MICHEL RODRIGO ZAMBRANO PASSARINI

**Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por
fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Lara
Durães Sette.

São Paulo
2008

RESUMO

PASSARINI, M. R. Z. **Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos**, 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os fungos filamentosos derivados de ambientes marinhos têm sido focos de estudos na área biotecnológica devido à produção de enzimas e metabólitos secundários com estruturas diferenciadas. Neste contexto, cerca de 150 fungos filamentosos foram isolados de diferentes espécies de cnidários marinhos (corais e zoantídeos) coletados em São Sebastião e Ilha Bela (litoral norte do Estado de São Paulo) visando avaliação da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de compostos com atividade antimicrobiana. Setenta e três fungos filamentosos representantes de grupos taxonômicos distintos foram submetidos aos experimentos de descoloração do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) em meio líquido e sólido e ao teste de MIC (Concentração Mínima Inibitória) contra as bactérias: *Vibrio parahaemolyticus* CBMAI 716, *Escherichia coli* ETEC 5041-1, *E. coli* EPEC 0031-2, *E. coli* EIEC 240-1, *E. coli* STEC 0157, *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 489, *Salmonella choleraesuis* CBMAI 484 e *Staphylococcus aureus* CBMAI 485. Treze isolados foram selecionados no experimento de descoloração do RBBR e foram submetidos ao teste de degradação de pireno e benzo[a]pireno por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM). Sete fungos apresentaram resultados satisfatórios de degradação destes HPAs, entretanto, o fungo *Aspergillus sulphureus* (8.2A) derivado do zoantídeo *Palythoa variabilis* apresentou os melhores resultados de degradação de pireno (99,7% após 8 dias de incubação) e benzo[a]pireno (73,6% após 16 dias de incubação). Com relação ao teste de MIC, 21 isolados foram capazes de inibir o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* EPEC e *Vibrio parahaemolyticus*. *Penicillium* sp. (12.12) foi o isolado que apresentou o melhor resultado de inibição do crescimento microbiano (MIC = 0,0078 mg/mL) contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os 23 isolados que apresentaram potencial de degradação de HPAs e/ou atividade antimicrobiana foram caracterizados taxonomicamente através de análises de seqüências de DNA do *operon* ribossomal. Os resultados derivados do presente trabalho sugerem que fungos filamentosos associados a cnidários marinhos possuem potencial para aplicação biotecnológica, em particular para biorremediação de ambientes marinhos contaminados com HPAs, visto que, esses isolados já estão adaptados às condições de salinidade destes ambientes.

Palavras-chave: Biorremediação; Benzo[a]pireno; Fungos filamentosos; Invertebrados marinhos; Metabólitos secundários; Ppireno.

ABSTRACT

PASSARINI, M. R. Z. **Study of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation and antimicrobial production by marine invertebrate derived fungi.** 2008. 107 f. Dissertation (Masters) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Filamentous fungi derived from marine ecosystems have been target of studies in biotechnology area due to their production of enzymes and secondary metabolites with differentiated structures. In this context, about 150 filamentous fungi were isolated from different species of marine cnidarians (coral and zoanthids) collected from São Sebastião and Ilha Bela (north coast of São Paulo State) aiming the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation and production of compounds with antimicrobial activity. Seventy three filamentous fungi representatives of distinct taxonomic groups were submitted to Remazol Brilliant Blue R (RBBR) decolorization experiments in liquid and solid media and to Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests against the bacteria: *Vibrio parahaemolyticus* CBMAI 716, *Escherichia coli* ETEC 5041-1, *E. coli* EPEC 0031-2, *E. coli* EIEC 240-1, *E. coli* STEC 0157, *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 489, *Salmonella choleraesuis* CBMAI 484 and *Staphylococcus aureus* CBMAI 485. Thirteen fungal isolates were selected from the RBBR dye decolorization experiments and were submitted to pyrene and benzo[a]pyrene degradation assays and analyzed by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS). Seven fungi showed satisfactory PAH degradation results. Among them *Aspergillus sulphureus* (8.2A) derived from the zoanthid *Palythoa variabilis* presented the best results degrading pyrene (99.7% after 8 days of incubation) and benzo[a]pyrene (73.6% after 16 days of incubation). Regarding the MIC experiments, 21 isolates were able to inhibit the growth of *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* EPEC and *V. parahaemolyticus*. *Penicillium* sp. (12.12) presented the best minimum inhibitory concentration results (MIC = 0,0078 mg/mL against the bacterium *S. aureus*). The 23 isolates that showed potential for PAH degrading and/or antimicrobial activity were taxonomically characterized through rDNA sequences analyses. Results derived from the present work suggest that cnidarians-derived filamentous fungi have a great potential for biotechnological application, in particular on bioremediation of marine environments contaminated by PAHs, since these fungi are already adapted to the salinity condition of these environments.

Key words: Benzo[a]pyrene; Bioremediation; Filamentous fungi; Marine invertebrate; Pyrene; Secondary metabolites.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos, de maneira geral, são capazes de produzir metabólitos secundários bioativos que são amplamente utilizados em importantes atividades exercidas nos dias atuais, como por exemplo: a produção de alimentos, vitaminas, ácidos orgânicos; produção de fármacos com propriedades antibióticas e antitumorais; utilização em controle biológico de pragas e vetores; bem como a produção de enzimas com aplicação na degradação de compostos poluentes ambientais, um processo conhecido como biorremediação.

Os microrganismos derivados de ambientes marinhos transformaram-se em uma importante fonte de recursos genéticos para aplicação biotecnológica, pois por pertencerem a ambientes ainda pouco explorados, podem representar a descoberta de novas drogas ou novos compostos bioativos. Devido ao fato de a micologia marinha ser uma ciência relativamente recente e de pouco se conhecer sobre a natureza biológica dos fungos marinhos, este grupo de organismo tem sido foco de estudos de biodiversidade e bioprospecção de compostos de interesse industrial.

Neste contexto, o presente projeto teve como objetivos o isolamento de fungos filamentosos associados a invertebrados marinhos e a avaliação da capacidade dos isolados selecionados da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de compostos antimicrobianos.

Cabe ressaltar que o isolamento e seleção de microrganismos de ambientes marinhos, visando sua aplicação em processos de degradação de hidrocarbonetos resultantes de derramamento acidental de petróleo nos oceanos, é estrategicamente interessante, uma vez que estes organismos já estão adaptados às condições de salinidade destes ambientes.

7 CONCLUSÕES

A metodologia utilizada no presente estudo, para o isolamento e cultivo de fungos filamentosos associados a invertebrados marinhos (cnidários) foi aplicada com sucesso, visto que foram obtidos cerca de 150 fungos filamentosos a partir de 30 amostras de cnidários marinhos, dos quais 73 foram selecionados como representantes de grupos taxonômicos distintos e submetidos aos experimentos de avaliação da degradação de HPAs e atividade antimicrobiana.

Cerca de 40% dos isolados representantes de grupos taxonômicos distintos apresentaram resultados satisfatórios, com potencial aplicação nas áreas ambiental e farmacológica. Neste contexto, a importância da identificação e preservação adequada desses isolados se torna evidente, para que os mesmos possam ser utilizados em estudos futuros de biorremediação, produção de compostos antimicrobianos, entre outras aplicações biotecnológicas.

A caracterização taxonômica permitiu a identificação ao menos em nível de gênero para 28 dos 29 fungos analisados. Em adição, a análise combinada dos resultados de caracterização convencional e molecular permitiu a inferência da diversidade destes microrganismos nas diferentes espécies de invertebrados marinhos, evidenciando que os quatros cnidários estudados (*Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus solanderi* e *Mussismilia hispida*) representam uma fonte potencial de microrganismos biotecnologicamente interessantes.

Os resultados obtidos no presente estudo, estimulam a realização de estudos adicionais visando à avaliação do metabolismo dos isolados com capacidade de degradação de pireno e benzo[a]pireno, bem como o isolamento e identificação dos princípios ativos responsáveis pelas atividades antimicrobianas. Em adição, o depósito destes isolados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, permitirá que estudos envolvendo outras aplicações biotecnológicas possam ser realizados.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F.J. Taxonomy and significance of black aspergilla. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.

ABEL, A.; ODA, Y.; ASANO, K.; SONE, T. The molecular phylogeny of the genus *rhizopus* based on rDNA sequences. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 2387-2393, 2006.

ABBONDANZI, F.; CAMPISI, T.; FOCANTI, M.; GUERRA, R.; IACONDINI, A. Assessing degradation capability of aerobic indigenous microflora in PAH-contaminated brackish sediments. **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 419-434, 2005.

AMAGATA, T.; MORINATA, B. I.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F. A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; CREWS, P. A Chemical Study of Cyclic Depsipeptides Produced by a Sponge-Derived Fungus. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1560-1565, 2006.

ANANDA, K.; SRIDHAR, K.R. Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India. **Current Science**, v. 87, p. 1431-1437, 2004.

ANEEL 2002. Agência Nacional de Energia Elétrica. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/>>. Acesso em: 15 nov. 2006.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, p. 215-242, 2006.

BABOROVÁ, P.; MÖDER, M.; BALDRIAN, P.; CAJTHAMLOVÁ, K.; CAJTHAML, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 248-253, 2006.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

BASTOS, V. D. Inovação Farmacêutica: Padrão Setorial e Perspectivas para o caso brasileiro. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 22, 2005.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.1007-1019, 2000.

BOOT, C. M.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F. A.; CREWS, P. Highly *N*-Methylated Linear Peptides Produced by an Atypical Sponge-Derived *Acremonium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 83-92, 2006.

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

BURTON, R.S.; NETZ, E. C.; FLOWERS, J. M.; WILLETT, C. S. Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod *Trigriopus californicus*: intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. **Gene**, v. 344, p. 105-113, 2005.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, v. 232, p. 147–154, 2001.

CAMARERO, S.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A.T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1775–1784, 2005.

CANET, R.; BIRNSTINGL, J.G.; MALCOLM, D.G.; LOPEZ-REAL, J.M.; BECK, A.J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native micro-ora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 113-117, 2001.

CAPOTORTI, G.; DIGIANVINCENZO, P.; CESTI, P.; BERNARDI, A.; GUGLIELMETTI, G. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus*

terreus strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. **Biodegradation**, v.15, p. 79–85, 2004.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, p. 351-368, 1992.

CHULALAKSANANUKUL, S.; GADD, G. M.; SANGVANICH, P.; SIHANONTH, P.; PIAPUKIEW, J.; VANGNAI, A. S. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 262, p.1-99, 2006.

CHRISTOPHERSEN, C.; CRESCENTE, O.; FRISVAD, J. C.; GRAM, L.; NIELSEN, J.; NIELSEN, P. H.; RAHBAEK, L. Antibacterial activity of marine-derived fungi. **Mycopathologia**, v. 143, p. 135-138, 1999.

CLEMENTE, I.; AGUIAR, M. A corrida do óleo. **Época**, Rio de Janeiro, v. 336, out 2004.

D'ANNIBALE, A.; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 28–36, 2006.

CLINICAL AND LABORATORIAL STANDARDS INSTITUTE. **CLSI norma M7-A6**. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6ª Edição. Pennsylvania, USA: CLSI, 2003. v. 23, n. 2.

DEBELLIS, T.; WIDDE, P. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 58, p. 225-235, 2006.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T-H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1998. p. 859.

EDRADA, R. A.; HEUBES, M.; BRAUERS, G.; WRAY, V.; BERG, A.; GRÄFE, U.; WOHLFARTH, M.; MÜHLBACHER, J.; SCHAUMANN, K.; SUDARSONO, S.; BRINGMANN, G.; PROKSCH, P. Online Analysis of Xestodecalactones A-C, Novel Bioactive Metabolites from the Fungus *Penicillium cf. montanense* and Their Subsequent Isolation from the Sponge *Xestospongia exigua*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1598-1604, 2002.

FERRÃO, C. M. **Derramamentos de óleo no mar por navios petroleiros.** Trabalho de conclusão de curso (Especialização em MBE – Pós Graduação em Executiva do Meio Ambiente) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação, Rio de Janeiro, 2005.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. haemophilus* *B. haemophilus*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226-236, 1928.

GARO, E.; STARKS, C. M.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Trichodermamides A and B, Cytotoxic Modified Dipeptides from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma virens*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 423-426, 2003.

GLENN, J. K; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 45, p. 1741-1747, 1983.

GRISHKAN, I.; NEVO, E.; WASSER, S.P. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. **Mycological Progress**, v. 2, p. 19-28, 2003.

HADERLAIN, A.; LEGROS, R.; RAMSAY, B. Pyrene mineralization capacity increases with compost maturity. **Biodegradation**, v. 17, p. 293-302, 2006.

HAMMAN, S. Bioremediation capabilities of white rot fungi. **Article Spring**, p. 12, 2004. Review.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi. **Phytopathology**, v. 87, p. 888-891, 1997.

HÖLLER, U.; KÖNING, G.M.; WRIGHT, A.D. Three New Metabolites from Marine-Derives Fungi of the Genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 14-118, 1999.

JAMES, T. Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C. L.; MATHENY, P. B.; HOFSTETTER, V.; COX, C. J.; CELIO, G.; GUEIDAN, C.; FRAKER, E.; MIADLIKOWSKA, J.; LUMBSCH, H. T.; RAUHUT, R.; REEB, V.; ARNOLD, A. E.; AMTOFT, A.; STAJICH, J. E.; HOSAKA, K.; SUNG, G.; JOHNSON, D.; O'ROURKE, B.; CROCKET, M.; BINDER, M.; CURTIS, J. M.; SLOT, J. C.; WANG, Z.; WILSON,

A. W.; SCHUBLER, A.; LONGCORE, J. E.; O'DONNELL, K.; STANDRIDGE, S. M.; PORTER, D.; LETCHER, P. M.; POWELL, M. J.; TAYLOR, J. W.; WHITE, M. M.; GRIFFITH, G. W.; DAVIES, D. R.; HUMBER, R. A.; MORTON, J. B.; SUGIYAMA, J.; ROSSMAN, A. Y.; ROGERS, J. D.; PFISTER, D. H.; HENSEN, K.; HAMBLENTON, S.; SHOEMAKER, R. A.; KOHLMAYER, J.; KOHLMAYER, V. B.; SPOTTS, R. A.; SERDANI, M.; CROUS, P. W.; HUGHES, K. W.; MATSUURA, K.; LANGER, E.; LANGER, G.; UNTEREINER, W. A.; LÜCHINGS, R. BÜDEL, B.; GEISER, D. M.; APTROOT, A.; DIEDERICH, P.; SCHMITT, I.; SCHULTZ, I.; YAHR, R.; HIBBETTS, D. S.; LUTZONI, F.; MCLAUGHLIN, D. J.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, p. 818-822, 2006.

JANNUZZI, G. D. M. **Estado da arte e tendências da tecnologia para a energia**. CTEnerg- Secretaria Técnica do Fundo Setorial de Energia-Centro de gestão e estudos estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. 2. ed. Brasília: 2003. 76 p. (Relatório).

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 45, p. 57-88, 2000.

KATE, K.T.; LAIRD, S.A. Biodiversity and business: coming to terms with the "grand bargain". **International Affairs**, v. 76, p. 241-264, 2000.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KOBAYASHI, H.; NAMIKOSHI, M.; YOSHIMOTO, T.; YOKOCHI, T. A screening method for antimutagenic and antifungal substances using conidia of *Pyriculariaoryzae*, modification and application to tropical marine fungi. **Journal of Antibiotics**, v. 49, p. 873-879, 1996.

KOHLMEYER, J. V. On the definition and taxonomy of higher marine fungi. **Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl.**, v.5, p.263-286, 1974.

KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 677-686, 1997.

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

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1216–1223, 1997.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331–371, 1998.

LARSSON, K. H. Molecular phylogeny of Hyphoderma and the reinstatement of Peniophorella. **Mycological Research**, v. 111, p. 186-195, 2007.

LI, Y.; LI, X.; KIM, S. K.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; RHO, J. R.; SON, B. W. Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 375-376, 2004.

LI, X.; LI, P.; LIN, X.; ZHANG, C.; LI, Q.; GONG, Z. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. **Journal Hazard Mater**, 2007.

LIU, G. Y.; CHEN, S. R.; WEI, Y. H.; LEE, F. L.; FU, H. M.; YUAN, G. F.; STALPERS, J. A. Polyphasic approach to the taxonomy of the Rhizopus stolonifer group. **Mycological Research**, v. 111, p. 196-203, 2007.

LIU, R.; Gu, Q.; Zhu, W.; Cui, C.; Fan, G.; Fang, Y.; Zhu, T.; Liu, H. 10-Phenyl-[12]-cytochalasins Z₇, Z₈, and Z₉ from the Marine-Derived Fungus *Spicaria elegans*. **Journal of Natural Products**, p. 69, p. 871-875, 2006.

LOTFABAD, S.K.; GRAY, M.R. Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 361–365, 2002.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical

brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

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

MCDONALD, L. A.; ABBANAT, D. R.; BARBIERI, L. R.; BERNAN, V. S., DISCAFANI, C. N.; GREENSTEIN, M.; JANOTA, K.; KORSHALLA, J. D.; LASSOTA, P.; TISCHLER, M.; CARTER, G. T. Spiroxins, DNA Cleaving Antitumor Antibiotics from a Marine-Derived Fungus. **Tetrahedron Letter**, v.40, p. 2489-2492, 1999.

MENDES, A.S. **Otimização, isolamento, identificação e atividade antiproliferativa da violaceína obtida por processo fermentativo**. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.

MORRISON-GARDINER, S.; Dominant fungi from Australian coral reefs. **Fungal Diversity**, v. 9, p. 105-121, 2002.

MUMMEY, D. L.; RILLIG, M. C. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 200–204, 2007.

NAMIKOSHI, M.; AKANO, K.; MEGURO, S.; KASUGA, I.; MINE, Y.; TAKAHASHI, T.; KOBAYASHI, H. A new macrocyclic trichothecene, 12,13-deoxyroridin E, produced by the marine-derived fungus *Myrothecium roridum* collected in Palau. **Journal of Natural Products**, v.64, p. 396-398, 2001.

NOGUEIRA, J .M. M. Fauna Living in Colonies of *Mussismilia hispida* (Verrill) (Cnidaria: Scleractinia) in four South-eastern Brazil islands. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 421-432, 2003.

O'BRIEN, H. E.; PARENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5544–5550, 2005.

OLIVEIRA, D. Petrobrás pode ser multada em R\$ 100 milhões. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 18 jan. 2000.

OSTERHEGE, C. **Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi**. Tese (Doutorado) - Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha, 2001.

OSTERHEGE, C.; KÖNIG, G. M.; HÖLLER, U.; WRIGHT, A. D. Rare Sesquiterpenes from the Algicolous Fungus *Drechslera dematioidea*. **Journal of Natural Products**, v.65, p. 306-313, 2002.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p. 17–24, 2005.

PEI-CHIH, W.; HUEY-JEN, S.; CHIA-YIN, L. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. **Science of the Total Environment**, v. 253, p. 111-118, 2000.

PETROBRAS, 2004. Disponível em: <<http://www2.petrobras.com.br>>. Acesso em: 26 out. 2006.

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

POTIN, O.; VEIGNIE, E.; RAFIN, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. **Microbiology Ecology**, v. 51, p. 71–78, 2004b.

RAEDER, J.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17-20, 1985.

RAVELET, C.; KRIVOBOK, S.; SAGE, L.; STEIMAN, R. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. **Chemosphere**, v. 40, p. 557-63, 2000.

ROTHERMICH, M. M.; HAYES, L.A.; LOVLEY, D.R. Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-

contaminated harbor sediment. **Environment Science Technologi**, v. 36, p. 4811-4817, 2002.

SALLENAVE-NAMONT, C.; POUCHUS, Y.F.; DU PONT, R.T.; LASSUS, P.; VERBIST, J.F. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. **Mycopathologia**, v. 149, p. 21-25, 2000.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. 6. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. p. 389.

SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 81-89, 2005.

SETTE L.D.; PASSARINI, M.R.Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 1185–1195, 2006.

SHIGEMORI, H.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; TSUDA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Sporiolides A and B, new cytotoxic twelve-membered macrolides from a marine-derived fungus *Cladosporium* species. **Marine Drugs**, v. 2, p. 164-169, 2004.

DA SILVA, M.; CERNIGLIA, C.E.; POTHULURI, J.V.; CANHOS, V.P. Screening filamentous funfi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 399-405, 2003.

DA SILVA, M.; ESPÓITO, E.; MOODY, J. D.; CANHOS, V. P.; CERNIGLIA, C. E. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the fialmentous fungus *Cylothyrrium* sp. **Chemosphere**, v. 57, p. 943-952, 2004.

SOARES, C. L. S.; PÉREZ, C. D.; MAIA, B. S.; SILVA, R. S.; MELO, L. F. Avaliação da atividade antiinfl amatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeoru* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 463-468, 2006.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. Nucleic acids and classification. In: GOODFELLOW, M.; O'DONELL, A. **Modern Approaches in Bacterial Systematics** (Ed.). London: Academic Press, 1993. p. 151-194.

STEFFEN, K. T.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 212–217, 2002.

STEFFEN, K. T.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Degradation of benzo[α]pyrene by the litterdecomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3957–3964, 2003.

STEFFEN, K. T.; SCHUBERT, S.; TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. **Biodegradation**, v. 18, p. 359-369, 2007.

SU, D.; LI, P.J.; FRANK, S.; XIONG, X.Z. Biodegradation of benzo[α]pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. **Jornal of Environmental Science and Health**, China, v. 18, p. 1204-9, 2006.

SUTAR, R.; DAVID, J.K.; GHOSH, A.K.; SINGHI, S.; CHAKRABARTI, A.; BACHHAWAT, A.K. Comparasion of ITS and IGS regions for strain typing of clinical and non-clinical isolates of *Pichia anomala*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1-5, 2004.

SUTHERLAND, J. B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 53-62, 1992.

TAKAMATSU, S.; MATSUDA, S.; NIINOMI, S.; HAVRYLENKO, M. Molecular phylogeny supports a Northern Hemisphere origin of *Golovinomyces* (Ascomycota: Erysiphales). **Mycological Research**, v. 110, p. 1093-1101, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAN, L.T.; CHENG, X.C.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Scytalidamides A and B, new cytotoxic cyclic heptapeptides from a marine fungus of the genus *Scytalidium*. **Journal of Organic Chemistry**, v.68, p. 8767-8773, 2003.

TANG, A. M. C.; JAEWON, R.; HYDE, K. D. Phylogenetic utility of protein (RBP2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of sordariomycetes (ascomycota, fungi). **Antonie van leeuwenhoek**, v. 91, p. 327-349, 2007.

TEKERE, M.; READ, J.S.; MATTIASSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by a subtropical white rot fungus in packed bed and suspended carrier bioreactor systems. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p.683-91, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 827.

VALENTÍN, L.; FEIJOOA, G.; MOREIRAB, M.T.; LEMA, J.M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. **Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58, p.15–21, 2006.

VERDIN, A.; SAHRAOUI, A. L.; LARUELLE, F.; GRANDMOUGIN-FERJANI, A.; DURAND, R. Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. **Mycological Research**, v. 110, p. 479-484, 2006.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRI, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VITALI, V. M. V. **Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.

VITALI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; ANDRÉA, M. M.; BONONI, V. L. R. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 256-261, 2006.

VOIGT, K.; CIGELNIK, E.; O'DONNELL, K. Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3957–3964, 1999.

WANG, G.; LI, Q.; ZHU, P. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, p. 163-174, 2008.

WU, Y.; LUO, Y.; ZOU, D.; NI, J.; LIU, W.; TENG, Y.; LI, Z. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. **Biodegradation**, 2007.

YAMAGUCHI, Y.; MASUMA, R.; UCHIDA, R.; ARAI, M.; TOMODA, H.; ÖMURA, S. *Phoma* sp. FOM-8108, a producer of gentisylquinones, isolated from sea sand. **Mycoscience**, v. 43, p. 127-133, 2002.

YLI-MATILLA, T.; MACH, R. L.; ALEKHINA, I. A.; BULAT, S. A.; KOSKINEN, S.; KULLNING-GRADINGER, C. M.; KUBICEK, C. P.; KLEMSDAL, S. S. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, α -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 267– 285, 2004.

ZANG, S.; LI, P.; LI, W.; ZHANG, D.; HAMILTON, A. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. **Chemosphere**, v. 67, p. 1368-74, 2007a.

ZANG, S.Y.; LI, P.J.; YU, X.C.; SHI, K.; ZHANG, H.; CHEN, J. Degradation of metabolites of benzo[a]pyrene by coupling *Penicillium chrysogenum* with KMnO_4 . **Jornal of Environmental Science and Health, China**, v. 19, p. 238-43, 2007b.