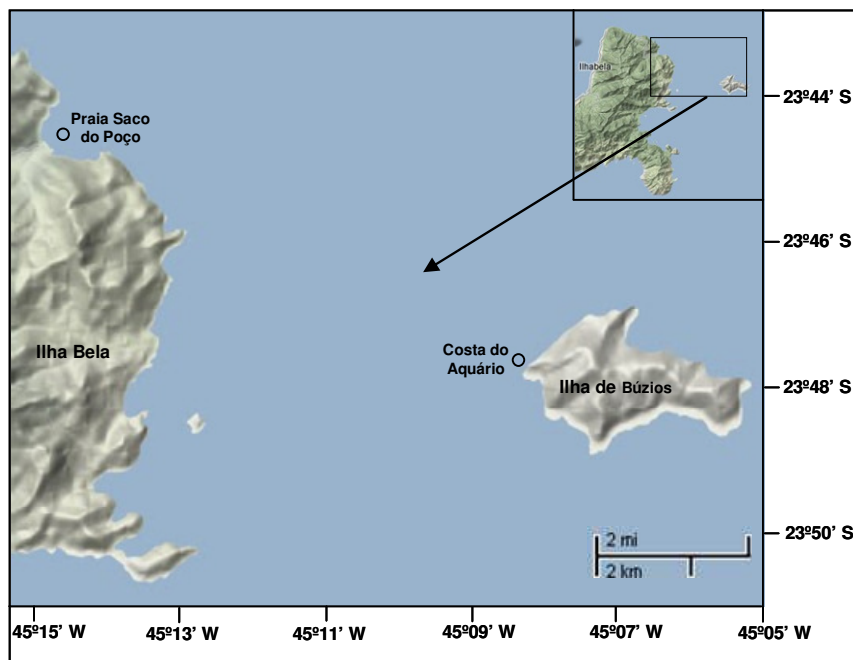


Figura 3. Mapa mostrando os dois pontos onde as amostras da esponja marinha *D. reticulatum* foram coletadas. Região da Ilha Bela e da Ilha de Búzios. Litoral norte do Estado de São Paulo.

4.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE IMAGENS

Para a caracterização morfológica, os isolados foram cultivados e mantidos em meio extrato de malte ágar (MEA: Oxoid CM0059, UK). Os isolados pertencentes ao gênero *Penicillium*, foram crescidos em meios: CYA (sacarose 30 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹; NaNO₃ 3 g L⁻¹; KCl 0,5 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,01 g L⁻¹; K₂HPO₄ 1 g L⁻¹; agar 15 g L⁻¹), MEA (extrato de malte 20 g L⁻¹; peptona 1 g L⁻¹; glicose 20 g L⁻¹; agar 20 g L⁻¹) e G25N (extrato de levedura 3,7 g L⁻¹; glicerol 250 g L⁻¹; NaNO₃ 3 g L⁻¹; KCl 0,5 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,5 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,01 g L⁻¹; K₂HPO₄ 0,75 g L⁻¹; ágar 12 g L⁻¹), através da técnica de três pontos no meio de cultivo.

Os isolados foram incubados durante 7 dias sem luz a 25 °C. As cores das colônias e as taxas de crescimento foram avaliadas com um estereoscópio (Leica

MZ 125 – Switzerland), e a presença e tamanho de esclerótios, seriação de cabeça e morfologia de conídios foram determinados através da coloração em lâminas com lactofenol ou azul de algodão com auxílio de um microscópio óptico (Leica DRM Switzerland). As imagens das estruturas sexuadas e assexuadas foram fotodocumentadas utilizando o software Leica Application Suite (Las EZ) Version 1.7.0 (Leica Microsystems – Switzerland Limits).

4.2.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO ISOLADO CBMAI 1335

A linhagem CBMAI 1335 foi crescida durante sete dias em meio de cultivo MA2% acrescido de 3% NaCl (extrato de malte 20 g L⁻¹; NaCl 30 g L⁻¹; agar 15 g L⁻¹) a 28 °C. A observação da estrutura morfológica foi realizada por MEV, num microscópio (Leica/Cambridge) S360. As amostras contendo o fungo aderido foram lavadas duas vezes em água destilada para retirar o possível excesso de micélio. A seguir, as amostras foram desidratadas por sucessivas lavagens em crescentes concentrações de soluções aquosas de etanol (10, 30, 60, 70%) e etanol puro (100%) e armazenadas num dessecador até ao momento da análise. As amostras foram revestidas com ouro antes da observação microscópica.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR MALDI-TOF CMS

Esta etapa foi desenvolvida na Universidade do Minho em Portugal sob a orientação do Prof. Nelson Lima e do Dr. Cledir Santos.

4.3.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Os fungos filamentosos foram cultivados em placa contendo meio Agar extrato de malte (MEA) e incubados por 72 h a 37 °C. As células de *Escherichia coli* DH5α (utilizada para calibração) foram obtidas da MUM (Micoteca da Universidade do Minho) e crescidas em Luria-Bertani ágar (LB), incubadas por 20 h a 37 °C. As culturas foram avaliadas quanto à pureza e foram sub-cultivadas ao menos uma vez antes das análises por MALDI-TOF ICMS.

4.3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de fungos filamentosos foram transferidas para uma placa de MALDI com 48 poços em seguida foi adicionado 0,5 µL de uma solução matriz (75 mg mL⁻¹; 2,5 ácido diidroxibenzóico em etanol/água/aceonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético). As amostras foram homogeneizadas e secas a temperatura ambiente. Os testes foram realizados em duplicatas. Todas as soluções foram preparadas e estocadas a temperatura de 4 °C.

4.3.3. ANÁLISES DOS DADOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Micologia e Biologia Molecular da MUM em um sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, Manchester, UK) equipado com um laser de nitrogênio (337 nm), onde a intensidade do laser foi definida um pouco acima do limiar para a produção de íons.

Foram utilizadas para a calibração interna as proteínas ribossomais das linhagens de *E. coli* DH5α cujo os valores de massas já são conhecidos. A faixa

da relação massa/carga (m/z) = 2.000 a 20.000 Da foi realizado utilizando um modo linear. O espectrômetro de massas foi utilizado em um modo linear com um atraso de 104 ns em uma voltagem de aceleração de 20 kV. Os espectros finais foram gerados somando 20 disparos de laser por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de até 10.800 disparos de laser por espectro. As listas de picos resultantes foram exportadas para o software SARAMIS™ (*Spectral Archiving and Microbial Identification System*, Anagnostec, Postdam-Golm, Germany, www.anagnostec.eu). No SARAMIS™, as listas com os picos das amostras foram comparadas com o banco de dados SuperSpectra, gerando uma lista ordenada dos espectros correspondentes.

SARAMIS™ utiliza um sistema de pontuação baseado na lista de picos com sinais de peso de massa de acordo com sua especificidade. A ponderação é baseada em dados empíricos de múltiplas amostras das linhagens de referência. SuperSpectra são consensos de espectros contendo um padrão de sinais de massa que são específicos para cada unidade toxonômica (OTU). Estes SuperSpectra são característicos para táxons individuais e permitem a identificação de espécimes bem como a análises de grupamentos dos espectros de múltiplas amostras. A similaridade entre espectros individuais é expressa como número relativo ou absoluto de combinações de sinais de massa após submeter os dados em um único *link* com um grupamento de algoritmos.

4.4. TAXONOMIA MOLECULAR

4.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DOS ISOLADOS

O DNA genômico de cada linhagem de fungo foi extraído de acordo com o protocolo de Hoog et al (2003, modificado): o micélio foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 400 µL do tampão de lise (tris-HCl – tris hidroximetil aminometano – 0,05 M; EDTA 0,005 M, NaCl - cloreto de sódio 0,1 M e SDS – dodecil sulfato de sódio 1%).

As amostras foram deixadas a -20 °C por 10 minutos e em seguida o micélio foi triturado com auxílio de um pistilo plástico. Foram adicionados 5 µL de proteinase K (50 µg mL⁻¹) e em seguida as amostras foram homogeneizadas e os tubos foram incubados por 30 minutos a 60 °C em banho-maria. Após incubação, foram adicionados às amostras 162 µL do tampão CTAB – brometo de cetil trimetilamônio – (Tris 2 M; NaCl 8,2%; EDTA 2 M e CTAB 0,2%) seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos a 65 °C. Após incubação, foram acrescentados 570 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) sendo posteriormente incubadas por 30 minutos em gelo. Foi realizada uma centrifugação à 13.200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e o tubo foi acrescido de 10% do volume de CH₃COONa – acetato de sódio – 3 M. Os tubos foram agitados, incubados a - 20 °C por 30 minutos e centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1.5 mL, adicionado de 50% do volume de isopropanol para precipitação do DNA e os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, 200 µL de etanol 70% gelado foram adicionados e uma nova centrifugação foi realizada. Esta etapa foi repetida por duas vezes. O etanol foi descartado, o *pellet* foi seco por aproximadamente 30 minutos e ressuspenso em 50 µL de água Milli-Q. Para remoção do RNA, foi adicionado 1 µL de RNase (10 mg mL⁻¹) às amostras, seguido de uma incubação a 37 °C por 60 minutos. O DNA genômico extraído foi armazenado a -20 °C.

Os resultados da extração de DNA foram visualizados em géis de agarose 0,8% (Tris- ácido bórico - EDTA (TBE 1X - Tris-base a 2 M; ácido bórico 2 M; EDTA a 50 mM e ajustado a pH 8,0), corados com brometo de etídeo (0,5 mg mL⁻¹). A eletroforese foi realizada em uma corrente de 100 V por 30 minutos. Antes do carregamento, para cada 2 µL das amostras de DNA, foram adicionados 2 µL de corante (azul de bromofenol a 0,25% (p/v), xileno-cianol a 0,25% (p/v) e sacarose a 40% (p/v) em H₂O. Os géis foram fotodocumentados utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System). As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ).

4.4.2. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA (*FINGERPRINTING*)

A avaliação de polimorfismo genético entre as linhagens fúngicas foi realizada por meio de utilização do método de ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis*) da região do *operon* ribossomal ITS1-5.8S-ITS2, utilizando *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (O'Donnell 1993), visando seleção mais

acurada dos isolados pertencentes a grupos taxonômicos distintos. Foram utilizados de 5-25 ng de DNA em reações de 25 µL contendo 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 µL Tampão da *Taq* (Invitrogen); 0,75 µL da solução $MgCl_2$ da *Taq* (Invitrogen); 0,2 mM de uma mistura de dNTP e 0,5 µM de cada *primer*. Os produtos de PCR foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *HaeIII*, *RsaI* e *MspI* (GE Healthcare). As reações de restrição foram realizadas a 37 °C por 2 h.

Os produtos de digestão foram visualizados em géis de agarose 2,5% (Tris-ácido bórico – EDTA [ácido etilenodiamino tetra-acético] (TBE, 1X). A solução estoque do tampão TBE (50X), corados com brometo de etídeo ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). A eletroforese foi realizada com uma corrente de 230 V por 2,5 horas. A análise do perfil de bandas foi realizado utilizando o software GelCompar versão 4.2 (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium) e dendrogramas construídos baseados em UPGMA a partir de matrizes de coeficiente de Dice (Dice, 1945). Um isolado representante de cada ribotipo distinto (corte $\geq 96\%$ de similaridade) foi sequenciado para inferência filogenética.

4.4.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A identificação molecular dos fungos filamentosos foi realizada com base na análise de sequências do DNAr envolvendo a extração do DNA genômico (item 4.4.1), amplificação e sequenciamento parcial de regiões do *operon* ribossomal: região espaçadora ITS1-5,8S-ITS2 e/ou DNAr 28S (região D1/D2).

Os genes (ou regiões) alvos foram amplificados pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras utilizando *primers* flaqueadores das regiões conservadas ITS-5.8S-ITS2 e a região 28S rRNA D1/D2: NL-1m (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL-4m (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3'). As condições de PCR foram as mesmas descritas no item 4.4.2. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min; e 72 °C por 3 min; com uma extensão final de 72 °C por 3 min. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) antes de serem submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). Foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 para região ITS1-5.8S-ITS2 e os *primers* NL-1m, NL-2m (5'-CTT GTG CGC TAT CGG TCT C-3'), NL-3m (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') e NL-4m para região D1/D2 (O'Donnell 1993).

As sequências da região ITS1-ITS2 e/ou D1/D2 obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* e comparadas com as sequências dessa mesma região do *operon* ribossomal de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo alvo foram recuperadas do GenBank para realização das análises filogenéticas.

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Muscle 3.7 (Dereeper et al. 2008; Dereeper et al. 2010) e as análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 5.05 (Tamura

et al., 2011), onde o modelo de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo Maximum Likelihood foi utilizado para as reconstruções filogenéticas, com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 replicatas.

4.4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DA β -TUBULINA E CALMODULINA PARA O ISOLADO CBMAI 1335

Estas análises foram realizadas para os três isolados que após o sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 e avaliação das características macro e microscópicas apresentaram resultados que sugerem a possibilidade de uma possível espécie nova do gênero *Penicillium*. Para a caracterização do gene da β -tubulina foram utilizados os *primers*: Bt2a (5'- GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC -3') e Bt2b (5'- ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC -3') (Glass & Donaldson, 1995) e para o gene Calmodulina foram utilizados os *primers*: Cf1 (5'- GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR -3') e Cf4 (5'- TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC -3') (Peterson et al., 2005). As condições da reação de PCR foram as mesmas descritas no item 4.4.2 e o programa de amplificação consistiu em um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; seguido por 35 ciclos a 96 °C por 30 seg, 51 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; com uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de amplificação foram purificados e sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). As análises filogenéticas foram realizadas conforme descrito no item 4.4.3.

4.4.5. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA LACASE PARA OS ISOLADOS CBMAI 1328 E CBMAI 1330

Após os experimentos de atividade enzimática (item 4.6) os isolados CBMAI 1328 e CBMAI 1330 foram submetidos aos experimentos de caracterização do gene da lacase. Foram utilizados três pares de *primers* degenerados, flaqueadores à região do gene da lacase. Par de *primers* 1 (desenhados): Lacase F1 (5'-TGG TAY CAYWSBCAYTWTTC-3') e Lacase R1 (5'-ACATCBCGRCGMKGDGGAT-3'), externos que amplificam um fragmento de aproximadamente 1100pb; par de *primers* 2 (desenhados): Laccase F2 (5'-ATYGAYRRHCACAMNWTBAMKGT-3') e Laccase R1, internos utilizados como *nested-PCR*, amplificando um fragmento de aproximadamente 720 bp e par de *primer* 3: LAC2FOR (5'-GGIACIWIITGGTAYCAYWSICA-3') e LAC3REV (5'-CCRTGIWKRTGIAWIGGRTGIGG-3') (Lyons et al., 2003).

Foram utilizados de 5-25 ng de DNA em reações de 25 µL contendo 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 µL Tampão da *Taq* (Invitrogen); 0,75 µL da solução MgCl₂ da *Taq* (Invitrogen); 0,2 mM de uma mistura de dNTP e 0,5 µM de cada *primer*. Para os pares de *primers* 1 e 2, foi utilizado o programa de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, (um gradiente de 42 a 47 °C por 30 seg) e 72 °C por 2º seg; com uma extensão final de 72 °C por 7 min. O programa de amplificação utilizado para o par de *primer* 3 foi: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 48 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min; com uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos de amplificação (bandas de interesse) foram extraídos

dos géis de agarose e purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare).

Os produtos purificados foram submetidos a reações de ligação com o vetor plasmidial pGEN-T Easy (Promega), segundo especificações do fabricante. A seguir, foi realizada a transformação com células competentes (*E. coli* JM109 – Promega, por meio de choque térmico e *E. coli* DHL5α preparadas no laboratório e estocadas a -80 °C, por eletroporação). Os clones obtidos (transformantes positivos) foram submetidos a reações de PCR empregando-se os *primers* M13f (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') e M13r (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3').

As condições da reação foram as mesmas descritas acima (item 4.4.2) e o programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 10 min seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 min; 65 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 72 °C por 10 min (O'Brian et al., 2005). Os clones foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare) e *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), utilizando-se os *primers* M13f e M13r (Sette et al., 2005).

As sequências da região do gene da lacase obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* (Ewing et al., 1998) e comparadas com as sequências dessa mesma região do *operon* ribossomal de organismos

representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As análises filogenéticas foram realizadas conforme descrito no ítem 4.4.3.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES FÚNGICAS: CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS – METODOLOGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO

4.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA DA COMUNIDADE

O DNA genômico total da comunidade fúngica foi extraído utilizando 4 protocolos distintos:

1) Power Soil® DNA isolation Kit (MoBIO Laboratories, Carlsbad, CA) de extração de DNA de solo (seguindo especificações do fabricante;

2) o protocolo proposto por Constantini (2004) modificado por Michel Passarini: pequenos pedaços das esponjas foram triturados em nitrogênio líquido e o resíduo formado foi transferido para tubos de 2,0 mL. Após trituração, foi adicionado aos tubos, aproximadamente 2,0 mL de 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8. Em seguida, uma solução de SDS (20%) foi adicionada e os tubos foram incubados em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. Após esta etapa, foi adicionado proteinase K (10 mg mL⁻¹) e uma nova incubação foi realizada por 3 horas a 50 °C, seguido de uma outra incubação por 3 horas a 37 °C, com adição de RNase (10 mg mL⁻¹). O DNA genômico foi extraído com fenol/clorofórmio e clorofórmio/álcool isoamílico sendo em seguida precipitado com 3 M CH₃COONa pH 5,9 e etanol. O DNA foi dissolvido em H₂O Milli-Q esterilizada e estocado a -20 °C;

3) protocolo desenvolvido por Yoshie et al. (2001): pequenos pedaços das esponjas foram transferidas para um tubo de 2,0 mL, seguido de uma

centrifugação por 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, amostras foram sonicadas por 30 segundos com lisozima (100 mg mL^{-1}) em um tampão de lise (0,3 M de sacarose; 0,7 M NaCl, 40 mM de EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5) e então, centrifugado por 5.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1.5 mL adicionado de SDS, proteinase K e brometo de hexadecil trimetilamônio. A purificação do DNA foi realizado com a utilização de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) seguindo uma precipitação com a adição de CH_3COONa e etanol. O DNA foi seco em estufa, resuspendido em H_2O Milli-Q esterilizada e estocado a -20°C ;

4) protocolo realizado por Großkopf et al. (1998) & Neria-Gonzáles et al. (2006), modificado por Vasconcellos et al. (2010): pedaços das esponjas marinhas foram transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e adicionados de 600 μL de tampão PBS 1% ($\text{NaCl } 8,2 \text{ g L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 1,05 \text{ g L}^{-1}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ } 0,35 \text{ g L}^{-1}$). Os tubos foram agitados em *vortex* para homogeneização e em seguida centrifugados por 1 minuto a 20°C 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a etapa de lavagem foi repetida. Após as duas lavagens, as amostras foram novamente adicionadas de 600 μL de tampão PBS 1%, agitadas em *vortex* e então adicionadas de 170 μL de lisozima (100 mg mL^{-1}) para início da lise enzimática das células. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 30 minutos com agitação manual a cada 10 minutos. Em seguida, foram adicionados às amostras 70 μL de Proteinase K (10 mg mL^{-1}) e 240 μL de SDS 10%. Os tubos foram agitados manualmente para homogeneização e em seguida colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos com agitação manual a cada 10 minutos.

Após esse período, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de “freeze-thaw”, etapa que consiste na exposição das amostras a altas e baixas temperaturas em intervalos curtos de tempo para quebra mecânica das células. A solução contendo as células microbianas foi submetida a 3 ciclos de 2 minutos a 65 °C, alternado com imersão dos tubos em nitrogênio líquido por 2 minutos.

Ao término do último congelamento, os tubos foram colocados a 65 °C por mais 2 minutos e acrescidos de fenol saturado (Tris-HCl pH 8,0) em igual volume. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10 °C e 12.000 rpm. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e adicionada de igual volume de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram invertidos e centrifugados sob as mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e o DNA precipitado com 10% v/v de NaCl 5 M e 800 µL de etanol 100% gelado. Os tubos foram invertidos e incubados a -80 °C por 16 horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 70% gelado. O álcool foi descartado e o DNA foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi suspenso em 30 µL de água Milli-Q autoclavada e estocado em freezer a -20 °C.

Os resultados da extração de DNA foram visualizados em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo (0,5 mg mL⁻¹) e fotodocumentados utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System). As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ).

4.5.2. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES RIBOSSOMAIS ITS E 18S

O par de *primers* utilizado para amplificação das regiões do DNAr ITS1-5.8S-ITS2 da comunidade de fungos a partir das amostras de DNA extraídas foram: Primer 1.; ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de acordo com Gardes e Bruns (1993) e o Primer 2 (nexted PCR): constituído dos primers externos ITS1F e ITS4 e internos ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC- 3') e ITS4 de acordo com Gao et al. 2008. Para a amplificação da subunidade menor do DNAr (SSU-18S) foram utilizados o par de primers 3: NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e Fung (5'-ATTCCCGTTACCCGTTG -3') de acordo com Gao et al. (2008); o par de primers 4 (desenhados): externos SSUf (5'-TAAGTATAARCAAATTTRTA-3' - degenerado) e SSUr710 (5'-ACAGTAAAAGTCCTGGTTCC-3') e os internos SSU13f (5'-GGGTGTATTTATTAGATAAA-3'); e SSUr710 e o par de primers 5 (desenhados): externos SSUf e SSUr830 (5'-TAATCATTACGGCGATCCTA-3') e os internos SSU13f/SSUr830.

As condições da reação foram as mesmas descritas no item 4.4.2 e o programa de amplificação utilizado BAC5 (Touch-down) para os primers 1, 2 e 3, que consiste em um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; seguido por 10 ciclos a 94 °C por 1 min, 30 seg a 58 °C (a temperatura de anelamento foi diminuindo 0,5 °C / ciclo de 58 °C até 53 °C) e 72 °C por 2 min; então 25 ciclos a 94 °C por 1 min, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 2 min; com uma extensão final de 72 °C por 2 min. Para os pares de primers 4 e 5, o programa consistiu em um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; seguido por 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 2.15 min a 48 °C (para o primer 4) e 53 °C (primer 5) e 72 °C por 1,15 min; com

uma extensão final de 72 °C por 3 min. Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene para a região ITS1-ITS2 foram confirmados em géis de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio (0.5 mg mL⁻¹) e fotodocumentados utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System).

4.5.3. ANÁLISES POR DGGE (*DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS*)

O DNA genômico foi utilizado como template para amplificar o gene da região ITS utilizando o primer 6: ITS1-F e ITS4 para a primeira reação de PCR e os *primers* ITS3 e ITS4-GC (grampo: CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C) como nested PCR, utilizando 1 µL do produto do primeiro PCR diluído 1:100. As condições da reação foram as mesmas descritas no item 4.4.2. As condições de ciclagem foram: 94 °C por 5min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1min, 72 °C por 1 min; com uma extensão final de 72 °C por 5 min (Arenz et al., 2006). Os produtos dos PCR foram visualizados em gel de 1,2% de agarose corados com SYBR[®] Safe (Invitrogen) e fotodocumentados utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System).

As análises de DGGE foram realizadas em um sistema de eletroforese INGENYphorU (Ingeny, The Netherlands) com um gradiente denaturante de 20-55% em 6% de gel de poliacrilamida, seguindo instruções do fabricante. O gel foi feito da seguinte forma: solução low - 18,8 mL da solução denaturante a 0% (6,25 mL de TAE 20X, 50 mL de 30% acrilamida 4k mix [37:1] e 250 mL de água Milli-Q esterilizada) e 6,2 mL da solução denaturante a 80% (6,25 mL de TAE 20X, 50 mL de acrilamida 4k mix [37:1]; 83,85 mL de uréia, 160 mL de formamida a 32% e 25

mL de água Milli-Q esterilizada); solução high - 7,8 mL da solução denaturante a 0% e 17,2 mL da solução denaturante a 80%. Foi utilizado um marcador de 100 pb. Foram adicionados em cada solução (low e high), 150 µL de persulfato de amônio e 25 µL de TEMED. Foram utilizados 5 µL do corante azul de bromofenol como *loading* em cada amostra e os fragmentos foram separados por 16 h a 100 V em uma temperatura de 60 °C. O gel foi corado com SYBR® Safe (Invitrogen) por 20 min e fotodocumentado utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System).

As bandas representativas foram extraídas do gel com auxílio de um bisturi, sendo colocadas dentro de um microtubo de 0,5 mL e adicionadas de 20 µL de água Milli-Q esterilizada. Os tubos foram agitados em vortex vigorosamente, sendo incubados *overnight* a 4 °C (Gao et al., 2008). Foram utilizados 2 µL do DNA eluído como template para as reações de amplificação por PCR com os *primers* sem o grampo GC, nas mesmas condições descritas anteriormente. Os produtos de PCR foram quantificados e clonados conforme descrito abaixo.

4.5.4. CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Cerca de 100 ng dos produtos de PCR foram utilizados em reações de ligação com o vetor plasmidial pGEN-T Easy (Promega), segundo especificações do fabricante. A seguir, foi realizada a transformação com células competentes (*E. coli* JM109 – Promega, por meio de choque térmico e *E. coli* DHL5α preparadas no laboratório e estocadas a -80 °C, por eletroporação). Os transformantes positivos (colônias brancas) foram repicados em microplacas (96 poços) contendo LB/ampicilina + glicerol 50% e estocados a -20 °C.

Os clones obtidos (transformantes positivos) foram submetidos a reações de PCR com os primers M13f (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') e M13r (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'). As condições da reação foram as mesmas descritas no item 4.4.2 e o programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 10 min seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 min; 65 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 72 °C por 10 min (O'Brien et al., 2005). Os clones foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare e ABI 3500, Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare) e *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), utilizando-se os *primers* M13f e M13r (Sette et al., 2005).

As sequências da região ITS-DNAr e/ou SSU-18S obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* e comparadas com as sequências dessa mesma região do *operon* ribossomal de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para os clones sequenciados com o sequenciador ABI 3500 os contigs não foram realizados, pois as sequências foram obtidas utilizando apenas o primer M13f. As análises filogenéticas foram realizadas conforme descrito no item 4.4.3.

4.5.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os índices de diversidade e riqueza foram calculados pelo programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005), o qual foi utilizado para atribuir sequências para OTUs (*operational taxonomic units*) e para calcular as curvas de rarefação utilizando um nível de 3% de distância entre as sequências (Oliveira et al. 2011). Foram usados os índices de diversidade Shannon (H'), Simpson (Magurran, 2004) e os estimadores de riqueza não paramétrico ACE (estimador de cobertura baseado em abundância), baseado na distribuição de espécies abundantes (>10) e raras (≤ 10) (Chao et al., 1993) e Chao I (baseado em “singletons” e “doubletons”) (Chao, 1984).

O programa MOTHUR v.1.19 foi utilizado para apresentar os resultados interamostrais, mostrando a estrutura das comunidades encontradas nas duas bibliotecas gênicas (DR6 e DR9) através do programa LIBSHUFF implementado no programa MOTHUR, bem como para a construção do Diagrama de Venn (Schloss, 2009).

4.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE

4.6.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os fungos representantes de grupos taxonômicos distintos foram submetidos a uma triagem inicial visando seleção de isolados potencialmente produtores de lacase. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio ágar Malte 2% (MA2: 2% de extrato de malte e 2% de ágar) acrescido de 3% de NaCl e incubados por 7 dias a 28 °C. Após o crescimento micelial foram preparados inóculos a partir da remoção de 2 cilindros de 5 mm de diâmetro de

micélio + ágar da margem das colônias, os quais foram transferidos para frascos de 50 mL contendo 20 mL de caldo extrato de malte 2% + 3% NaCl. Os frascos foram incubados durante 7 dias sob agitação de 140 rpm a 28 °C. Os extratos enzimáticos foram obtidos por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C. O meio sem inóculo foi utilizado como branco nos ensaios de absorbância e como controle na avaliação enzimática.

4.6.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE

4.6.2.1. TRIAGEM INICIAL

A atividade enzimática de lacase foi determinada como descrito por Bonugli-Santos et al. (2010a) a partir da oxidação de 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) utilizado como substrato enzimático. A mistura foi composta de 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0); 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,1 mL da solução enzimática. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U L⁻¹ do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da Equação 1, derivada da Lei de Beer-Lambert.

$$U\ L^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad \text{(Equação 1)}$$

ΔA diferença entre a absorbância final e a inicial

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

10⁶ converte os mols do ε para µmols

ε coeficiente de extinção (M⁻¹ cm⁻¹)

R quantidade de caldo enzimático (L)

T tempo de reação (min)

4.6.2.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS ISOLADOS SELECIONADOS NA TRIAGEM INICIAL: CBMAI 1328 E CBMAI 1330

Esta etapa do projeto foi desenvolvida na Universidade do Minho em Portugal, sob a orientação do Prof. Dr. Nelson Lima e colaboração da Doutora Cristiane Ottoni.

4.6.2.2.1. DETECÇÃO DA LACASE EM DIFERENTES SUBSTRATOS

A atividade da enzima lacase foi novamente determinada utilizando o substrato siringaldazina e respectivo aumento da absorbância a 525 (Givaudan et al., 1993). A reação ocorreu a partir da mistura de: 10 μL de sobrenadante das amostras recolhidas, 90 μL de solução 0,11 mM de siringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído azina, Sigma) em etanol absoluto (Merck) e 200 μL de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenosfosfato de sódio de pH 6,0.

4.6.2.2.2. EFEITO INDUTOR DE ÍONS COBRE NA SÍNTESE DE LACASE

As amostras foram crescidas em MA2+3% NaCl (20,0 g L^{-1} de extrato de malte, 3% NaCl, 15 g L^{-1} de ágar) a 28 °C por 14 dias. Cinco discos de 8 mm de diâmetro foram retirados da área periférica das placas e transferidos para frascos com 100 mL do mesmo meio de cultivo com adição de CuSO_4 em concentrações variando de 1 mM a 10 mM (exceto no caso do controle). Os frascos foram incubados em plataforma rotativa a 28 °C e 150 rpm por 7 dias. O meio fermentativo foi filtrado e submetido às análises das concentrações de proteínas totais e da atividade enzimática extracelular. As amostras foram retiradas no 1º dia

e posteriormente em intervalos de 2 dias, sendo a amostra final retirada ao 7º dia de cultivo. Foram realizados 3 experimentos com diferentes concentrações de CuSO_4 (1 mM, 5 mM e 10 mM), além do controle onde não houve adição de CuSO_4 .

4.6.2.2.3. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR

O crescimento dos isolados foi quantificado em termos de peso seco micelial (mg) por mL de meio de cultura. Para tanto, a biomassa foi filtrada a vácuo utilizando-se uma membrana de porosidade 0,45 μm (previamente seca em estufa a 105 °C e pesada em balança Mettler AE200). O filtrado foi seco em estufa a 105 °C por 24 h. A massa micelial foi calculada pela diferença entre o peso seco total e o peso seco da membrana.

4.6.2.2.4. EXPRESSÃO DE LACASE PELA INFLUÊNCIA DE CuSO_4 NOS ISOLADOS CBMAI 1328 E CBMAI 1330

4.6.2.2.4.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Cinco discos de 8 mm de diâmetro de Meio MA2+3% NaCl, colonizados pelas linhagens CBMAI 1328 e CBMAI 1330, foram transferidos para um erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de cultivo. O tempo de incubação foi de 72, 96 e 120 h, a 28 °C e 150 rpm.

4.6.2.2.4.2. EXTRAÇÃO DO RNA DAS AMOSTRAS

Após o crescimento das linhagens CBMA 1328 e CBMAI 1330 com adição de CuSO_4 (concentrações 1 mM e 5 mM) em tempos distintos (48, 72, 96 e 120 h),

realizou-se a extração do RNA total utilizando-se o micélio correspondente a cada condição e tempo de cultivo.

As amostras foram extraídas de acordo com o protocolo de extração proposto por Chomczynski e Sacchi (1987). O micélio foi filtrado em gaze estéril e transferido para um almofariz, sendo convertido em pó por maceração na presença de nitrogênio líquido. A biomassa foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 50 mL de capacidade. Na sequência, foi adicionado ao tubo de centrifugação, 10 mL de uma solução de tiocianato de guanidina em pH 7,0 (tiocianato de guanidina a 4 M, citrato de sódio a 25 mM, sarcosil a 0,5% (p/v) e EDTA a 0,5 mM) e agitou-se por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se 72 µl de 2-mercaptoetanol a 14,3 M à mistura anterior, obtendo-se uma concentração final de 0,1 M de 2-mercaptoetanol para o volume de solução de tiocianato de guanidina utilizado.

Após a homogeneização, a mistura foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 50 mL de capacidade no qual foram adicionadas soluções na seguinte sequência: 1 mL de NaOAc a 2 M, 10 mL de tampão saturado de fenol, 2 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A cada adição de um reagente à mistura efetuou-se uma agitação branda e, no final deste processo, agitou-se o meio vigorosamente por 1 minuto. A mistura foi então incubada em gelo por 25 minutos e centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 50 mL de capacidade e a seguir adicionou-se isopropanol em quantidade igual à da fase aquosa. A solução foi deixada por 1 h a -80 °C e então centrifugada a 10.000 g durante 20 min a 4 °C.

O sedimento foi lavado por agitação em vórtex com etanol a 70% e centrifugado a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C.

Ressuspendeu-se o sedimento obtido em 3 mL de solução de cloreto de lítio de composição: (cloreto de lítio a 3 M, uréia a 6 M, EDTA a 1 mM, pH 7,6) por grama de micélio. A suspensão obtida foi agitada vigorosamente por 1 minuto em vórtex e então mantida em movimento constante em superfície móvel a 40 rpm por 3 horas, a 4 °C. Após esta etapa a suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Decorrido este período, o sedimento foi cuidadosamente umedecido com 1mL da solução de cloreto de lítio. A adição de 1 mL de etanol a 70% ao sedimento ocorreu por duas vezes, onde primeiramente agitou-se vigorosamente por 1 minuto em vórtex e centrifugou-se a suspensão a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi dissolvido em 1,5 mL da solução tampão Tris-EDTA (TE, Tris-HCl a 1 M; EDTA a 0,5 M, pH 8,0), SDS a 0,5% (p/v) ajustada a pH 7,6 e agitado em vórtex por 1 min. Em microtubos estéreis de capacidade de 1,5 mL, foi adicionado o volume 750 µL da suspensão. As amostras foram mantidas em movimento constante em superfície móvel a 40 rpm por 20 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e, ao sedimento, foram adicionados 750 µL de clorofórmio e igual volume de fenol. A mistura foi mantida em movimento constante em superfície móvel a 40 rpm por 15 minutos, em temperatura ambiente.

Uma alíquota de 0,05 volumes de cloreto de sódio a 4 M foi adicionada e a solução foi agitada por 2 minutos em vórtex seguida por centrifugação em microcentrífuga a 14.000 g durante 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi então extraída com um volume igual de clorofórmio e, em seguida, incubada com

isopropanol durante a noite a -20 °C. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 14.000 g durante 10 minutos. O sedimento foi lavado com solução aquosa de etanol a 70% (v/v) sob agitação em vórtex e centrifugado a 14.000 g durante 10 minutos a 4 °C. O sedimento voltou a ser lavado com etanol P.A. e centrifugado a 14.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi finalmente seco à temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspenso em um volume adequado de H₂O Milli-Q estéril, previamente tratada com DEPC.

A quantificação das amostras de RNA foi realizada por espectrofotometria (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) em uma relação de absorbância entre 260 e 280 nm. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v) com composição Tris-Acetato-EDTA (TAE, 1X). A solução estoque do tampão TAE (50X) tem a seguinte composição: Tris-base a 2M, ácido acético glacial a 2 M, EDTA a 50 mM e ajustado a pH 8. Os poços foram carregados com 10 µL de uma mistura de: 1 µL de amostras de RNA, 2 µL do corante de carregamento e 7 µL H₂O tratada com DEPC. A eletroforese em gel ocorreu a 150 V por 10 min, em solução tampão TAE.

Com a finalidade da remoção das nucleases, todos os utensílios de vidro, assim como todas as soluções foram previamente tratados com uma diluição de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% (v/v) em H₂O Milli-Q estéril. Tanto os materiais quanto as soluções ficaram em repouso durante a noite e no dia seguinte foram autoclavados para inativar o DEPC.

4.6.2.2.4.3. REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT- PCR)

Na síntese do cDNA da lacase foram utilizados microtubos de 0,5 µL previamente tratados com DEPC. Foram utilizados cerca de 5 µg de RNA total nas reações de 10 µL contendo 1 µL de Primer Oligo (dT)₂₀ a 50 µM (sintetizados de acordo com Lyons et al. 2003, cujas sequências estão descritas no item 4.4.5), 1 µL de dNTP mix em pH neutro (10 µM) com o volume de 10 µL final, completado com H₂O Milli-Q estéril desionizada tratada com DEPC.

As misturas foram mantidas a 65 °C por 5 minutos e na sequência incubadas em gelo por 1 minuto. Uma breve centrifugação “ *spin down*” foi efetuada. A cada microtubo adicionou-se 4 µL de solução tampão Thermo-X™ RT (5X, Invitrogen), 1 µL de Thermo-X™ RT (Invitrogen), 2 µL de EDTA a 50 mM e H₂O Milli-Q estéril desionizada e tratada com DEPC, até perfazer o volume de 20 µL. Após um *spin down* por centrifugação, a mistura foi incubada a uma temperatura de 60 °C por 30 minutos. A inativação da reação ocorreu a 90 °C por 5 minutos. O cDNA do gene da β-tubulina foi sintetizado utilizando as mesmas condições de reação do cDNA da lacase descritas acima com os *primers* desenhados, Forward (5`-CGGTGAGAGGCGTCGGACAC-3`) e Reverse (5`-CATTGGTACACGCAGGAGGG-3`). Os cDNAs foram armazenados a -20 °C até a amplificação por PCR.

As reações de amplificação foram realizadas conforme mencionado no item 4.4.2 em um termociclador (Bio-Rad, MyCycler). Em um microtubo de 500 µL previamente tratado com DEPC foram adicionados: 2 µL do cDNA das referidas amostras, 1 µL de nucleotídeos a 200 µM (dNTP, Promega), 3 µL de solução de MgCl₂ a 25 mM, 10 µL Tampão GoTaq Flexi (10x), 1 µL de cada primer, 0.25 µL

da enzima Polymerase Hot Start GoTaq (Promega) e água Milli-Q para perfazer o volume final de 50 µl. Os parâmetros utilizados para a amplificação do gene da lacase consistiu em um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; seguido por 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 48 °C (para o gene da β -tubulina foi utilizado uma temperatura de 47 °C) por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; com uma extensão final de 72 °C por 4 minutos. Um gel de eletroforese foi preparado em uma concentração de agarose a 1,0% (p/v). A eletroforese dos produtos do PCR foi conduzida a 100 V por 40 min. Utilizando-se o aparelho Gel Doc XR System (Bio-Rad) foi possível visualizar o gel e foto-documentar as imagens obtidas.

4.6.2.2.4.4. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

As análises para a quantificação dos níveis de expressão do gene de interesse foi realizada por densitometria. As imagens fotodocumentadas das amplificações foram tratadas com o auxílio do programa ImageJ 1.44f. Disponível em: <http://www.macosxfreeware.com/imagej-1-44f-scriptable-java-app-for-scientific-image-processinganalysis/>. Acesso em: 14 jun. 2011.

Os resultados obtidos por densitometria foram normalizados de acordo com a expressão do gene constitutivo β -tubulina. Deste modo, foi possível estabelecer a razão entre a expressão gênica da lacase em relação à β -tubulina nas diferentes condições estudadas, sendo os resultados apresentados em unidades arbitrárias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS À ESPONJA MARINHA *Dragmacidon reticulatum*

A partir de duas amostras da esponja marinha *D. reticulatum* coletadas em diferentes regiões, foram obtidos 108 fungos filamentosos, dos quais 55 foram recuperados a partir de pedaços da amostra DR6 e 53 a partir de pedaços da amostra DR9. O meio MS+RBBR derivou o maior número de isolados fúngicos (32), seguido do meio MS+R (23), MS (18), TM (13), AC (12) e AG (10) (Tabela 3).

O meio MS apresenta em sua formulação o componente extrato de malte que é amplamente utilizado pelos fungos filamentosos como fonte de carbono, favorecendo assim, o crescimento destes micro-organismos. A incorporação do corante RBBR (*Remazol Brilhante Blue R*) na concentração de 1 g L^{-1} ao meio MS e a preparação do meio ácido gálico (AG) e do meio MS+R, foram realizadas como uma estratégia de seleção prévia de isolados produtores de lacase (da Silva et al., 2008). O composto iprodine (Rovral® Bayer S.A., Rio de Janeiro, Brazil) foi utilizado na concentração de 500 mg L^{-1} com a finalidade de retardar o crescimento de fungos esporulados e proporcionar o aparecimento e consequentemente o isolamento de fungos filamentosos de crescimento mais lento.

Tabela 3. Isolamento de fungos filamentosos a partir da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*.

Amostra	Meio de cultivo	Número de isolados	%
<i>D. reticulatum</i> (DR6)	MS+RBBR	20	36
	MS	8	15
	MS+Rovral	13	24
	Gálico	3	5
	TM	6	11
	AC	5	9
	Total	55	100
<i>D. reticulatum</i> (DR9)	MS+RBBR	12	23
	MS	10	19
	MS+Rovral	10	19
	Gálico	7	13
	TM	7	13
	AC	7	13
	Total	53	100

De acordo com Bugni e Ireland (2004), a investigação da diversidade de fungos derivados do ambiente marinho baseados em ensaios químicos revelou que uma maior diversidade tem sido encontrada em esponjas. No presente trabalho, diversos isolados recuperados das duas amostras da esponja *D. reticulatum* apresentaram características macro e micromorfológicas similares às dos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma*. Esses dois gêneros são considerados como “esponja-generalistas”, ou seja, fungos comumente encontrados em associação com este invertebrado (Li & Wang, 2009) e também frequentemente encontrados em ambientes terrestres.

Representantes dos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma* já foram reportados como produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo policetídeos com atividade antimicrobiana e antitumoral (Bugni & Ireland, 2004). O elevado número de compostos bioativos produzidos por fungos derivados marinhos do gênero *Penicillium* pode estar associado ao fato de que representantes deste gênero são tolerantes ao sal, de rápido crescimento e facilmente obtidos a partir de diferentes substratos. Como o mar é considerado

um ambiente com uma alta salinidade e pressão, pode-se dizer que os compostos naturais produzidos por fungos associados a substratos marinhos podem ser diferentes dos produzidos por fungos encontrados em ambientes terrestres. O ambiente pode influenciar na ativação de diferentes vias metabólicas que um micro-organismo pode utilizar em função de sintetizar certas enzimas vitais na sua adaptação a determinadas condições ambientais.

No presente trabalho, 11 fungos dematiaceos foram isolados das amostras de esponja. Numerosas espécies de fungos dematiaceos (fungos que contêm melanina) têm sido isoladas de amostras marinhas tais como esponjas, algas e cnidários. Estes fungos são comumente encontrados em habitats que apresentam altos níveis de estresse como, por exemplo, os desertos, salinas e o mar morto de Israel (da Silva et al. 2008). Em adição, 45 isolados classificados como hialinos (fungos que apresentaram estruturas reprodutivas assexuadas hialinas) foram recuperados das amostras estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos fungos recuperados de *D. reticulatum* isolados após análises macro e microscópicas.

Grupos	Isolados	Descrição
hialinos	45	Conídios e/ou conidióforos hialinos ou levemente coloridos
<i>Trichoderma</i> -like	38	Estruturas semelhantes às encontradas no gênero <i>Trichoderma</i>
<i>Penicillium</i> -like	14	Estruturas semelhantes às encontradas no gênero <i>Penicillium</i>
dematiaceus	11	Conídios e/ou conidióforos negros

Os fungos do grupo dos Ascomicetos são facilmente obtidos quando técnicas dependentes de cultivo são aplicadas (Baker et al. 2009). Uma das hipóteses que explica a predominância dos Ascomicetos em ambientes aquáticos

é a presença de esporos com apêndices, os quais facilitam a flutuabilidade na água e aderência ao substrato (Prasannarai & Sridhar, 2001). Algumas espécies de fungos Ascomicetos de água doce possuem um anel apical que possibilita a dispersão do esporo, e este fato poderia explicar a melhor adaptação dos ascomicetos ao ambiente aquático do que outros grupos tais como os basidiomicetos (Vijaykrishna et al., 2006). Fato que pode ser visto na Tabela 5, onde que a espécie *Trichoderma harzianum* foi recuperada em todos os meios de cultivo utilizados no presente trabalho.

Tabela 5. Relação dos fungos filamentosos recuperados da esponjia D. reticulatum e os meios de cultivo utilizados.

Taxon	MS+RBBR	MS	MS+Rovral	Gálico	TM	AC
Nº de isolados						
<i>Annulohypoxylon</i> sp.	----	----	1	----	----	----
<i>Anthostomella</i> sp.	----	1	----	----	----	----
<i>Aporospora</i> sp.	----	----	1	----	----	----
<i>Arthopyrenia</i> sp.	1	----	----	----	----	3
<i>Biatrispora</i> sp.	----	----	----	----	----	1
<i>Biscogniauxia</i> sp.	----	1	----	----	----	----
<i>Bionectria</i> sp.	1	1	2	----	----	----
<i>Chaunopycnis</i> sp.	----	----	----	----	----	----
<i>Cladosporium</i> sp.	----	----	1	----	----	1
<i>Daldinia</i> sp.	----	----	----	----	1	----
<i>Diaporthe</i> sp.	----	----	----	----	----	1
<i>Eupenicillium shearii</i>	----	2	----	----	----	----
<i>Fusarium</i> sp.	----	1	----	----	----	----
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	----	----	----	----	1	----
<i>Mucor</i> sp.	1	----	----	----	----	----
<i>Nectria</i> sp.	----	1	----	----	----	----
<i>Nemania</i> sp.	----	----	2	----	----	----
<i>Nigrospora</i> sp.	----	----	----	----	1	----
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	----	----	2	----	----	----
<i>Penicillium</i> sp.	----	----	----	3	----	----
<i>Penicillium brevicompactum</i>	----	----	1	----	2	----
<i>Penicillium manginii</i>	----	1	----	----	----	----
<i>Penicillium virgatum</i>	3	----	3	----	----	----
<i>Penicillium simplicissimum</i>	----	----	----	2	----	----
<i>Penicillium chrysogenum</i>	----	----	1	----	----	----
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	----	1	----	----	----	1
<i>Pleospora</i> sp.	----	----	----	----	----	1
<i>Trichoderma asperellum</i>	----	----	----	2	1	1
<i>Trichoderma atroviride</i>	9	----	----	----	----	----
<i>Trichoderma harzianum</i>	11	6	4	1	2	5

Continuação da Tabela 5

<i>Trichoderma viride</i>	----	----	1	----	----	----
<i>Trichoderma cf. stilbohypoxyli</i>	----	1	----	----	----	----
<i>Xylaria</i> sp.	----	----	3	----	2	----
Não identificados*	6	2	1	2	3	----
Total	32	18	23	10	13	12

*Isolados não identificados devido à ausência de crescimento após as respectivas reativações.

5.2. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA (*FINGERPRINTING*) E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ISOLADAS DAS AMOSTRAS

A partir de uma análise preliminar macro e microscópica, os isolados foram selecionados em 4 grandes grupos: dematiaceos, hialinos, *Trichoderma*-like e *Penicillium*-like, os quais foram submetidos a análise de *fingerprinting* genético pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) utilizando três enzimas de restrição (*HaeIII*, *HhaI* e *MspI*).

No total foram recuperados 64 ribotipos distintos a partir dos 108 isolados de fungos filamentosos: 9 ribotipos a partir de 11 isolados do grupo dos dematiaceus (DR6 n=1 ribotipo, DR9 n=9 ribotipos); 6 à partir de 14 isolados do grupo dos *Penicillium*-like (DR6 n=3, DR9 n=3); 10 à partir de 38 isolados do grupo dos *Trichoderma*-like (DR6 n=8, DR9 n=7), sendo que 5 destes foram comuns entre as duas amostras e 39 à partir de 45 isolados do grupo dos hialinos (DR6 n=21, DR9 n=19), sendo que 1 entre eles, foi comum entre as duas amostras (Figura 4). Apenas 6 ribotipos iguais (*Trichoderma*-like n=5 e hialinos n=1), foram encontrados em ambas as amostras, demonstrando uma diversidade diferenciada dos fungos associados às amostras DR6 e DR9. O grupo dos hialinos apresentou o maior número de ribotipos distintos (61%), seguido do grupo dos *Trichoderma*-like (16%), dematiaceus (14%) e *Penicillium*-like (9%).

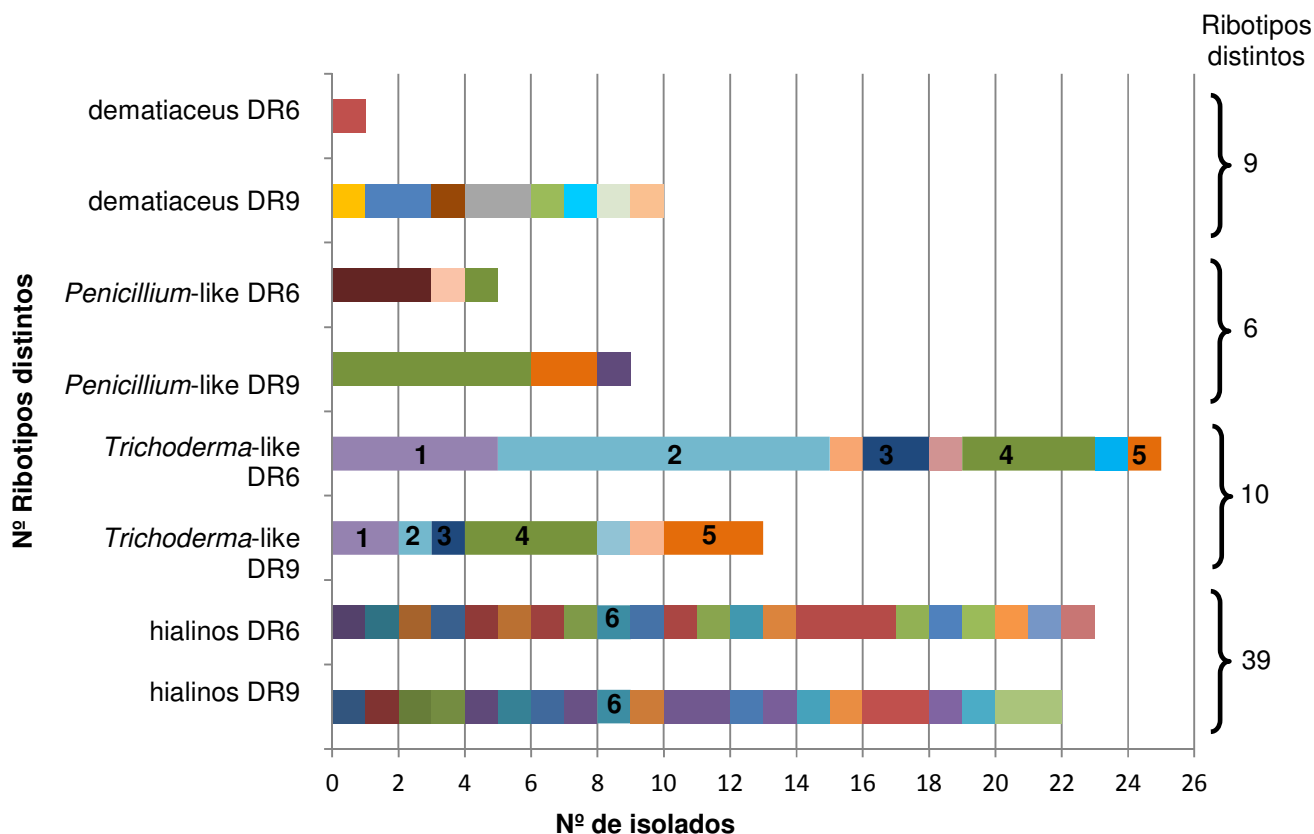


Figura 4. Ribotipos distintos obtidos para os fungos filamentosos isolados das amostras DR6 e R9. Os ribotipos em comuns são aqueles que estão numerados (do número 1 ao 5 no grupo dos *Trichoderma*-like e o número 6 do grupo dos hialinos). Obs: cada cor da barra representa um ribotipo distinto.

O meio MS+RBRR apresentou um maior número de isolados (32), no entanto a diversidade dos fungos recuperados deste meio foi baixa, pois foram obtidos apenas 11 ribotipos distintos. Por outro lado, o meio MS+Rovral derivou um total de 23 isolados, dos quais 18 apresentaram ribotipos distintos, demonstrando uma maior diversidade. Este resultado sugere a eficiência do Rovral no retardo da esporulação de fungos altamente esporulados, permitindo o desenvolvimento de outros grupos de fungos.

Os resultados da avaliação da diversidade genética dos fungos filamentosos derivados das amostras de esponja *D. reticulatum* nos mostram a existência de uma ampla diversidade em cada amostra estudada (33 ribotipos

distintos entre 55 isolados da amostra DR6 e 37 ribotipos distintos entre 53 isolados da amostra DR9, Figura 5) e entre as amostras estudadas, visto que apenas 6 ribotipos foram comuns a ambas as amostras. O gênero *Penicillium* apresentou a maior diversidade (7 ribotipos distintos) enquanto que o gênero *Trichoderma* foi o mais frequente (n=38).

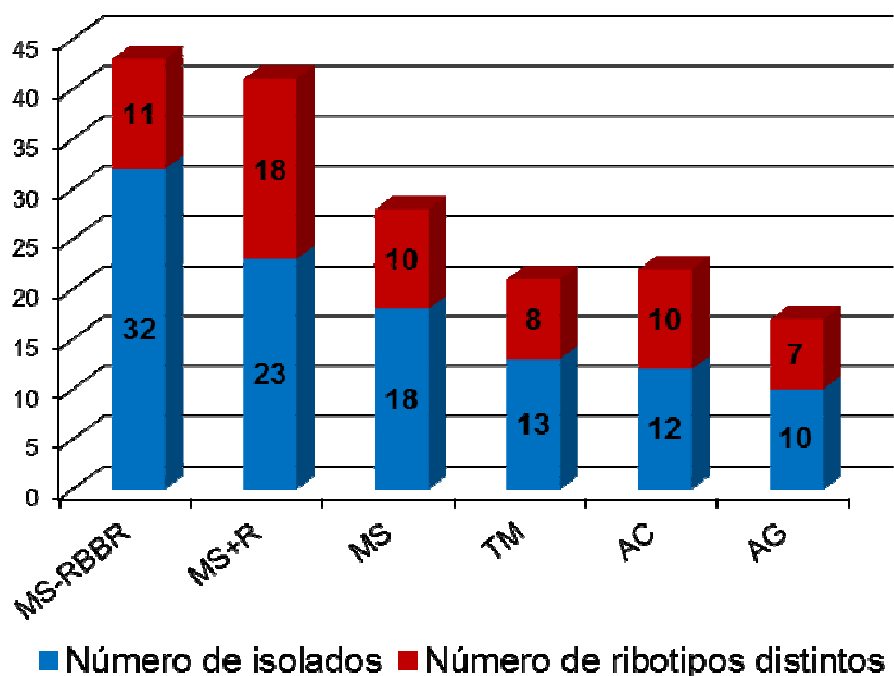


Figura 5. Relação dos ribotipos e dos isolados para cada meio de cultivo

5.3. CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA E CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE IMAGENS DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Dos 108 fungos isolados, 98 foram analisados por microscopia com o intuito de realizar caracterização morfológica bem como a construção de um banco de imagens a partir da visualização das estruturas de reprodução e dos conídios (esporos). Não foi possível realizar a ativação de 10 isolados mantidos pelos métodos de Castellani e criopresevação a - 80 °C). Como a grande maioria dos

isolados pertencentes ao grupo dos Moniliaceus não esporulavam, os mesmos foram submetidos a um sistema de iluminação com luz UV (12 h) e luz branca (12 h) para induzir a esporulação. A Figura 6 mostra algumas das fotos microscópicas.

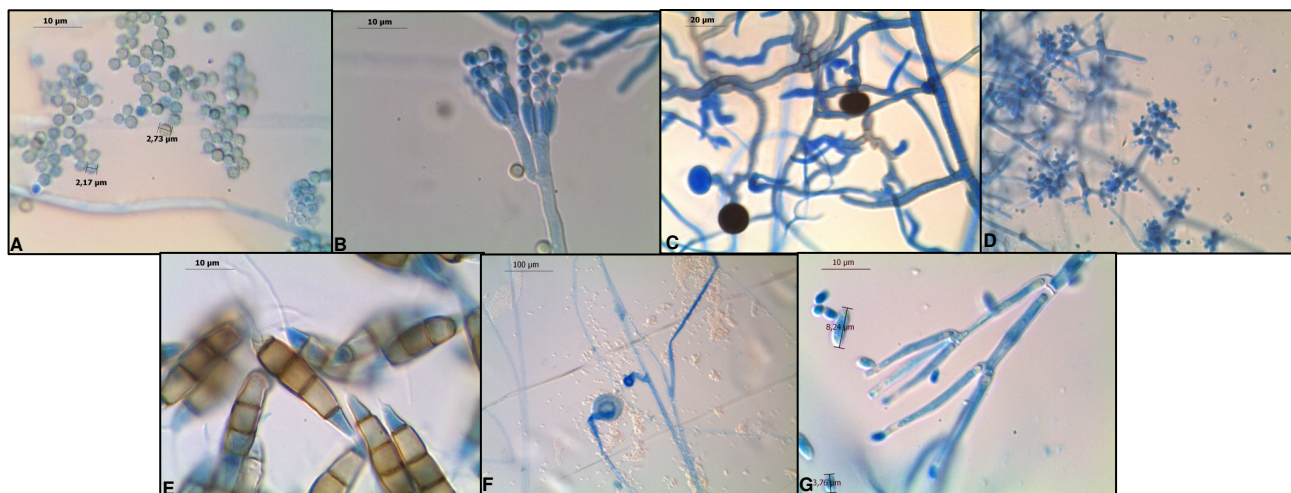


Figura 6. Banco de imagens construído na Universidade do Minho. A e B *Penicillium virgatum* (CBMAI 1336); C- *Nigrospora* sp. CBMAI 1328; D- *Trichoderma harzianum* CBMAI 1359; E- *Pestalotiopsis* sp. CBMAI 1357; F- *Mucor flavus* CBMAI 1355; G- *Bionectria pseudochroleuca* CBMAI 1348.

Análises macro- e micromorfológicas indicam que o grupamento *Penicillia* foi representado por *Eupenicillium shearii* (n=2 isolados), *P. brevicompactum* (n=3), *Penicillium chrysogenum* (n=1), *P. mangini* (n=1), *P. simplicissimum* (n=2), *P. virgatum* (n=6) e *Penicillium* spp. (n=3). Em adição, representantes do gênero *Trichoderma* foram identificados como: *Trichoderma asperellum* (n=1), *T. atroviride* (n=1), *T. harzianum* (n=28), *T. stromaticum* (n=1) *T. viride* (n=1), e *Trichoderma* sp. (n=12). Os isolados remanescentes foram identificados como *Bionectria* spp. (n=4), *Cladosporium* sp. (n=1), *Daldinia* sp. (n=1), *Microsphaeropsis* sp. (n=1), *Mucor* sp. (n=1), *Nectria* sp. (n=1), *Nemania* spp. (n=2), *Nigrospora* sp. (n=1), *Paecilomyces lilacinus* (n=2), *Pestalotiopsis* spp. (n=2). Não foi possível realizar a

identificação de 21 isolados através de técnicas exclusivamente morfológicas. O software on-line: [from/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm](http://from.taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm) (Samuels et al., 2001) foi utilizado para diferenciar espécies de *Trichoderma* através de análises das estruturas dos conídios e dos conidióforos.

5.4. TAXONOMIA MOLECULAR DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

De acordo com o sequenciamento e análises filogenéticas do gene ribossomal ITS, foram identificados 17 gêneros pertencentes ao filo Ascomycota, entre eles: *Cladosporium* sp. (n=1), da ordem Capnodiales; *Eupenicillium shearii* (n=2) *Penicillium* spp. (n=3), *P. brevicompactum* (n=3), *P. chrysogenum* (n=1), *P. mangini* (n=1), *P. simplicissimum* (n=2) e *P. virgatum* (n=6), pertencentes à ordem Eurotiales; *Diaporthe* sp. (n=1) da ordem Diaporthales; *Bionectria* spp. (n=4), *Chaunopycnis* sp. (n=1), *Fusarium* sp. (n=1), *Nectria* sp. (n=1), *Paecilomyces lilacinus* (n=2), *Trichoderma viride* (n=2), *T. atroviride* (n=9), *T. cf. Stilbohypoxyli* (n=1), *T. asperellum* (n=5) e *T. harzianum* (n=29) da ordem Hypocreales; *Nigrospora* sp. (n=1) pertencente à ordem Trichosphaeriales; e *Biscogniauxia* sp. (n=1), *Daldinia* sp. (n=1), *Pestalotiopsis* sp. (n=1) e *Xylaria* spp. (n=6) da ordem Xylariales. Dois isolados foram identificados como *Microsphaeropsis* sp., pertencente ao grupo dos fungos anamórficos e um outro como *Aporospora* sp. (*incertae sedis*). Um único isolado representante do Filo Zygomycota foi identificado como *Mucor* sp. (Figura 7).

Dez isolados apresentaram sequências ITS com baixa qualidade e foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 do gene ribossomal 28S rDNA, sendo identificados como: *Biatrispora* sp. (n=1) da ordem Dothideales;

Arthopyrenia sp. (n=4) e *Pleospora* sp. (n=1) pertencente à ordem Pleosporales; *Annulohypoxyton* sp. (n=1), *Anthostomella* sp. (n=1) e *Nemania* sp. (n=2), pertencentes à ordem Xylariales (Figura 8).

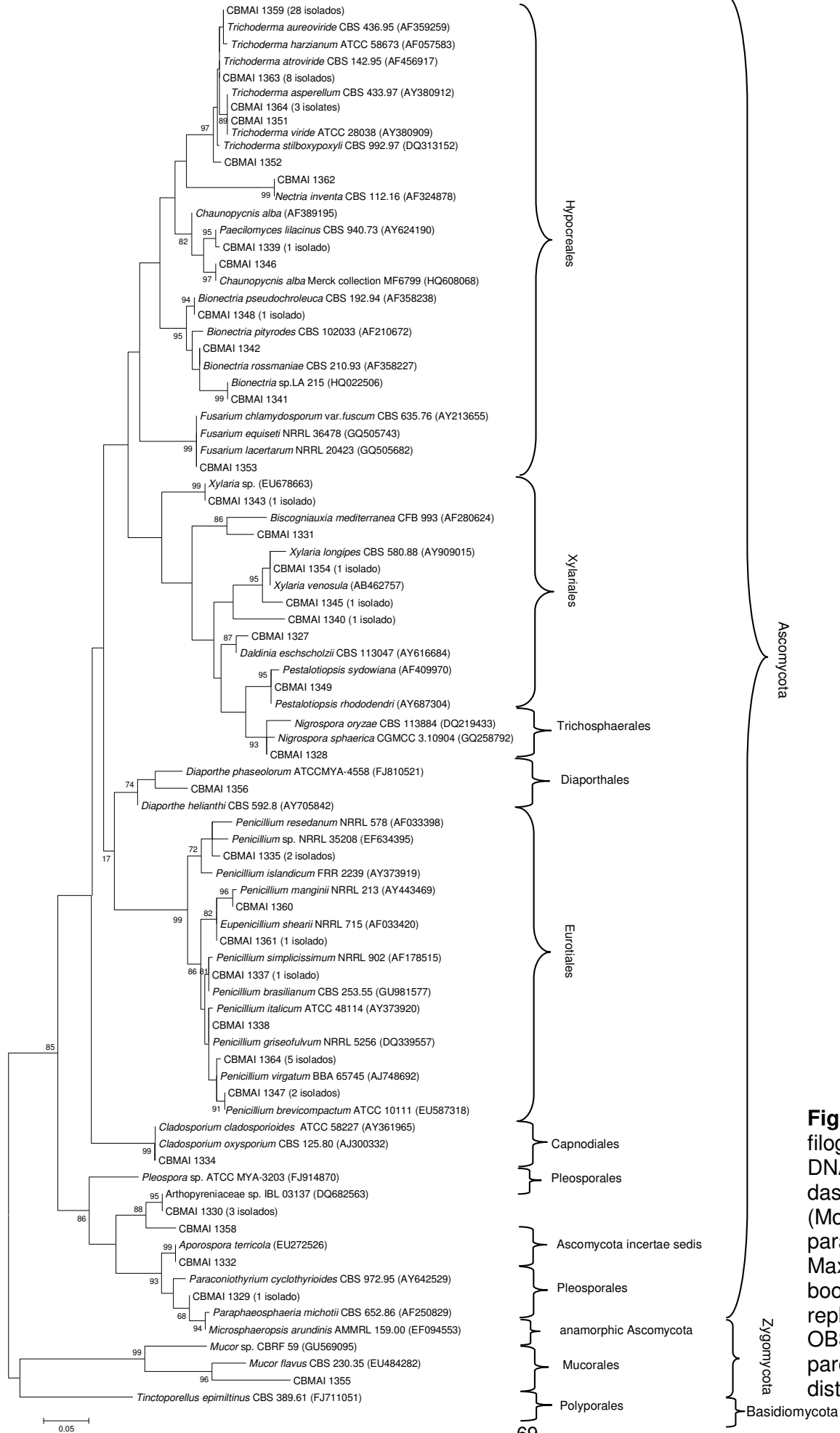


Figura 7: Árvore filogenética do gene ITS do DNAr dos fungos isolados das amostras de esponja. (Modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Maximum Likelihood; bootstrap com 1,000 replicatas); *cutoff* = 0,03. OBS: os isolados entre parênteses são os ribotipos distintos.

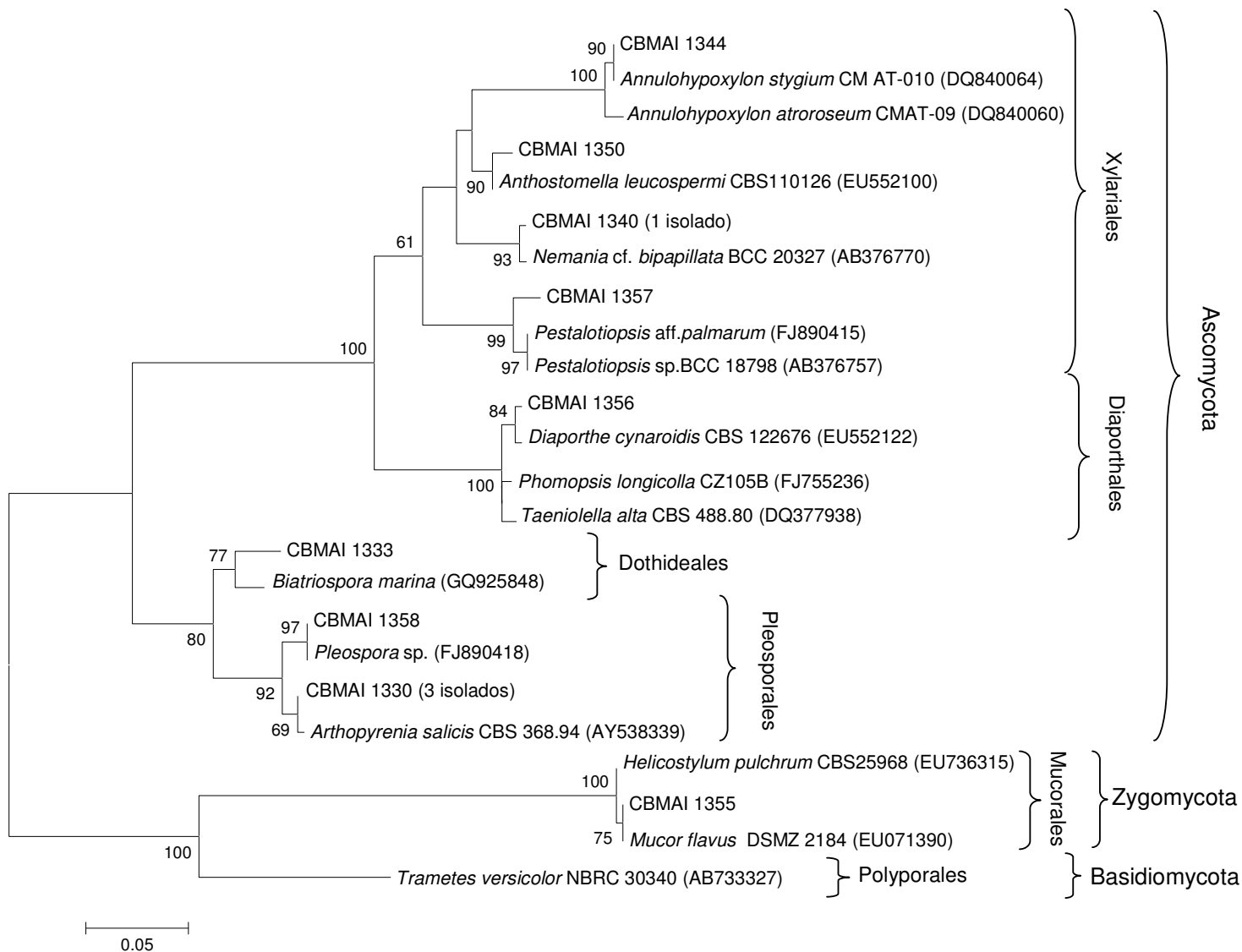


Figura 8. Árvore filogenética baseada em análises do gene 28S (regiãoD1/D2 do DNAr) dos fungos isolados da esponja marinha *D. reticulatum* (Modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Maximum Likelihood; bootstrap com 1,000 replicatas); *cutoff* = 0,03. OBS: os isolados entre parênteses são os ribotipos distintos.

A amostra DR9 apresentou uma maior diversidade de fungos em comparação com a amostra DR6. Na amostra DR9 foram identificados representantes dos gêneros *Annulohypoxylon*, *Aporospora*, *Biatrispora*, *Chaunopycnis*, *Cladosporium*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Microsphaeropsis*, *Nemania* e *Nigrospora*. Enquanto que na amostra DR6 foram encontrados representantes dos gêneros *Anthostomella*, *Biscogniauxia*, *Nectria*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Pleospora*. Os gêneros *Arthopyrenia*, *Bionectria*,

Penicillium, *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* e *Xylaria* foram encontrados em ambas as amostras (Figura 7).

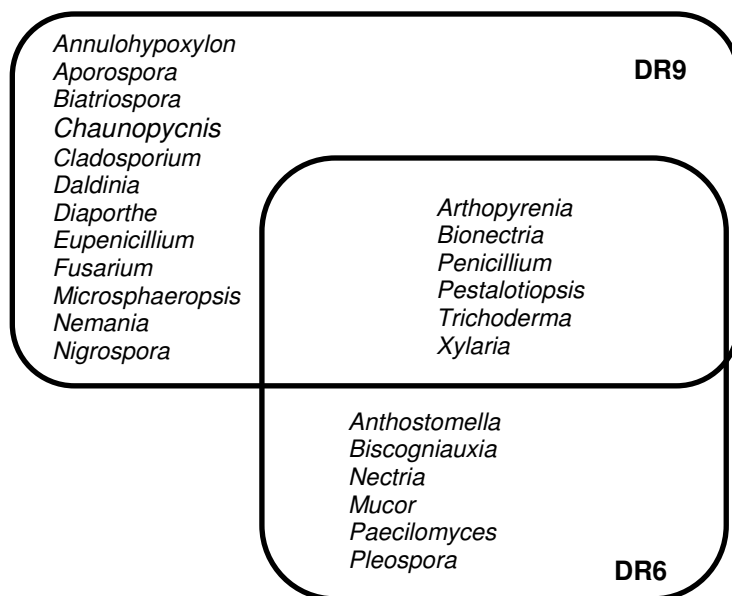


Figura 9. Diversidade dos gêneros encontrados nas amostras e entre as amostras DR6 e DR9.

Alguns estudos tem reportado o isolamento de representantes dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Bionectria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Nectria*, *Diaporthe* e *Nigrospora* a partir de substratos marinhos tais como algas, ascídias, esponjas e cnidários (Li & Wang, 2009; da Silva et al., 2008, Wang et al., 2008). Estes fungos são marinhos facultativos, pois podem ser isolados tanto no ambiente marinho quanto no ambiente terrestre. Entretanto, embora sejam organismos facultativos, adaptações genéticas podem ocorrer devido à influência do ambiente que estes micro-organismos habitam.

Representantes do gênero *Paecilomyces* já foram isolados em praias de Olínda, Pernambuco, Brasil (Gomes et al., 2008), *Nigrospora* em profundidades de

500 m (Roth et al., 1964), *Xylaria* na costa da China (Lin et al., 2001), *Daldinia escholzii* já foi isolada de algas marinhas (Indriani, 2009), *Pleospora* em praias de Portugal (Figueira & Barata, 2007) e o fungo *Aporospora terricola* foi isolado de mangues na Espanha (Maciá-Vicente et al., 2008). A espécie *Biatriospora marina* pode ser encontrada em vários substratos, tais como folhas de pântanos, mangues e no mar (Chinnaraj, 1993; Suetrong et al., 2009). Existem relatos do isolamento dos gêneros *Annulohyphoxylon* no norte da Tailândia (Fournier et al., 2010) e no nordeste do Brasil (Pereira et al., 2010), de *Anthostomella* em amostras de madeira em mangues da costa da Índia e pântanos da Tailândia (Pinnoi et al., 2006; Sarma & Vittal, 2001) e de *Nemania* em águas da costa de Hong Kong (Jones & Vrijmoed, 2003).

5.5. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR MALDI-TOF ICMS

Representantes do gênero mais abundante *Trichoderma* (n=33) e ao mais diverso *Penicillium* (n=18) foram submetidos às análises por MALDI-TOF ICMS. As Figuras 10A e B, mostram os respectivos dendrogramas relacionados a estes dois gêneros.

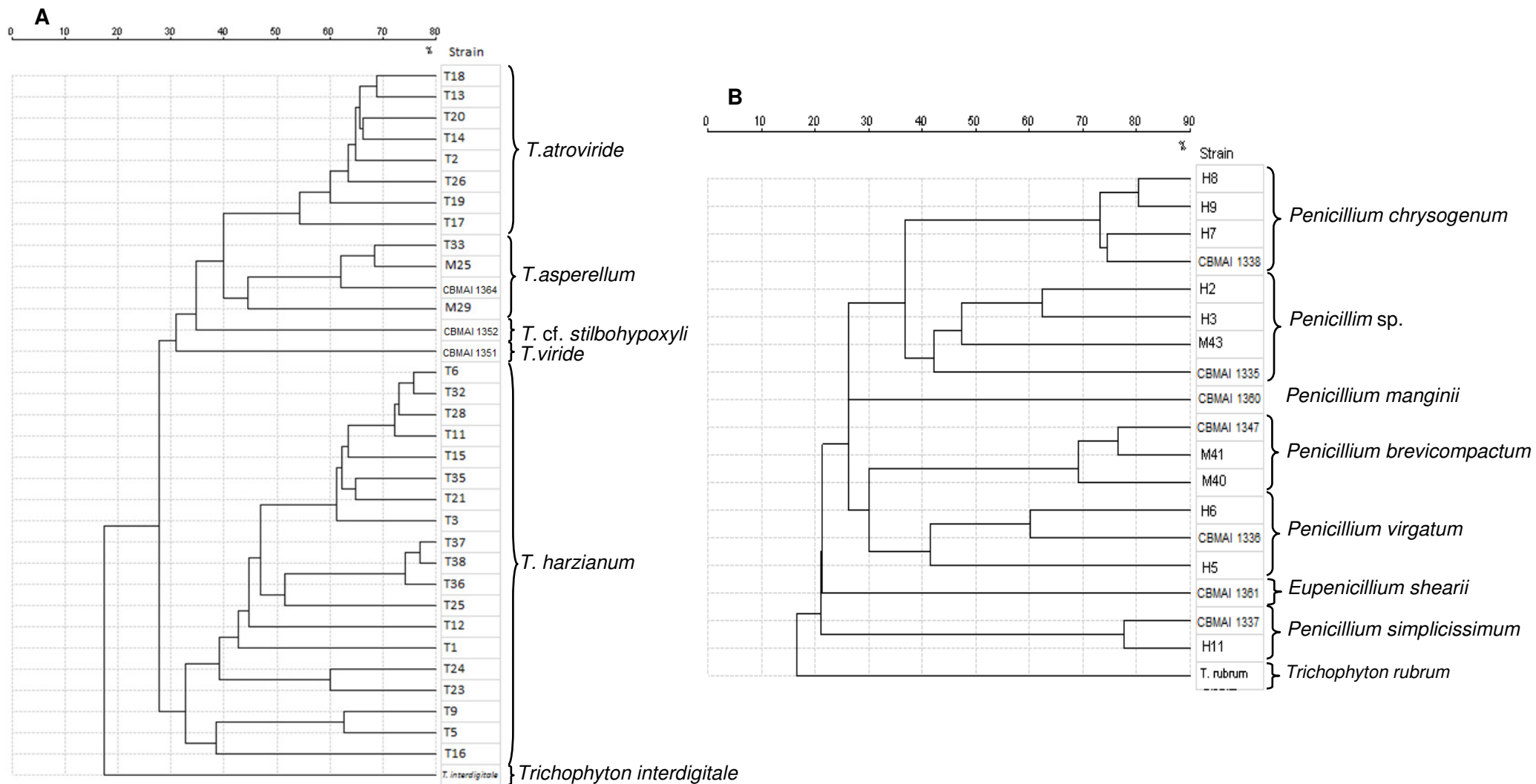


Figura 10. Dendrogramas obtidos a partir de análises por MALDI-TOF ICMS, mostrando a similaridade entre os isolados. **A-** gênero *Trichoderma* (*Trichophyton interdigitale* foi usado como *outgroup*); **B-** gênero *Penicillium* (*Trichophyton rubrum* foi usado como *outgroup*). Erro = 0,08%.

A identificação de micro-organismos, especialmente as células vegetativas e os esporos por MALDI TOF ICMS é considerada uma tecnologia emergente (Lasch et al., 2008). De acordo com Van Veen et al. (2010) o MALDI-TOF MS é uma técnica que pode ser implementada com facilidade para identificação de rotina de bactérias e leveduras em um laboratório de microbiologia médica. Entretanto, bases de dados amplas e confiáveis devem ser estruturadas para que as comparações dos espectros possam ser realizadas e a amostra identificada. Embora o banco de dados SARAMIS™ contenha registros de espectros de *Penicillium* e *Trichoderma*, neste trabalho em particular, nenhuma correspondência foi alcançada entre estes espectros e os espectros obtidos a partir de nossos isolados. Análises mais precisas devem ser realizadas utilizando diferentes meios e condições de crescimento para superar as discrepâncias entre os dados. Entretanto, observando a figura 7, podemos verificar que os dendrogramas mostraram agrupamentos entre os isolados que corrobora com os resultados encontrados nas análises filogenéticas do gene DNAr ITS.

O presente trabalho contribuiu para a ampliação do banco de dados SARAMIS™, disponível na Micoteca da Universidade do Minho (MUM), uma vez que, conseguimos os respectivos espectros da grande maioria dos 98 isolados que foram submetidos as análises por MALDI TOF. Este banco de dados composto por uma ampla diversidade de espectros de fungos ambientais irá proporcionar uma melhor identificação para futuros estudos de taxonomia polifásica que serão desenvolvidos na própria MUM ou em colaboração com outras instituições.

5.6. POTENCIAIS NOVAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Penicillium*

Os resultados do sequenciamento do DNAr ITS e análise filogenética (Figura 7) de três linhagens do mesmo ribotipo (H1, H2, H3) representantes do gênero *Penicillium*, revelaram proximidade evolutiva com um isolado de *Penicillium* depositado na coleção NRRL cuja espécie não é ainda conhecida (*Penicillium* sp. NRRL 35208). Desta forma, análises adicionais de taxonomia convencional (microscopia eletrônica de varredura) e taxonomia molecular (sequenciamento dos genes da β -tubulina e calmodulina) foram realizadas visando confirmação da hipótese da nova espécie. A Figura 11 mostra três árvores filogenéticas baseadas em alinhamentos dos genes ITS, β -tubulina e Calmodulina, dos *Penicillium* spp. isolados com sequências recuperadas do Genbank.

Os resultados da microscopia eletrônica não foram satisfatórios, visto que as células ficaram colapsadas, prejudicando as análises. Entretanto, os dados derivados do sequenciamento e análise filogenética dos genes β -tubulina e calmodulina corroboram os resultados do sequenciamento do gene ITS.

Novas análises morfológicas serão realizadas, bem como análises de MALDI-TOF ICMS, por comparação de novos espectros após aquisição de linhagens taxonomicamente próximas aos isolados utilizados no estudo, que serão adquiridas junto a Coleções de Cultura de referência como a NRRL, CBS e outras.

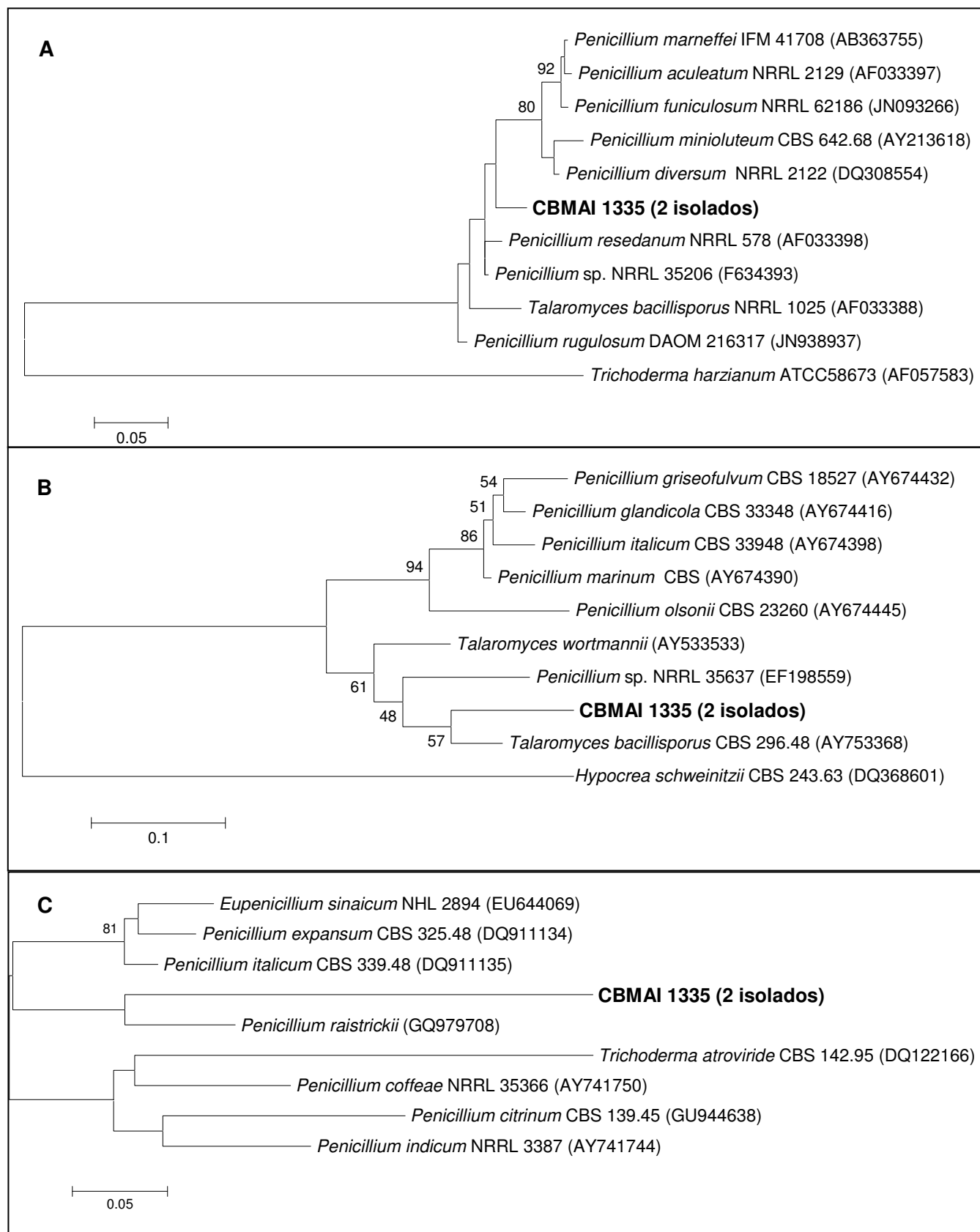


Figura 11. Árvore filogenética baseada em análises dos genes ITS (**A**), β -tubulina (**B**) e Calmodulina (**C**), dos *Penicillium* spp. e de sequências recuperadas do Genbank (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Maximum Likelihood; bootstrap com 1,000 replicatas). OBS: os isolados entre parênteses são os ribotipos distintos.

Após a realização da análise de taxonomia polifásica dos 98 fungos filamentosos isolados a partir de amostras da esponja marinha *D. reticulatum* um total de 38 isolados foram devidamente caracterizados e depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e suas respectivas sequência gênicas do DNAr ITS e/ou D1/D2- 28S, foram depositadas no Genbank (Tabela 6).

Cabe ressaltar a relevância da utilização de abordagem polifásica em estudos de diversidade de micro-organismos recuperados de amostras ambientais.

Tabela 6. Comparação da identificação dos fungos filamentosos isolados das amostras DR6 e DR9 obtidos por diferentes metodologias.

Amostra	Nº CBMAI	Nº Genbank	Identificação Molecular (BLAST _N)	Macro- e microscopia	MALDI-TOF ICMS	Identificação final
DR6	1331	JN903537	100% <i>Biscogniauxia</i> sp. (FJ884075)	NI	ND	<i>Biscogniauxia</i> sp.
	1335	JN903541	97% <i>Penicillium</i> sp. NRRL 35208 (EF634395)	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
	1339	JN903545	99% <i>Paecilomyces lilacinus</i> CBS 940.73 (AY624190)	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	ND	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
	1342	JN903548	96% <i>Bionectria rossmaniae</i> CBS 211.93 (AF210665)	<i>Bionectria</i> sp.	ND	<i>Bionectria</i> sp.
	1343	JN903549	99% <i>Xylaria</i> sp. EU678663.1	NI	ND	<i>Xylaria</i> sp.
	1344	JN903550	100% <i>Annulohypoxylon stygium</i> CM AT-010 (DQ840064)	NI	ND	<i>Annulohypoxylon</i> sp.
	1348	JN903554	99% <i>Bionectria pseudochroleuca</i> OY10207 (FJ571441)	<i>Bionectria</i> sp.	ND	<i>Bionectria</i> sp.
	1351	JN903557	100% <i>Trichoderma viride</i> ATCC 28038 (AY380909)	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma</i> cf. <i>viride</i>	<i>Trichoderma viride</i>
	1355	JN903561	99% <i>Helicostylum pulchrum</i> CBS:259.68 (EU736315) 99% <i>Mucor flavus</i> DSMZ 2184 (EU071390)	<i>Mucor</i> sp.	ND	<i>Mucor</i> sp.
	1357	JN903563	98% <i>Pestalotiopsis</i> sp. BCC 18798 (AB376757)	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	ND	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
	1358	JN903564	100% <i>Pleospora</i> sp. PP141 (FJ890418) D1/D2	NI	ND	<i>Pleospora</i> sp.
	1360	JN903566	99% <i>Penicillium manginii</i> NRRL 2134 (AY443469) 98% <i>Penicillium decaturense</i> strain P1.29 (EU833218)	<i>Penicillium manginii</i>	<i>Penicillium</i> cf. <i>manginii</i>	<i>Penicillium manginii</i>
	1362	JN903568	100% <i>Nectria inventa</i> CBS 112.16 (AF324878)	<i>Nectria</i> sp.	ND	<i>Nectria</i> sp.
DR9	1363	JN903569	100% <i>Trichoderma atroviride</i> SWFC10246 (GQ203607)	<i>Trichoderma atroviride</i>	ND	<i>Trichoderma atroviride</i>
	1327	JN903533	99% <i>Daldinia eschscholzii</i> (DQ322085)	<i>Daldinia</i> sp.	ND	<i>Daldinia</i> sp.
	1328	JN903534	97% <i>Nigrospora sphaerica</i> CGMCC 3.10904 (GQ258792) 96% <i>Nigrospora oryzae</i> CBS 113884 (DQ219433)	<i>Nigrospora</i> sp.	ND	<i>Nigrospora</i> sp.
	1329	JN903535	98% <i>Microsphaeropsis arundinis</i> (FJ798603)	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	ND	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
	1330	JN903536	99% <i>Arthopyrenia salicis</i> CBS 368.94 (AY538339)	NI	ND	<i>Arthopyrenia</i> sp.
	1332	JN903538	100% <i>Aporospora terricola</i> (EU272526)	NI	ND	<i>Aporospora</i> sp.
	1333	JN903539	97% <i>Biatrispora marina</i> isolate CY_1228 (GQ925848) 100% <i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 58227 (AY361965)	NI	ND	<i>Biatrispora</i> sp.
	1334	JN903540	100% <i>Cladosporium oxysporum</i> IFM 56397 (EU759979)	<i>Cladosporium</i> sp.	ND	<i>Cladosporium</i> sp.
	1336	JN903542	99% <i>Penicillium virgatum</i> BBA 15745 (AJ748692) 97% <i>Penicillium lanosum</i> NRRL 2009 (DQ304540)	<i>Penicillium virgatum</i>	<i>Penicillium</i> cf. <i>virgatum</i>	<i>Penicillium virgatum</i>
	1337	JN903543	98% <i>Penicillium simplicissimum</i> NRRL 902 (AF178515) 98% <i>Penicillium brasilianum</i> FKI-3368 (AB455514)	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Penicillium</i> cf. <i>simplicissimum</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
	1338	JN903544	99% <i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10108 (AY371634)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	1340	JN903546	99% <i>Nemania</i> cf. <i>bipapillata</i> BCC 20327 (AB376770)	<i>Nemania</i> sp.	ND	<i>Nemania</i> sp.
	1341	JN903547	99% <i>Bionectria</i> sp. (HQ022506)	<i>Bionectria</i> sp.	ND	<i>Bionectria</i> sp.
	1345	JN903551	100% <i>Xylaria venosula</i> PP071023 (AB462757)	NI	ND	<i>Xylaria</i> sp.

Continuação da Tabela 6.

1346	JN903552	99% <i>Chaunopycnis alba</i> (HQ608068)	NI	ND	<i>Chaunopycnis</i> sp.
1347	JN903553	99% <i>Penicillium brevicompactum</i> NRRL (AY484927)	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Penicillium cf. brevicompactum</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
1349	JN903555	100% <i>Pestalotiopsis rhododendri</i> (AY687304) 100% <i>Pestalotiopsis sydowiana</i> (AF409970)	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	ND	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
1350	JN903556	97% <i>Anthostomella brabeji</i> CBS:110128 (EU552098)	NI	ND	<i>Anthostomella</i> sp.
1352	JN903558	100% <i>Trichoderma cf. stilbohypoxyli</i> DIS 240M (EU263996)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma cf. stilbohypoxyli</i>	<i>Trichoderma cf. stilbohypoxyli</i>
1353	JN903559	100% <i>Fusarium equiseti</i> (HQ718416) 100% <i>Fusarium chlamydosporum</i> (GU134902) 100% <i>Fusarium incarnatum</i> strain HKI00504 (EU111657)	ND	ND	<i>Fusarium</i> sp.
1354	JN903560	100% <i>Xylaria</i> sp. (FJ175174)	NI	ND	<i>Xylaria</i> sp.
1356	JN903562	98% <i>Taeniolella alta</i> CBS 488.80 (DQ377938) 98% <i>Diaporthe</i> sp. CBS 134.42 (DQ377874)	NI	ND	<i>Diaporthe</i> sp.
1359	JN903565	100% <i>Hypocrea lixii</i> strain CBS 102174 (AY328037) 100% <i>Trichoderma harzianum</i> ATCC58673 (AF057583)	<i>Trichoderma harzianum</i>	ND	<i>Trichoderma harzianum</i>
1361	JN903567	99% <i>Eupenicillium shearii</i> NRRL 715 (AF033420)	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium cf. shearii</i>	<i>Eupenicillium shearii</i>
1364	JN903570	100% <i>Trichoderma asperellum</i> CPK2722 (FJ412053) 100% <i>Trichoderma viride</i> NRRL 6418 (GQ221864)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma cf. asperellum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>

NI: Não identificado; ND: Não detectado

5.7. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE FUNGOS: CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS

Visando ampliar o conhecimento da comunidade de fungos filamentosos presentes nas duas amostras da esponja *D. reticulatum* foi proposto no presente trabalho a utilização de abordagem independente de cultivo por meio da construção de 2 bibliotecas genômicas. Para tanto, foram utilizados quatro diferentes protocolos de extração para obtenção do DNA genômico da comunidade fúngica presente nas amostras estudadas. O protocolo descrito por Yoshie et al. (2001) foi o único que não derivou resultados satisfatório de extração (canaleta 6 e 7 da Figura 12C). Os demais protocolos renderam resultados satisfatórios (Figura 12).

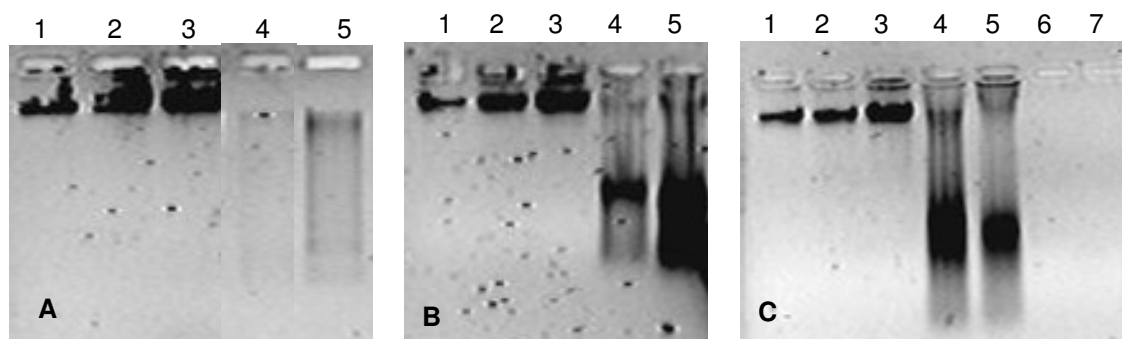


Figura 12. Extração de DNA genômico das amostras de esponja DR6 e DR9. **A** – Extração com kit Mo BIO, canaleta 4 (DR6) e canaleta 5 (DR9); **B** - Extração com o protocolo proposto por Großkopf et al. 1998 & Neria-Gonzáles et al., 2006, canaleta 4 (DR6) e canaleta 5 (DR9); **C** - Extração com os protocolos propostos por: Costantini, 2004, canaleta 4 (DR6) e canaleta 5 (DR9); e Yoshie et al., 2001, canaleta 6 (DR6) e canaleta 7 (DR9). **A, B e C:** canaleta 1 (λ 25ng), canaleta 2 (λ 50ng), canaleta 3 (λ 100ng)

De acordo com os resultados obtidos após utilização dos protocolos de extração, Power Soil DNA Isolation Kit (Mo BIO); Constantini (2004); Yoshie et al. (2001) e Großkopf et al. (1998) & Neria-Gonzáles et al. (2006), pode-se observar que o Power Soil DNA Isolation Kit (Mo BIO) mostrou uma melhor eficiência,

levando-se em consideração os resultados dos amplicons com os *primers* ITS1F e ITS4, observados em géis de agarose após respectivas reações de amplificação (canaletas 2, 3, 4 e 5 da Figura 13A). Todas as estratégias de PCR utilizadas no presente projeto foram realizadas com sucesso, visto que as bibliotecas para cada gene DNAr (ITS1/ITS2 e SSU-18S) foram construídas (Figuras 14 e 15).

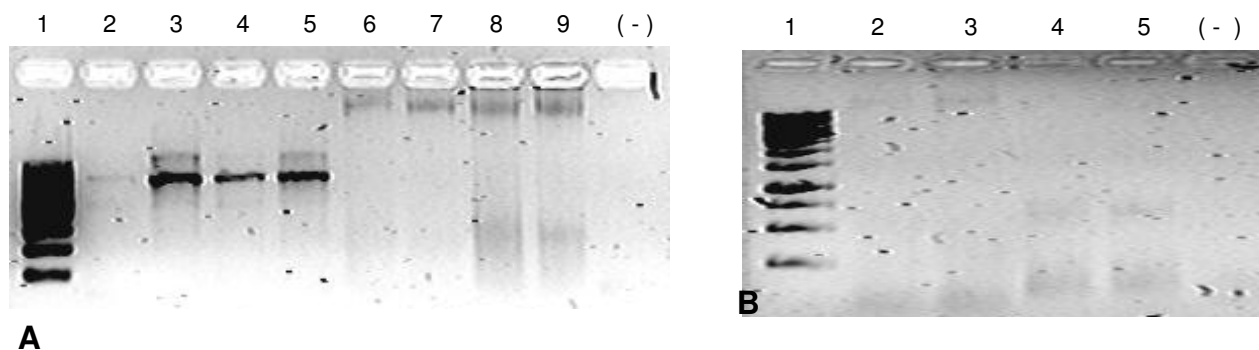


Figura 13. Amplificação da região do DNAr ITS1-5,8S-ITS2 (primer set 1) a partir do DNA extraído das amostras de esponja DR6 e DR9. **A** – DNAs extraídos com o kit Mo BIO: canaletas 2 e 4 (DR6); canaletas 3 e 5 (DR 9). DNAs extraídos com o protocolo proposto por Costantini, 2004: canaletas 6 e 8 (DR 6); canaletas 7 e 9 (DR 9). **B** - DNAs extraídos com o protocolo proposto por Großkopf et al. 1998 & Neria-González et al., 2006: canaleta 2 (DR6) e canaleta 3 (DR9). DNAs extraídos com o protocolo proposto por Yoshie et al., 2001: canaleta 4 (DR6) e canaleta 5 (DR9). **A e B:** canaleta 1 (marcador de 100pb).

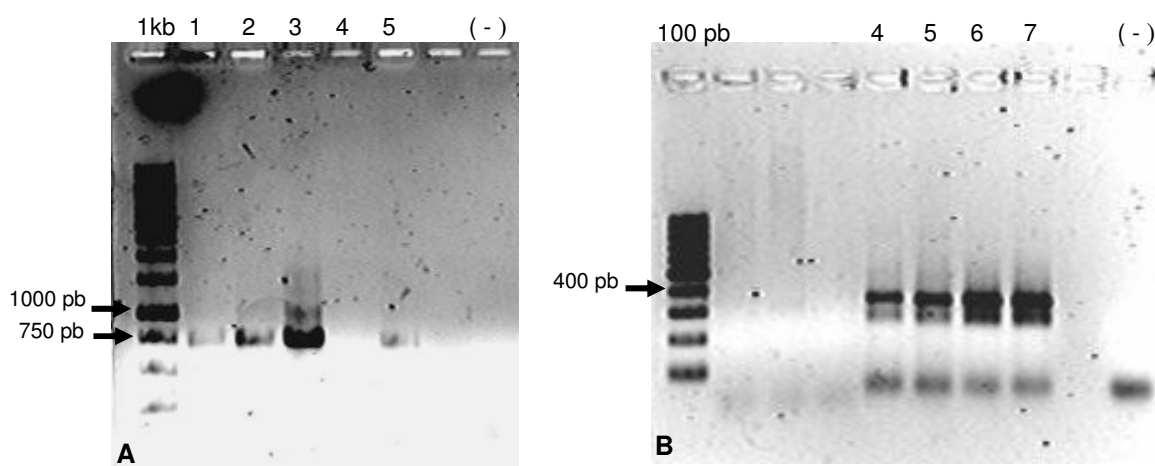


Figura 14. Amplificação da região do DNA ITS1-5,8S-ITS2 (primer set 2). **A** - reação de PCR com os *primers* ITS1F e ITS4 (externos) canaleta 1 e 2 (DR6), canaleta 3, 4 e 5 (DR9); **B** – nested PCR com os *primers* ITS3 e ITS4 (internos) canaleta 4 e 5 (DR6), canaleta 6 e 7 (DR9).

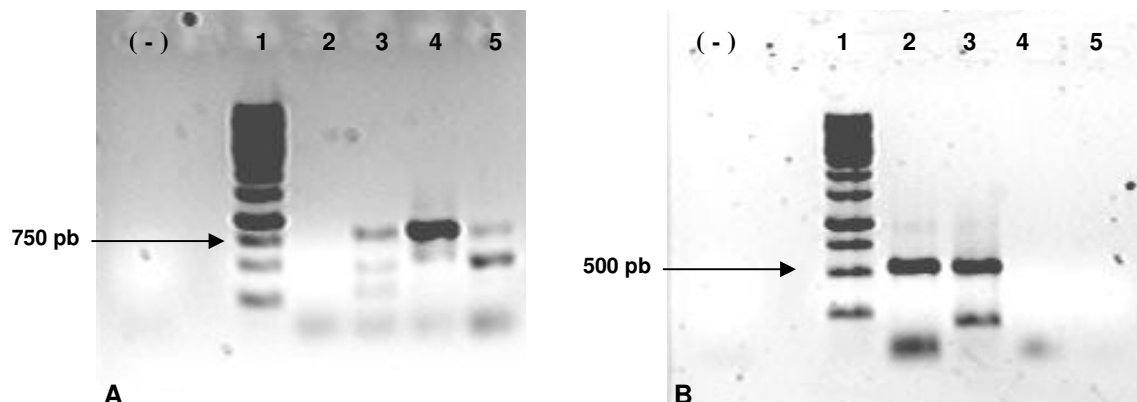


Figura 15. Amplificação da região do DNAr SSU-18S (primer set 4 e 5) a partir do DNA extraído das amostras de esponja DR6 e DR9. **A** – primer set 5, Nested-PCR com *primers* SSU13f/SSUr830: canaletas 2 (DR6); 3 (DR9); 4 (DR6) e 5 (DR 9) **B** – primer set 4, Nested-PCR com *primers* SSU13f/SSUr710: canaletas 2 (DR6); 3 (DR9); 4 (DR6) e 5 (DR9). **A e B:** canaleta 1 (marcador de 100pb).

5.7.1. DIVERSIDADE FÚNGICA NÃO CULTIVADA ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DE ESPONJA ESTUDADAS

Foram utilizadas duas estratégias independentes de cultivo para a recuperação da diversidade das amostras de esponjas marinhas: 1) metodologia de sequenciamento direto dos genes DNAr ITS (pares de *primers* 1 e 2) e 18S (pares de *primers* 3, 4 e 5); 2) metodologia de DGGE seguida de sequenciamento do gene ITS (par de *primer* 6). Foram construídas várias bibliotecas genômicas referentes aos genes ribossomais ITS (cerca de 960 clones recuperados, sendo aproximadamente 260 sequenciados) e SSU-18S (cerca de 300 clones foram recuperados, sendo aproximadamente 150 clones sequenciados).

A maior diversidade foi recuperada a partir do gene ribossomal ITS, tendo em vista a recuperação de insertos representando 7 gêneros e o grupo dos fungos anamórficos. A partir da estratégia 1 (sequenciamento direto) da amostra DR9, foi possível a identificação dos seguintes grupos taxonômicos: 1 clone afiliado ao gênero *Penicillium* da ordem Eurotiales, um clone afiliado ao gênero *Preussia* da

ordem Pleosporales, um clone afiliado ao gênero *Metschnikowia* da ordem Saccharomycetales e um *uncultured* clone afiliado a ordem Arthoniales, ambas sequências afiliadas ao Filo Ascomycota. O Filo Basidiomycota foi representado por dois clones afilidos ao gênero *Gonoderma* da ordem Polyporales (Figura 16 e Tabela 7).

Com relação à amostra DR6, não foi possível encontrar nenhum inserto de fungos filamentosos, apenas de esponjas marinhas. Entretanto, após sequenciamento dos clones a partir das bandas extraídas do gel de DGGE (estratégia 2) (Figura 18), foi possível a recuperação dos seguintes grupos taxonômicos da amostra DR6: 23 clones afiliados ao gênero *Microsphaeropsis* do grupo dos anamórficos, 19 clones afiliados ao gênero *Devriesia* da ordem Capnodiales e 9 clones afiliados ao gênero *Fusarium*, da ordem Hypocreales. Os resultados obtidos da amostra DR9 pela estratégia de DGGE e sequenciamento foram: 18 clones afiliados ao gênero *Aureobasidium* pertencente a ordem Dothideales, 14 clones afiliados ao gênero *Microsphaeropsis* do grupo dos fungos anamórficos e 19 clones pertencentes ao gênero *Penicillium* da ordem Eurotiales. Todos os clones foram afiliados ao Filo Ascomycota (Figura 16 e Tabela 7).

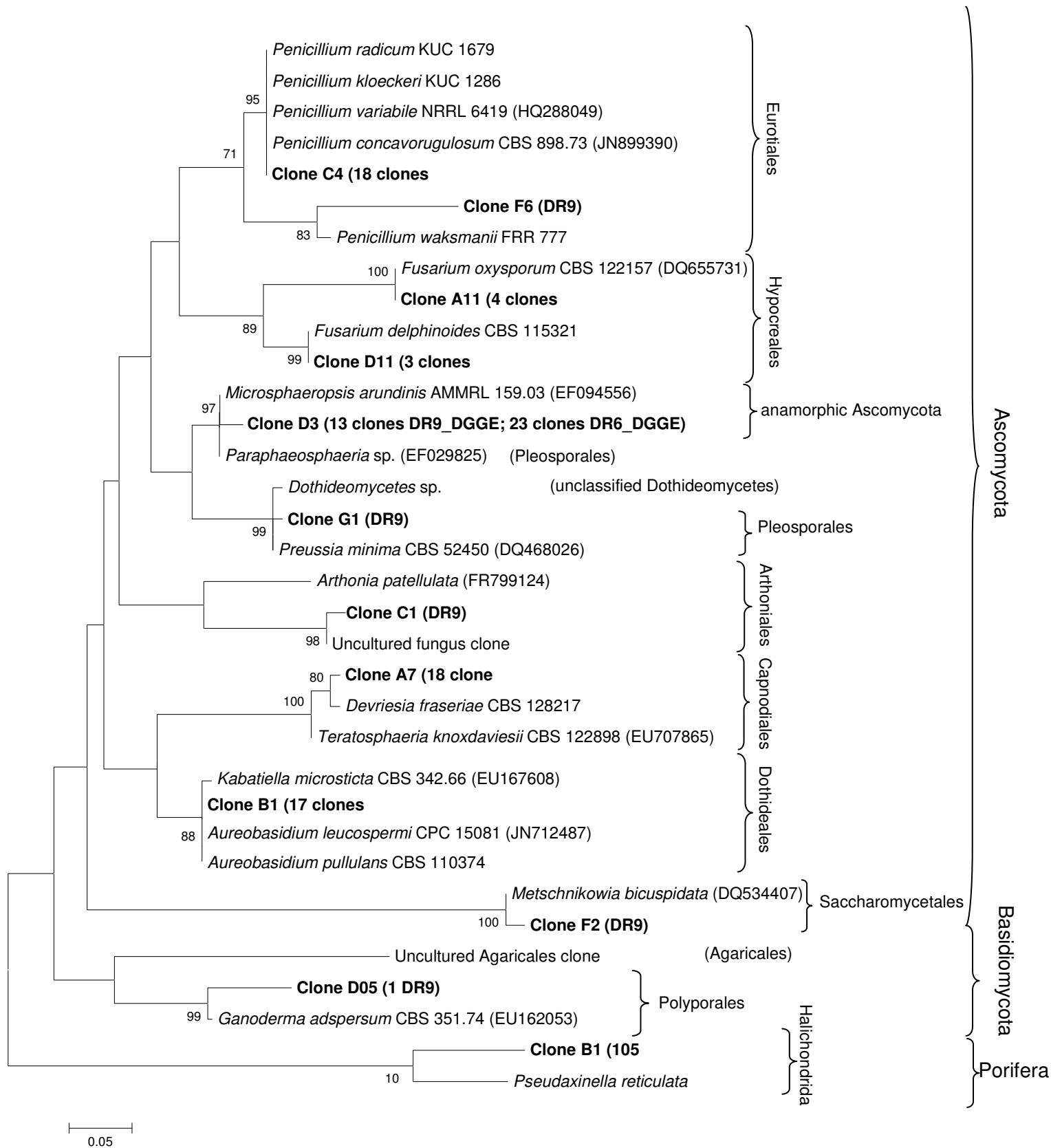


Figura 16: Árvore filogenética baseada em análises da região DNAr-ITS, mostrando a relação entre os clones recuperados das amostras de esponjas relacionados com sequências recuperadas do banco de dados Genbank (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Maximum Likelihood; bootstrap com 1,000 replicatas); *cutoff* = 0,03. OBS: entre parênteses estão os clones recuperados de cada biblioteca.

Tabela 7. Similaridade de clones das amostras DR6 e DR9 a partir de insertos dos genes DNAr ITS e 18S comparadas com sequências do GenBank.

Gene DNAr	Metodologia	Amostra	Taxon	Primer set	Clones	ID				
ITS	Seq.direto	DR9	Basidio. Asco.	1	2	98% <i>Ganoderma</i> sp. (AM269769)				
					1	90% <i>Penicillium waksmanii</i> (AY373940)				
					1	97% <i>Metschnikowia bicuspidata</i> (DQ534407)				
					1	98% <i>Preussia minima</i> CBS 52450 (DQ468026)				
					1	99% Uncultured soil fungus (GU993530)				
		DGGE	DR6 (4 insertos)	Eucary. Asco.	6	23	99% <i>Microsphaeropsis arundinis</i> AMMRL 159.03 (EF094556)			
						19	97% <i>Devriesia fraseriae</i> CBS128217 (EU707865)			
						5	100% <i>Fusarium oxysporum</i> CBS122157 (JQ228255)			
						4	99% <i>Fusarium delphinoides</i> CBS 115321(EU926244)			
						DR9 (6 insertos)	Asco	6	18	99% <i>Aureobasidium pullulans</i> SUB 04-313 (FJ744598)
	14	99% <i>Microsphaeropsis arundinis</i> AMMRL 159.03 (EF094556)								
	19	99% <i>Penicillium variabile</i> NRRL 6419 (HQ288049)								
	18S	Seq. Direto	DR6	Basidio.	4				55	97% <i>Malassezia restricta</i> CBS 7877 (EU192367)
									1	97% Uncultured Basidiomycota clone North Pole (HQ438180)
						DR9	4	53	99% <i>Malassezia restricta</i> CBS 7877 (EU192367)	
3								97% Uncultured Basidiomycota clone North Pole (GQ120139)		
1								100% <i>Coprinellus radians</i> SZMC-NL-1373 (JN939891)		

OBS: a metodologia de sequenciamento direto da amostra DR6 a partir do primer set 1, não foi realizada, tendo em vista a baixa especificidade do mesmo set primer para a amostra DR9.

A diversidade encontrada a partir de sequências do gene ribossomal 18S foi relativamente maior do que a encontrada com sequências do gene ITS. A partir da estratégia 1 (sequenciamento direto), observamos que a grande maioria dos clones foram afiliadas ao gênero *Malassezia* da ordem Malasseziales (55 clones a partir da amostra DR6 e 53 a partir da amostra DR9) e um clone derivado da amostra DR9 foi afiliado ao gênero *Coprinellus* da ordem Agaricales, filo Basidiomycota (Figura 17, Tabela 7). A obtenção de sequências a partir do gene

ribossomal ITS (amostra DR9) afiliada ao Filo Ascomycota (Figura 16) bem como do gene ribossomal 18S (DR9) afiliada ao Filo Basidiomycota (Figura 17), que apresentaram similaridades com sequências de fungos não cultivados, sugere a existência de fungos associados à esponja *D. reticulatum* ainda não caracterizados.

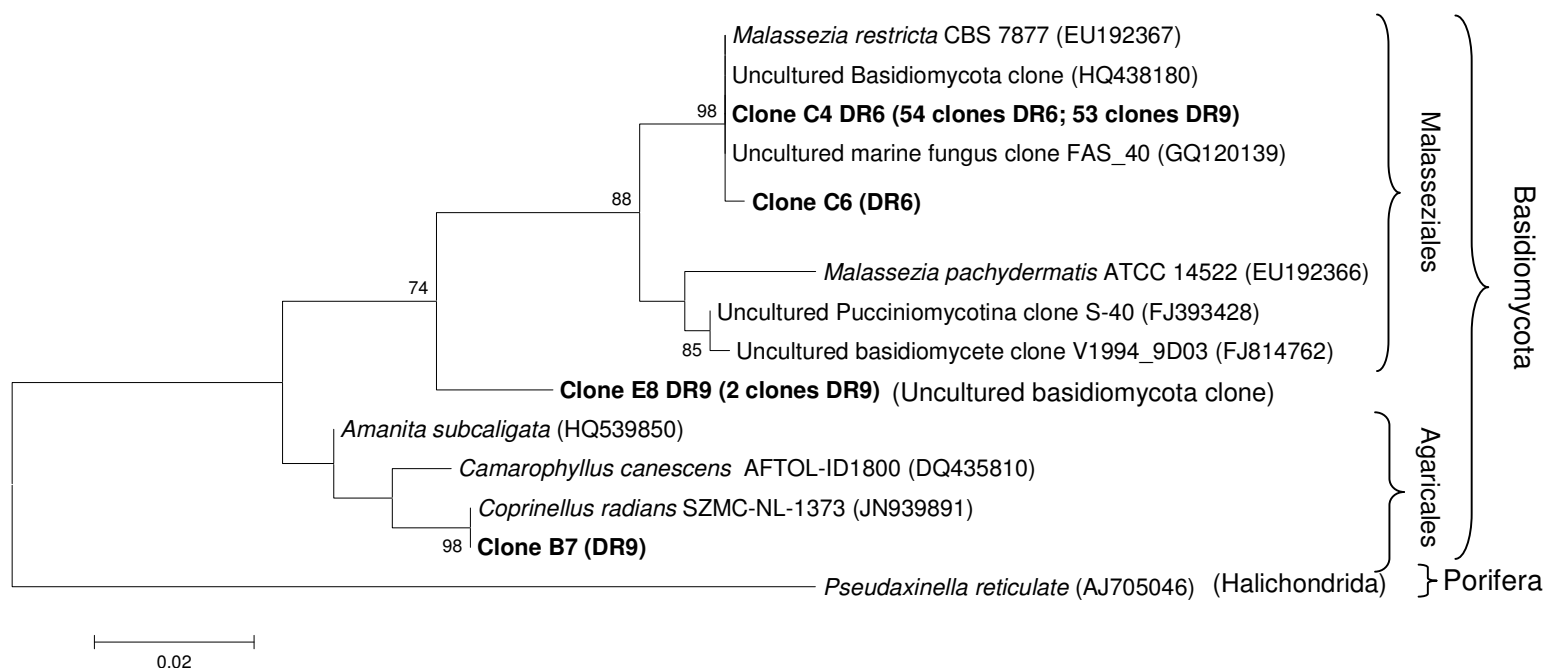


Figura 17: Árvore filogenética baseada em análises da região DNaR-18S, mostrando relação entre os clones das amostras de esponjas relacionados com sequências recuperadas do banco de dados Genbank (modelo Kimura 2-parâmetros; algoritmo Maximum Likelihood; bootstrap com 1,000 replicatas). OBS: entre parênteses estão os clones recuperados de cada biblioteca.

A baixa diversidade encontrada a partir dos genes DNaR ITS e 18S, com a utilização da estratégia 1 (sequenciamento direto), se deve, muito provavelmente à baixa especificidade dos pares de *primers* flanqueadores das regiões gênicas encontradas no pool de DNAs extraído a partir das amostras de esponjas marinhas. Resultados similares foram obtidos por Gao e colaboradores (2008) onde somente 5,4% de um total de 139 clones apresentaram similaridade com inserto fúngico. O uso do par de *primer* 3 também nos rendeu apenas insertos de

esponjas. Por outro lado, os insertos recuperados com os pares de *primers* 4 e 5, não apresentaram afiliação com sequências de esponjas, entretanto, estes pares de primers acabaram apresentado especificidade restrita ao grupo dos basidiomicetos (Figura 17).

A metodologia de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) também revelou uma diversidade distinta entre as amostras DR6 e DR9, como pode ser observado na Figura 18. As bandas A, B e C foram encontradas somente na amostra DR9. Foram extraídas do gel de DGGE 8 bandas representando a diversidade da amostra DR9 e 5 bandas da amostra DR6. Entretanto apenas 6 bandas da amostra DR9 e 4 da amostra DR6 apresentaram amplificação e puderam ser sequenciadas.

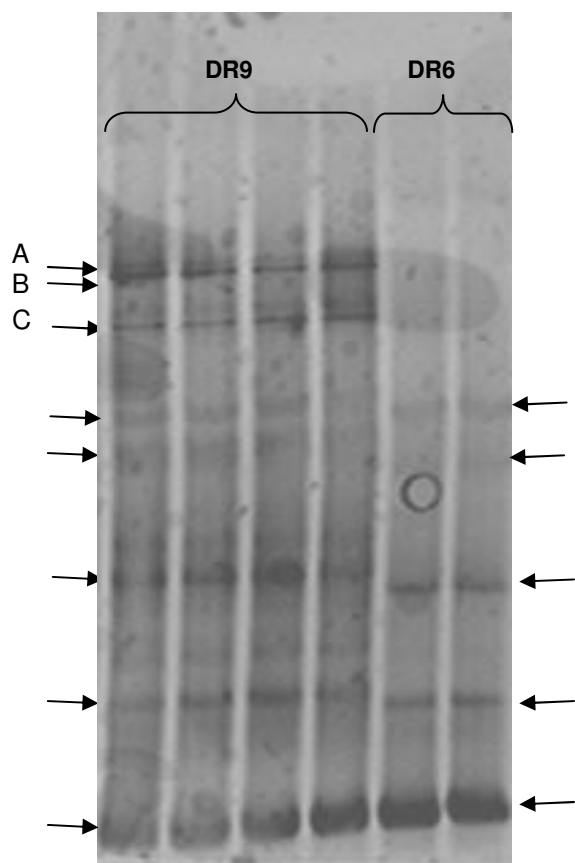


Figura 18: Gel de DGGE mostrando o padrão de bandas das comunidades fúngicas oriundas das amostras DR6 e DR9. As setas mostram as respectivas bandas extraídas do gel.

Gao et al. (2008) utilizando o gene rDNA ITS, recuperaram uma grande diversidade de sequências tanto de ascomicetos quanto de basidiomicetos de amostras de esponjas marinhas, utilizando a técnica de DGGE. No entanto, quando o gene rDNA 18S foi utilizado, os autores não encontraram resultados satisfatórios. Resultados similares foram encontrados no presente trabalho, onde representantes dos Filos Ascomycota e Basidiomycota foram encontrados com base nas análises independentes de cultivo. Por outro lado, com base na metodologia dependente do cultivo foram recuperados fungos pertencentes aos Filos Ascomycota e Zygomycota (Figura 19).

Observando os resultados encontrados no presente trabalho com base na metodologia dependente de cultivo juntamente com a metodologia independente de cultivo, podemos concluir que existe uma relação entre os micro-organismos encontrados nas duas metodologias, pois foram recuperadas sequências relacionadas às ordens Capnodiales, Dothideales, Eurotiales, Hypocreales, Pleosporales e representantes do grupo dos fungos anamórficos, em ambas as metodologias. Entretanto, as ordens Agaricales, Arthoniales, Malasseziales, Polyporales e Saccharomycetales foram encontradas somente na metodologia independente de cultivo e representantes das ordens Diaporthales, Trichosphaerales, Mucorales, Xylariales e do grupo dos fungos ainda não definidos (*insertae sedis*) na metodologia dependente de cultivo. A ordem Xylariales apresentou o maior número de gêneros recuperados (n=7), seguida da ordem Hypocreales (n=6).

Gao e colaboradores (2008) conseguiram identificar sequências afiliadas aos gêneros *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Malassezia* e *Gibberella* (anamórfico do

gênero *Fusarium*) em amostras de esponjas marinhas coletadas no Hawaii. Existe relato de isolamento do gênero *Ganoderma* na Ilha de Trindade, no Brasil (Alves, 1998). No entanto, não encontramos relato na literatura consultada referente à associação dos gêneros *Coprinellus* e *Ganoderma* com algum tipo de substrato de origem marinha.

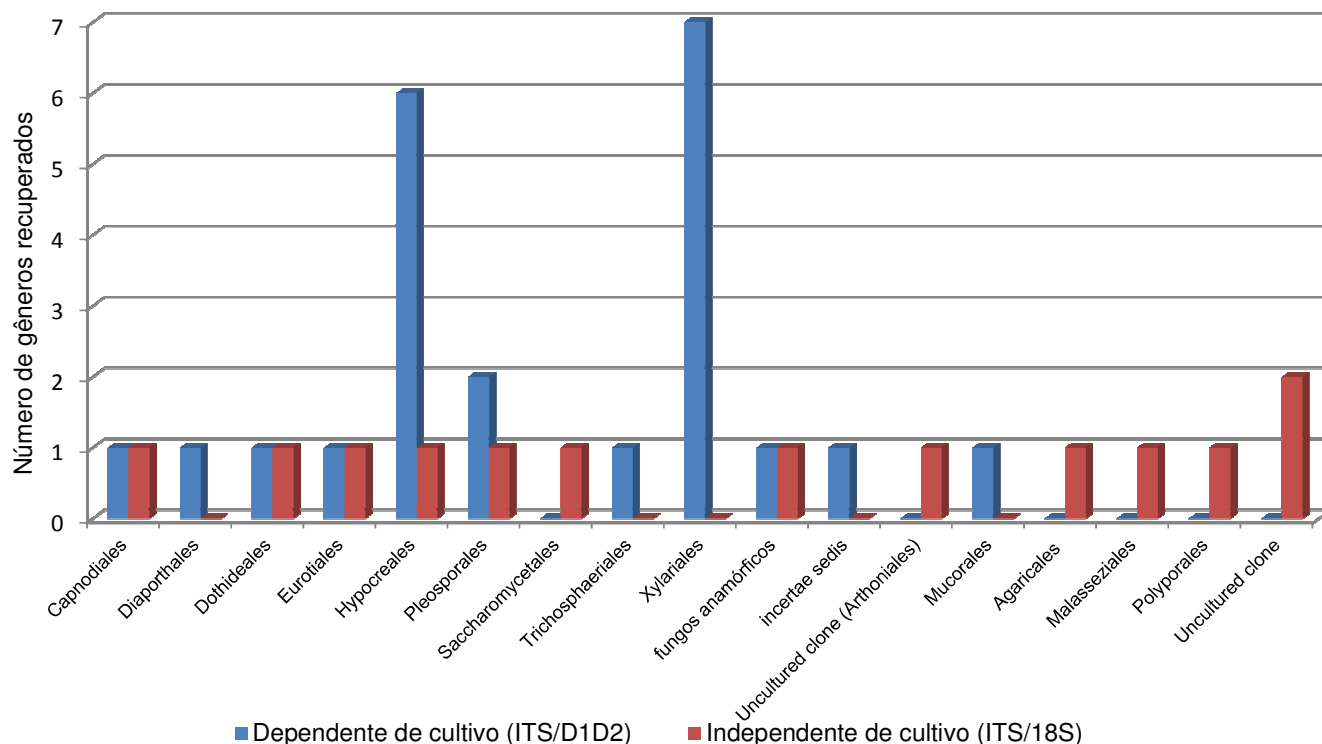


Figura 19. Grupos taxonômicos encontrados nas metodologias dependente e independente de cultivo.

5.7.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As curvas de rarefação construídas a partir de 96 sequências gênicas amplificadas a partir dos isolados resuperados das amostras de esponja *D. reticulatum* (51 sequências da amostra DR6 e 45 sequências da amostra DR9) (Figura 20) demonstram que a diversidade recuperada a partir da metodologia dependente de cultivo foi quase que completamente alcançada, visto que as curvas estão tendendo a formar um platô que indica a saturação da amostra.

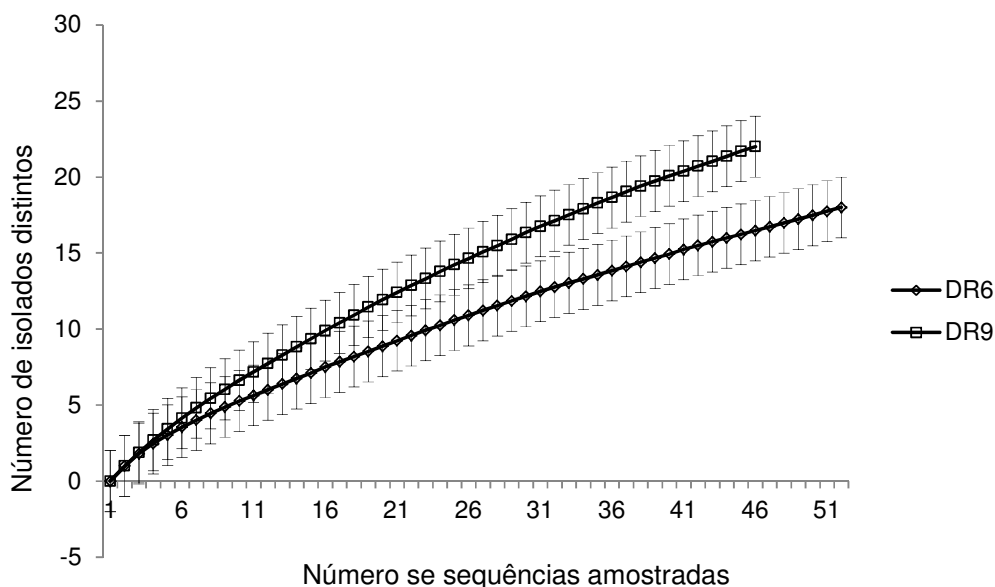


Figura 20. Curva de rarefação da riqueza dos isolados recuperados a partir das amostras de esponjas marinhas DR6 e DR9 em uma distância evolucionária de 0,03.

Quanto às análises estatísticas de rarefação dos clones das bibliotecas gênicas construídas a partir das amostras DR6 (n=51) e DR9 (n=57) (Figura 21), podemos dizer que a diversidade recuperada a partir da metodologia independente de cultivo foi alcançada para a amostra DR6 devido à formação do platô na curva de rarefação desta amostra. Entretanto, para a amostra DR9, a curva de rarefação não alcançou o platô, indicando a necessidade da realização de novo esforço amostral de clones.

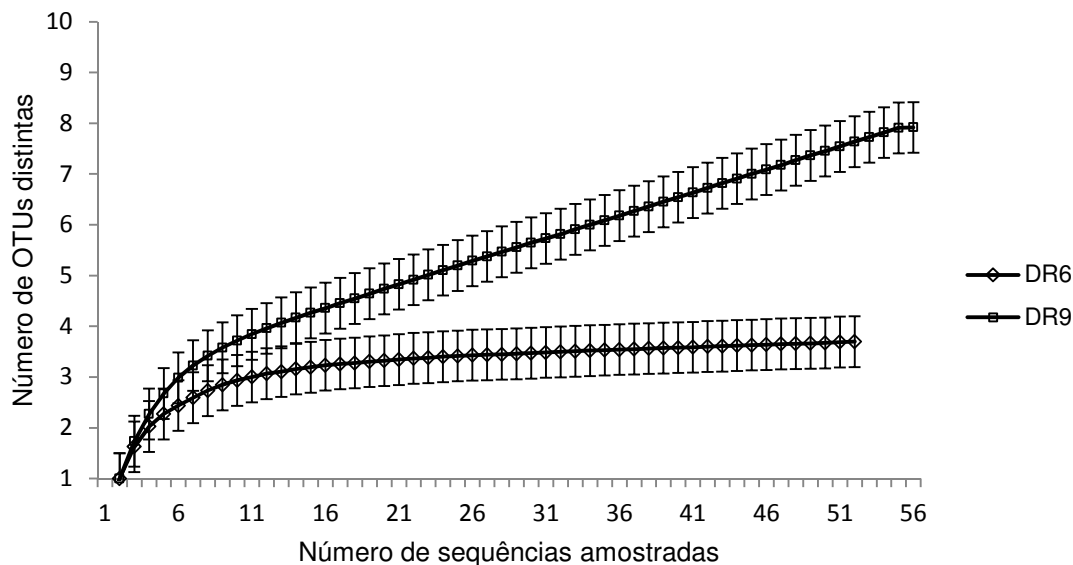


Figura 21. Curva de rarefação da riqueza dos clones recuperados a partir das amostras de esponjas marinhas DR6 e DR9 em uma distância evolutiva de 0,03.

Comparando os resultados dos dados dos estimadores de riqueza não paramétricos (ACE) e Chao1, que foram utilizados para estimar o número total de OTUs a partir das amostras estudadas, verificamos que os valores em nível de espécie (OTUs) foi um pouco superior ao valor de riqueza observado para a amostra DR6. Esses dados podem sugerir que quase todas as espécies presentes nesta amostra foi amostrada. Por outro lado, para a amostra DR9 os valores apresentados pelos estimadores (ACE) e Chao1 e para a riqueza, revelam que o número de espécies amostradas não representa a diversidade que pode ser encontrada da amostra. (Tabela 8).

Tabela 8. Estimativas de riqueza e diversidade para bibliotecas de clones de rRNA a partir de amostras de esponjas marinhas.

Amostra (n^a)	Riqueza^b	Chao1^c	ACE^d	Shannon^e	1/Simpson^f
DR6 (51)	3	4	5	1,0	0,27
DR9 (57)	7	18	19	1,4	0,40

Classificação das sequências foi baseada em valores de *cutoff* determinado pelo DOTUR (distância evolucionária de 0,03).

^an, número de sequências analisadas;

^briqueza baseada em OTUs observadas;

^cestimador de riqueza baseado na abundância;

^destimador baseado no conceito de cobertura de amostra (abundância ou o número de *singletons* e *doubletons*;

^eíndice de diversidade Shannon. Um maior número representa uma maior diversidade;

^frecíproco do índice de diversidade Simpson. Um maior número representa uma maior diversidade.

Foram utilizados dois índices de diversidade Shannon e o Simpson (1/D) para avaliar a diversidade da comunidade fúngica das amostras de esponjas em uma distância evolutiva de 0,03. Os valores encontrados para o índice de Shannon foram 1,0 a 1,4 para as bibliotecas DR6 e DR9, respectivamente e os valores para o índice de Simpson (1/D) foram 0,27 para a biblioteca DR6 e 0,40 para a biblioteca DR9 (Tabela 8). Estes resultados indicam que a maior diversidade foi encontrada a partir das OTUs recuperadas da amostra DR9, o que corrobora os resultados encontrados nas curvas de rarefação das duas bibliotecas gênicas (Figura 21).

As análises comparativas entre as duas bibliotecas geradas pelo programa MOTHUR em uma distância evolutiva de 0,03; através do gráfico do Diagrama de Venn (Figura 22), demonstrou que uma maior diversidade foi recuperada a partir da biblioteca DR9 (5 espécies). Em adição, de acordo com os resultados estatísticos gerados pelo programa LIBSHUFF (inserido dentro do programa MOTHUR) que foi utilizado para mostrar se existe diferenças biológicas entre as bibliotecas estudadas, existe uma diferença significativa entre as duas bibliotecas

pois, os valores de P para ambas as bibliotecas foram de $<0,0001$ uma vez que, valores de $P < 0,05$ são considerados significativamente distintos (Tabela 9) (Schloss et al., 2004).



Número de espécies no grupo DR6 = 3
 Número de espécies no grupo DR9 = 7
 Número espécies compartilhada entre os grupos DR6 e DR9 = 2
 % de espécies que estão compartilhadas nos grupos DR6 e DR9 = 25
 Total de riqueza em todos os grupos = 8

Figura 22. Diagrama de Venn gerado pelo programa MOTHUR, mostrando a diversidade encontrada nas duas bibliotecas gênicas

Tabela 9. Estimativas de riqueza e diversidade para bibliotecas de clones de rRNA a partir de amostras de esponjas marinhas.

Comparação	Valor de P
DR6 – DR9	$<0,0001$
DR9 – DR6	$<0,0001$

Apesar de terem sido utilizadas apenas uma amostra da esponja *D. reticulatum* coletadas em diferentes regiões, os resultados das análises de diversidade obtidos no presente trabalho, sugerem que a localização da coleta das

amostras de esponjas pode possuir influência na diversidade de seus micro-organismos associados. Fatores como salinidade, temperatura e pH da água do mar podem influenciar na atividade, abundância e distribuição de fungos marinhos (Booth & Kenkel, 1986; Gomes et al., 2008; Suetrong et al., 2009). De um modo geral, fungos marinhos precisam de temperaturas altas (geralmente entre 25 e 30 °C), para se desenvolverem, entretanto, a temperatura da água nos dias da coleta das amostras de esponjas, 03/12/2008 (DR6) e 05/12/2008 (DR9) estava em torno de 15 °C (<http://satelite.cptec.inpe.br/acervo>).

A água dos oceanos da Terra tem uma salinidade média aproximada de 35 PSU (*practical salinity units*) ou seja, para cada litro de água do mar há 35 g de sais dissolvidos (a maior parte é cloreto de sódio, NaCl). A salinidade do Oceano Atlântico, em média fica na faixa de 3,54% ou 35,4 PSU (Costa & Carvalho, 2006-2007). Em períodos mais quentes e com menores descargas fluviais, a evaporação das águas superficiais na costa tende a aumentar, tornando-as mais salinas. A descarga de água doce reduz a salinidade da água marinha adjacente e transporta nutrientes para a plataforma continental (Eça, 2009). De acordo com Gambale et al. (1977) citado por Gomes et al. (2008), a salinidade tem grande influência na microbiota dos estuários. Um trabalho feito por Borut e Jonhnson (1962) citado por Gomes et al. (2008) com fungos isolados de sedimentos de estuário, mostraram que o desenvolvimento de fungos foi influenciado pela salinidade sendo que, *Aspergillus wentii* e *Penicillium janthinellum* apresentaram um baixo crescimento em água do mar autoclavada e filtrada, mas com um bom crescimento em água com 3,5% de cloreto de sódio. O pH da água do mar é

alcalina devido a presença de íons alcalinos em maior quantidade que os ácidos, podendo variar entre 7,5 a 8,2 (Raghukumar et al., 2008).

A maior diversidade de fungos isolados perto da costa tais como mangues, areia, praia, rios e estuários é influenciada pelo ambiente costeiro. Influências ambientais (inundações, ventos) muitas vezes levam fungos terrestres aos ambientes marinhos. Deste modo, rotineiramente fungos isolados de hospedeiros marinhos frequentemente exibem características morfológicas idênticas à taxa terrestre (Geiser, 1998; Méjanelle, 2000; Morrison-Gardiner, 2002). Kirk (1980), descobriu que a germinação dos esporos de alguns táxons (*Penicillia* e *Aspergilli*) de origens terrestre que se adaptaram à vida em ambientes marinhos, foi inibida pela água do mar. Assim, embora seja provável que alguns fungos isolados a partir de locais próximos da costa, podem ter uma origem terrestre, é igualmente possível que eles também estão devidamente adaptados à vida no ambiente marinho. Para entender completamente a ascendência verdadeira destes fungos, mais estudos devem ser realizados.

Neste sentido, fatores abióticos podem influenciar na diversidade de micro-organismos associados às esponjas. Por outro lado, fatores relacionados aos macro-organismos (fatores bióticos) que abrigam seus micro-organismos associados, podem também contribuir na recuperação da diversidade microbiana associada ao hospedeiro marinho. Alguns estudos comentam sobre a simbiose entre esponjas e fungos derivados marinhos, mas a resposta para esta questão permanece desconhecida (Li & Wang, 2009). Um exemplo foi descrito por Perovic'-Ottstadt et al. (2004), onde os autores mostraram a habilidade que a esponja *Suberites domuncula* tem em reconhecer fungos em seu ambiente a nível

molecular. Um estudo descrito por (Rot et al., 2006) mostrou a transferência horizontal de genes em um *intron* mitocondrial de um fungo de esponja sugerindo assim, uma relação simbiótica entre fungos e esponjas. Em nosso trabalho, podemos ver claramente a existência de alguns gêneros que foram encontrados em ambas as amostras, que pode suportar esta “simbiose” ou relação entre esponjas marinhas e fungos filamentosos derivados marinhos. Estudos adicionais e específicos devem ser realizados com o objetivo de compreendermos a respeito da diversidade de fungos marinhos e das esponjas marinhas às quais eles estão associados.

Frente aos resultados obtidos, destacamos que a utilização simultânea das técnicas dependente e independente de cultivo é de fundamental importância quando se objetiva conhecer a diversidade microbiana em uma determinada amostra ambiental.

5.8. PRODUÇÃO DE LACASE PELOS FUNGOS DERIVADOS DA ESPONJA *D. Reticulatum*

5.8.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE

Os 64 isolados representantes de ribotipos distintos foram submetidos à triagem inicial de produção de lacase. Dentre esses, 8 apresentaram atividade da enzima entre 0,10 e 0,40 U L⁻¹. O isolado identificado como *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330 apresentou o melhor resultado de produção de lacase (0,40 U L⁻¹), seguido pelo isolado *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 (0,30 U L⁻¹). Os outros isolados produtores de lacase foram identificados como pertencentes aos gêneros:

Penicillium, *Microsphaeropsis*, *Bionectria*, *Nectria*, *Nemania*, *Chaunopycnis* e *Pleospora* (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação da produção de lacase pelos fungos filamentos que apresentaram ribotipos distintos nos experimentos de ARDRA.

Invertebrado	Código CBMAI	Meio isolamento	Siringaldazina (U L ⁻¹)	ABTS (U L ⁻¹)	Taxonomia Polifásica
DR6	1362	MS	ND	0,14	<i>Nectria</i> sp.
	1358	AC	ND	0,10	<i>Pleospora</i> sp.
	1330	MS+RBBR	7.7	0,40	<i>Arthopyrenia</i> sp.
	1341	MS+RBBR	ND	0,12	<i>Bionectria</i> sp.
DR9	1347	MS+R	ND	0,14	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	1340	MS+R	ND	0,21	<i>Nemania</i> sp.
	1328	TM	6.5	0,30	<i>Nigrospora</i> sp.
	1329	TM	ND	0,18	<i>Microsphaeropsis</i> sp.

ND: não determinado.

Os fungos *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 e *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330 selecionados por apresentarem maiores atividades de lacase (substrato ABTS) foram submetidos a novos experimentos de produção desta enzima na Universidade do Minho em Portugal utilizando o substrato siringaldazina. De acordo com Bonugli-Santos et al. 2010a, a diferença na oxidação entre os diferentes substratos pode ser explicada pela especificidade do substrato para diferentes isoformas, através da diferença no potencial redox, justificando os diferentes valores de atividade enzimática encontrados no presente trabalho.

Childs e Bradsley (1975) foram os primeiros a determinar a atividade enzimática com a utilização do composto ABTS. A metodologia da siringaldazina foi utilizada pela primeira vez por Harkin e Obst (1973) e, de acordo com Thurston (1994), a utilização deste composto é uma metodologia típica para a detecção da enzima lacase, com o aparecimento de uma coloração púrpura, após uma reação enzimática, identificada devido à formação de quinona.

Diferentes grupos de fungos foram reportados como produtores de enzimas, o que vem aumentando nos últimos anos a quantidade de informações sobre a produção de enzimas ligninolíticas como a lacase por fungos derivados do ambiente marinho (Raghukumar et al., 2008). Em um trabalho recente realizado pelo grupo de pesquisa da Dra. Lara Sette, foi reportado a produção de enzimas ligninolíticas (manganês peroxidase e lacase) em condição salina (12,5% e 23%), por uma linhagem de *Mucor racemosus* CBMAI 847 isolada de cnidário marinho, demonstrando o potencial biotecnológico de fungos derivados marinhos em processos ou ambientes salinos (Bonugli-Santos et al., 2010a).

No presente trabalho, foram utilizados os meios MS+RBBR e AG com objetivo de uma seleção prévia (isolamento seletivo) de fungos produtores de enzimas ligninolíticas. No entanto, apenas dois isolados produtores de lacase, CBMAI 1330 (*Arthopyrenia* sp.) e CBMAI 1341 (*Bionectria* sp.), foram obtidos a partir do meio MS+RBBR. Os dois meios utilizados proporcionaram a recuperação de um grande número de fungos: MS+RBBR (n=32) e AG (n=10) (Tabela 5). Isso se deu, muito provavelmente, devido ao fato do composto extrato de malte (fonte de carbono) estar presente na composição destes meios.

5.8.2. EFEITO INDUTOR DE ÍONS COBRE NA SÍNTESE DE LACASE E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os experimentos de indução da síntese de lacase por íons cobre nas concentrações entre 1 mM, 5 mM e 10 mM de CuSO₄ e a avaliação a produção de biomassa, foram realizados para os fungos selecionados *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 e *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330.

As Figuras 23 e 24 apresentam os valores de biomassa e de lacase obtidos em diferentes concentrações de CuSO_4 . A elevação da concentração de íons cobre adicionado ao meio de cultivo, não inibiu a formação de biomassa das duas linhagens nos níveis estudados, muito embora tenha sido detectado o decréscimo da produção de lacase em concentrações de CuSO_4 superiores a 5 mM.

A síntese de lacase em fungos está intrinsicamente ligada a condições específicas do meio de cultivo e nem sempre elevados valores de biomassa correspondem ao aumento da produção da mesma (Kunamneni et al., 2007). Rodríguez-Couto et al. (2009) avaliaram o efeito da adição de Cu^{+2} ao meio de cultivo onde a adição de 0,5 mM de Cu^{+2} proporcionou a obtenção de elevados níveis de atividade de lacase (25773 U L^{-1}) para a linhagem *T. pubescens*. Entretanto, os autores ressaltam o fato de que não existe uma relação linear entre a formação de biomassa e atividade desta enzima, ou seja, a influência deste indutor na produção de lacase não está interligada com a formação de biomassa.

A adição de íons cobre na concentração de 5 mM, proporcionou um aumento da atividade enzimática em 3,9X do fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 em 120 h (5 dias), com uma produção de $25,2 \text{ U L}^{-1}$ (Figura 23C). O fungo *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330 apresentou um aumento em 1,2X após 120 h (5 dias) com produção de $9,0 \text{ U L}^{-1}$ (Figura 24C). Por outro lado, os experimentos de indução para o *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330, apresentaram resultados de atividade enzimática bem semelhantes. A indução de íons cobre nas três concentrações utilizadas, não influenciou uma elevada atividade (em comparação com o isolado CBMAI 1328) e sim uma produção relativamente similar após 5 dias de crescimento (Figura 24). Podemos dizer que esta diferença de atividade pode

estar ligada a diferenças metabólicas que cada linhagem fúngica pode apresentar em relação a cada composto utilizado como indutor.

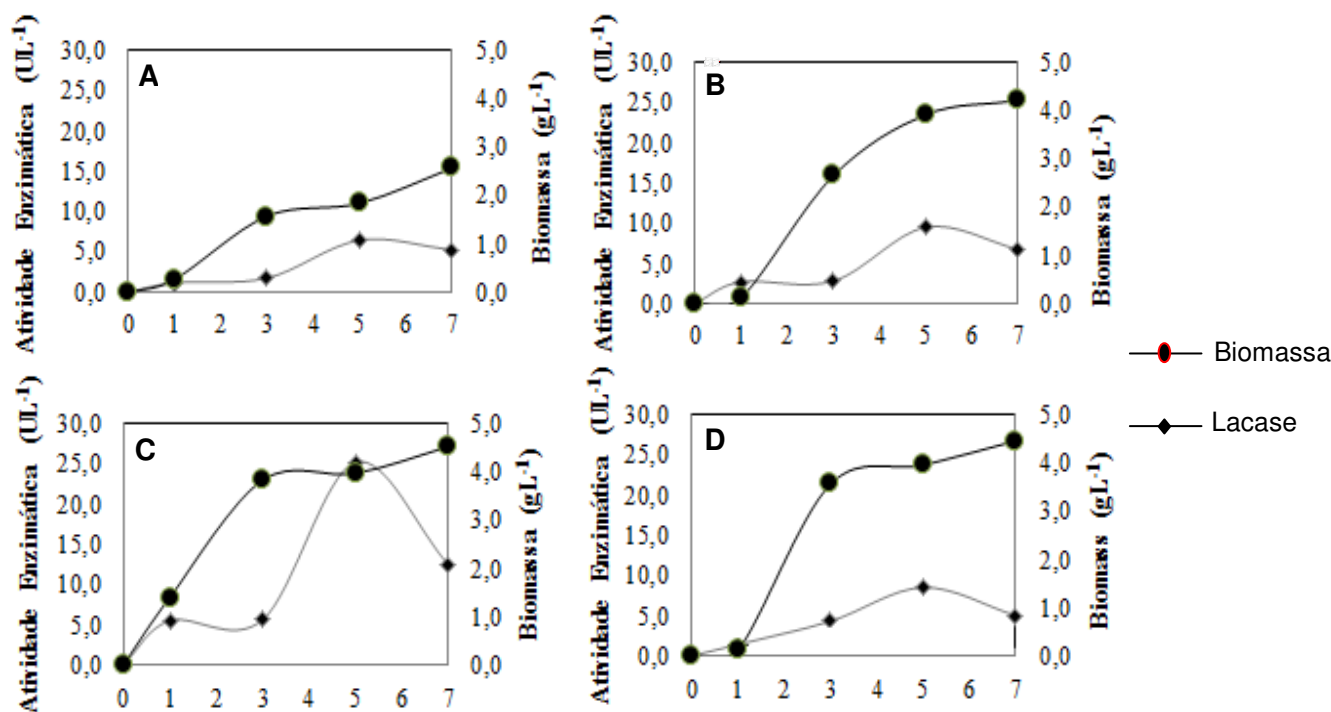


Figura 23. Efeito da adição de CuSO_4 na formação de biomassa e na produção de lacase para o fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328. (A) controle; (B) 1.0 mM CuSO_4 ; (C) 5.0 mM CuSO_4 ; (D) 10.0 mM CuSO_4 .

Estudos similares onde se evidencia o aumento da atividade de lacase em presença de indutores têm sido reportados em literatura como o estudo realizado por Cordi e colaboradores (2007) onde foi demonstrado que a adição de 0,07 a 0,1 mM de sulfato de cobre no cultivo de *T. versicolor* promoveu o aumento da atividade desta enzima, atingindo um valor máximo de $40,44 \text{ UL}^{-1}$ no 12º dia de fermentação. Em contrapartida, na ausência deste indutor os valores obtidos de lacase foram considerados insignificantes.

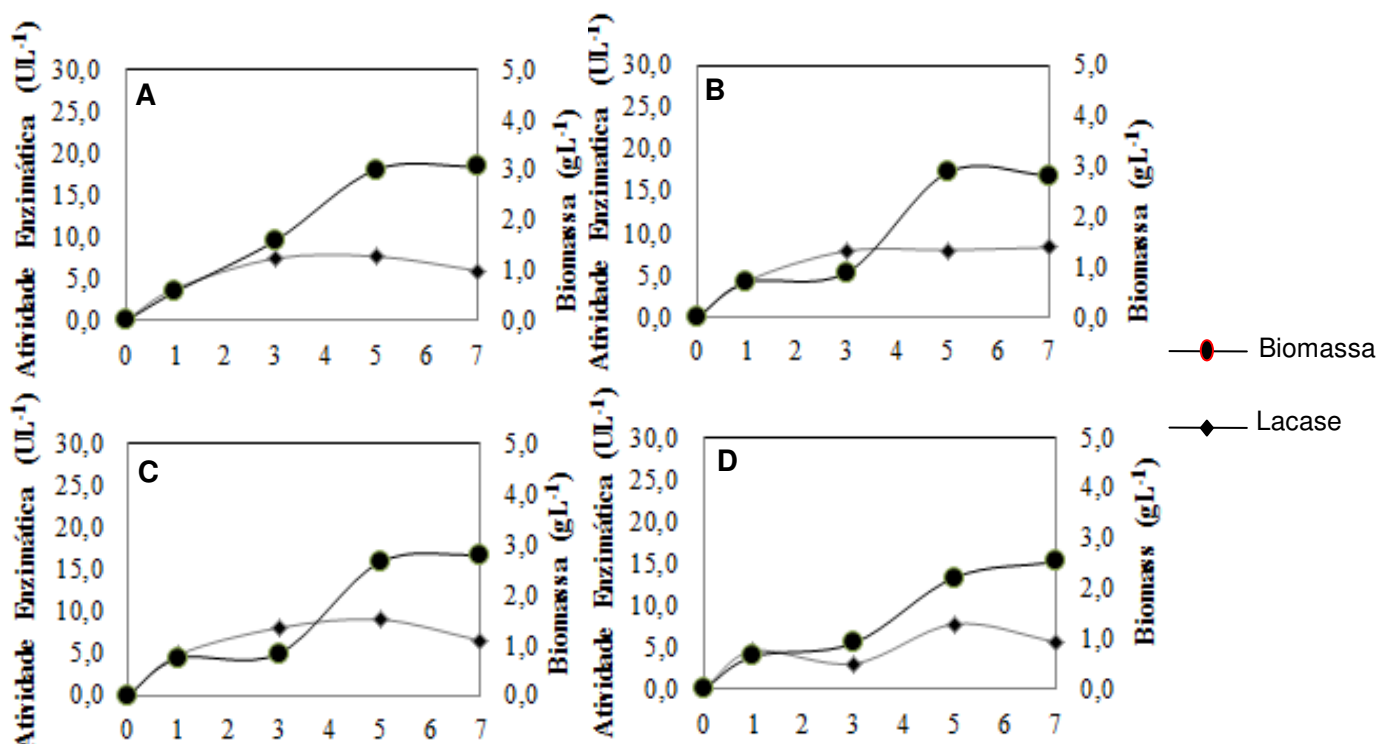


Figura 24. Comparação entre o efeito da adição de CuSO_4 na formação de biomassa e sua correlação na produção de lacase para o fungo *Arthorpyrenia sp.* CBMAI 1330. (A) controle; (B) 1.0 mM CuSO_4 ; (C) 5.0 mM CuSO_4 ; (D) 10.0 mM CuSO_4 .

5.8.3. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS COBRE NA EXPRESSÃO GÊNICA DE LACASE

Um padrão de diferentes intensidades de expressão da enzima lacase foi determinado por análise densitométrica utilizando-se como controle interno o gene da β -Tubulina. O fungo *Nigrospora sp.* CBMAI 1328 (Figura 25A e B) na presença de 5 mM de CuSO_4 apresentou a maior taxa de expressão gênica de lacase em 120 h (5 dias) de incubação. Por outro lado, a maior expressão de lacase para o fungo *Arthorpyrenia sp.* CBMAI 1330 (Figura 25C e D) foi obtida em 96 h de incubação sem adição de íons Cu^{+2} .

De acordo com os resultados obtidos, a adição de íons Cu^{+2} induziu uma maior expressão da enzima pela linhagem *Nigrospora sp.* CBMAI 1328, sendo que

este íon diminuiu a expressão de lacase na linhagem *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. Estes resultados corroboram com os dados encontrados nos experimentos da indução da atividade enzimática, onde o fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 apresentou uma maior atividade enzimática e *Nigrospora* sp. CBMAI 1330 apresentou níveis de atividade similares ao controle.

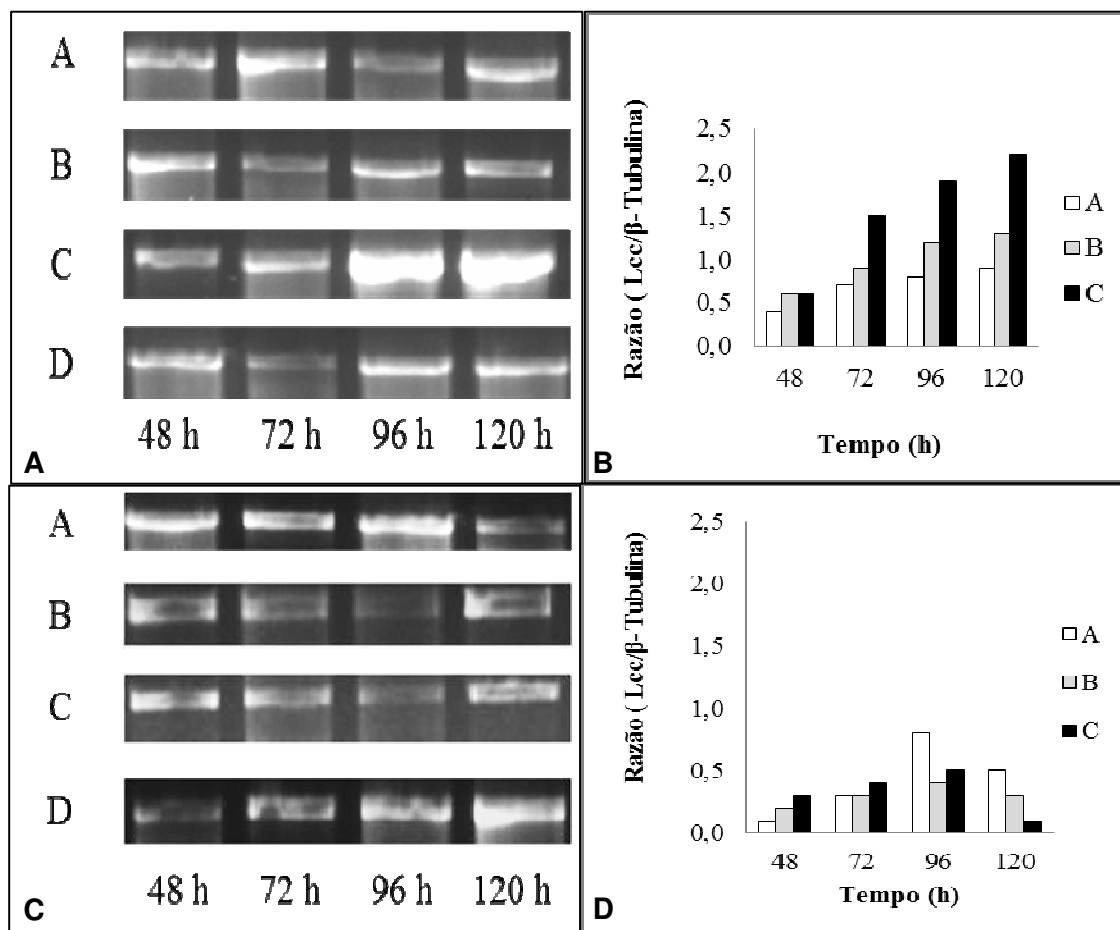


Figura 25: Detecção da expressão gênica da lacase sintetizada pelas linhagens CBMAI 1328 (A e B) e CBMAI 1330 (C e D), em diferentes tempos e concentrações de CuSO₄ por RT-PCR. Linha: (A) sem CuSO₄, (B) 1 mM de CuSO₄, (C) 5 mM de íons CuSO₄, (D) β -Tubulina (controle interno). Lcc: lacase.

O cobre assim como outros elementos metálicos são moléculas importantes para os micro-organismos, pois participam de diversas reações essenciais servindo como cofatores de muitas enzimas do metabolismo microbiano. Em

excesso, este metal pode ser tóxico, podendo causar efeitos nas células e no crescimento dos organismos (Eide, 1998; De Freitas et al., 2002). Alguns trabalhos descritos na literatura enfatizam a existência de um número divergente de sítios ativos de cobre em vários fungos estudados, ou seja, alguns isolados podem apresentar os cobres tipo 1, 2, 3 e 4 e outros como por exemplo *Pleurotus florida*, o cobre tipo 3 pode estar ausente (Das et al., 2001). Existem outros átomos como os de zinco, ferro e manganês que podem estar nos lugares dos átomos de cobre, usualmente encontrado nos sítios ativos das lacases (Garcia, 2006).

A enzima lacase foi detectada em todas as amostras analisadas, na presença ou na ausência do indutor e em diferentes tempos de incubação, indicando que a mesma é expressa de forma constitutiva pelos fungos estudados. Em adição, os resultados da utilização de íons Cu^{+2} revelaram que a lacase do fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 pode ser também expressa indutivamente.

5.9. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA LACASE

Os experimentos de caracterização do gene da lacase foram realizados para os isolados selecionados *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 e *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330 . Para tanto, foram utilizados três diferentes pares *primers* (1, 2 e 3). Com os pares de *primers* 1 e 2 (degenerados desenhados), nenhum resultado satisfatório foi obtido. Desta forma, os DNAs das duas amostras foram amplificados com o par de *primers* 3 (Figura 26), os *amplicons* foram extraídos do gel de agarose, sendo posteriormente purificados, transformados em células

competentes *E. coli*, sendo os clones positivos (colônias brancas) submetidas ao sequenciamento.

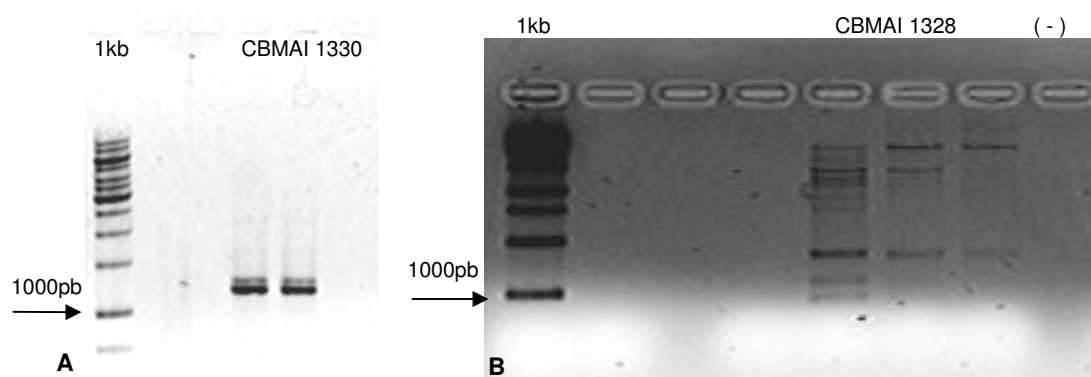


Figura 26: A e B: PCR das amostras CBMAI 1320 (A) e CBMAI 1328 (B), com o par de *primers* 3 flanqueadores do gene da lacase. A seta mostra o amplicon extraído do gel de agarose 1,2%.

A partir do sequenciamento de 20 clones da amostra *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330, encontramos duas sequências gênicas apresentando similaridade de 70 a 100% com uma lacase do fungo *Clavariopsis aquatic* (ACR20672), um ascomiceto marinho da ordem Microascales (Tabla 11). Após o sequenciamento de 17 clones a partir da amostra *Nigrospora* sp. CBMAI 1328, foi obtido um clone com 45% de similaridade com o fungo *Stagonospora* sp. (Tabela 11), que pode ser encontrado em ambientes marinhos tais como pântanos (Lyons et al., 2003).

Tabela 11: Similaridade dos clones a partir de amplificações do gene da lacase dos isolado *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 e *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330

CBMAI	Clone	Nº Acesso GenBank	ID	Similaridade (%)
1328	A1	AAN17288	<i>Stagonospora</i> sp.	45
1330	C9	ACR20672	<i>Clavariopsis aquatic</i>	71
	F9	ACR20672	<i>Clavariopsis aquatic</i>	100

Os resultados derivados das análises filogenéticas revelarem que apenas uma sequência do fungo *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 (clone F9), formou um cluster com o fungo *Clavariopsis aquatica*, as demais (clone C9 *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 e clone A1 de *Nigrospora* sp. CBMAI 1328) agruparam entre si e em um cluster separado das demais sequências recuperadas do GenBank. Este resultado pode ter ocorrido devido à ausência no banco de dados de sequências referentes ao gene da lacase próximas às dos fungos *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 e *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330, ou pode ilustrar a obtenção de potenciais novas lacases (cópias divergentes no genoma) recuperadas dos fungos estudados associados a esponjas marinhas brasileiras (Figura 27).

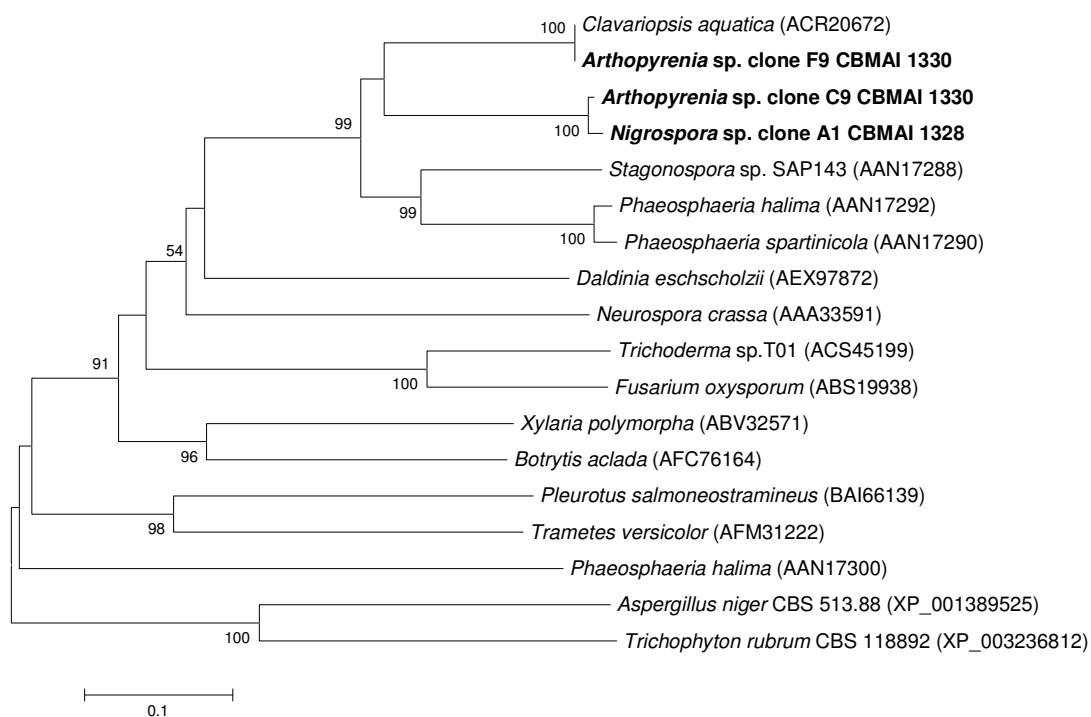


Figura 27. Árvore filogenética construída baseada no alinhamento dos aminoácidos de sequências proteicas do gene da lacase de ascomicetos derivados marinhos. Bootstrap foi realizado com 1000 replicatas pela análise por P-distance. Valores maiores do que 50 % estão indicados nos nós dos ramos.

Três putativos genes novos da enzima lacase foram detectados pelo nosso grupo de pesquisa a partir de basidiomicetos derivados marinhos (Bonugli-Santos et al., 2010a). Em adição, Lyons et al. (2003) identificaram 15 sequências de lacases distintas a partir de ascomicetos isolados de pântanos de água salgada no sudeste dos E.U.A.

O conjunto de *primers* utilizado no presente projeto (Lyons et al., 2003) foi desenhado para ser específico para lacase de fungos tendo como alvo sequências conservadas ao redor de dois pares de histidina (G184-H191 e P476-G482 de *Neurospora crassa* linhagem TS, número de acesso M18334) envolvidas em duas das quatro regiões de ligação de cobre, sendo estas designadas II e III, de sequências de ascomicetos conhecidas (Lyons et al., 2003). Desta forma, os resultados do alinhamento das duas sequências proteicas do fungo *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 podem estar relacionados às regiões II e III de ligação de íons cobre e a sequência proteica do fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 pode estar relacionada à região III de ligação do íon cobre (Figura 28).

A comparação do alinhamento das sequências proteicas com o alinhamento das sequências gênicas (Figura 28A e B), revelaram que as sequências dos clones F9 e C9 (*Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330) são muito próximas entre si. Foram encontrados 5 nucleotídeos diferentes nas sequências gênicas e 29 aminoácidos distintos nas sequências proteicas (retângulos pretos). Estes resultados podem justificar a hipótese da existência de cópias divergentes no genôma deste micro-organismo, onde duas isoformas podem ser expressas em determinadas condições experimentais.



Figura 28. A- Alinhamento dos clones de lacase sequenciados relacionados aos isolados *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 e *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 com os isolados que apresentaram maior similaridade no banco de dados GenBank. As caixas em vermelho mostram as possíveis regiões de ligação de íons cobre. **B-** Alinhamento das sequências gênicas. Os retângulos pretos mostram as diferenças entre as sequências de aminoácidos entre os clones F9 e C9 (*Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330).

Como a lacase pertence à família de enzimas multicobre oxidases, bem como as ferroxidades e as ascorbato oxidases, Hoegger e colaboradores 2006, fizeram um trabalho onde foi realizado uma análise filogenética comparando e classificando sequências de lacases de vários organismos incluindo fungos ascomicetos e basidiomicetos com sequências de outras enzimas pertencentes a esta família. Os autores concluíram que a composição das multicobres oxidases em diferentes espécies podem ser muito variáveis e que algumas espécies parecem codificar apenas um tipo de enzima como, por exemplo, as ferroxidades, como também outras espécies podem produzir os outros tipos de enzimas pertencentes a esta família.

Deste modo, foram recuperadas várias sequências proteicas utilizadas pelos autores acima citados (sequências de lacases verdadeiras; sequências de ferroxidase; e sequências de “ferroxidades/lacase – enzimas que podem apresentar ambas as atividades; forte atividade ferroxidase e fraca atividade de lacase, não sendo uma típica enzima com atividade de lacase) e alinhamos com nossas sequências proteicas de lacase (Figura 29). Os resultados indicam que as lacases produzidas pelos fungos marinhos formam um cluster com sequências proteicas que codificam estritamente a enzima lacase. Em adição, todas as 3 sequências de lacase dos fungos *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 e *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 agruparam com sequências proteicas de lacase de ascomicetos marinhos e derivados de ambientes marinhos.

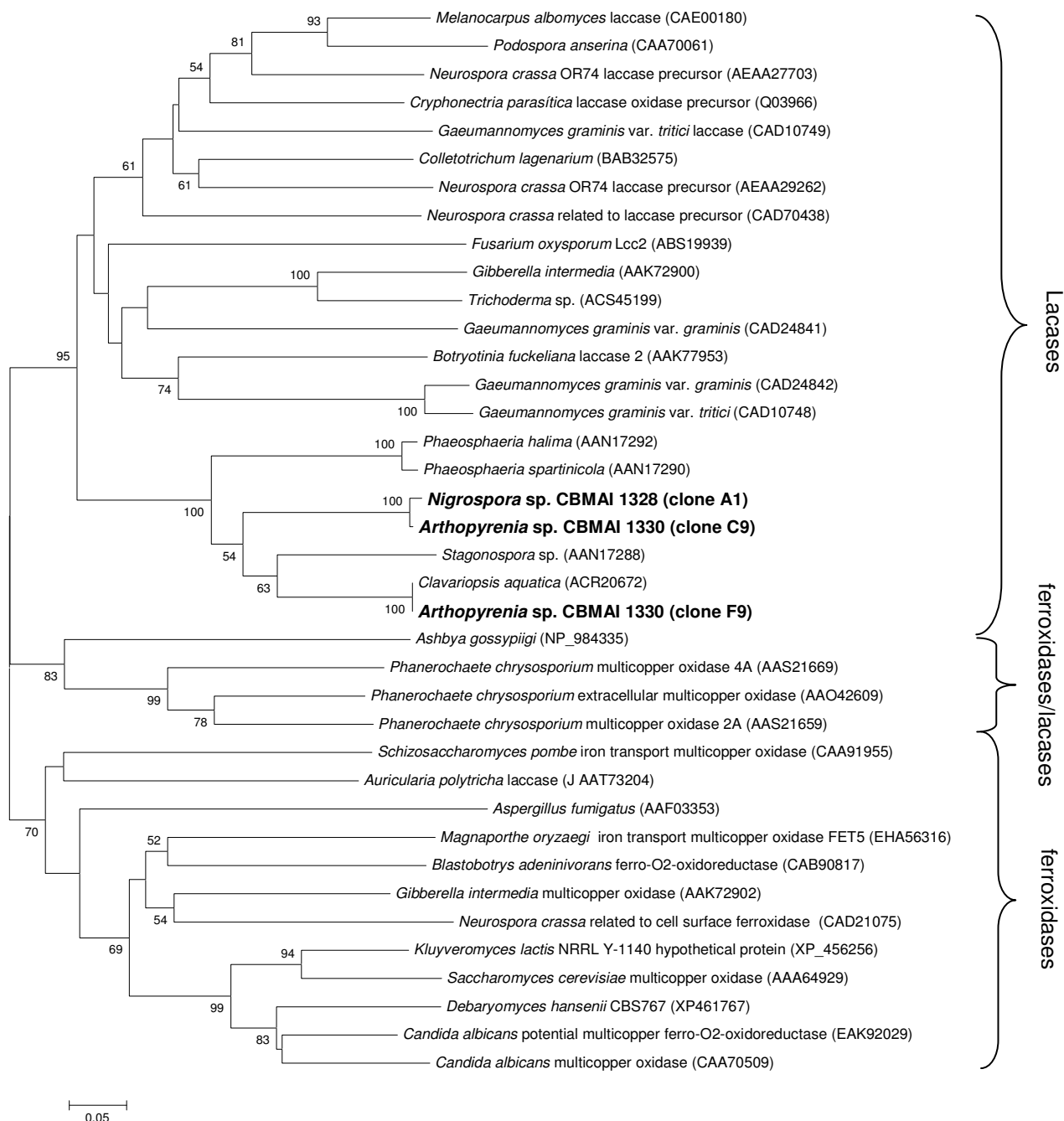


Figura 29. Árvore baseada no alinhamento dos aminoácidos de seqüências proteicas recuperadas do GenBank. Bootstrap realizado com 1000 replicatas pela análise por P-distance. Valores maiores do que 50 % estão indicados nos nós dos ramos.

De acordo com Susla e colaboradores (2007), as lacases são frequentemente produzidas como isoformas. A diversidade das isoformas desta

enzima é atribuída às modificações pós-transcricionais sofridas pelas enzimas dentro da célula, no entanto a caracterização de diversas famílias de genes da lacase sugere que parte dessa diversidade pode estar associada à multiplicidade dos genes dentro do genoma fúngico uma vez que o número de cópias do gene da lacase varia entre cada gênero ou espécie fúngica (Ong et al., 1997). A utilização da construção de bibliotecas do gene da lacase a partir de fungos filamentosos tem sido reportada em literatura como uma tecnologia poderosa na caracterização deste gene (Dedeyan et al., 2000; D' Souza et al., 1996; Dubé et al., 2008).

Podemos ver claramente que nos experimentos de indução da atividade enzimática pelo íon cobre, houve um aumento na produção desta enzima quando o fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 foi estimulado com cobre na concentração de 5 mM após 120 horas (Figura 23). Resultados que corroboram com os resultados da expressão da enzima lacase, para o fungo *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 tendo em vista o aumento na expressão desta enzima na mesmas condições de crescimento (120 dias) e na mesma concentração (5 mM). Entretanto, para o fungo *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330, a expressão da enzima lacase foi maior quando o íon cobre estava ausente no meio de cultivo. Este resultado pode ser justificado levando-se em consideração dois fatores: 1) a proporção de enzimas produzidas depende das condições de cultivo e das condições operacionais empregadas (Moldes et al., 2004) uma vez que, a utilização de NaCl pode inibir a atividade enzimática (Bonugli-Santos et al. 2010a); 2) uma isoforma diferente pode ter sido expressa ao ser utilizado o íon cobre, pois os resultados da caracterização

da lacase revelaram a presença de duas possíveis isoformas da enzima produzida pelo fungo *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 (como foi utilizado primers degenerados, duas isoformas pode ter sido expressas) (Figura 27 e 28).

Os genes de lacase caracterizados no presente projeto, agruparam com genes de lacases descritos em literatura (Lyons et al., 2003) como genes provenientes de fungos derivados de pântanos salinos. Fungos derivados do ambiente marinho podem produzir enzimas diferentes das sintetizadas por fungos do ambiente terrestre.

Levando-se em consideração o fato de que os fungos marinhos já estão adaptados às condições de pH e salinidade dos oceanos, a procura por enzimas ligninolíticas e a utilização dos mesmos em processos biotecnológicos que requerem a atuação em condições salinas (*e.g.* biorremediação de ambientes marinhos contaminados por poluentes ambientais ou tratamento de efluentes têxteis), podem ser consideradas estratégicas para o setor biotecnológico e ambiental.

6. CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para o isolamento de fungos filamentosos foi aplicada com sucesso, pois foram recuperados 108 fungos filamentosos a partir de duas amostras da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*.
- A taxonomia polifásica é uma ferramenta fundamental para caracterização de comunidades microbianas recuperadas de amostras ambientais.
- As abordagens utilizadas para acessar a diversidade de fungos nas amostras de esponja revelaram diferença nas comunidades de fungos nas duas amostras estudadas.
- Dentre os fungos recuperados das amostras de esponjas estudadas, dois isolados apresentaram potencial biotecnológico referente à produção de lacases em condições salinas.

Considerações finais

Por ser o ambiente marinho uma fonte rica de recursos genéticos com potenciais aplicações biotecnológicas, a coleção de fungos filamentosos obtida a partir do presente trabalho poderá ser utilizada em estudos futuros, incluindo entre outros, a produção de compostos naturais bioativos, biorremediação e bioprocessos. Os resultados derivados do presente trabalho estimulam o desenvolvimento de estudos subsequentes de otimização da produção por meio de desenho experimental e caracterização bioquímica das lacases produzidas pelos fungos *Arthorpyrenia* sp. CBMAI 1330 e *Nigrospora* sp. CBMAI 1328, isolados a partir das amostras da esponja *D. reticulatum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilla. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:33-49.
- Abel, A., Oda, Y., Asano, K., Sone, T. 2006. The molecular phylogeny of the genus *rhizopus* based on rDNA sequences. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70: 2387-2393.
- Ahlgren, N.A. Rocap, G. 2006. Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7193-7204.
- Aisemberg, G.O., Groewold, E., Taccioli, G.E., Judewicz, N. 1989. A major transcript in the response of *Neurospora crassa* to protein synthesis inhibition by cycloheximide. *Experimental Mycology* 13: 121-128.
- Alves, R.J.V. 1998. Ilha da Trindade & Arquipélago Martin Vaz: Um Ensaio Geobotânico. Rio de Janeiro: Serviço de Documentação da Marinha. 144 p.
- Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I. 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology* 5: 36-47.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6: 769-779.
- Arenz, B.E. Helda., B.W., Jurgens, J.A., Farrell, R.L., Blanchette, R.A. 2006. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry* 3: 3057-3064.
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 719-739.
- Arora, D.S., Sharma, R.K. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1760-1788.
- Arora, D.S., Sandhu, D.K. 1985. Survey of some Indian soils for laccase producing fungi and their lignin degrading ability. *Proceedings of the Indiana Academy of Sciences* 94: 567-574.
- Baker, P.W., Kennedy, J., Dobson, A.D.W., Marchesi J.R. 2009. Phylogenetic Diversity and Antimicrobial Activities of Fungi Associated with *Haliclona* simulans Isolated from Irish Coastal Waters. *Marine Biotechnology* 11: 540-547.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters* 30: 215-242.
- Bennett, J.W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In: Machida, M., Gomi, K. (Eds.), *Aspergillus* molecular biology and genomics. 238 p.
- Blackwell, M. 2011. The Fungil: 1, 2, 3 ... 5.1 Million species? *American Journal of Botany* 98:426-438.
- Bonugli-Santos, R.C., Durrant, L.R., da Silva, M., Sette, L.D. 2010a. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbiol Technology* 46: 32-37.

- Bonugli-Santos, R.C., Durrant, L.R., Sette, L.D. 2010b. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. *Fungal Biology* 114:863-872.
- Boot, C.M., Tenney, K., Valeriote, F.A., Crees, P. 2006. Highly *N*-Methylated Linear Peptides Produced by an Atypical Sponge-Derived *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products* 69: 83-92.
- Booth, T., Kenkel, N. 1986. Ecological studies of lignicolous marine fungi: a distribution model based on ordination and classification. In: Moss, S.T. (Ed.), *The Biology of Marine Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, 297-310.
- Borut, S.Y., Johnson, T.W. 1962. Some biological observations on fungi in estuarine sediments. *Mycology* 54: 181-193.
- Bugni, T. S., Ireland, C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Journal of Natural Products* 21: 143-163.
- Burton, R.S., Netz, E.C., Flowers, J.M., Willett, C.S. 2005. Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod *Trigriopus californicus*: intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. *Gene* 344: 105-113.
- Call, H.P., Mucke, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 53: 163-202.
- Chao, A., Ma, M.C., Yang, M.C.K. 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* 80: 193-201.
- Chao, A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistic* 11: 265-270.
- Chandler, D.P., Shu-Mei, L., Spadoni, C.M., Drake, G.R., Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J. 1997. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 23: 131-144.
- Chen, H.Y., Xue, D.S., Feng, X.Y., Yao, S.J. 2011. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. *Appl Biochem Biotechnol* 165:1754-1769.
- Childs, R.E., Bardsley, W.G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *The Biochemical Journal*, 145: 93-103.
- Chinnaraj, A., Untawale, A.G. 1992. Manglicolous fungi from India. *Mahasagar* 25: 25-29.
- Chinnaraj, S. 1993. Higher marine fungi from mangroves of Andaman and Nicobar Islands. *Sydowia* 45:109-115.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Ciullini, I., Tilli, S., Scozzafava, A., Brigant, F. 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes *Bioresource Technology* 99: 7003-7010.

- Conceição, D.M., de Angelis, D.A., Bidoia, E.D., de Angelis, D.F. 2005 Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arquivos do Instituto Biológico* 72:99-106.
- Cordi, L., Minussi, R.C., Freire, R.S., Durán, N. 2007. Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology* 6: 1255-1259.
- Costa, P., Carvalho, D. Dinâmica do Clima. 2006-2007. Estado Médio Observado. Estrutura da Salinidade dos Oceanos, 13 p.
- Costantini, M. 2004. An analysis of sponge genomes. *Gene* 342: 321-325.
- Couto, S.R., Herrera, J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513.
- Das, N., Chakraborty, T.K., Mukherjee, M. 2001. Purification and characterization of a growth-regulation laccase from *Pleurotus floripa*. *Journal Basic Microbiology* 4: 261-267.
- Da Silva, M., Passarini, M.R.Z., Bonugli, R.C., Sette, L.D., 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: Isolation, characterization and RBBR decolourization screening. *Environmental Technology* 29, 1331-1339.
- DeBellis, T., Widde, P. 2006. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology* 58: 225-235.
- Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron T., Iacazio, G., Gil, G., Le Petit, J. 2000. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 925-929.
- De Freitas, J., Wintz, H., Kim, J.H., Poynton, H., Fox, T., Vulpe, C. 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *BioMetals* 16: 185-197.
- dela Cruz, T.E.E., Schlz, B.E., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. 2006. Carbon source utilization by the marine *Dendryphiella* species *D. arenaria* and *D. salina*. *FEMS Microbiol Ecol* 58:343-353.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescit M, Claverie JM, Gascuel O (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:465-469.
- Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol* 12:10:8.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26. 297-302.
- Dion, W.M. 1951. Production and properties of a polyphenol oxidase from the fungus *Polyporus versicolor*. *Canadian Journal of Botany* 30: 9-20.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813-828.

- D'Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3739-3744.
- D'Souza, D.T., Tiwari, R., Sah, A.K., Raghukumara, C. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 504-511.
- Durán, N., Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 714: 1-17, 2000.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C., Beaugregard, M. 2008. Homologous cloning, expression, and characterization of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 597-603.
- Eça, G. F. 2009. Biogeoquímica de nutrientes e clorofila-a na plataforma continental rasa entre Itacaré e Canavieiras, Bahia. Dissertação (Mestrado). 56 p. Universidade Estadual de Santa Cruz.
- Eide, D.J. 1998. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition* 18: 441-469.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., Green, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Figueira, D., Barata, M. 2007. Marine fungi from two sandy beaches in Portugal. *Mycologia* 99: 20-23.
- Fournier, J., Stadler, M., Hyde, K.D., Duong, M.J. 2010. The new genus *Rostrohypoxylon* and two new *Annulohypoxylon* species from Northern Thailand Jacques. *Fungal Diversity* 40: 23-36.
- Fraga, M.E., Santana, D.M.N., Gatti, M.J., Direito, G.M. Cavaglieri, L.R. Rosa, C.A.R. 2008. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 540-544.
- Gambale, W., Purchio, A., Croce, J. 1977. Flora fúngica anemófila da grande São Paulo. *Revista de Microbiologia* 8: 74-79.
- Gao, Z., Li, B., Zheng, C., Wang, G. 2008. Molecular detection of fungal communities in the hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Applied and Environmental Microbiology* 74:6091-6101.
- Gao, Z., Johnson, Z.I., Wang, G. 2010. Molecular characterization of the spatial diversity and novel lineages of mycoplankton in Hawaiian coastal waters *The ISME Journal* 4: 111-120.
- Garcia, T.A. 2006. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and ruts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Geiser, D.M., Taylor, I.W., Ritchie, K.B., Smith, G.W. 1998. Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature* 394: 137-138.

- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1-10.
- Gesner, S., Cohen, N., Ilan, M., Yarden, O., Carmeli, S. 2005. Pandangolide 1a, a Metabolite of the Sponge-Associated Fungus *Cladosporium* sp., and the Absolute Stereochemistry of Pandangolide 1 and *iso*-Cladospolide B. *Journal of Natural Products* 68: 1350-1353.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Portier, P., Bouillant, M.L., Bally, R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* 108: 205-210.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
- Godet, M., Munaut, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. *FEMS Microbiology Letters* 304:157-168.
- Gomes, D.N.F. 2007. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. Tese (Doutorado). 114 p. Universidade de Pernambuco..
- Gomes, D.N.F., Cavalcanti, M.A.Q., Fernandes, M.J.S., Lim, D.M.M., Passavante, J.Z.O. 2008. Filamentous fungi isolated from sand and water of "Bairro Novo" and "Casa Caiada" beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 68: 577-582.
- Großkopf, R., Stubner, S., Liesack, W. 1998. Novel Euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 960-969.
- Hamman, S. 2004. Bioremediation capabilities of white rot fungi. Review. Article Spring p. 12.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Harkin, J., Obst, J.R. 1973. Syringaldazine an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia* 29: 381-508.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
- Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D., Beezhold, D.H. 2008. Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 2555-2560.
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kües, U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273: 2308-2326.

- Hoog, G.S., Vicente, V., Caligiorne, R.B., Kantarcioglu, S., Tintelnot, K., Gerrits van den Ende, A.H.G., Haase, G. 2003. Species Diversity and Polymorphism in the *Exophiala spinifera* Clade Containing Opportunistic Black Yeast-Like Fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 10: 4767-4778.
- Hummel, H., Sepers, A.B.J., de Wolf, L., Melissen, F.W. 1988. Bacterial growth on the marine sponge *Halichondria panicea* induced by reduced waterflow rate. *Marine Ecology Progress Serie* 42:195-198.
- Hyde, K.D., Jones, E.B.G. 1988. Marine mangrove fungi. *Marine Ecology* 9: 15-33.
- Indriani, I.D. 2008. Biodiversity of marine-derived fungi and identification of their metabolites. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade de Dusseldorf, Alemanha.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V. Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, R., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajichs, J. E., Hosaka, K., Sung, G., Johnson, D., O'rourke, B., Crocket, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schubler, A., Longcore, J.E., O'donnell, K., Standridge, S.M., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hensen, K., Hamblenton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, V.B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lühchings, R., Büdel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, I., Yahr, R., Hibbetts, D.S., Lutzoni, F., Mclaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Vilgalys, R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Jones, E.B.G., Vrijmoed, L.L.P. 2003. Perspectives on Marine Environment Change in Hong Kong and Southern China, 1977-2001. In: Morton, B. (Ed.), *Proceedings of a International Workshop Reunion Conference, Hong Kong 21-26 October 2001*. Hong Kong: Hong Kong University Press. Biodiversity of marine fungi in Hong Kong coastal waters, 824 p.
- Jones, E.B.G. 2011. Fifty years of marine mycology. *Fungal Diversity* 50:73-112.
- Kemptoner, J., Marchetti-Deschmann, M., Mach, R., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Allmaier, G. 2009. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 3: 877-884.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kirby, N., Marchant, R. M., Mullan, G. 2000. Decolorization of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiology Letters* 188: 93-96.
- Kirk, P.W. 1980. The mycostatic effect of seawater on spores of terrestrial and marine higher fungi. *Botanica Marina* 23: 233-238.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. CABI, Wallingford, UK.

- Kis-Papo T. (2005). Marine fungal communities. In: Dighton J, White JF, and Oudemans P (eds). *The Fungal Community: its Organization and Role in the Ecosystem*. Taylor & Francis: Boca Raton, FL. pp 61–92
- Kohlmeyer, J.V. 1974. On the definition and taxonomy of higher marine fungi. *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl.* 5: 263-286.
- Kubaneck, J., Jensen, P.R., Keifer, P.A., Sullards, M.C., Collins, D.O., Fenical, W. 2003. Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6916–6921.
- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M. 2007. Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, Microbiology Book Series, Formatex, Badajoz, 233-245.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1216-1223.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Larsson, K.H. 2007. Molecular phylogeny of *Hyphoderma* and the reinstatement of *Peniophorella*. *Mycological Research* 111: 186-195.
- Lasch, P., Nattermann, H., Erhard, M., Stamm, M., Grunow, R., Bannert, N., Appel, B., Naumann, D. 2008. MALDI-TOF Mass Spectrometry Compatible Inactivation Method for Highly Pathogenic Microbial Cells and Spores. *Analytical Chemistry*. 80: 2026-2034.
- Leong, W.F., Tan, T.K., Jones, E.B.G. 1991 Fungal colonization of submerged *Bruguiera cylindrica* and *Rhizophora apiculata* wood. *Botanica Marina* 34: 69-76.
- Li, Q., Wang, G. 2009 Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiological Research* 164: 233-241.
- Lima, N., Rodrigues, P., Soares, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A. 2008. *Proceeding Book of the XXVII ECCO Meeting*, Ghent, Belgium, 11-12.
- Lin, Y., Wu, X., Feng, S., Jiang, G., Luo, J., Zhou, S., Vrijmoed, L.L.P., Jones, E.B.G., Krohn, K., Steingröver, K., Zsila, F. 2001. Five unique compounds: xyloketals from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast. *Journal of Organic Chemistry* 66: 6252-6256.
- Liou, G.Y., Chen, S.R., Wei, Y.H., Lee, F.L., Fu, H.M., Yuan, G.F., Stalpers, J.A. 2007. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. *Mycological Research* 111: 196-203.
- Liu, W.C., Li, C.Q., Zhu, P., Yang, J.L., Cheng, K.D. 2010. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with two marine sponges: *Haliclona simulans* and *Gelliodes carnosus*, collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. *Fungal Diversity* 42:1-15.

- Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A., Moran, M.A. 2003. Diversity of Ascomycete Laccase Gene Sequences in a Southeastern US Salt. *Microbial Ecology* 45:270-281.
- Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Abdullah, S.K., Descals, E., Salinas, J., Lopez-Llorca, L.V. 2008. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 64:90-105.
- Magurran, A.E. 2004. Measuring biological diversity. Oxford (UK): Blackwell Publishing, 256 p.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. 2002. Review – Laccase: new functions for a old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Méjanelle, L., Lopez, J.F., Gunde-Cimerman, N., Grimalt, J.O. 2000. Sterols of melanised fungi from hypersaline environments. *Organic Geochemistry* 31: 1031-1040.
- Mendes, A.S. Otimização, isolamento, identificação e atividade antiproliferativa da violaceína obtida por processo fermentativo. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.
- Menezes, C.B.A., Bonugli-Santos, R.C., Miqueletto, P.B., Passarini, M.R.Z., Silva, C.H.D., Justo, M.R., Leal, R.R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research* 165: 466-482.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205-216.
- Moldes, D., Lorenzo, M., Sanroman, M. A. 2004. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic waste. *Biotechnology Letters* 26: 327-330.
- Morrison-Gardiner, S. 2002. Dominant fungi from Australian coral reefs. *Fungal Diversity* 9: 105-121.
- Mouzouras, R. 1989. Soft rot decay of wood by marine microfungi. *J Inst Wood Sci* 11: 393-201
- Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. 2004. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Amsterdam, London, Elsevier Academic Press.
- Mueller, G.M., Schmit, J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation* 16: 1-5.
- Mummey, D.L., Rillig, M.C. 2007. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Microbiological Methods* 70: 200-204.
- Muricy, G., Esteves, E.L., Moraes, F.C., Santos, J.P., Silva, S.M., Klautau, M., Lanna, E. 2008. *Biodiversidade marinha da Baía Potiguar: Porífera*. Série Livros 29. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 156 pages.
- Muricy, G., Hajdu, E. 2006. *Porífera Brasilis: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil*. Série Livros 17, Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- Naves, R.L., Sanhueza, R.M.V., Santana, A.P.S., Henrique, C.R., Morante, J.P., 2008. Controle biológico das podridões dos cachos em uvas finas de mesa

- no noroeste do Estado de São Paulo. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Vitória-ES.
- Neria-González, I., Wang, E.T., Ramírez, F., Romero, J.M., Hernández-Rodríguez, C. 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from southeast of Mexico. *Anaerobe* 12: 122-133.
- O'Brien, H.E., Parent, J.L., Jackson, J.A., Mpnalvo, J.M., Vilgalys, R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544-5550.
- O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 225-233.
- Oliveira, V.M., Lopes-Oliveira, P.F., Passarini, M.R.Z., Menezes, C.B.A., Oliveira, W.R.C., Rocha, A.J., Sette, L.D. 2011 Molecular analysis of microbial diversity in corrosion samples from energy transmission towers. *Biofouling* 27: 435-447.
- Ong, E., Pollock, W.B.R., Smith, M. 1997. Cloning and sequence analysis of two laccasecomplementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene* 196, 113-119.
- Osterhege, C., König, G.M., Höller, U., Wright, A.D. 2002. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. *Journal of Natural Products* 65: 306-313.
- Osterhege, C. 2001. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi. Tese (Doutorado) - Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha.
- Pei-Chih, W., Huey-Jen, S., Chia-Yin, L. 2000. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. *Science of the Total Environment* 253: 111-118.
- Pereira, J., Rogers, J.D., Bezerra, J.L. 2010. New *Annulohypoxylon* species from Brazil. *Mycologia* 102:248-52.
- Perovic´-Ottstadt, S., Adell, T., Proksch, P., Wiens, M., Korzhev, M., Gamulin, V., Müller I.M., Müller W.E.G. 2004. A (1-3)- β -D-glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*: mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression. *European Journal of Biochemistry* 271: 1924-37.
- Peterson, S.W., Vega, F.E., Posada, F., Nagai, C. 2005. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia* 97:659–666.
- Pinnoi, A., Lumyong, S., Hyde, K.D., Jones, E.B.G. 2006. Biodiversity of fungi on the palm *Eleiodoxa conferta* in Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Fungal Diversity* 22:205-218.
- Prasannarai, K., Sridhar, K.R. 2001. Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. *Current Science* 81: 304-311.
- Qian, J., Cutler, J.E., Cole, R.B., Cai, Y. 2008. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of

- morphogenesis markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392: 439-449.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'Souza, T.M., Reddy, C.A. 1994. Laccase and other lignocellulose modifying enzyme of marine fungi isolated from the Coast of India. *Botanica Marina* 37:515-523.
- Raghukumar, C., D'Souza, T.M., Thorn, R.G., Reddy, C.A. 1999. Lignin-Modifying Enzymes of *Flavodon flavus*, a Basidiomycete Isolated from a Coastal Marine Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2103-2111.
- Raghukumar, C., Rivonkar, G. 2001. Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 510-514.
- Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., Verma, A.K. 2008. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 34: 189-206.
- Ridley, S.O., Dendy, A. 1886. Preliminary Report on the Monaxonida collected by H.M.S. 'Challenger'. *Annals and Magazine of Natural History*(5) 18:325-351, 470-493.
- Reiswig, H.M. 1971. Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biological Bulletin* 141: 568-591.
- Robene-Saustrade, I., Lung-Escarmant, B., Bonno, J.J., Taris, B. 1992. Identification and partial characterization of an extracellular manganese-dependent phenol oxidase in *Armillaria ostoyae* and *Armillaria mellea*. *European Journal of Forest Pathology* 22: 227-236.
- Rode, T.M., Berget, I., Langsrud, S., Møretrø, T., Holck, A. 2009. MALDI-TOF mass spectrometry for quantitative gene expression analysis of acid responses in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods* 78: 86-93.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129: 187-193.
- Rodríguez-Couto, S., Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L. 2009. Removal of synthetic dyes by an eco-friendly strategy. *Engineering in Life Sciences* 9: 116-123.
- Rot, C., Goldfarb, I., Ilan, M., Huchon, D. 2006. Putative crosskingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria. *BMC Evolutionary Biology* 6: 1-11.
- Roth, F.J., Orpurt, P.A., Ahearn, D.J. 1964. Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. *Canadian Journal of Botany* 42:375-383.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44: 133-148.
- Samson, R.A., Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology* 47: 1-8.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., McCray, E.B. 2001. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 18, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

- Santos, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A., Lima, N. 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108: 375-385.
- Sarma, V.V., Vittal, B.P.R. 2001. Biodiversity of manglicolous fungi on selected plants in the Godavari and Krishna deltas, East coast of India. *Fungal Diversity* 6:115-130.
- Schmidt, O., Kallow, W. 2005. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. *Holzforschung* 59: 374-377.
- Schloss, P.D., Larget, B.R., Handelsman, J. 2004. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5485-5492.
- Schloss, P.D., Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71:1501-1506.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Horn, D.J.V., Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7537-7541.
- Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F., Dannaoui, E. 2006. Molecular identification of Zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 340-349.
- Schwarzenbach, K., Widmer, F., Enkerli, J. 2007. Cultivation-Independent analysis of fungal genotypes in soil by using simple sequence repeat markers. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6519-6525.
- Seifert, K.A., Samson, R.A., Dewaard, J.R., Houbraken, J., Levesque, C.A., Moncalvo, J.M., Louis-Seize, G., Hebert, P.D. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 3901-3906.
- Sette, L. D., Oliveira, V. M., Manfio, G. P. 2005. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 81-89.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delamarlina, C., Salati, F., Duarte, M.C.T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 1185-1195.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z.P., Rodrigues, A., Leal, R.R., Simioni, K.C.M., Nobre, F.S., Brito, B.R., Rocha, A.J., Pagnocca, F.C. 2010. Fungal diversity associated with Brazilian energy transmission towers. *Fungal Diversity* 44: 53-63.
- Seyfarth, F., Ziemer, M., Sayer, H.G., Burmester, A., Erhard, M., Welker, M., Schliemann, S., Straube, E., Hippler, U. 2008. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Experimental Dermatology* 17: 965-971.

- Stackebrandt, E., Liesack, W. 1993. Nucleic acids and classification. In: Goodfellow, M.; O'Donell, A. Modern Approaches in Bacterial Systematics (Ed.). London: Academic Press, 151-194.
- Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M. 2002. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 212-217.
- Steffen, K. T., Schubert, S., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M. 2007. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation* 18: 359-369.
- Stephen, J.R., Mccaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., Embley, T.M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4147-4154.
- Suetrong, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Sakayaroj, J., Phongpaichit, S., Tanaka, K., Hirayama, K., Jones, E.B.G. 2009. Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. *Studies in Mycologia* 64: 155-173.
- Susla, M., Novotn, C., Svobodová, K. 2007. The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresource Technology* 98: 2109-2115.
- Sutar, R., David, J.K., Ghosh, A.K., Singhi, S., Chakrabarti, A., Bachhawat, A.K. 2004. Comparasion of ITS and IGS regions for strain typing of clinical and non-clinical isolates of *Pichia anomal*. *Journal of Medical Microbiology* 53 1-5.
- Takamatsu, S., Matsuda, S., Niinomi, S., Havrylenko, M. 2006. Molecular phylogeny supports a Northern Hemisphere origin of *Golovinomyces* (Ascomycota: Erysiphales). *Mycological Research* 110: 1093-1101.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolucionary Distance, and Maximum Parsimony Methods *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Tang, A.M.C., Jaeewon, R., Hyde, K.D. 2007. Phylogenetic utility of protein (RBP2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequeces in the systematics of sordariomycetes (ascomycota, fungi). *Antonie van leeuwenhoek* 91: 327-349.
- Tavares, A.P.M. 2006. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira. Tese (Doutorado). 190 p. Universidade de Aveiro.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 295-347.
- Thakur, N.L., Muller, W.E.G. 2004. Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, v. 86, p. 1506–1512, 2004.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Trabulsi, L.R., Atterthum, F. 2005. *Microbiologia*. 4ª ed. Atheneu. 718 p.

- Trincone A (2011) Marine Biocatalysts: Enzymatic features and applications. *Mar Drugs* 9:478-499.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, Ed.J. 2010. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 900-907.
- Vasconcellos, S.P., Angolini, C.F.F., García, I.N.S., Dallagnezze, B.M., Silva, C.C., Marsaioli, A.J., Neto, E.V.S., Oliveira, V.M. 2010. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry* 41: 675-681.
- Vijaykrishna, D., Jeewon, R., Hyde, K.D. 2006. Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater Ascomycetes. *Fungal Diversity* 23: 351-390.
- Vishwakiran, Y., Thakur, N.L., Raghukumar, S., Yennawar, P.L., Anil, A.C. 2001. Spatial and temporal distribution of fungi and wood borers in the coastal tropical waters of Goa, India. *Botanica Marina* 44: 47–56.
- Voigt, K., Cigelnik, E., O'Donnell, K. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3957-3964.
- Wang, G. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33:545-551.
- Wang, G., Li, Q., Zhu, P. 2008. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 93: 163-174.
- Waterman, S.R., Hacham, M., Panepinto, J., Hu, G., Shin, S., Williamson, P.R. 2007. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. *Infection and Immunity* 75:714-722.
- Watson, J. T. 1997. Introduction to mass spectrometry. Third edition, Lipprancott, Raven, USA.
- Westermarck, U., Eriksson, K.E. 1974. Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation. *Acta Chemica Scandinavica Series B: Organic Chemistry and Biochemistry* 28: 209-214.
- Wilkinson, C.R. 1992. Symbiotic interactions between marine sponges and algae. In: Reisser, W. (Ed.), *Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*. Biopress Limited, Bristol, United Kingdom, 111-151 p.
- Yli-Matilla, T., Mach, R.L., Alekhina, I.A., Bulat, S.A., Koskinen, S. Kullning-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P., Klemsdal, S.S. 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, α -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology* 95: 267-285.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y. 2001. Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of pcr-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 346-353.

Zhu, P., Li, Q; Wang, G. 2008. Unique Microbial Signatures of the Alien Hawaiian Marine Sponge *Suberites zeteki*. *Microbial Ecology* 55:406-41.

8. ANEXO I

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Caracterização da diversidade de fungos filamentosos associados a esponjas marinhas e avaliação da produção de lacase":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

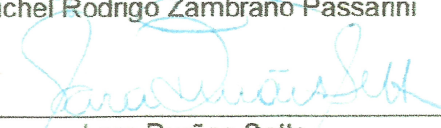
(x) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 25/2009, Instituição: CPQBA/UNICAMP.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

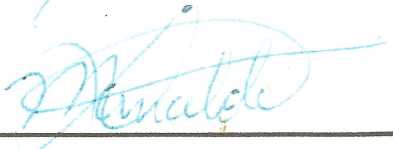

Michel Rodrigo Zambrano Passarini


Lara Durães Sette

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura