



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**VICTOR TEIXEIRA NORONHA**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS MARINHOS**  
**ASSOCIADOS A SEDIMENTOS DA PRAIA DO PECÉM**

**FORTALEZA-CE**

**2014**

**VICTOR TEIXEIRA NORONHA**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS MARINHOS  
ASSOCIADOS A SEDIMENTOS DA PRAIA DO PECÉM**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

**FORTALEZA-CE**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

N769d

Noronha, Victor Teixeira.

Diversidade e potencial enzimático de fungos marinhos associados a sedimentos da Praia do Pecém / Victor Teixeira Noronha. -2014.

66 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.

Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

1. Fungos. 2. Filamentosos marinhos. 3. Atividade enzimática. 4. Sedimentos marinhos.

I. Título.

CDD 660.6

---

**VICTOR TEIXEIRA NORONHA**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS MARINHOS  
ASSOCIADOS A SEDIMENTOS DA PRAIA DO PECÉM**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 25 / 11 / 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima (Examinador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta (Examinadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha Tia Ilmar (*in memoriam*) por todo apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de iniciação científica.

À Universidade e a todo o corpo docente que participou da minha formação.

À Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, pela orientação científica durante quase três anos.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Cristiano Souza Lima e Profa. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta pela disponibilidade e pelas valiosas colaborações e sugestões.

À equipe do Laboratório de Micologia pelo suporte, paciência e presteza, em especial a Israel, Francisco e, novamente, ao Prof. Cristiano.

A toda equipe do LABS, em especial a Fátima, Leandro, Reinaldo pelo apoio.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Hugo, Yasmine, Cláudia, Manel, Raissa, Ítalo, Renato, Roberta e Dalton.

Aos meus demais amigos aqui no Ceará, em outros estados e além-mar, especialmente a Eduardo, Italo e Bruno.

À minha família pelo incentivo e apoio incondicional.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.” (Carl Sagan)

## RESUMO

Este trabalho apresenta os estudos da diversidade e atividades enzimáticas de fungos isolados de sedimentos da praia do Pecém, São Gonçalo do Amarante, Ceará. Um total de treze isolados foi obtido, sendo seis pertencentes ao gênero *Penicillium* (isolados B, E, G, H, I e K), dois ao gênero *Cladosporium* (isolados A e F), dois ao gênero *Acremonium* (isolados D e J), dois ao gênero *Rhinochadiella* (isolados L e M), e um identificado como *Aspergillus terreus* (isolado C). Todos os isolados apresentaram crescimento em meios compostos por água do mar e água destilada, sendo classificados como facultativamente marinhos. No estudo das atividades enzimáticas, dois dos isolados obtidos (A e F) apresentaram atividade lipolítica, dois (isolados B e C) apresentaram atividade amilolítica, e setes (isolados B, C, D, E, F, H e J) apresentaram atividade celulolítica. Os resultados obtidos corroboram a importância da prospecção de fungos marinhos na busca de novas fontes enzimáticas.

**Palavras-chave:** Fungos marinhos. Atividade enzimática. Sedimentos marinhos.

## ABSTRACT

This work reports the study of diversity and enzyme activity from marine-derived fungi isolated from sediments collected in Pecém beach, São Gonçalo do Amarante, Ceará. Thirteen fungal isolates were obtained, six of them from *Penicillium* genus (isolates B, E, G, H, I and K), two from *Cladosporium* (isolates A and F), two from *Acremonium* (isolates D and J), two from *Rhinoctadiella* (isolates L and M), and one of them identified as *Aspergillus terreus* (isolate C). All isolates were able to grow in media prepared with sea water and distilled water, being classified as facultative marine fungi. Regarding the investigated enzymatic activities, two isolates (A and F) showed lipolytic activity, two (isolates B and C) presented amyolytic activity, and seven isolates (B, C, D, E, F, H and J) showed cellulolytic activity. The obtained results corroborate the importance of prospecting marine fungi as new sources of enzymes.

**Keywords:** Marine fungi. Enzyme activity. Marine sediments.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classes de compostos produzidos por fungos marinhos até a metade de 2010.	4
Figura 2	Aumento, por década, no número de fungos filamentosos marinhos descritos.	5
Figura 3	Artigos encontrados no <i>Web of Knowledge</i> utilizando o termo <i>marine enzymes</i> no período de 1956 a 2014, somando um total de 7740 publicações.	9
Figura 4	Etapas da realização da técnica de lavagem de sedimentos.	12
Figura 5	Exemplo de halo de atividade lipolítica.	15
Figura 6	Exemplo de halo de atividade amilolítica.	16
Figura 7	Exemplo de halo de atividade celulolítica.	17
Figura 8	Percentual de gêneros de fungos marinhos associados a sedimentos nos últimos cinco anos.	18
Figura 9	Trabalhos publicados nos últimos cinco anos para cada estudo/aplicação.	23
Figura 10	Isolados classificados como <i>Penicillium</i> spp.: características morfológicas.	25
Figura 11	<i>Penicillus</i> , estrutura presente em fungos do gênero <i>Penicillium</i> .	26
Figura 12	Isolado A ( <i>Cladosporium</i> sp.): características morfológicas.	27
Figura 13	Isolado F ( <i>Cladosporium</i> sp.): características morfológicas.	27
Figura 14	Isolado C ( <i>Aspergillus terreus</i> ): características culturais e morfológicas.	28
Figura 15	Isolados D e J ( <i>Acremonium</i> spp.): características morfológicas.	29
Figura 16	Isolados M e L ( <i>Rhinochadiella</i> spp.): características culturais e morfológicas.	30
Figura 17	Atividade lipolítica dos isolados A e F.	32
Figura 18	Atividade amilolítica dos isolados B e C.	33
Figura 19	Atividade celulolítica dos isolados B, C, D, E, F, H, J.	34

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Aplicações de microrganismos em biotecnologia.	1
Tabela 2	Desenho experimental do isolamento dos fungos do sedimento marinho.	13
Tabela 3	Comparação de diversidade de espécies em trabalhos de isolamento de fungos a partir de sedimentos marinhos.	19
Tabela 4	Fungos isolados dos sedimentos da praia do Pecém.	24
Tabela 5	Dados do índice de atividade enzimática relativa (IAER) para todos os isolados e atividades.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Meio batata-dextrose ágar.
CMA	Meio <i>corn-meal agar</i> .
CMAM	Meio <i>corn-meal agar</i> / água do mar.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico).
IAER	Índice de atividade enzimática relativa.
LAV	Relacionado à suspensão obtida em decorrência do processo de lavagem de sedimentos.
SED	Meio produzido com a solução resultante da lavagem dos sedimentos.
SNA	Meio <i>synthetic nutrient-poor agar</i> .
SNAM	Meio <i>synthetic nutrient-poor agar</i> / água do mar.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Fungos marinhos</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Sedimentos marinhos e diversidade fúngica</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Fungos marinhos como fontes de enzimas</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Levantamento bibliográfico</b>	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolamento dos fungos</b>	<b>11</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Coleta do material</i>	<b>11</b>
<b>3.2.2</b>	<i>Isolamento dos fungos associados</i>	<b>11</b>
<b>3.2.3</b>	<i>Identificação morfológica dos isolados</i>	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Ensaio enzimáticos</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Ensaio para atividade lipolítica</i>	<b>15</b>
<b>3.2.2</b>	<i>Ensaio para atividade amilolítica</i>	<b>15</b>
<b>3.2.3</b>	<i>Ensaio para atividade celulolítica</i>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Diversidade fúngica em sedimentos marinhos: levantamento bibliográfico</b>	<b>18</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolamento e identificação dos fungos</b>	<b>23</b>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio enzimáticos</b>	<b>31</b>
<b>4.3.1</b>	<i>Ensaio para atividade lipolítica</i>	<b>31</b>
<b>4.3.2</b>	<i>Ensaio para atividade amilolítica</i>	<b>32</b>
<b>4.3.3</b>	<i>Ensaio para atividade celulolítica</i>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>36</b>
	<b>APÊNDICE A - LISTA DE MÉTODOS, MEIOS DE ISOLAMENTO, ESPÉCIES ISOLADAS E ORIGEM DE AMOSTRAS DE SEDIMENTOS UTILIZADAS PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS</b>	<b>43</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Por milhares de anos, microrganismos têm sido explorados de ponto de vista biotecnológico pelo homem. Mesmo sem saber como as mudanças químicas e biológicas ocorriam, estes organismos acabavam por ser utilizados na fermentação de bebidas e alimentos, ainda que de forma inconsciente. A contribuição microbiana para a sociedade é dividida em três grandes fases: (i) a primeira é denominada de microbiologia industrial tradicional. Esta fase corresponde à utilização dos microrganismos na preservação de leites e vegetais e na produção de itens como, bebidas destiladas, cerveja, pão, pickles, queijo, vinagre, vinho e outros materiais fermentados; (ii) a segunda é denominada de fermentação industrial moderna e teve seu início no começo do século XX. Nesta fase, entraram em cena os processos de fermentação em grande escala, envolvendo a produção de ácidos orgânicos, enzimas, solventes, vitaminas e outros produtos. Já na metade deste mesmo século, as pesquisas para escalonamento do processo de produção de dois antibióticos, penicilina e estreptomicina, acabaram por conceber um novo ramo da microbiologia industrial, a engenharia bioquímica. Esse avanço foi responsável pelo arcabouço científico do desenvolvimento da genética mutacional microbiana, ferramenta imprescindível para o melhoramento de cepas; (iii) a terceira representa a revolução em direção à tecnologia do ADN recombinante. Esta etapa teve início na década de 70, depois de diversas descobertas na área de genética básica que impulsionaram o estabelecimento de indústrias de biotecnologia (DEMAIN; ADRIANO, 2008; LEE, 2002). Dessa forma, a aplicação industrial de microrganismos tornou-se possível em diversas áreas, como exemplificado na Tabela 1:

**Tabela 1** - Aplicações de microrganismos em biotecnologia.

Área	Produtos ou aplicações
<b>Farmacêutica</b>	Antibióticos, antígenos, endorfina (neurotransmissor), $\gamma$ -globulina (prevenção de infecções), hormônio do crescimento humano (tratamento de crianças com nanismo), linfocinas (modulação da resposta imune), anticorpos monoclonais (diagnóstico ou entrega de drogas), peptídeos neuroativos (mimetizam o controle de dor por peptídeos), ativador de plasminogênio em tecidos (dissolve coágulos sanguíneos), vacinas.
<b>Agricultura e Pecuária</b>	Desenvolvimento de sementes livres de doença para utilização na alimentação animal, maior produtividade de animais utilizados na alimentação, transferências de características de resistência contra estresse, herbicidas ou pestes em cultivares, desenvolvimento de plantas com habilidades aumentadas de fotossíntese ou fixação de nitrogênio, desenvolvimento de inseticidas biológicos.

<b>Química fina</b>	Aminoácidos, aromáticos hidroxilados, biopolímeros, enzimas, lipídeos e vitaminas.
<b>Ambiental</b>	Lixiviação de minerais, concentração de metal, controle de poluição, degradação de resíduos tóxicos e recuperação melhorada de petróleo.
<b>Insumos químicos</b>	Ácido acético, acetona, butanol, etanol e muitos outros produtos derivados do processo de conversão de biomassa.
<b>Bioeletrônica</b>	Biosensores, biochips.

Fonte: Adaptado de LEE (2002).

Muitos dos produtos ou processos que empregam microrganismos poderiam ser substituídos por processos químicos ou por outros organismos, como plantas e animais. Entretanto, a utilização de microrganismos apresenta diversas vantagens, tais como: (i) alta razão área superficial/volume, o que facilita a rápida captação de nutrientes necessários para altas taxas de metabolismo e síntese de biomoléculas; possibilidade de realizarem uma grande variedade de reações; (ii) facilidade de adaptação em diferentes tipos de ambientes, permitindo seu cultivo em escala de laboratório ou fermentador industrial, onde são capazes de utilizar fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo para produzir compostos de alto valor agregado; (iii) fácil manipulação genética, *in vitro* e *in vivo*, permitindo o aumento da produtividade em até milhares de vezes, a modificação de estruturas e atividades e síntese de produtos inteiramente novos; (iv) simplicidade das etapas de seleção, permitindo que inúmeras cepas possam ser analisadas em tempo relativamente curto; (v) alta diversidade, dessa forma, diferentes espécies podem produzir enzimas diferentes, mas que são capazes de catalisar a mesma reação, permitindo, por exemplo, uma flexibilidade em relação às condições de operação de um reator (DEMAIN; ADRIO, 2008).

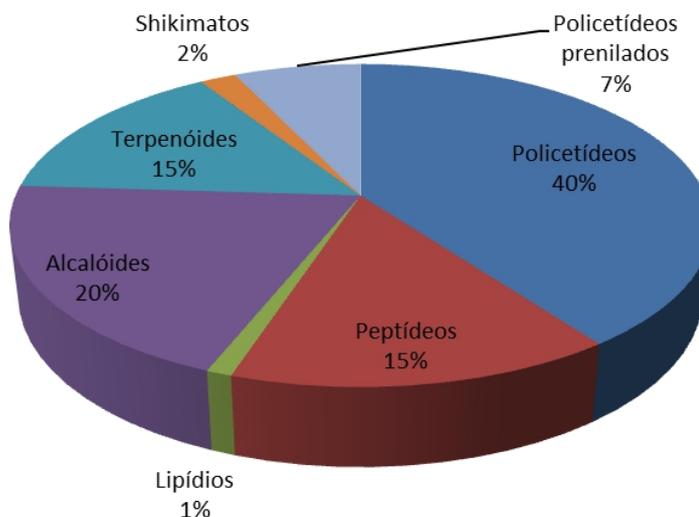
Dentre os microrganismos empregados na área de biotecnologia, destacam-se os fungos (terrestres e marinhos), que representam uma parcela significativa da diversidade microbiana presente na Terra. Embora o número de espécies de fungos seja estimado entre 1,5 e 1,6 milhão, estudos baseados em sequências de DNA de amostras de solo sugerem que essa diversidade pode ser ainda maior, entre 3,1 e 5,1 milhões de espécies, mas que menos de 5% dessa diversidade fúngica encontra-se descrita e mantida em cultura (RICHARDS et al., 2012). Esses microrganismos são capazes de crescer em quase todos os *habitats* do planeta, sendo superados apenas pelas bactérias em termos de tolerância a condições extremas de temperatura, atividade de água e fonte de carbono (BLACKWELL, 2011).

A natureza única do ambiente marinho torna a compreensão e estudo desse ecossistema imprescindível na prospecção de novos genes, uma vez que os processos

biotecnológicos são influenciados pelas adaptações singulares dos organismos ao ambiente em que vivem. Salinidade, altas concentrações de íons de sódio, baixo potencial hídrico, pH, baixas temperaturas e alta pressão hidrostática acabaram por fazer com que os fungos marinhos desenvolvessem características específicas para sobrevivência nesse ambiente, como produção de enzimas funcionais em pH entre 7-8, acumulação de osmólitos, como glicerol, manitol e trealose, e desenvolvimento de vacúolos de armazenamento ou de ATPases de efluxo de sódio bastante eficientes. Tais adaptações estão relacionadas a genes novos capazes de prover estas propriedades especiais, tornando estes organismos capazes de produzir metabólitos únicos (DEWAPRIYA; KIM, 2014; MOUTON et al., 2012; RAGHUKUMAR, 2008).

Nos últimos anos, os metabólitos secundários derivados de fungos marinhos passaram a receber mais atenção, muito em virtude das características estruturais únicas que lhes conferem propriedades interessantes do ponto de vista biológico e farmacológico. Embora o antibiótico cefalosporina C tenha sido produzido a partir de um fungo do gênero *Cephalosporium* Corda, obtido na costa da Sardenha, Itália, na década de 40, apenas cerca de trintas anos depois, fungos marinhos começaram a ser avaliados de forma sistemática quanto ao seu potencial químico. Até o ano de 2010, o número de novos produtos naturais obtidos a partir de fungos já excedia 1000 compostos. Um panorama dos tipos de compostos mais produzidos por esses microrganismos pode ser observado na Figura 1. Muitos destes compostos apresentam atividade farmacológica com relevância clínica como, por exemplo, a dicetopiperazina hamilida, substância descoberta nos anos 90 e que possui ação citotóxica contra células cancerígenas (RATEB; EBEL, 2011).

**Figura 1** – Classes de compostos produzidos por fungos marinhos até a metade de 2010.



Fonte: Adaptado de RATEB e EBEL (2011).

Além da utilização de metabólitos secundários, metabólitos primários como enzimas também possuem alta relevância do ponto de vista industrial. Em virtude da constante demanda e potencialidade dessas biomoléculas em uma ampla variedade de processos industriais, a exploração de enzimas fúngicas constitui uma alternativa interessante (MICHEL; CZJZEK, 2013).

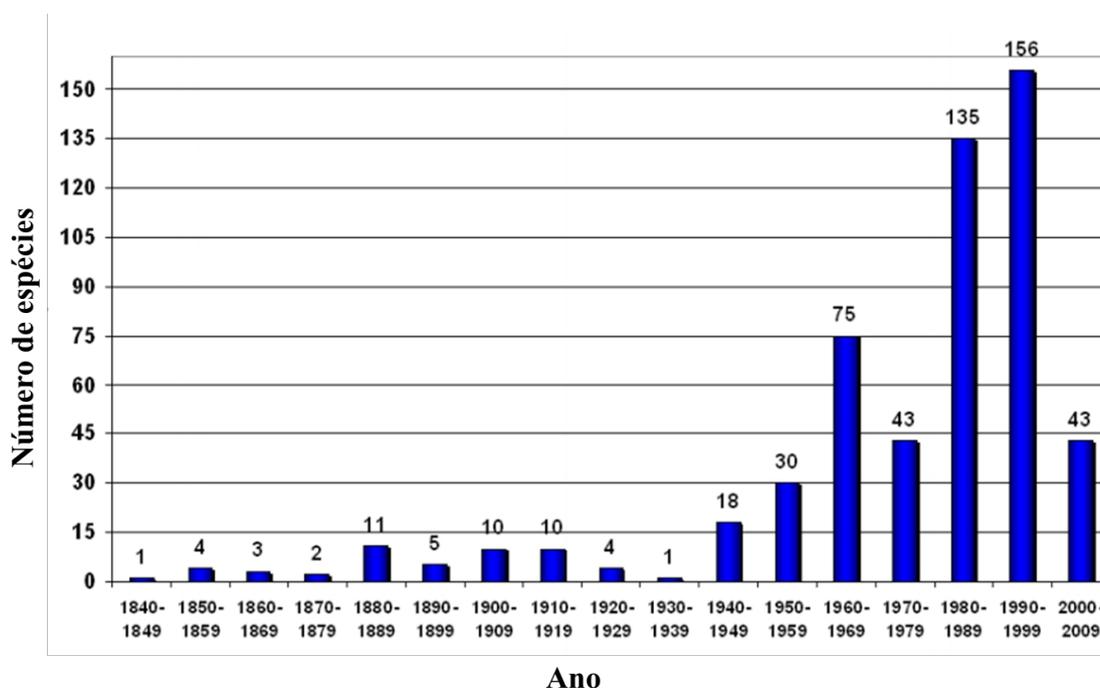
### 1.1 Fungos marinhos

Fungos marinhos podem ser definidos como um grupo ecológico, independentemente das diferenças em seus padrões fisiológicos, nutricionais ou filogenéticos (HYDE et al., 1998; KOHLMAYER; VOLKMANN-KOHLMEYER; NEWELL, 2004; MOUTON et al., 2012; RATEB; EBEL, 2011). Estes fungos podem ser divididos em duas categorias: **fungos estritamente marinhos**, que podem crescer, esporular e germinar somente em *habitats* marinhos ou estuarinos; e **fungos facultativamente marinhos**, que são aqueles provenientes de ambientes terrestres e água doce fisiologicamente adaptados para crescer em um ambiente marinho (MOUTON et al., 2012; RAGHUKUMAR, 2008; RATEB; EBEL, 2011). Fungos cujo *habitat* restringe-se a zonas estuarinas imersas ou plantas marinhas são considerados terrestres, porém halotolerantes (KOHLMAYER; VOLKMANN-KOHLMEYER; NEWELL, 2004). De acordo com Mouton *et al.* (2012), a maioria dos fungos que podem ser encontrados no mar são espécies facultativas, pertencendo a gêneros como *Penicillium* Link: Fries,

*Aspergillus Micheli* ex Link, *Trichoderma* Persoon ex Gray, *Wardomyces* F.T. Brooks & Hansford, *Chrysosporium* Corda e *Chaetomium* Kunze ex Fries.

Nos oceanos, uma grande diversidade microbiana pode ser encontrada (SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2013). De acordo com uma das revisões literárias mais recentes no assunto, o número de espécies marinhas de fungos filamentosos é de 549, havendo aumentado dramaticamente desde os primeiros relatos provenientes do século XIX (JONES, 2011b), conforme representado na Figura 2. Apesar disto, apenas no início da década de 60 o ramo da micologia marinha foi consolidado com a publicação do primeiro livro dedicado ao assunto (KOHLMEYER; VOLKMANN-KOHLMEYER; NEWELL, 2004).

**Figura 2** – Aumento, por década, no número de fungos filamentosos marinhos descritos.



Fonte: Adaptado de JONES et al. (2009).

A exploração de ambientes localizados nos trópicos, novos substratos e localizações geográficas culminaram em um acréscimo massivo de novas espécies a partir dos anos 80. Entretanto, esse número ainda é baixo quando comparado às estimativas, como aquelas propostas por Jones (2011a) e Jones *et al.* (2009), que projetam o número de fungos marinhos em 10.000 e 6.000, respectivamente. Sugere-se que o ambiente marinho abrigue um número significativo de novos grupos, a maioria pertencendo aos filos dos ascomicetos e

basidiomicetos, grupos que já constituem a maioria de fungos marinhos (BLACKWELL, 2011; HIBBETT et al., 2007; RICHARDS et al., 2012).

Fungos marinhos podem ser saprófitas, simbiontes ou parasitas de plantas e animais, podendo ser encontrados em uma ampla variedade de substratos, como matéria inorgânica (solo, *habitats* arenosos, sedimentos, e em suspensão na coluna d'água), material floculado e madeira em decomposição, além de associações com organismos vivos, como a algas, plantas marinhas ou de mangues, invertebrados marinhos (crustáceos, esponjas, corais, ascídios, holoturianos, bivalvos) e vertebrados (comumente peixes) (RATEB; EBEL, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Em relação ao estudo da diversidade fúngica, manguezais são os *habitats* mais estudados, sendo que 50% das espécies de fungos marinhos obrigatórios descritos até o ano 2000 eram habitantes de madeira presentes nesses ambientes. Os manguezais fazem parte da zona costeira que constitui apenas cerca de 8% das áreas cobertas por águas marinhas do planeta (DAS; LYLA; KHAN, 2006).

Segundo Edgcomb *et al.* (2011), fungos compõem a porção majoritária da sub-superfície marinha. Esta informação é respaldada por Richards *et al.* (2012), que sugerem que a maior parte dos fungos apresenta uma preferência em residir em organismos hospedeiros e ambientes bentônicos, que incluem regiões de águas marinhas profundas. Destaca-se ainda o fato de poucas sequências de DNA terem sido recuperadas de águas marinhas mais próximas a superfície. No entanto, sedimentos ainda são pobremente explorados como fonte de diversidade fúngica (fungos bentônicos) (JONES, 2011a).

## **1.2 Sedimentos marinhos e diversidade fúngica**

Sedimento marinho é definido pela Enciclopédia Britânica como “qualquer depósito de material insolúvel, principalmente rochas e partículas de solo, transportada de áreas terrestre para o oceano pelo vento, gelo e rios, assim como os restos de organismos marinhos, produtos de vulcanismo submarino, propriedades químicas da água do mar e materiais externos (ex.: meteoritos) que se acumulam no fundo do mar” (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA ONLINE, 2014). De acordo com a literatura, 16% dos novos compostos descobertos a partir de fungos derivados do mar foram obtidos de organismos isolados de sedimentos, incluindo sedimentos de mar profundo (RATEB; EBEL, 2011).

Alguns trabalhos abordam o papel dos fungos marinhos em sedimentos, entretanto ainda não está esclarecido completamente como eles agem neste *habitat*. Ao nível bentônico, há um constante influxo de matéria particulada em direção ao sedimento, essa condição ambiental favorece o desenvolvimento de fungos saprófitas, que são responsáveis pelo processamento de detritos (RICHARDS *et al.*, 2012). Desta forma, eles devem exercer um papel similar aos de ambiente terrestre, os quais estão envolvidos no processamento de detritos, armazenamento de nitrogênio e carbono, nos ciclos biogeoquímicos e estabilização do solo (BILLS *et al.*, 2004; RICHARDS *et al.*, 2012; SHEARER; LANGSAM; LONGCORE, 2004). Além disso, os fungos são os principais responsáveis pela degradação de material lignocelulósico em ecossistemas marinhos. A habilidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio os torna agentes dominantes na degradação do material vegetal (HYDE *et al.*, 1998; RAGHUKUMAR, 2004; RICHARDS *et al.*, 2012). Eles também são responsáveis pelo suprimento de nutrientes essenciais (ex.: lisina, metionina, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados, esteróis) ao ambiente marinho, apoiando a teia alimentar (PHILLIPS, 1984). Também é descrito na literatura que fungos marinhos são capazes de degradar estruturas calcáreas presentes em revestimento de tocas, conchas de cracas e moluscos, assim como tunicina, uma espécie de celulose presente em tunicatos (HYDE *et al.*, 1998). Além disso, há um relato na literatura mostrando que fungos marinhos são capazes de executar o processo de desnitrificação a baixas concentrações de oxigênio, processo crucial para o ciclo do nitrogênio no ambiente marinho (CATHRINE; RAGHUKUMAR, 2009).

### **1.3 Fungos marinhos como fontes de enzimas**

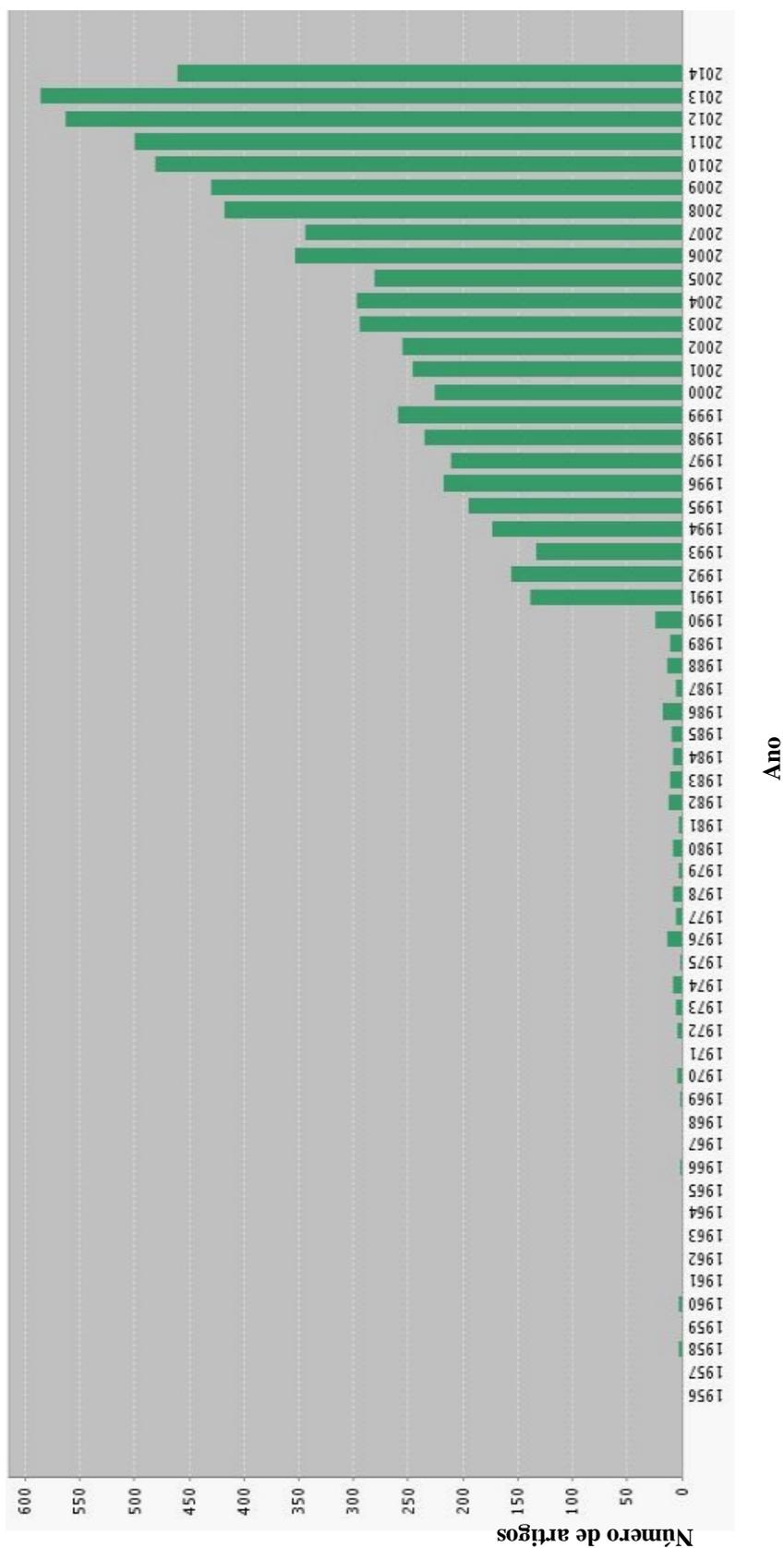
A grande maioria das enzimas utilizadas em escala industrial pertence ao grupo das hidrolases, que são capazes de catalisar reações com diversos substratos diferentes. A indústria de detergentes é a maior consumidora de enzimas em geral, tanto em termos de valor, quanto de volume, e os microrganismos, por muitos anos, têm sido utilizados como fontes de enzimas com aplicações para este segmento (SARANRAJ; STELLA, 2013).

Enzimas de organismos oriundos de *habitats* marinhos, que apresentam um maior número de ambientes frios estáveis quando comparados à terra firme, devem ser capazes de

atuar a temperaturas mais baixas, sendo uma vantagem do ponto de vista energético em processos industriais (ARMSTRONG; FALK-PETERSEN; KASPERSEN, 2013). Outro aspecto interessante é a halotolerância dos microrganismos marinhos, uma vez que as enzimas hidrolíticas que estes organismos possuem são capazes de atuar sob condições que resultariam em desnaturação de grande parte das demais enzimas. Isto resultaria em enzimas mais seguras e menos tóxicas para serem aplicadas, por exemplo, na terapia em humanos, uma vez que o plasma sanguíneo tem natureza química salina semelhante a água do mar (DAS; LYLA; KHAN, 2006).

Apesar de um grande número de enzimas já ser empregado em biocatálise, a contribuição do ambiente marinho neste ramo continua sendo limitada e amplamente negligenciada, havendo ocorrido um crescimento apenas nas últimas duas décadas. Tal observação pode ser constatada através de levantamento bibliográfico no *Web of Knowledge*, utilizando o termo ‘marine enzymes’, sem restrição de período, tendo sido encontrado um total de 7740 publicações no período de 1956 a 2014 (Figura 3). Em virtude disto, a investigação de enzimas provenientes de ambientes marinhos é de extrema importância para que se possa explorar toda a potencialidade deste ambiente (ARMSTRONG; FALK-PETERSEN; KASPERSEN, 2013).

**Figura 3** - Artigos encontrados no *Web of Knowledge* utilizando o termo *marine enzymes* no período de 1956 a 2014, somando um total de 7740 publicações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a diversidade de fungos associados a sedimentos coletados na praia do Pecém e suas atividades enzimáticas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar levantamento bibliográfico sobre a diversidade de fungos filamentosos em sedimentos marinhos.
- Isolar fungos filamentosos associados a sedimentos coletados na praia do Pecém.
- Avaliar as atividades de lipase, amilase e celulase nos isolados obtidos.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Levantamento Bibliográfico**

O levantamento bibliográfico foi realizado na base de dados *SciFinder*, delimitando o período de 2009 a 2014, e empregando o termo ‘marine fungi’ como palavra-chave. Somente as publicações em língua inglesa e portuguesa, e que envolviam o isolamento de fungos de sedimentos marinhos foram avaliados.

### **3.2 Isolamento dos fungos**

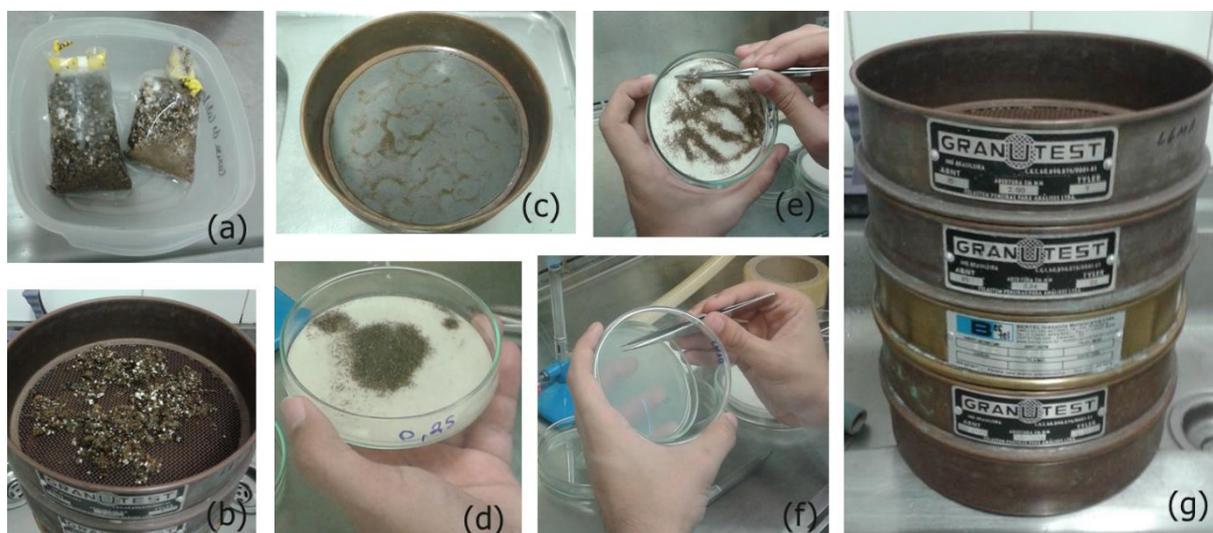
#### ***3.2.1 Coleta do material***

Porções de 20 g de sedimento marinho foram coletadas nas proximidades de uma das colunas de sustentação da rampa de acesso ao pier do Porto do Pécem, em São Gonçalo do Amarante, Ceará, em agosto de 2014. As amostras foram armazenadas em sacos estéreis de 7,5 x 18,5 centímetros (Whirl-Pak, Nasco) e seguiram para a etapa de processamento.

#### ***3.2.2 Isolamento dos fungos associados***

Para o isolamento de fungos associados ao sedimento, foi utilizada a técnica de lavagem de solo, comumente empregada para isolamento de fungos de solo terrestre (PFENNING; ABREU, 2006). Uma porção de 20 g de sedimento marinho (Figura 4.a) foi disposta sobre a primeira peneira (Figura 4.b) de uma série de cinco (Figura 4.g) com os seguintes diâmetros de abertura de malha: 9, 20, 48, 60 e 100 mesh (2,822; 1,270; 0,529; 0,423 e 0,254 mm), respectivamente. As peneiras foram previamente esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v). O sedimento foi lavado, utilizando-se uma pisseta, com água do mar esterilizada em autoclave. Da massa retida nas três peneiras de menores diâmetros (Figura 4.c), 48, 60 e 100 mesh, uma porção foi retirada para secagem em papel de filtro esterilizado sob fluxo laminar (Figura 4.d). Após a etapa de secagem, partículas foram transferidas para placas de Petri através de pinça estéril (Figuras 4.e e 4.f).

**Figura 4** - Etapas da realização da técnica de lavagem de sedimentos. **(a)** Saco contendo sedimento coletado. **(b)** Sedimentos dispersos sobre a primeira peneira. **(c)** Sedimentos dispersos na última peneira, após o processo de lavagem. **(d)** Sedimentos em placa com papel de filtro para processo de secagem. **(e)** Transferência de sedimentos através de pinça **(f)** Partícula sendo dispensada em placa com meio de cultura. **(g)** Estrutura da sequência de peneiras montada para o procedimento de lavagem.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cinco meios diferentes (CMA, CMAM, SNA, SNAM, SED) foram utilizados no inoculamento de 10 partículas de sedimento por placa. Além do retido nestas três peneiras de menores diâmetros, a suspensão de partículas resultante do processo de lavagem foi coletada e 1 mL foi espalhado em cada placa com um dos cinco meios utilizados. Os meios de cultura utilizados apresentam a seguinte composição:

- CMA (*Corn-meal agar*): 17 g de ágar e 60 g de filtrado de fubá de milho cozido para 1 L de água destilada (GAMS; HOEKSTRA; APTROOT, 1998);
- CMAM (*corn-meal agar/ água do mar*): 17 g de ágar e 60 g de filtrado de fubá de milho cozido para 1 L de água do mar;
- SNA (*synthetic nutrient-poor agar*): 1 g de dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1 g de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,5 g de cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), 0,2 g de glicose, 0,2 g de sacarose, 20 g de ágar para 1 L de água destilada (GAMS; HOEKSTRA; APTROOT, 1998);
- SNAM (*synthetic nutrient-poor agar/ água do mar*): 1 g de dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1 g de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado

(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 0,5 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de glicose, 0,2 g de sacarose, 20 g de ágar para 1 L de água do mar;

- SED (suspensão resultante da lavagem dos sedimentos): 500 mL da suspensão resultante da lavagem dos sedimentos com água do mar foi coletada e ágar foi adicionado a uma concentração de 20 g/L. A suspensão foi, então, esterilizada e utilizada como meio de cultivo.

Em todos os meios de cultura, foram adicionados penicilina, estreptomicina + L-glutamina e cloranfenicol nas concentrações de 50 g/L cada. As placas foram incubadas à temperatura de 25 °C durante quatro semanas. O desenho experimental encontra-se disposto na Tabela 2, abaixo:

**Tabela 2** - Desenho experimental do isolamento dos fungos do sedimento marinho.

Meio de cultivo	Peneira de lavagem (mesh)	Código do experimento
<i>Corn-meal agar/ água destilada</i>	48	CMA (48)
	60	CMA (60)
	100	CMA (100)
	Suspensão resultante	CMA (LAV)
<i>Corn-meal agar/ água do mar</i>	48	CMAM (48)
	60	CMAM (60)
	100	CMAM (100)
	Suspensão resultante	CMAM (LAV)
<i>Synthetic nutrient-poor agar/ água destilada</i>	48	SNA (48)
	60	SNA (60)
	100	SNA (100)
	Suspensão resultante	SNA (LAV)
<i>Synthetic nutrient-poor agar/ água do mar</i>	48	SNAM (48)
	60	SNAM (60)
	100	SNAM (100)
	Suspensão resultante	SNAM (LAV)
Suspensão resultante da lavagem dos sedimentos	48	SED (48)
	60	SED (60)
	100	SED (100)
	Suspensão resultante	SED (LAV)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As colônias crescidas foram transferidas para placas contendo meio SNA e SNAM através de semeadura em linha. Depois da confirmação da pureza da colônia através da observação de preparados microscópicos, foi realizada a preservação dos isolados segundo o método de Castellani, onde cinco ou seis discos contendo micélio do isolado foram transferidos para um criotubo de 2 mL contendo água destilada estéril (CASTELLANI, 1963; GAMS; HOEKSTRA; APTROOT, 1998).

### ***3.2.3 Identificação morfológica dos isolados***

A identificação dos isolados foi realizada em parceria com o Laboratório de Micologia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará. Com base na avaliação de preparações microscópicas das estruturas reprodutivas, os isolados foram identificados. Os isolados preservados foram recuperados em meio SNA a partir dos discos contendo micélio. Blocos de ágar contendo o micélio crescido foram transferidos utilizando-se espátula estéril para uma lâmina e recobertos com uma lamínula para identificação morfológica através de análise de microscopia de luz.

### **3.3 Ensaio enzimáticos**

Os isolados preservados e identificados foram repicados para placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar em água destilada (BDA), crescidos durante uma semana, e posteriormente utilizados para os ensaios enzimáticos. Isolados caracterizados como fungos de esporos secos foram transferidos para três pontos de cada placa através da inoculação de esporos por intermédio de uma alça de platina estéril umedecida com ágar. Os demais foram repicados através da transferência de três discos de ágar contendo micélio do isolado (GAMS; HOEKSTRA; APTROOT, 1998).

A atividade enzimática foi mensurada por meio do índice de atividade enzimática relativa (IAER), calculado através da razão entre a área do halo de atividade e a área de crescimento da colônia (BRADNER; GILLINGS; NEVALAINEN, 1999). A medição das áreas foi realizada com o auxílio do *software* AXIO Vs 40 V.4.8.2.0 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### ***3.3.1 Ensaio para atividade lipolítica***

A atividade lipolítica foi testada em meio de cultura sólido, contendo Tween® 80 como substrato lipídico, além de peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0,1 g/L, ágar 20 g/L. Foi adicionado 1 mL de Tween® 80 para cada 100 mL de meio. Os isolados foram inoculadas no meio de cultivo e incubadas a 25 °C por até 6 dias. A medição do halo opaco em volta da colônia, resultante da formação de cristais de oleato de cálcio, foi utilizada como indicativo de atividade lipolítica, conforme exemplificado na figura 5 (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; PLOU et al., 1998).

**Figura 5** – Exemplo de halo de atividade lipolítica.



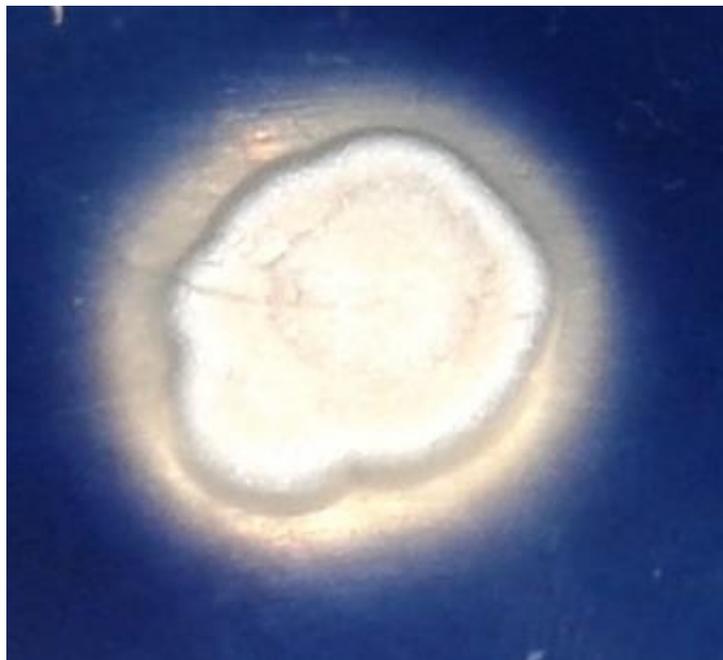
Fonte: Elaborado pelo autor.

### ***3.3.2 Ensaio para atividade amilolítica***

A atividade amilolítica foi testada utilizando o meio APY (10 g/L de amido, 2,5 g/L de extrato de levedura, 2,5 g/L de peptona e 20 g/L de ágar). Os isolados foram inoculados no meio de cultivo e incubados à 25 °C por até 6 dias, seguido por um período de incubação de 1 h a 35 °C. Então, foi adicionada, sobre as placas, uma solução de iodo e iodeto de potássio (0,3% de iodo e 1% de iodeto de potássio) e deixou-se reagir por 2 minutos. Em seguida, foi drenado o excesso da solução de iodo/iodeto e o halo, indicativo da atividade enzimática, foi

mensurado de acordo com a formação de uma zona pálido-amarelada ao redor da colônia no meio de coloração azulada, conforme exemplificado na figura 6 (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; STRAUSS et al., 2001).

**Figura 6** – Exemplo de halo de atividade amilolítica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### ***3.3.3 Ensaio para atividade celulolítica***

A atividade celulolítica foi avaliada utilizando meio Ágar-CMC (10 g/L de carboximetilcelulose, 2,5 g/L de extrato de levedura, 2,5 g/L de peptona e 20 g/L de ágar). As linhagens foram inoculadas no meio de cultivo e incubadas à 28 °C por até 6 dias. Após este período, as placas foram incubadas a 35 °C por 1 hora e, então, verteu-se uma solução de vermelho congo (0,1 % m/v) sobre as placas, permanecendo em reação durante 30 minutos. Em seguida, o excesso da solução foi drenado e sobre as placas verteu-se uma solução de cloreto de sódio (1 mol/L), deixando-se reagir por 20 minutos. O excesso foi drenado e o halo indicativo da atividade enzimática foi mensurado de acordo com a formação de uma zona pálida ao redor da colônia, conforme exemplificado na figura 7 (KASANA et al., 2008).

**Figura 7** – Exemplo de halo de atividade celulolítica.



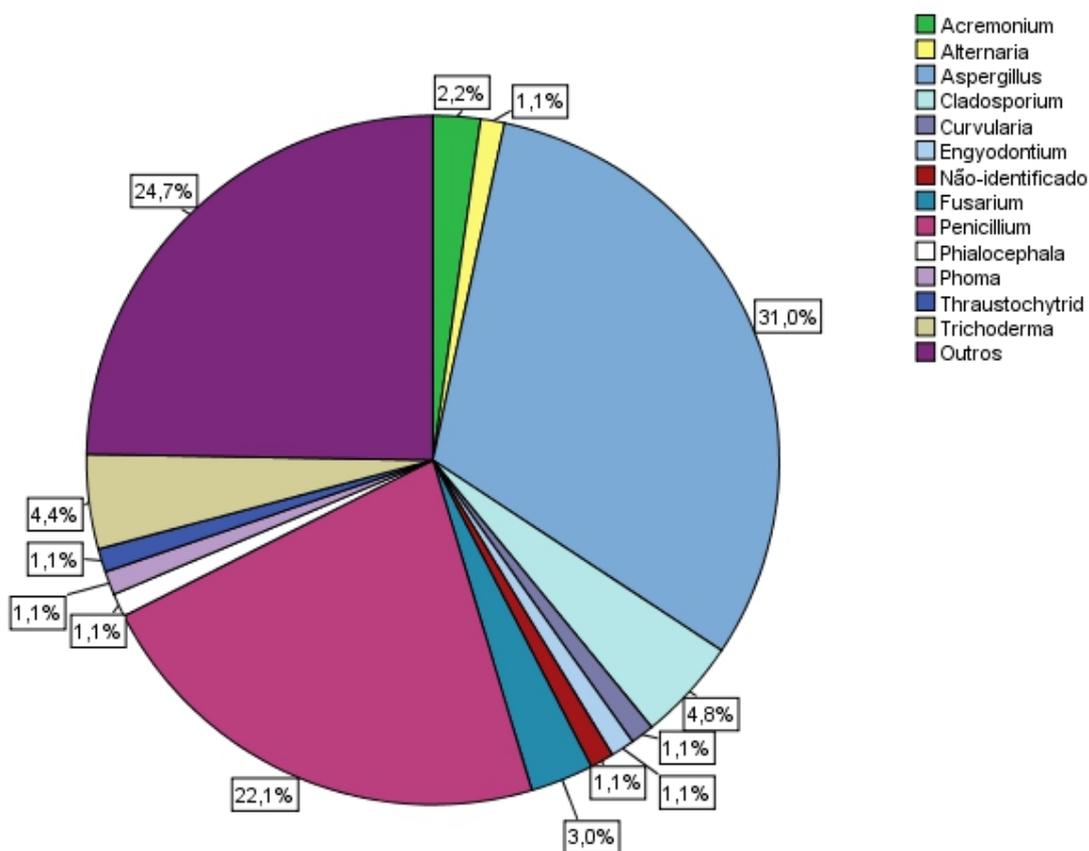
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade fúngica em sedimentos marinhos: levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico forneceu um total de 1297 artigos científicos nos últimos 5 anos (2009-2014), contendo o termo *marine fungi*. Dentre estes, somente 118 trabalhos envolviam o isolamento de fungos de sedimentos marinhos. A Figura 8, abaixo, apresenta um gráfico contendo a participação (em percentual) dos gêneros de fungos identificados nesses sedimentos.

**Figura 8** – Percentual de gêneros de fungos marinhos associados a sedimentos nos últimos cinco anos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar que a maioria dos isolados pertence aos gêneros *Aspergillus* (31,0%), *Penicillium* (22,1%), *Cladosporium* Link ex Fries (4,8%), *Trichoderma* (4,4%) e *Acremonium* Link ex Fries (2,2%). Fungos destes gêneros podem ser facilmente encontrados

em amostras de solos e material vegetal em decomposição. Embora tenham origem terrestre, estes fungos são comumente encontrados em ambientes marinhos, mostrando a capacidade de adaptação desses gêneros a este tipo de ambiente. Apesar de estes organismos serem, muitas vezes, largamente estudados e bem conhecidos, faz-se necessário o estudo de sequências moleculares destas cepas para comparação com isolados terrestres, uma vez que o perfil de metabólitos secundários apresentados pelas linhagens marinhas pode diferir dos seus pares terrestres (ELLIS et al., 2007; JONES, 2011b).

Dentre os trabalhos analisados, apenas vinte deles descreveram a metodologia e meios empregados no processo de isolamento (a lista completa dos isolados em cada trabalho encontra-se no Apêndice A). Apenas em quatro deles objetivou-se isolar a maior diversidade de fungos quanto possível. Através da Tabela 3, abaixo, pode-se comparar os isolados obtidos em cada trabalho. Novamente, os gêneros *Cladosporium* e, principalmente, *Aspergillus* e *Penicillium* aparecem com o maior número de isolados. Os gêneros que mais apresentam recorrência de isolamento dentre os trabalhos comparados são: *Acremonium* (3 trabalhos), *Aspergillus* (4 trabalhos), *Cladosporium* (3 trabalhos) e *Penicillium* (3 trabalhos).

**Tabela 3** – Comparação de diversidade de espécies em trabalhos de isolamento de fungos a partir de sedimentos marinhos.

	(CATHRINE; RAGHUKUMAR, 2009)	(MOUTON et al., 2012)	(THENNARASU; PANNEERSELVA M; THAJUDDIN, 2011)	(ZHANG et al., 2013)
<b>Método de isolamento</b>	Espalhamento de partículas retidas no processo de peneiragem em placa.	Espalhamento em placa de diluições ( $10^{-1}$ a $10^{-6}$ ); inoculação de filtros em placa; espalhamento em placa de suspensão enriquecida de sedimentos	Diluição seriada, seguida de plaqueamento.	Espalhamento de partículas retidas no processo de peneiragem em placa.
<b>Local</b>	Zona costeira anóxica de Goa, Índia	Baía de Santa Helena, África do Sul	Ilhas Andamã	Mar do Sul da China
<b>Isolados</b>			<i>Absidia glauca</i>	<i>Arthrinium phaeospermum</i>
		<i>Acremonium alternatum</i>		<i>Acremonium implicatum</i> (2 isolados)
			<i>Acremonium sp.</i> <i>Acrocylindrium oryzae</i>	

(CATHRINE; RAGHUKUMAR, 2009)	(MOUTON et al., 2012)	(THENNARASU; PANNEERSELVA M; THAJUDDIN, 2011)	(ZHANG et al., 2013)
		<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria tenuissima</i>
		<i>Aspergillus awamori</i>	
		<i>Aspergillus chevalieri</i>	
	<i>Aspergillus candidus</i> (2 isolados)		
		<i>Aspergillus flavipes</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
		<i>Aspergillus granulosis</i>	
		<i>Aspergillus koeningii</i>	
		<i>Aspergillus luchensis</i>	
		<i>Aspergillus nidulans</i>	
		<i>Aspergillus niger</i>	
		<i>Aspergillus ochraceous</i>	
		<i>Aspergillus oryzae</i>	
			<i>Aspergillus penicillioides</i> (2 isolados)
		<i>Aspergillus quercinus</i>	
			<i>Aspergillus restrictus</i> (3 isolados)
			<i>Aspergillus sydowii</i>
			<i>Aspergillus sydowii</i>
			<i>Aspergillus tubingensis</i> (2 isolados)
		<i>Aspergillus ruber</i>	
<i>Aspergillus</i> sp. (2 isolados)	<i>Aspergillus</i> sp. (11 isolados)		
	<i>Aspergillus terreus</i> (3 isolados)	<i>Aspergillus terreus</i>	
		<i>Aspergillus terricola</i>	
			<i>Aspergillus unguis</i> (2 isolados)
		<i>Aspergillus ustus</i>	
		<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> (4 isolados)
			<i>Aspergillus vitricola</i> (4 isolados)
			<i>Aspergillus westerdijkae</i>
			<i>Aureobasidium pullulans</i> (2 isolados)
		<i>Botrytis cinerea</i>	

(CATHRINE; RAGHUKUMAR, 2009)	(MOUTON et al., 2012)	(THENNARASU; PANNEERSELVA M; THAJUDDIN, 2011)	(ZHANG et al., 2013)
<i>Byssochlamys sp.</i>			<i>Catenulostroma protearum</i>
		<i>Cephalosporium sp.</i>	
		<i>Chaetomium sp.</i>	
		<i>Circinella sp.</i>	
			<i>Cladosporium cladosporioides</i> (6 isolados)
			<i>Cladosporium colombiae</i> (2 isolados)
		<i>Cladosporium herbarum</i>	
		<i>Cladosporium lignicolum</i>	
<i>Cladosporium sp.</i>			
			<i>Cladosporium oxysporum</i> (3 isolados)
			<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (4 isolados)
			<i>Cladosporium uredinicola</i> (2 isolados)
		<i>Curvularia lunata</i>	
	<i>Eurotium amstelodami</i> (2 isolados)		
			<i>Engyodontium album</i> (6 isolados)
			<i>Geomyces vinaceus</i> (2 isolados)
		<i>Fusarium lactis</i>	
		<i>Fusarium moniliforme</i>	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	
		<i>Fusarium poae</i>	
		<i>Fusarium semitectum</i>	
<i>Fusarium sp.</i>			
		<i>Geotrichum candidum</i>	
		<i>Geotrichum sp.</i>	
		<i>Helminthosporium oryzae</i>	
<i>Humicola sp.</i> (2 isolados)			
		<i>Masoniella grisea</i>	
<i>Myceliophthora sp.</i>			

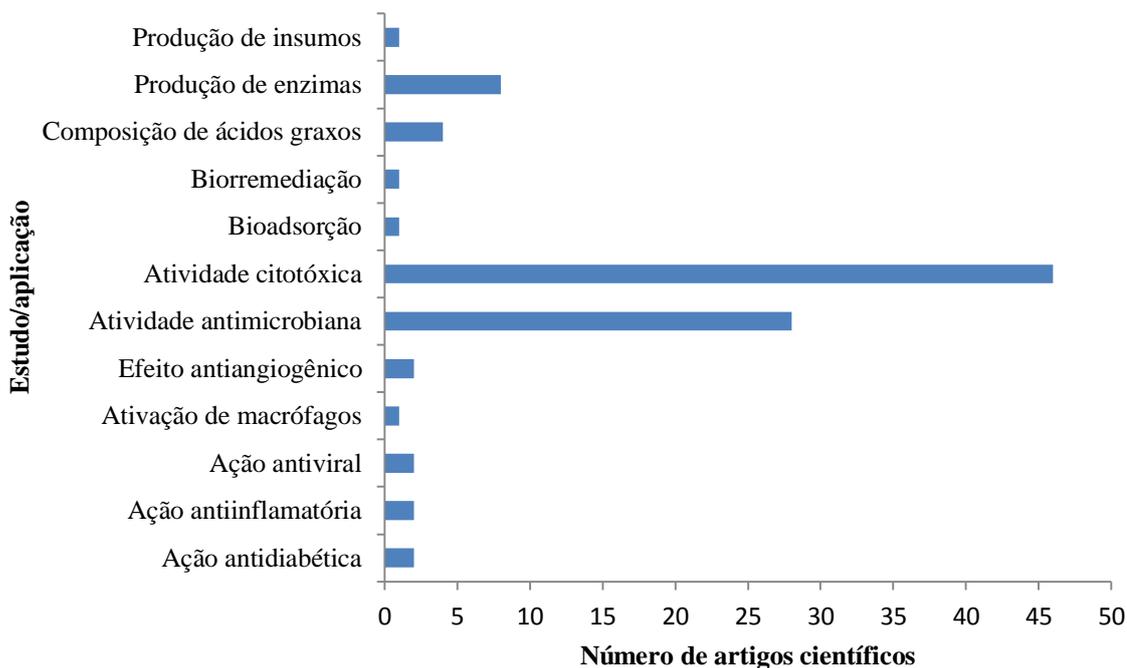
(CATHRINE; RAGHUKUMAR, 2009)	(MOUTON et al., 2012)	(THENNARASU; PANNEERSELVA M; THAJUDDIN, 2011)	(ZHANG et al., 2013)
		<i>Oospore lupuli</i>	
<i>Paecilomyces</i> sp.			<i>Penicillium biourgeianum</i> (6 isolados)
	<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i> (2 isolados)		
	<i>Penicillium canescens</i>		
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
		<i>Penicillium citrinum</i>	
			<i>Penicillium commune</i>
		<i>Penicillium expansum</i>	
		<i>Penicillium granulatum</i>	
		<i>Penicillium janthinellum</i>	
		<i>Penicillium luteum</i>	
	<i>Penicillium</i> sp. (8 isolados)	<i>Penicillium</i> sp.	
			<i>Penicillium verruculosum</i>
			<i>Phaeosphaeriopsis musae</i> (3 isolados)
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2 isolados)
		<i>Scopulariopsis</i> sp.	
<i>Scolicobasidium</i> sp.			
		<i>Spicaria elegans</i>	
		<i>Sporotrichum</i> sp.	
		<i>Thamnidium</i> sp.	
		<i>Torula</i> sp.	
Traustoquitridios (3 isolados)			
		<i>Trametes hirsuta</i>	
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp. (5 isolados)		
		<i>Tubercularia</i> sp.	
<i>Tritirachium</i> sp. (2)			
		<i>Verticillium</i> sp.	
		<i>Verticillium terrestre</i>	
	<i>Yarrowia lipolytica</i> (7 isolados)		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora os locais onde as amostras foram coletadas e os métodos de isolamento possam variar, pode-se observar uma tendência no isolamento de espécies altamente cosmopolitas. Tal comportamento ratifica a linha de pensamento de que a maior parte de fungos isolados de amostras marinhas seria proveniente de ambientes terrestres, porém adaptados a esses ambientes, os classificando como fungos marinhos facultativos.

Com relação à aplicação destes fungos, grande parte (46 dos 118 trabalhos) dos estudos analisados concentra-se na avaliação da atividade citotóxica dos seus metabólitos secundários contra linhagens celulares cancerígenas. Em 28 trabalhos, as atividades bactericida e/ou fungicida dos metabólitos secundários foram avaliadas. Em somente oito trabalhos buscou-se avaliar a produção e atividade de enzimas. Este cenário ratifica o potencial biotecnológico dos isolados obtidos através de sedimentos. A Figura 9 apresenta um gráfico com o número de artigos científicos por estudos/aplicações envolvidas.

**Figura 9** –Trabalhos publicados nos últimos cinco anos para cada estudo/aplicação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2 Isolamento e identificação dos fungos

Com a finalidade de se obter uma maior diversidade de isolados, a técnica de lavagem de solos, seguida do plaqueamento individual de partículas, foi aplicada aos sedimentos marinhos coletados. A aplicação destas técnicas em conjunto é útil na procura por espécies raras ou específicas. A técnica de lavagem de solo ou filtração de partículas foi desenvolvida em laboratórios no Canadá, Suécia e Alemanha com o objetivo de ser uma alternativa aos métodos tradicionais de diluição e plaqueamento, e foi utilizada na tentativa de isolamento de fungos obrigatoriamente marinhos. O propósito básico desta técnica é eliminar o excesso de esporos dormentes presentes na amostra, tendendo a favorecer o isolamento de fungos com fragmentos miceliais presentes no substrato ao invés de colônias obtidas de esporos. A escolha do plaqueamento das partículas retidas apenas nas três peneiras de menor diâmetro foi feito em virtude do tamanho das partículas serem inversamente proporcional ao número de isolados que podem ser obtidos (BILLS et al., 2004; PFENNING; ABREU, 2006). Treze isolados foram obtidos nesse processo, os quais se encontram descritos na Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4** – Fungos isolados dos sedimentos da praia do Pecém.

<b>Isolado</b>	<b>Meio de isolamento</b>	<b>Espécie</b>
<b>A</b>	CMAM (LAV)	<i>Cladosporium</i> sp. 1
<b>B</b>	CMAM (LAV)	<i>Penicillium</i> sp. 1
<b>C</b>	CMA (48)	<i>Aspergillus terreus</i>
<b>D</b>	SNA (100)	<i>Acremonium</i> sp. 1
<b>E</b>	SNA (60)	<i>Penicillium</i> sp. 2
<b>F</b>	SNAM (LAV)	<i>Cladosporium</i> sp. 2
<b>G</b>	SNAM (LAV)	<i>Penicillium</i> sp. 3
<b>H</b>	CMA (LAV)	<i>Penicillium</i> sp. 4
<b>I</b>	CMA (48)	<i>Penicillium</i> sp. 5
<b>J</b>	CMA (LAV)	<i>Acremonium</i> sp. 2
<b>K</b>	SED (60)	<i>Penicillium</i> sp. 6
<b>L</b>	SNAM (60)	<i>Rhinochadiella</i> sp. 1
<b>M</b>	CMAM (60)	<i>Rhinochadiella</i> sp. 2

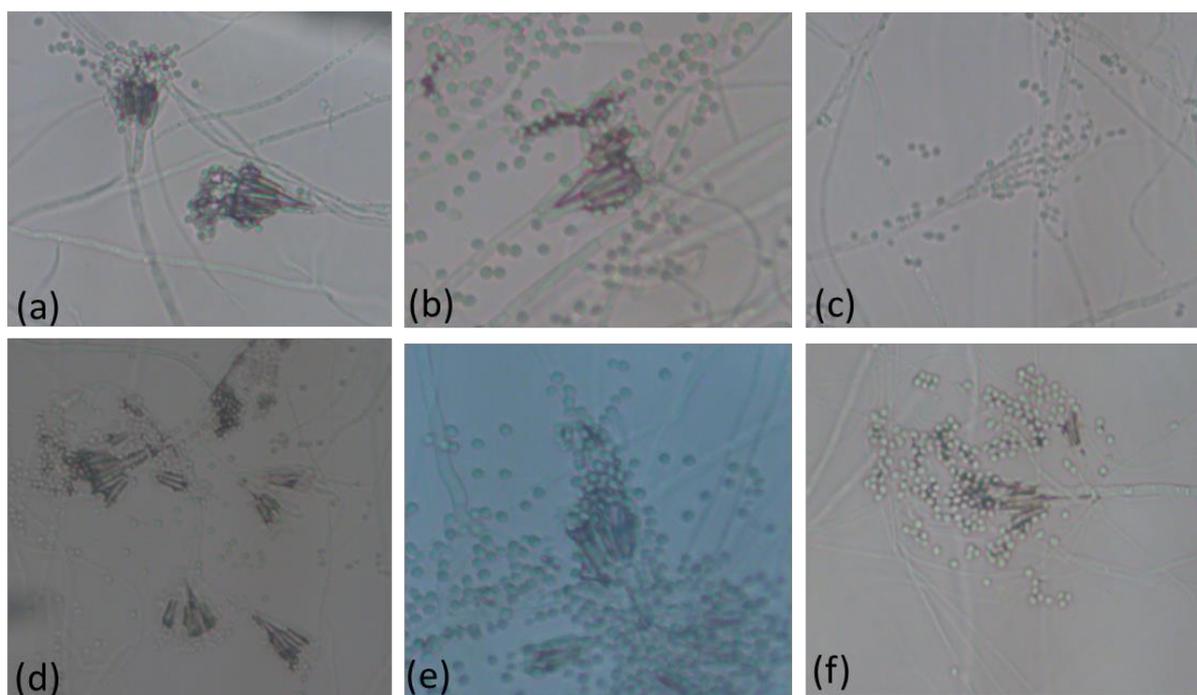
Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os 13 isolados, 7 deles foram obtidos a partir das partículas retidas nas peneiras (2 isolados a partir da peneira de abertura de malha igual a 48 mesh, 4 isolados provenientes da peneira de 60 mesh de abertura de malha e 1 da peneira de 100 mesh). Sete isolados foram recuperados a partir de meios à base de água do mar. Os isolados A-J foram recuperados durante a primeira semana de incubação, os isolados K e L durante a segunda semana, e o isolado M na terceira semana. Durante a etapa de elaboração das preparações microscópicas,

todos os isolados apresentaram crescimento tanto em meio SNA quanto SNAM. Dessa forma, segundo a definição proposta para fungos marinhos, esses isolados seriam classificados como fungos marinhos facultativos.

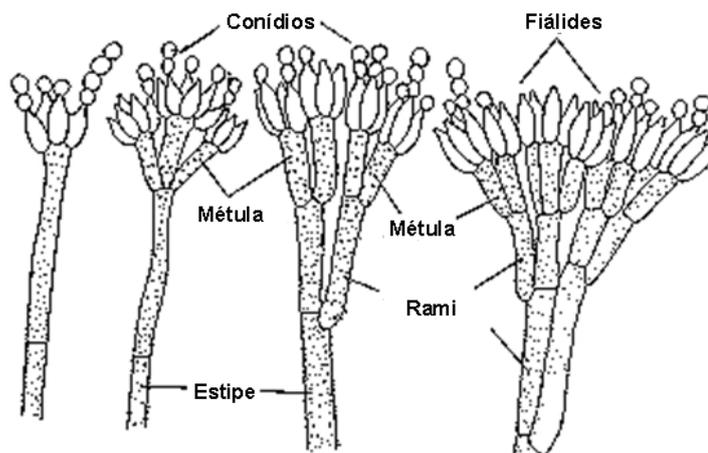
Os isolados B, E, G, H, I e K foram classificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*. A partir das micrografias apresentadas na Figura 10, é possível observar estruturas tipicamente presentes em organismos deste gênero: conidióforos simples ou ramificados com presença de métula, fiálides e conídios produzidos em cadeias a partir das fiálides, conforme representado na Figura 11. Essa estrutura, com aspecto similar ao de um pincel, é denominada *penicillus* (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980; VISAGIE et al., 2014).

**Figura 10** - Micrografias dos isolados classificados como *Penicillium sp.* (a) Isolado B. (b) Isolado E. (c) Isolado G. (d) Isolado H. (e) Isolado K. (f) Isolado I. Aumento de 400 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 11** - *Penicillus*, estrutura presente em fungos do gênero *Penicillium*.

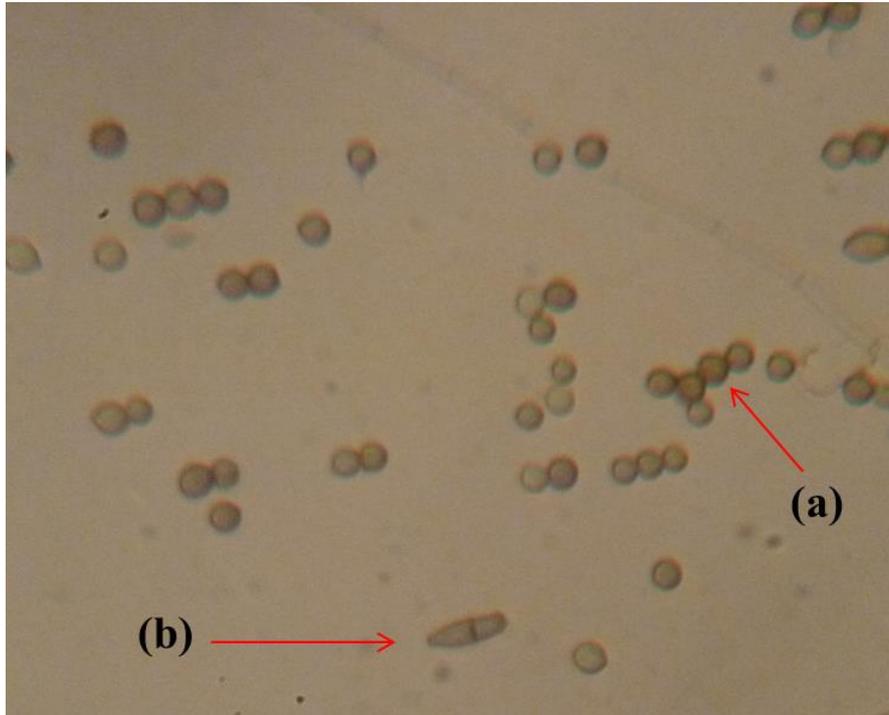


Fonte: Adaptado de “Mycology Online: *Penicillium* sp.” (s.d.).

Fungos do gênero *Penicillium* estão entre os mais comuns encontrados na natureza, podendo ser obtidos de amostras de solo, vegetação ou mesmo do ar atmosférico (VISAGIE et al., 2014). Apenas três espécies deste gênero encontram-se caracterizadas como obrigatoriamente marinhas, segundo Jones et al. (2009), nomeadamente *P.dimorphosporum* H.J. Swart, *P.dravuni* Janso e *P.limosum* S. Udea.

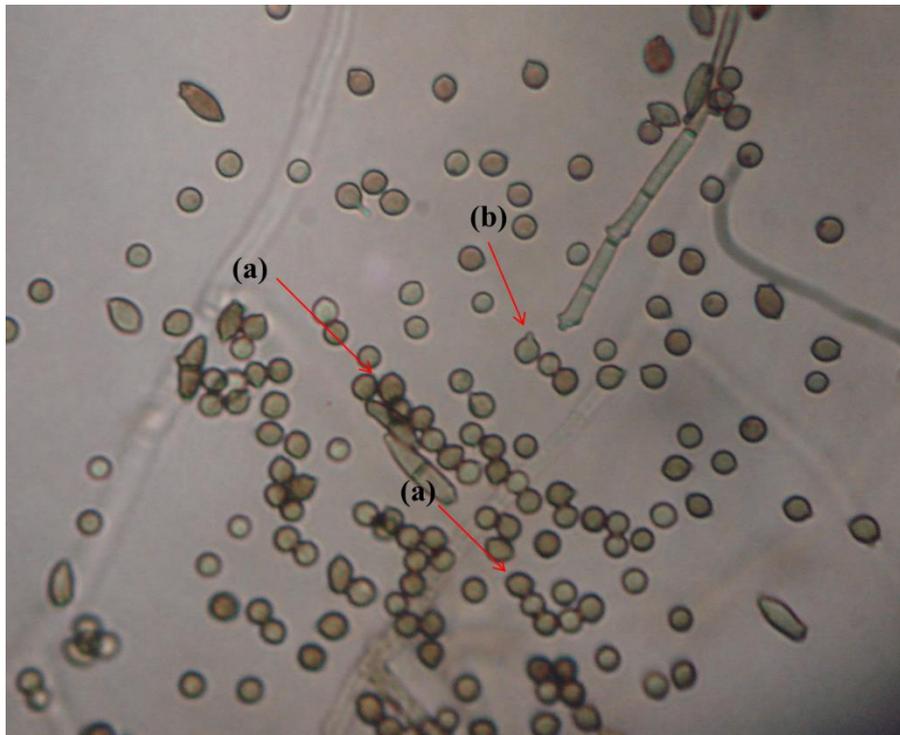
Os isolados A e F (Figuras 12 e 13) foram classificados como pertencentes ao gênero *Cladosporium*. Todas as espécies de *Cladosporium* possuem a capacidade de produzir conídios em cadeias verdadeiramente acropetais, *i. e.*, produzidos em sucessão e apresentando o elemento apical como mais jovem. Os conídios podem ser uni-, bi- e até tricelulares, apresentando variação de forma e tamanho, entretanto, costumam apresentar formato globoso ou ovalado quando unicelulares. Presença de hilo distinto (*i. e.* ponto, marca ou cicatriz, especialmente na região de inserção no conidióforo) e cadeias de conídios facilmente desarticuláveis são características que, em conjunto com aquelas mencionadas acima, permitem distinguir espécies deste gênero das demais (BENSCH et al., 2012; DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980; ELLIS et al., 2007; GASPAROTTO et al., 2012; OGÓREK et al., 2012).

**Figura 12** - Isolado A (*Cladosporium* sp.): características morfológicas. **(a)** Conídios unicelulares de formato globoso. **(b)** Conídio bicelular. Aumento de 400 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 13** – Isolado F (*Cladosporium* sp.): características morfológicas. **(a)** Conídios unicelulares de formato globoso. **(b)** Hilo. Aumento de 400 vezes.

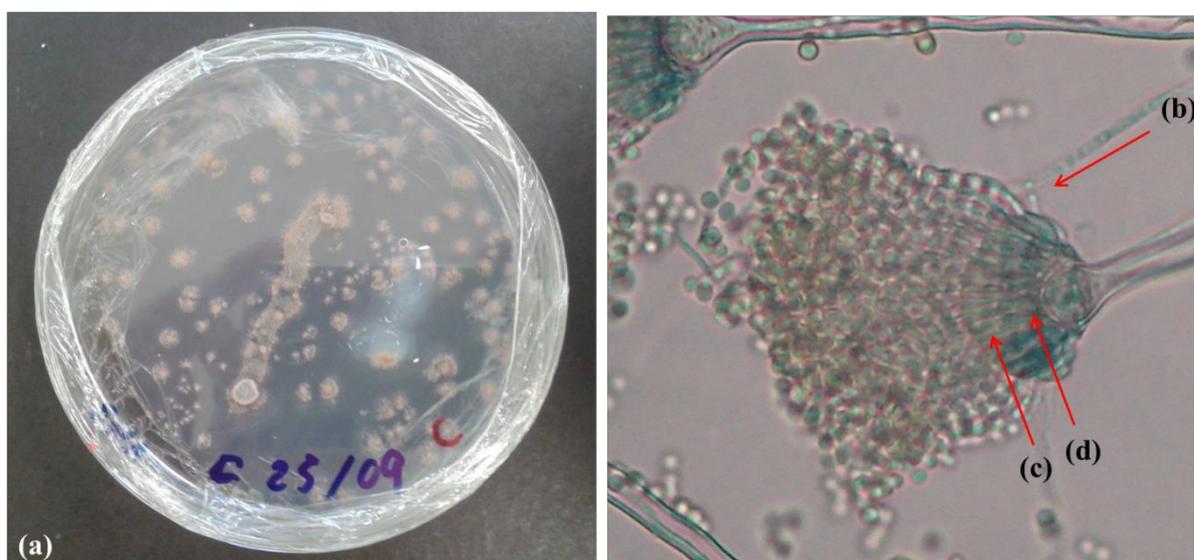


Fonte: Elaborado pelo autor.

As espécies de *Cladosporium* apresentam distribuição cosmopolita, sendo comumente isoladas a partir de amostras de solo, comida, tinta, têxteis e matéria orgânica. A presença destas espécies em ambientes marinhos é amplamente relatada em material à deriva, havendo, inclusive, uma espécie caracterizada como obrigatoriamente marinha, a *C. algarum*. Entretanto, nenhuma investigação com mais profundidade em relação aos *taxa* marinhos desse gênero foi realizada até agora (BENSCH et al., 2012; JONES et al., 2009).

O isolado C foi classificado como pertencente à espécie *Aspergillus terreus* Thom. A coloração marrom da colônia em placa e a presença de cabeças conidiais colunares, *i. e.* não se espalham de forma radial, e bisseriadas, *i. e.* métulas e fiáldes de tamanhos semelhantes, foram características chaves para a identificação do isolado (ELLIS et al., 2007) (Figura 14).

**Figura 14-** Isolado C (*Aspergillus terreus*): características culturais e morfológicas (a) Placas com colônias de *Aspergillus terreus* apresentando coloração marrom. (b) Cabeça conidial apontada em uma direção (colunar). (c) Fiáldes. (d) Métulas. Micrografia (à direita) com aumento de 400 vezes.



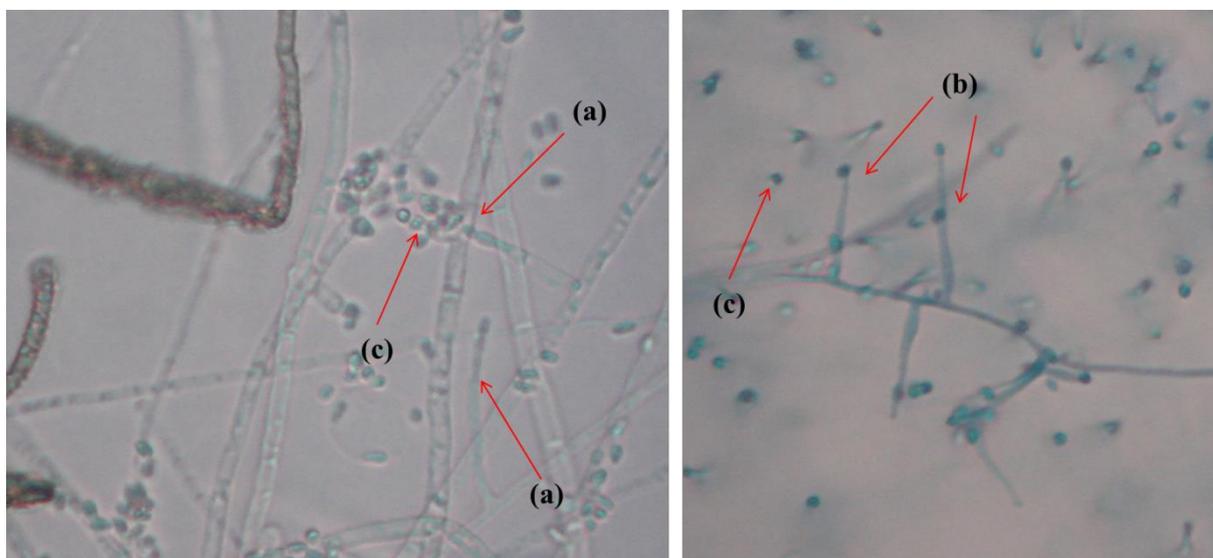
Fonte: Elaborado pelo autor.

*A. terreus* é considerado um fungo ubíquo e em conjunto com os demais fungos do gênero *Aspergillus* sp. são classificados como fungos terrestres. Entretanto, a capacidade de tolerância a altas concentrações de sal permitiu com que fungos deste gênero pudessem crescer em ambientes marinhos (PARVATKAR et al., 2009). Diversos trabalhos na literatura revelam a presença de isolados de *A. terreus* em ambientes marinhos, como sedimentos

(MOUTON et al., 2012; SRIRAM; PRIYADHARSHINI; SIVASAKTHI, 2012; WU et al., 2009), rizosferas de mangues (GAO et al., 2013), associados a esponjas marinhas (YIN et al., 2012) e até associados a peixes (WANG et al., 2013), mostrando a capacidade da espécie de se desenvolver nesse tipo de *habitat*.

Os isolados D e J foram classificados como espécimes do gênero *Acremonium*. Este gênero é constituído em sua maioria por fungos saprofíticos, isolados de material vegetal morto ou do solo. Entretanto, algumas espécies podem atuar como patógenos oportunistas de homens e animais (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980). Fungos deste gênero apresentam aspecto hialino, crescimento lento e tem como características chave para a identificação a presença de fiálides solitárias, eretas e mais afiladas na extremidade, produzindo conídios unicelulares com formato globoso ou cilíndrico que podem se agrupar no ápice de cada fiálide (ELLIS et al., 2007). Estas características podem ser observadas nas micrografias abaixo, Figura 15.

**Figura 15** - Isolados D e J (*Acremonium* spp.): características morfológicas. Fiálides solitárias, eretas e mais afiladas na extremidade com conídios unicelulares globosos: (a) Fiálides: Isolado D. (b) Fiálides: Isolado J. (c) Conídios. Aumento de 400 vezes.



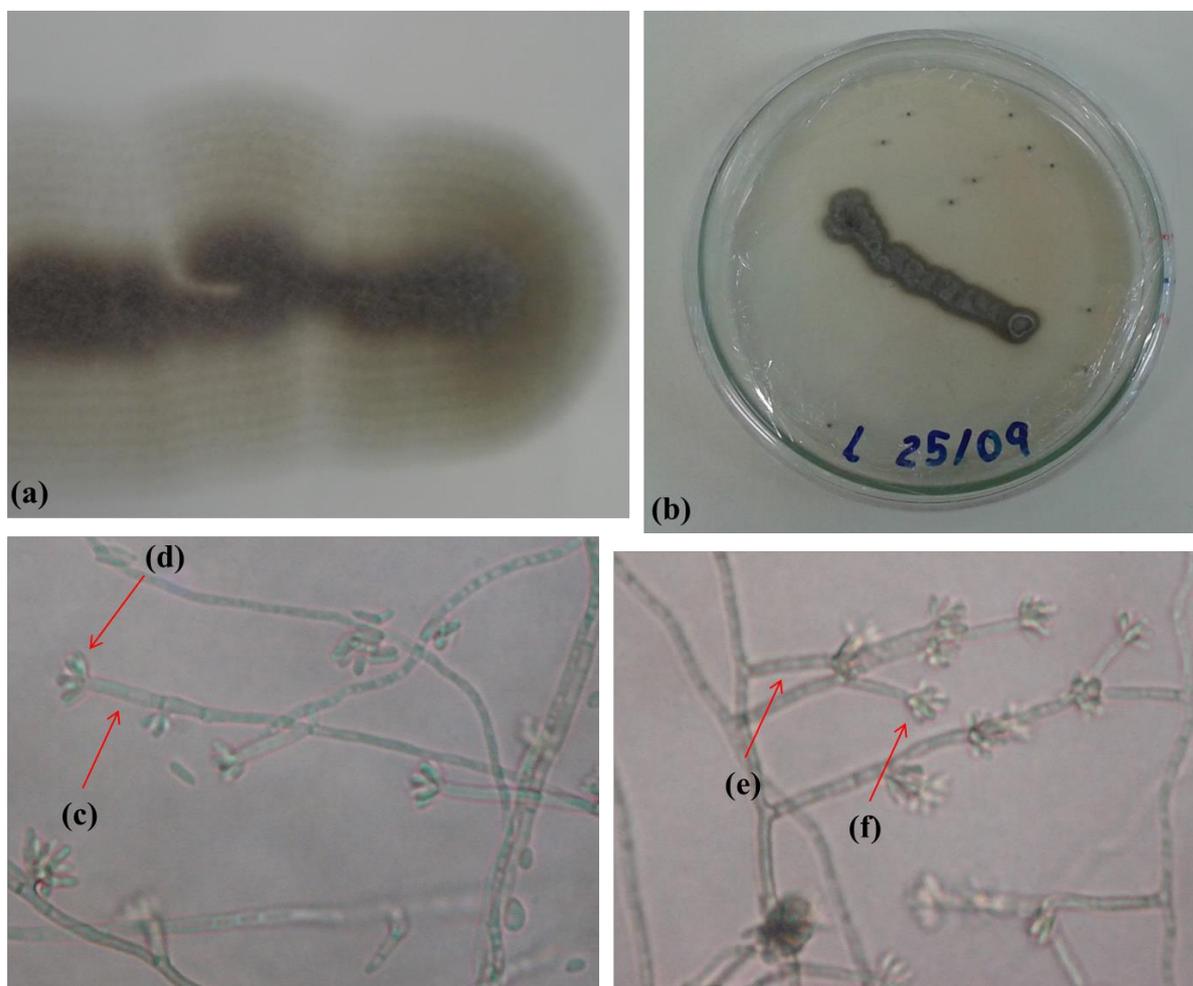
Fonte: Elaborado pelo autor.

Espécies de *Acremonium* são frequentemente encontradas em amostras de sedimento marinho, conforme discutido anteriormente, bem como incubados em madeira proveniente de ambientes marinhos. Além disso, há relatos na literatura do isolamento de espécies de

*Emericellopsis* J.F.H. Beyma, forma teleomórfica das espécies de *Acremonium*, a partir de sedimentos marinhos (JONES et al., 2009; SUMMERBELL et al., 2011).

Os isolados L e M (Figura 16) foram classificados como pertencentes ao gênero *Rhinocladiella* Nannfeldt. Este gênero apresenta distribuição cosmopolita, podendo ser encontrados em amostras de solo, substratos herbáceos e madeira em decomposição (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980). As colônias apresentam coloração marrom-olivácea, conídios unicelulares e de paredes lisas e células conidiogênicas cilíndricas.

**Figura 16** - Isolados M e L (*Rhinocladiella* spp.): características culturais e morfológicas (a) Isolado M. (b) Isolado L. Células conidiogênicas dos isolados M (c) e conidióforos de L (e). Conídios unicelulares de paredes lisas: isolado M (d) e isolado L (f). Micrografias (abaixo) com aumento de 400 vezes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Poucos trabalhos relatam o isolamento de fungos deste gênero a partir de amostras de ambientes marinhos. No estudo publicado por Bhaduty *et al.* (2011), material genético de

*Rhinochadiella* sp. foi extraído de ovos de nematoides presentes em sedimentos de mar profundo. Em outros dois estudos (DE VITA-MARQUES et al., 2008; KOSHIMURA et al., 2009), isolados de fungos deste gênero foram recuperados de algas marinhas.

### 4.3 Ensaios enzimáticos

Os IAER calculados para cada isolado nos diferentes testes encontram-se apresentados na Tabela 5. Para as análises estatísticas e desenho de gráficos, foram utilizados os softwares SPSS Statistics versão 17.0 (Chicago, Illinois, EUA) e GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, California, EUA).

**Tabela 5** – Dados do índice de atividade enzimática relativa (IAER) para todos os isolados e atividades.

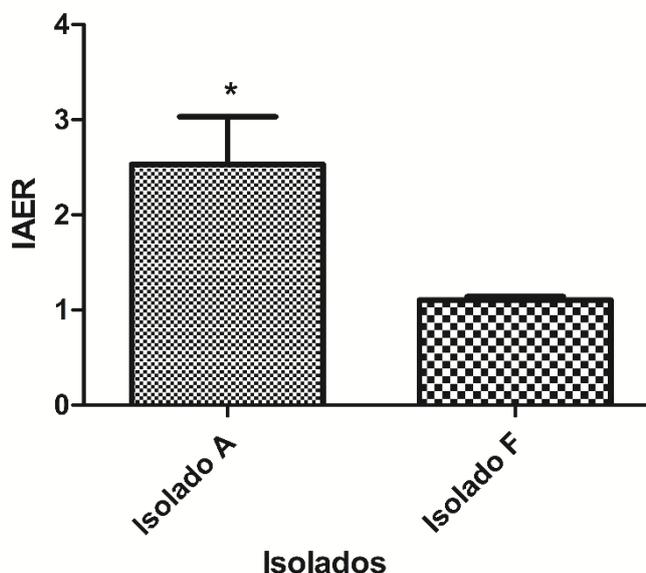
Isolado	Espécie	IAER		
		Lipolítica	Amilolítica	Celulolítica
A	<i>Cladosporium</i> sp. 1	2,53 ± 0,50	n.o.	n.o.
B	<i>Penicillium</i> sp. 1	n.o.	0,66 ± 0,03	2,04 ± 0,17
C	<i>Aspergillus terreus</i>	n.o.	1,11 ± 0,04	0,92 ± 0,12
D	<i>Acremonium</i> sp. 1	n.o.	n.o.	0,31 ± 0,05
E	<i>Penicillium</i> sp. 2	n.o.	n.o.	3,24 ± 1,04
F	<i>Cladosporium</i> sp. 2	1,11 ± 0,04	n.o.	1,00 ± 0,39
G	<i>Penicillium</i> sp. 3	n.o.	n.o.	n.o.
H	<i>Penicillium</i> sp. 4	n.o.	n.o.	2,56 ± 0,47
I	<i>Penicillium</i> sp. 5	n.o.	n.o.	n.o.
J	<i>Acremonium</i> sp. 2	n.o.	n.o.	0,28 ± 0,04
K	<i>Penicillium</i> sp. 6	n.o.	n.o.	n.o.
L	<i>Rhinochadiella</i> sp. 1	n.o.	n.o.	n.o.
M	<i>Rhinochadiella</i> sp. 2	n.o.	n.o.	n.o.

Fonte: Elaborado pelo autor; n.o. = não observado

#### 4.3.1 Ensaio para atividade lipolítica

Dentre os isolados testados, apenas os isolados A e F, ambos caracterizados como *Cladosporium* sp., apresentaram crescimento e atividade no meio testado, com maior IAER para o isolado A, diferindo estatisticamente do isolado F ( $p < 0,05$ ), Figura 17.

**Figura 17** - Atividade lipolítica dos isolados A e F.



Fonte: Elaborado pelo autor.

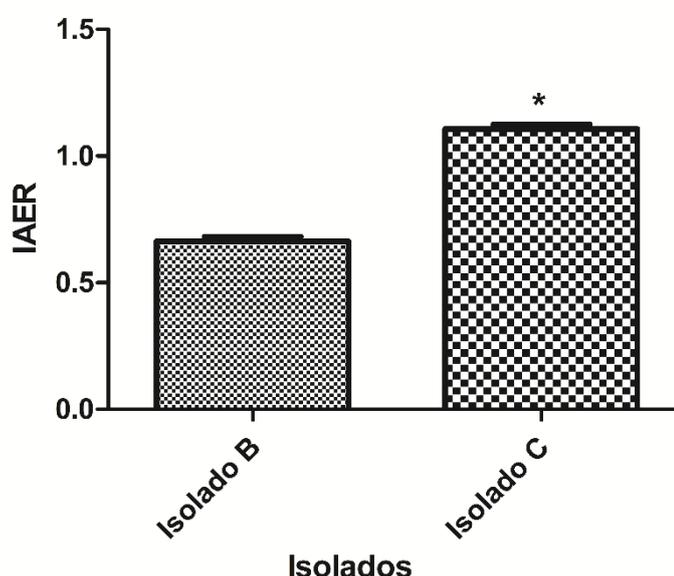
Relatos na literatura dão conta da presença de lipases em fungos deste gênero. No estudo conduzido por Jaouani *et al.* (2014), um isolado de uma salina na Tunísia, pertencente à espécie *C. sphaerospermum*, apresentou atividade quando submetida ao ensaio de lipólise em placa com Tween 20 como substrato. Outro isolado de *C. cladosporioides*, obtido de solo contaminado com petróleo, mostrou boa capacidade de hidrolisar lipídios mesmo sob presença de solventes orgânicos, indicando boa potencialidade industrial (KALYANI; SARASWATHY, 2014). A fim de destacar o viés comercial destas enzimas, pode-se citar três patentes de lipases e acetil-CoAses provenientes de cepas de *Cladosporium* sp. (CHANG *et al.*, 2013; IKUTA *et al.*, 1980; “Prodn. of optically active aromatic cyanohydrin acetate(s) - by reacting aromatic aldehyde with cyano-donating cpd. and acetyl-donating acetate cpd. in presence of lipase and organic base,” 1991).

#### **4.3.2 Ensaio para atividade amilolítica**

Apenas os isolados B, pertencente ao gênero *Penicillium*, e C, caracterizado como *Aspergillus terreus*, apresentaram crescimento e atividade no ensaio avaliado, diferindo estatisticamente a um nível de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ), Figura 18. Amilases são enzimas que podem ser encontradas em diversos microrganismos como fungos e bactérias. Segundo Saranjaj e Stella (2013), a fonte desta enzima em fungos encontra-se confinada a isolados

terrestres, nomeadamente a espécies do gênero *Aspergillus*. Apenas um relato da produção de amilases por fungos filamentosos isolados de ambientes marinhos foi encontrado na literatura, envolvendo uma espécie do gênero *Mucor* Fresen. associada a uma esponja marinha (MOHAPATRA; BANERJEE; BAPUJI, 1998). Isolados de *A. terreus* provenientes de resíduos de horticultura (REDDY; SINGH, 2002) e sementes de legumes (SALEEM; EBRAHIM, 2014) também apresentaram atividade para degradação de amido, assim como isolados de *Penicillium* sp. das mesmas sementes.

**Figura 18** - Atividade amilolítica dos isolados B e C.



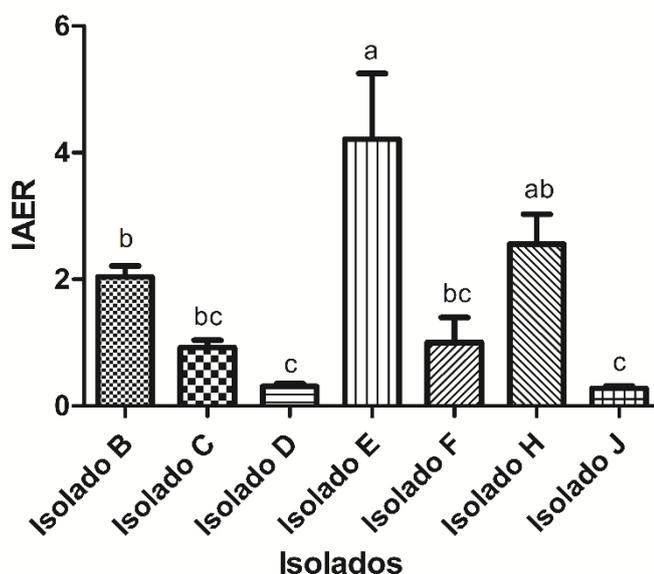
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### **4.3.3 Ensaio para atividade celulolítica**

Dentre os treze isolados analisados, sete deles apresentaram atividade no teste para degradação de CMC: isolados B, E e H, pertencentes ao gênero *Penicillium*, isolado C, *Aspergillus terreus*, e isolados D e J, pertencentes ao gênero *Acremonium*. O isolado E apresentou maior atividade celulítica dentre as cepas analisadas, apresentando diferença estatisticamente significativa a um nível de significância de 5% empregando-se o teste de Tukey (Figura 19). Apenas um trabalho encontrado relata a utilização de uma levedura marinha, isolada de sedimentos de mar profundo, como fonte de celulose (CHI et al., 2009). Narra *et al.* (2014) realizaram a produção, purificação e caracterização de uma endoglucanase, enzima pertencente ao grupo das celulases, proveniente de uma cepa de *A. terreus* isolada de

amostras de solo. Fungos dos gêneros *Penicillium* (MARJAMAA et al., 2013; SINGHANIA et al., 2014) e *Acremonium* (GOLDBECK et al., 2013) também mostraram capacidade de produção de celulases, de acordo com trabalhos na literatura.

**Figura 19** - Atividade celulolítica dos isolados B, C, D, E, F, H, J..



Fonte: Elaborado pelo autor. Barras acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5%.

A comparação dos resultados obtidos com trabalhos similares da literatura (metodologia de avaliação de atividade similar) revelou o grande potencial do isolado E na produção de celulases. No estudo de Maza *et al.* (2014), onde fungos testados foram obtidos de amostras de solo e de resíduos de cana-de-açúcar, os isolados com maiores IAER situam-se em cerca de 1,5. O isolado E apresentou IAER de 3,24, mais do que o dobro do isolado do referido estudo. Entretanto, vale salientar que o teste de atividade em placa apresenta um caráter mais qualitativo do que propriamente quantitativo, sendo necessários estudos mais detalhados para avaliação da atividade de forma mais confiável. Provavelmente, em virtude do constante influxo de material vegetal em direção à região bentônica, fungos presentes nos sedimentos acabaram por desenvolver adaptações a este ambiente, como, por exemplo, enzimas que pudessem aproveitar essa disponibilidade de nutrientes de forma mais eficaz, nomeadamente celulases. Em virtude dos resultados obtidos neste ensaio, podemos afirmar que fungos de sedimentos marinhos seriam um bom alvo na prospecção de enzimas deste gênero.

## 5 CONCLUSÃO

Com base no levantamento bibliográfico realizado, pode-se perceber que a maior parte dos isolados obtidos nos últimos cinco anos de sedimentos marinhos são espécies cosmopolitas, majoritariamente facultativas no ambiente marinho. Os estudos realizados com fungos recuperados deste ambiente têm como focos principais a obtenção de metabólitos com atividade citotóxica e com propriedades antimicrobianas.

Através da metodologia de isolamento empregada, treze isolados puderam ser obtidos de sedimentos coletados na praia do Pecém. Seis isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Penicillium* (isolados B, E, G, H, I e K), dois ao gênero *Cladosporium* (isolados A e F), dois ao gênero *Acremonium* (isolados D e J), dois ao gênero *Rhinocladiella* (isolados L e M) e um foi identificado como *Aspergillus terreus* (isolado C). Todos estes fungos apresentaram crescimento tanto em meios compostos por água do mar, quanto em meios com água destilada, podendo ser caracterizados como isolados facultativamente marinhos.

Dois dos isolados obtidos foram capazes de degradar Tween 80 (A e F), dois foram capazes de hidrolisar amido (B e C) e sete (B; C, D, E, F, H e J) mostraram capacidade de degradar CMC nos testes realizados.

## REFERÊNCIAS

- ANNAPURNA, S. A. et al. Screening , Isolation and Characterisation of protease producing modarately halophilic microorganisms. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences**, v. 14, n. 4, p. 603–612, 2012.
- ARMSTRONG, C. W.; FALK-PETERSEN, J.; KASPERSEN, I. W. 1 - Treasures in the deep sea. In: TRINCONI, A. (Ed.). . **Marine Enzymes for Biocatalysis**. Woodhead Publishing Series in Biomedicine. [s.l.] Woodhead Publishing, 2013. p. 3–16.
- BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in mycology**, v. 72, n. 1, p. 1–401, 15 jun. 2012.
- BHADURY, P. et al. Molecular diversity of fungal phylotypes co-amplified alongside nematodes from coastal and deep-sea marine environments. **PloS one**, v. 6, n. 10, jan. 2011.
- BILLS, G. F. et al. 13 - Saprobic Soil Fungi. In: FOSTER, G. M. M. F. B. S. (Ed.). . **Biodiversity of Fungi**. Burlington: Academic Press, 2004. p. 271–302.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–38, mar. 2011.
- BRADNER, J. R.; GILLINGS, M.; NEVALAINEN, K. M. H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 131–132, 1999.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata**, p. 1–6, 1963.
- CATHRINE, S. J.; RAGHUKUMAR, C. Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. **Mycological Research**, v. 113, n. Pt 1, p. 100–9, jan. 2009.
- CHANG, G. et al. **New *Cladosporium* species strain, useful for producing lipase, which is useful in animal tissue, biological diesel oil, medical industry, food industry, oil chemical industry, detergent, textile, and paper making**, 2013.
- CHEN, H.-Y. et al. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 7-8, p. 1754–69, dez. 2011.
- CHI, Z. et al. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 236–55, 2009.
- DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. Marine microbial diversity and ecology : importance and future perspectives. **Current Science**, v. 90, n. 10, 2006.

- DE VITA-MARQUES, A. M. et al. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1099–1103, 2008.
- DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41–55, jan. 2008.
- DEWAPRIYA, P.; KIM, S. Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. **Food Research International**, v. 56, p. 115–125, fev. 2014.
- DOMSCH, K. K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. [s.l.] Academic Press, 1980.
- EDGCOMB, V. P. et al. Marine subsurface eukaryotes: the fungal majority. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 172–83, jan. 2011.
- ELLIS, D. et al. **Descriptions of Medical Fungi**. 2<sup>a</sup>. ed. Adelaide, Austrália: [s.n.].
- ENCYCLOPEDIA BRITANNICA ONLINE. **Marine Sediment ( oceanography ) -- Britannica Online Encyclopedia Table of Contents**. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/365317/marine-sediment>>. Acesso em: 12 abr. 2014.
- FAN, Y. et al. Indole-diterpenoids with anti-H1N1 activity from the aciduric fungus *Penicillium camemberti* OUCMDZ-1492. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1328–36, 26 jul. 2013.
- GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. (EDS.). **CBS Course of Mycology**. 4<sup>o</sup>. ed. Baarn, Holanda: [s.n.]. p. 165
- GAO, H. et al. Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 6, p. 1776–8, 15 mar. 2013.
- GAO, S.-S. et al. Comazaphilones A-F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 2, p. 256–61, 25 fev. 2011.
- GASPAROTTO, L. et al. **Glossário de Fitopatologia**. 2. ed. Brasília, DF, Brasil: Embrapa, 2012.
- GOLDBECK, R. et al. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 797–803, jan. 2013.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975.

- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 782–98, 2009.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. Pt 5, p. 509–47, maio 2007.
- HYDE, K. D. et al. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 1161, n. 7, p. 1147–1161, 1998.
- IKUTA, S. et al. **Acyl-coenzyme=A-oxidase prodn. for enzymatic analysis - by cultivation of Macrophomina, Cladosporium, Aspergillus, Monascus, Saccharomyces or Arthrobacter microorganism**, 1980.
- JAOUANI, A. et al. Diversity and enzymatic profiling of halotolerant micromycetes from Sebkh El Melah, a Saharan salt flat in southern Tunisia. **BioMed Research International**, v. 2014, jan. 2014.
- JONES, E. B. G. et al. Classification of marine Ascomycota , anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, 2009.
- JONES, E. B. G. Are there more marine fungi to be described ? **Botanica Marina**, v. 54, p. 343–354, 2011a.
- JONES, E. B. G. Fifty years of marine mycology. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 73–112, 4 ago. 2011b.
- KALYANI, N.; SARASWATHY, N. Optimization of lipase production by a new fungal strain *Cladosporium cladosporioides* NK-LF36 isolated from oil contaminated soil. **Research Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 88–96, 2014.
- KANSOH, A. L. et al. Broad Spectrum Antimicrobial Agent from a Local Isolate of Marine Fungus Strain. v. 6, n. 6, p. 580–588, 2010.
- KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–7, nov. 2008.
- KIM, M.-Y. et al. Alternaramide, a cyclic depsipeptide from the marine-derived fungus *Alternaria* sp. SF-5016. **Journal of natural products**, v. 72, n. 11, p. 2065–8, nov. 2009.
- KOHLMEYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; NEWELL, S. Y. 24 - Marine and Estuarine Mycelial Eumycota and Oomycota. In: FOSTER, G. M. M. F. B. S. (Ed.). . **Biodiversity of Fungi**. Burlington: Academic Press, 2004. p. 533–545.
- KOSHIMURA, M. et al. Biotransformation of bromosesquiterpenes by marine fungi. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17-18, p. 2023–6, dez. 2009.
- LEE, J. M. **Biochemical Engineering**. [s.l.] Prentice-Hall Inc., 2002. v. 13

LEE, S. U. et al. Protuboxepins A and B and Protubonines A and B from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. SF-5044. **Journal of Natural Products**, p. 1284–1287, 2011.

LIU, Y. et al. Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 24 nov. 2013.

MARJAMAA, K. et al. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 6-7, p. 358–69, 10 maio 2013.

MATHAN, S. et al. Anticancer and Antimicrobial Activity of *Aspergillus protuberus* SP1 Isolated from Marine Sediments of South Indian Coast. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, n. 4, p. 286–292, 2011.

MAZA, M. et al. Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 18–25, fev. 2014.

MICHEL, G.; CZYZEK, M. **Marine Enzymes for Biocatalysis**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 429–464

MOHAPATRA, B. .; BANERJEE, U. .; BAPUJI, M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 113–117, fev. 1998.

MOUTON, M. et al. Diversity and characterization of culturable fungi from marine sediment collected from St. Helena Bay, South Africa. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 2, p. 311–9, ago. 2012.

**Mycology Online: *Penicillium* sp.** Disponível em:

<[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Penicillium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium/)>. Acesso em: 30 out. 2014.

NARRA, M. et al. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 150–161, mar. 2014.

NAZARETH, S.; GONSALVES, V.; NAYAK, S. A first record of obligate halophilic aspergilli from the dead sea. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 1, p. 22–7, mar. 2012.

OGÓREK, R. et al. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. **Mikologia Lekarska**, v. 19, n. 2, p. 80–85, 2012.

PADMAVATHI, T.; AGARWAL, P.; NANDY, V. Exploring marine fungal strains for cellulase production. **Annals of Biological Research**, v. 3, n. 7, p. 3602–3613, 2012.

PARVATKAR, R. R. et al. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 128–32, jan. 2009.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. DE. Diversity of Microbial in Tropical Soils. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. Q.; BRUSSARD, L. (Eds.). . **Soil Biodiversity In Amazonian and Others Brazilian Ecosystems**. [s.l.] CABI Publishing, 2006. p. 184–205.

PHILLIPS, N. W. Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores. **Bulletin of Marine Science**, v. 35, n. 3, p. 283–298, 1984.

PLOU, F. J. et al. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 3, p. 183–186, 1998.

**Prodn. of optically active aromatic cyanohydrin acetate(s) - by reacting aromatic aldehyde with cyano-donating cpd. and acetyl-donating acetate cpd. in presence of lipase and organic base.** , 1991.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology : an ecological perspective. **Fungal Diversity**, n. 31, p. 19–36, 2008.

RAGHUKUMAR, S. 10 . The Role of Fungi in Marine Detrital Processes. In: RAMAIAH, N. (Ed.). . **Marine Microbiology: Facets & Opportunities**. Goa, India: National Institute of Oceanography, 2004. p. 91–101.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats †. **Natural Products Reports**, v. 28, n. 2, p. 290–344, 2011.

REDDY, C. S. .; SINGH, R. . Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR10. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 1, p. 69–71, out. 2002.

RICHARDS, T. A. et al. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, n. 1, p. 495–522, 15 jan. 2012.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 2, p. 90–97, abr. 2014.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal Amylase - A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 2, p. 203–211, 2013.

SHANG, Z. et al. Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 30, n. 2, p. 305–314, 1 mar. 2012.

SHEARER, C. A.; LANGSAM, D. M.; LONGCORE, J. E. 23 - Fungi in Freshwater Habitats. In: FOSTER, G. M. M. F. B. S. (Ed.). . **Biodiversity of Fungi**. Burlington: Academic Press, 2004. p. 513–531.

- SINGHANIA, R. R. et al. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 490–5, out. 2014.
- SOHN, J.-H.; OH, H.-C. Protulactones A and B: Two New Polyketides from the Marine-derived Fungus *Aspergillus* sp. SF-5044. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 6, p. 1695–1698, 20 jun. 2010.
- SRIRAM, N.; PRIYADHARSHINI, M.; SIVASAKTHI, S. Production and Characterization of Amino Peptidase from Marine *Aspergillus flavus*. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 3, p. 221–226, 2012.
- STRAUSS, M. L. et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 1, p. 182–90, jul. 2001.
- SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9291–321, nov. 2013.
- SUMMERBELL, R. C. et al. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, v. 68, p. 139–62, jan. 2011.
- THENNARASU, V.; PANNEERSELVAM, A.; THAJUDDIN, N. An investigation of the mycoflora in marine soil from Andaman Islands. **European Journal of Experimental Biology**, v. 1, n. 3, p. 188–199, 2011.
- VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 2000, p. 343–371, jun. 2014.
- WANG, C. et al. Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1395–1401, set. 2013.
- WU, Q. et al. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 2, p. 197–203, 24 set. 2010.
- WU, Y.-R. et al. Removal of Benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 1395–1401, 29 abr. 2009.
- YIN, Y. et al. Medium optimization for the high yield production of single (+)-terrein by *Aspergillus terreus* strain PF26 derived from marine sponge *Phakellia fusca*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 887–891, maio 2012.
- ZENG, X. et al. Isolation, identification and screening of microorganisms for cytotoxic activities from deep sea sediments at different pacific stations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2141–2150, 6 abr. 2010.

ZHANG, X.-Y. et al. Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity. **Current Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 525–30, nov. 2013.

ZHANG, Y. et al. Bioreactor technology in marine microbiology: from design to future application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 312–21, 2011.

APÊNDICE A – Lista de métodos, meios de isolamento, espécies isoladas e origem de amostras de sedimentos utilizadas para o isolamento de fungos.

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Referência
			Fonte	Local de coleta	
Diluição seriada.	<p>Extrato de levedura 1% (m/v), Glicose 6% (m/v), Extrato de malte 1% (w/v), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1% (m/v), MgSO<sub>4</sub> 0,5% (m/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5% (m/v), Peptona 2% (w/v), NaCl 10% (w/v), ágar 2% (w/v) .7H<sub>2</sub>O-</p> <p>01% (w/v), MgSO<sub>4</sub> -0.5% (w/v), K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> -0.5% (w/v), Peptone-2% (w/v), NaCl-10% (w/v), Agar 2% (w/v), (Srinubabu et al., 2007)</p>	<i>Aspergillus flavus</i>	Amostras de solo	Lago Sambhar (Rajastão) e litoral de Mumbai	(ANNAPURN A et al., 2012)
1 g da suspensão sedimento foi peneirada sucessivamente através de malhas com tamanho de abertura iguais a 200 mm e 100 mm. As partículas que passaram pela malha 200 mm, mas foram retidos na malha de 100 milímetros foram espalhados em placa.	Os meios usados para o isolamento foram: ágar-extrato de malte, caldo de extrato de malte, agar-fubá de milho e Czapek Dox-ágar. Todos os meios foram utilizados em 1/5 da força. Eles foram preparados em água do mar e enriquecido com estreptomicina (0,1 g em 100 ml de meio) e penicilina (40000 unidades em 100 ml de meio), para inibir o crescimento bacteriano.	<p><i>Aspergillus sp.</i></p> <p><i>Tritirachium sp.</i></p> <p><i>Humicola sp.</i></p> <p><i>Fusarium sp.</i></p> <p><i>Traustoquitrídio</i></p> <p><i>Myceliophora sp.</i></p> <p><i>Byssoschlamys sp.</i></p> <p><i>Paecilomyces sp.</i></p> <p><i>Cleistothecial form</i></p> <p><i>Cladosporium sp.</i></p> <p>Espécies não-identificadas</p> <p><i>Aspergillus sp.</i></p> <p><i>Scolicobasidium sp.</i></p> <p><i>Tritirachium sp.</i></p> <p><i>Humicola sp.</i></p>	Sedimentos marinhos	Zona costeira anóxica de Goa, Índia	<p>14 m</p> <p>(CATHRINE; RAGHUKUMAR, 2009)</p> <p>26 m</p>

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem			Referência
			Fonte	Local de coleta	Profundidade	
		<i>Thraustochytrid</i> <i>Non-sporulating</i> <i>Trichoderma sp.</i> <i>Thraustochytrid</i> Espécies não-identificadas				
Lama marinha, grama marinha, amostras de manguezais e sedimentos foram coletadas na ilha de Nanji, costa leste da China, no Oceano Pacífico. Os fungos foram isoladas, colocando pedaços de amostras em placas com meio basal contendo solução de antibiótico para prevenir o crescimento bacteriano.	Meio basal continha 10 g /L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar.	<i>Pestalotiopsis sp.</i> J63	Lama, grama, sedimentos marinhos e amostras de mangues	Ilha de Nanji, China		(CHEN et al., 2011)
Os sedimentos (1 g) foram secos ao ar durante 24 h, e, em seguida, os sedimentos secos foram diluídos a 10-2 g/ml em água estéril, 100 µL dessa solução foi dispensada	BDA (200 g de batata, 20 g glicose, 20 g de ágar por litro de água da torneira) placa contendo cloramfenicol (100 µg/mL) como inibidor bacteriano.	<i>Penicillium camemberti</i> OUCMDZ-1492	Sedimentos de mangue próximos a raízes de <i>Rhizophora apiculata</i>	Wenchang, Província de Hainan, China		(FAN et al., 2013)

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Profundidade	Referência
			Fonte	Local de coleta		
<p>sobre uma placa de BDA (200 g de batata, 20 g glicose, 20 g de ágar por litro de água da torneira) placa contendo cloramfenicol (100 ug / mL) como inibidor de bactérias. Uma única colônia foi transferida para outra placa de BDA e identificada por biologia molecular.</p>						
<p>A amostra de sedimento foi diluída em 10, 100 e 1000 vezes utilizando água do mar esterilizada. Um mililitro de cada amostra diluída foi processado utilizando o método da espalhamento em placa em meio BDA.</p>	<p>Meio BDA (200 g de batata cortada, 20 g de dextrose, 20 g de ágar em 1 L de água marinha).</p>	<p><i>Penicillium commune</i> QSD-17</p>	<p>Sedimentos marinhos</p>	<p>Mar do Sul da China</p>	<p>210 m</p>	<p>(GAO et al., 2011)</p>
<p>Técnica de diluição, conforme Johnson et al. 1 mL da diluição inoculado em meio de cultura.</p>	<p>Czapex Dox ágar suplementado com diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15, 20, 25 e 30% (m/v)), rosa bengala (1/3000 m/v), streptomina e penicillina (5 mg/ml).</p>	<p><i>Penicillium viridicatum</i></p>	<p>Sedimentos e água marinhos</p>	<p>Mar mediterrâneo, Egito</p>	<p>1-3 m</p>	<p>(KANSOH et al., 2010)</p>

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Pro fundidade	Referência
			Fonte	Local de coleta		
A amostra foi diluída em 10 vezes com água do mar esterilizada. Um mililitro de amostra diluída foi processado utilizando o método de espalhamento em placa em meio BDA.	Meio BDA (24 g de batata-dextrose ágar, 1 L de água do mar)	<i>Alternaria sp.</i> SF-5016	Sedimentos marinhos	Baía de Masan, Coréia do Sul		(KIM et al., 2009)
A amostra foi diluída em 10 vezes com água do mar esterilizada. Uma quantidade de 1 ml da amostra diluída foi processada utilizando o método de espalhamento em placa em batata-dextrose ágar (BDA) contendo 3% de NaCl.	Batata-dextrose ágar (BDA) contendo 3% de NaCl.	<i>Aspergillus sp.</i> SF-5044	Sedimentos de entremarés	Praia de Dadaepo, Busan, Coréia do Sul		(LEE et al., 2011)
As amostras de sedimento foram suspensas em água do mar esterilizada e semeadas diretamente em placas de meio MT. O meio MV continha 0,075 g estreptomycin e 0,05 g de ampicilina para 100 ml	Meio Vishniac modificado (MV)	<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	Sedimentos marinhos	Região do Delta do Rio das Pérolas, China		(LIU et al., 2013)
As amostras coletadas	Meio Sabouraud-dextrose ágar (SDA), preparada	<i>Aspergillus protuberus</i>	Sedimentos marinhos	Cinturão costeiro	3 m	(MATHAN et al., 2011)

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem			Referência	
			Fonte	Local de coleta	Profundidade		
foram diluídas em série e as primeiras três diluições foram usadas.	usando água do mar e uma mistura de água destilada numa razão de 1:1 pela técnica de derramamento em placa.	sp 1		de Muttom, sul da Índia			
Uma série de diluições (10-1 a 10-6) foi preparado em triplicata, a filtração de uma subamostra recolhida por espátula e suspensa em 100 ml de água do mar esterilizada, por meio de um sistema de filtro estéril Sartorius, equipado com um filtro de acetato de celulose (0,2 µm; Sartorius Stedim Biotech, Alemanha); os filtros foram em seguida colocados em placas de Petri contendo MFA, MEA, e OA; 1 ml das suspensões de sedimento de todas as subamostras foi enriquecido em 100 ml de caldo de MF (MFA sem agarose) em	Meio MFA (2 % D(+)) Glucose, 1 % amido solúvel, 2 % caldo de triptona de soja, 0,3% extrato de carne em pó, 0,5 % extrato de levedura em pó, 1,5 % ágar bacteriológico, 0,2 g/l cloramfenicol e 1 l de água marinha. Extrato de Malte-ágar (MEA), Ágar-aveia (3 % de flocos de aveia fervidos (30 min) em água destilada, clarificada por filtração através de um crivo de aço inoxidável, misturada com 1,5 % ágar bacteriológico.	<i>Acromonium alternatum</i>	Sedimentos marinhos	Baía de Santa Helena, África do Sul	32 m	(MOUTON et al., 2012).	
		<i>Aspergillus</i> sp. 1 (3 isolados)			15 m		
		<i>Aspergillus</i> sp. 2 (2 isolados)					
		<i>Aspergillus</i> sp. 3 (2 isolados)					
		<i>Aspergillus</i> sp. 4					
		<i>Aspergillus</i> sp. 5					
		<i>Aspergillus</i> sp. 6					
		<i>Aspergillus</i> sp. 7					
		<i>Penicillium chrysogenum</i>					
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					
		<i>Aspergillus terreus</i> (3 isolados)					
		<i>Eurotium amstelodami</i> (2 isolados)					61 m
		<i>Penicillium canescens</i>					
<i>Penicillium</i> sp. 1 (2 isolados)							
<i>Penicillium</i> sp. 2 (2 isolados)							
<i>Penicillium</i> sp. 3							
<i>Penicillium</i> sp. 4							
<i>Penicillium</i> sp. 5 (2 isolados)							

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem			Referência
			Fonte	Local de coleta	Profundidade	
um balão de Erlenmeyer incubadas num agitador a 28 ° C durante 24 h no escuro. No isolamento dos microorganismos enriquecidos foram feitos por transferência de 100 µl de cultura líquido de cada frasco Erlenmeyer pra uma placa de cultura com uma auxílio de um pipeta (realizadas em triplicata).		<i>Aspergillus candidus</i> (2 isolados)			8 m	
		<i>Paraconiothryium cyclothyrioides</i> (2 isolados)				
		<i>Trichoderma sp.</i> (5 isolados)				
Plaqueamento de suspensão de sedimentos	Czapek-Dox ágar + 20% de sal solar e Czapek-Dox ágar + 10% de sal solar.	<i>Aspergillus penicillioideus</i> (23 cepas)	Sedimentos marinhos	Praia de Kalya, Israel	0,5 m	(NAZARETH; GONSALVES; NAYAK, 2012)
	Czapek-Dox ágar + 20% de sal solar e Czapek-Dox ágar + 10% de sal solar.	<i>Aspergillus versicolor</i> (7 cepas)				
Diluição seriada até 10 <sup>-4</sup> , seguida de plaqueamento e método modificado de placa de solo (modified soil plate method) (Johnson, L. F).	Meio BDA água marinha com supressor de crescimento bacteriano (ácido láctico).	<i>Aspergillus terreus</i>	Solo marinho	Litoral de Mangalore e Pondicherry, Índia		(PADMAVATHI; AGARWAL; NANDY, 2012)
		<i>Mucor plumbeus</i>				
Diluição seriada	Meio BDA	<i>Penicillium commune</i>	Sedimentos de mar profundo	Mar do Sul da China	118 m	(SHANG et al., 2012)

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem			Referência
			Fonte	Local de coleta	Profundidade	
Diluição (1:10) de sedimentos e espalhamento em placa.	Meio BDA acrescido de NaCl (3%).	<i>Aspergillus sp.</i> SF-5044	Sedimento intermareal	Praia de Dadaepo, Busan, Coréia do Sul		(SOHN; OH, 2010)
Diluição seriada seguida de plaqueamento e plaqueamento do sedimento diretamente no meio sólido.	Meio de isolamento não-informado	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus sparsus</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus koningii</i> <i>Aspergillus humicola</i> <i>Aspergillus niger</i>	Solo marinho	Região costeira de Atharam pattinam, Thanjavur (Dt), Índia.		(SRIRAM; PRIYADHARS HINI; SIVASAKTHI, 2012)
Diluição seriada seguida de plaqueamento	Meio BDA	<i>Absidia glauca</i> Hagen <i>Circinella sp.</i> <i>Thamnidium sp.</i> <i>Chaetomium sp.</i> <i>Acremonium sp.</i> <i>Acrocyndrium oryzae</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>Aspergillus awamori</i> Kawachi <i>Aspergillus chevalieri</i> Thom e Church <i>Aspergillus flavipes</i> Bainier e Thom <i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Aspergillus granulosis</i> Raper e	Solo marinho	Ilhas Andamã		(THENNARAS U; PANNEERSELVAM; THAJUDDIN, 2011)

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Referência
			Fonte	Local de coleta	
		Thom			
		<i>Aspergillus koeningii</i> Oudemans			
		<i>Aspergillus luchensis</i> Lnui			
		<i>Aspergillus nidulans</i> Winter			
		<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem			
		<i>Aspergillus ochraceous</i> Wilhelm			
		<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburgin Korschelt ) Cohn			
		<i>Aspergillus quercinus</i>			
		<i>Aspergillus ruber</i> Thom e Raper			
		<i>Aspergillus terreus</i> Thom			
		<i>Aspergillus terricola</i> Marchal			
		<i>Aspergillus ustus</i> Thom e Church			
		<i>Aspergillus versicolor</i> Thom e Raper			
		<i>Botrytis cinerea</i> Persoon			
		<i>Cephalosporium sp.</i>			
		<i>Cladosporium herbarum</i> (Person) Link			
		<i>Cladosporium lignicolum</i> Corda			

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Referência
			Fonte	Local de coleta	
		<i>Curvularia lunata</i> (Walker) Boedijn			
		<i>Fusarium lactis</i> Pirotta e Riboni			
		<i>Fusarium moniliforme</i> Shrdon var. minus Wollenweber			
		<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl			
		<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenweber			
		<i>Fusarium semitectum</i> Berkeley e Ravenel			
		<i>Geotrichum candidum</i> Link			
		<i>Geotrichum sp.</i>			
		<i>Helminthosporium oryzae</i> Breda de Haan			
		<i>Masoniella grisea</i> (Smith) Smith			
		<i>Oospore lupuli</i> (Matthews and Lott) Lindau			
		<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom			
		<i>Penicillium citrinum</i> Thom			
		<i>Penicillium expansum</i>			

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem			Referência
			Fonte	Local de coleta	Profundidade	
		(Link) Thom <i>Penicillium granulatum</i> Biourge <i>Penicillium janthinellum</i> Biourge <i>Penicillium luteum</i> Zukal <i>Penicillium sp.</i> <i>Scopulariopsis sp.</i> <i>Spicaria elegans</i> (Corda) <i>Sporotrichum sp.</i> <i>Torula sp.</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Tubercularia sp.</i> <i>Verticillium terrestre</i> (Link) )Lindau <i>Verticillium sp.</i>				
Filtragem do sedimentos e diluição seriada do filtrado seguido por spread plate	Meio extrato de levedura-peptona-dextrose suplementado com antibióticos.	<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	Areia	Mar Báltico, Alemanha		(WU et al., 2010)
Suspensão e diluição dos sedimentos, seguida de filtragem <i>in situ</i> e plaqueamento	Meio BDA.	<i>Phialocephala malorum</i>	Sedimentos de mar profundo	Leste do Pacífico (W154°8 04'57', N88°30' 20'')	505 9 m	(ZENG et al., 2010)
Peneiragem do sedimento em peneiras de 200 e 100 µm de abertura de malha e	Ágar-extrato de malte, Czapek Dox ágar, Glucose-peptona-amido ágar e BDA. Inibidor de crescimento bacteriano foi adicionado aos meios.	<i>Arthrinium phaeospermum</i> <i>Aspergillus restrictus</i> (3 isolados) <i>Aspergillus</i>	Sedimentos de mar profundo	Mar do Sul da China	232 6 m	(ZHANG et al., 2013)

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Referência	
			Fonte	Local de coleta		
espalhamento do retido na última peneiragem em placa.		<i>versicolor</i> (3 isolados)				
		<i>Catenulostroma protearum</i>				
		<i>Penicillium biourgeianum</i> (3 isolados)				
		<i>Penicillium verruculosum</i>				
		<i>Aspergillus sydowii</i>				
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (2 isolados)				243 9 m
		<i>Engyodontium album</i> (3 isolados)				
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (2 isolados)				
		<i>Cladosporium uredinicola</i>				356 3 m
		<i>Penicillium brevicompactum</i> (2 isolados)				
		<i>Phaeosphaeria iopsis musae</i> (3 isolados)				
		<i>Alternaria tenuissima</i>				
		<i>Aspergillus penicillioideus</i> (2 isolados)				
		<i>Aspergillus vitricola</i> (3 isolados)				240 3 m
		<i>Aureobasidium pullulans</i> (2 isolados)				
<i>Cladosporium colombiae</i> (2 isolados)						

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Referência
			Fonte	Local de coleta	
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (2 isolados)			
		<i>Aspergillus unguis</i> (2 isolados)			
		<i>Aspergillus versicolor</i>			
		<i>Cladosporium cladosporioides</i> (2 isolados)			373 9 m
		<i>Engyodontium album</i> (3 isolados)			
		<i>Penicillium commune</i>			
		<i>Aspergillus vitricola</i>			
		<i>Penicillium brevicompactum</i>			
		<i>Penicillium chrysogenum</i>			392 8 m
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2 isolados)			
		<i>Acremonium implicatum</i> (2 isolados)			
		<i>Aspergillus westerdijkiae</i>			291 8 m
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (2 isolados)			
		<i>Aspergillus sydowii</i>			
		<i>Aspergillus tubingensis</i> (2 isolados)			341 5 m
		<i>Cladosporium uredinicola</i>			
		<i>Cladosporium</i>			353

Método de isolamento	Meio de isolamento	Espécies isoladas	Origem		Profundidade	Referência
			Fonte	Local de coleta		
		<i>m oxysporum</i> (3 isolados)			6 m	
		<i>Geomyces vinaceus</i> (2 isolados)				